

**Université de Montréal**

**Évaluation de l'angiogenèse thérapeutique par vecteurs  
plasmidiques dans un modèle murin d'ischémie  
périphérique chronique**

**par**

**Marianne Coutu**

**Programme de Sciences biomédicales**

**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**

**Mars, 2002**

**© Marianne Coutu, 2002**



W  
4  
U58  
2002  
V.100

**Université de Montréal  
Faculté des études supérieures**

**Ce mémoire intitulé :**

**Évaluation de l'angiogenèse thérapeutique par vecteurs  
plasmidiques dans un modèle murin d'ischémie  
périphérique chronique**

**présenté par :**

**Marianne Coutu**

**a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :**

**Alain Rivard  
président-rapporteur**

**Guy Leclerc  
directeur de recherche**

**Normand Poirier  
Codirecteur**

**membre du jury  
Jean-François Tanguay**

**Mémoire accepté le : .....**

## RÉSUMÉ

La thérapie génique est une nouvelle modalité thérapeutique dans le traitement de la maladie coronarienne athérosclérotique. La plupart des modèles animaux utilisés pour l'étudier demandent temps, argent et infrastructures. L'objectif de ce travail était de déterminer si un modèle murin d'ischémie périphérique à l'aide du *Laser Doppler Imager* (LDI) s'avérerait un outil simple, rapide et peu coûteux dans l'évaluation de substances angiogéniques par vecteurs plasmidiques.

Ce travail fut divisé en six expériences. Des souris, soit C57BL/6, diabétiques et hypercholestérolémiques, étaient soumises à une ischémie aiguë de la patte arrière par ligature de l'artère fémorale. Une injection de solution pré-déterminée, soit les plasmides vide, VEGF, HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$ , l'adéno-VEGF ou le normal salin, était réalisée dans le quadriceps de l'animal. Ensuite, les animaux étaient soumis à une étude doppler déterminant un ratio de perfusion de la patte ischémique traitée sur la patte normale. À l'aide de lectures sériées, il s'agissait de déterminer la ou lesquelles des substances étaient angiogéniques et de les comparer entre elles.

Les résultats de cette étude n'ont pas pu mettre en évidence une supériorité angiogénique d'une substance par rapport à une autre et ce, après avoir modifier plusieurs conditions expérimentales. Après les injections, il semblait se produire simultanément un processus d'angiogenèse et d'inflammation que le LDI n'arrive pas à discerner.

Ainsi, le modèle animal utilisé se voulait simple, rapide et peu coûteux mais le LDI ne semble pas suffisamment sensible et spécifique pour évaluer le potentiel angiogénique des plasmides VEGF, HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  et de l'adéno-VEGF.

## MOTS-CLÉS

Modèle animal - thérapie génique - maladie cardiaque athérosclérotique - maladie vasculaire périphérique.

## SUMMARY

Gene therapy is a new therapeutic option in the treatment of coronary artery disease. Animal models used to study therapeutic angiogenesis are usually time-consuming and expensive. The principal objective of this work was to determine if a murine model of peripheral ischemia using a *Laser Doppler Imager* (LDI) could be a rapid, inexpensive and simple tool in the evaluation of angiogenic substances mediated by plasmidic vectors.

This work was divided in six experiences. Mices, C57BL/6, diabetic and hypercholesterolemic, were submitted to acute hindlimb ischemia realized by femoral artery ligation. A pre-determined solution, either naked, VEGF, HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  plasmids, adeno-VEGF or saline was injected in the quadriceps muscle of the animal. Doppler studies were then taken to calculate a perfusion ratio between the normal and the treated limb. Weekly studies were compared in each group to determine which substances were angiogenic and which one was superior compared to others.

Results of this study did not reveal an angiogenic superiority of one substance even after modifications of environmental conditions. Simultaneous processes of angiogenesis and inflammation induced by the injection of the substances were not distinguished by the LDI.

This animal model was rapid, inexpensive and simple but the LDI seems to be insufficiently sensitive and specific in the evaluation of VEGF, HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  plasmids and adeno-VEGF as angiogenic substances.

## **KEY WORDS**

Animal model – gene therapy – coronary artery disease- peripheral vascular disease.

### **Sommaire :**

L'athérosclérose est un processus pathologique touchant les artères de calibre moyen causant ainsi un rétrécissement graduel de leur lumière. La forme coronarienne se manifeste par de l'angine, un infarctus, des arythmies ventriculaires et auriculaires, de la défaillance cardiaque et même la mort. Malheureusement, les modalités thérapeutiques actuelles ne font que contrôler les symptômes et retarder la progression de la maladie. Certains patients présenteront toujours des symptômes malgré un traitement médical optimal et des procédures de revascularisation. D'autres ne pourront bénéficier d'un traitement de revascularisation en raison de leur anatomie coronarienne.

Une nouvelle avenue de recherche qui pourrait venir en aide à ces patients est l'angiogenèse thérapeutique. Elle est présentement à l'étude dans les maladies athérosclérotiques coronariennes et vasculaires périphériques. Elle consiste en une injection, locale ou systémique, de substances ayant pour objectif de stimuler la production de nouveaux vaisseaux au niveau de zones ischémiques. Ces substances angiogéniques sont utilisées soit sous forme de protéine recombinante ou de gène incorporé dans un vecteur choisi. Pour déterminer la sécurité et l'efficacité thérapeutique de ces substances, des études pré-cliniques sont actuellement en cours et utilisent l'angiographie, les microsphères et les mesures de pression locale. Or, ces méthodes sont invasives, coûteuses et longues à effectuer.

L'objectif de ce travail consistait à évaluer l'efficacité thérapeutique de substances angiogéniques par vecteurs plasmidiques dans un modèle murin d'ischémie périphérique à l'aide du *Laser Doppler Imager*. Malgré son utilisation limitée chez les petits animaux et sa grande sensibilité aux mouvements et à aux conditions environnementales, cet

appareil semblait être l'outil recherché pour développer un modèle simple, rapide et précis chez le petit animal qui permettrait de tester plusieurs molécules seules ou en combinaison avant de les évaluer chez les grands animaux.

Ce travail fut divisé en six expériences basées sur le même modèle. Des souris étaient soumises à une ischémie aiguë de la patte de derrière par ligature de l'artère fémorale. Ensuite, une injection de solution pré-déterminée était réalisée dans le quadriceps de l'animal. Les substances angiogéniques utilisées au cours de ce travail furent les plasmides VEGF, HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  et l'adéno-VEGF et les produits contrôles furent le plasmide vide et le normal salin.

Trois souches murines furent utilisées: C57BL/6, diabétiques (NOD) et hypercholestérolémiques (ApoE). Par la suite, les animaux étaient soumis à une étude doppler afin de calculer le ratio de perfusion de la patte ischémique traitée sur la patte normale. À l'aide de lectures sériées, il s'agissait de déterminer la ou lesquelles des substances étaient angiogéniques et de les comparer entre elles.

Les résultats de cette étude n'ont pas pu mettre en évidence une supériorité angiogénique d'une substance par rapport à une autre et ce, après avoir modifier plusieurs conditions expérimentales. Après les injections, il semblait se produire simultanément un processus d'angiogenèse et d'inflammation que le LDI n'arrive pas à discerner.

Ainsi, le modèle animal utilisé se voulait simple, rapide et peu coûteux mais le LDI ne semble pas suffisamment sensible et spécifique pour évaluer le potentiel angiogénique des plasmides VEGF, HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  et de l'adéno-VEGF. Néanmoins, nous étudions un autre instrument plus précis, la tomographie émettrice de positrons ("*PET-Scan*"), dans l'évaluation de l'angiogenèse chez les petits animaux.

## Table des matières

Identification du jury	2
Sommaire	3
Table des matières	5
Liste des tableaux	10
Liste des graphiques et figures	11
Liste des photos	12
Liste des sigles et abréviations	13
Dédicace	15
Remerciements	16
Avant-propos	17
<b>1. INTRODUCTION</b>	
<b>1.1 Angiogenèse et artériogenèse</b>	18
1.1.1 Terminologie	18
1.1.2 Mécanismes	18
1.1.3 Facteurs stimulateurs de l'angiogenèse	21
<b>1.2 Facteurs de croissance</b>	22
1.2.1 <i>Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)</i>	22
a) Gène et structure	22
b) Récepteur	23
c) Fonctions	23
d) Bio-activité	24

## Table des matières

<b>1.2 Facteurs de croissance (suite)</b>	
1.2.2 Basic <i>Fibroblast Growth Factor</i> (b-FGF)	24
a) Structure, gène et récepteurs	
b) Distribution et actions biologiques	
1.2.3 <i>Hypoxic-Inductible Factor 1 et 2</i> (HIF-1 et HIF-2)	25
a) Structure	
b) Expression, fonctions et gènes cibles	
<b>1.3 Régulation du gène de VEGF</b>	26
1.3.1 Portée scientifique	27
<b>1.4 Angiogenèse thérapeutique</b>	28
1.4.1 Contexte actuel	28
1.4.2. Nouvelles stratégies de revascularisation	29
1.4.3 Thérapie angiogénique ou artériogénique	30
1 4.4 Méthodes de livraison	30
1.4.5 Voies d'administration	32
1.4.6 Profil d'effets secondaires	33
1.4.7 Modèles animaux	35
<b>1.5 Études sur l'angiogenèse thérapeutique</b>	37
1.5.1 Études pré-cliniques et VEGF	37
1.5.2 Études cliniques	38
a) Études de phase I	38
b) Études de phase II	40

## Table des matières

<b>1.6 Limites de l'angiogenèse thérapeutique</b>	42
<b>1.7 Mesure de l'angiogenèse thérapeutique</b>	42
1.7.1 Laser Doppler Imager	42
a) Principes	43
b) Unités de mesure	44
c) Limites :	44
1- Pénétration limitée dans les tissus	44
2- Sensibilité aux variations de température	45
3- Haute variabilité	45
4- Changements dus à l'irritation du tissu étudié	45
<b>1.8 Description du projet</b>	45
1.8.1 Objectifs	45
1.8.2 Problématique	46
<b>2. MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	
<b>2.1 Modèle murin d'ischémie de la patte arrière</b>	47
2.1.1 Souches animales	47
2.1.2 Procédure chirurgicale	47
<b>2.2 Laser Doppler Imager</b>	49
2.2.1 Principes d'imagerie	49
2.2.2 Prise d'images	50
2.2.3 Analyse d'images et calcul de ratios de perfusion	50

## Table des matières

<b>2.3 Préparations des vecteurs plasmidiques et viraux</b>	51
<b>2.4 Densité vasculaire</b>	53
2.4.1 Préparation des lames histologiques	53
2.4.2 Calculs	53
<b>2.5 Statistiques</b>	54
<b>3. RÉSULTATS</b>	
<b>3.1 Expérience 1</b>	55
3.1.1 Complications	55
3.1.2 Résultats de l'analyse des images obtenues par LDI	56
<b>3.2 Expérience 2</b>	59
3.2.1 Complications	59
3.2.2 Résultats de l'analyse des images obtenues par LDI	59
<b>3.3 Expérience 3</b>	62
3.3.1 Première hypothèse: Solution plasmidique inflammatoire ?	62
3.3.2 Résultats de l'analyse des images obtenues par LDI	62
<b>3.4 Expérience 4</b>	64
3.4.1 Deuxième hypothèse: récupération endogène rapide de la souche C57BL/6 ?	64
3.4.2 Complications	64
3.4.3 Résultats de l'analyse des images obtenues par LDI	65
<b>3.5 Expérience 5</b>	66
3.5.1 Complications	67
3.5.2 Résultats de l'analyse des images obtenues par LDI	67

**Table des matières**

<b>3.6 Expérience 6</b>	68
3.6.1 Troisième hypothèse: dose insuffisante de gènes ?	68
3.6.2 Complications	68
3.6.3 Résultats de l'analyse des images obtenues par LDI	68
<b>3.7 Densité vasculaire</b>	69
<b>4. DISCUSSION</b>	71
<b>SOURCES DOCUMENTAIRES</b>	80
<b>ANNEXES</b>	98

**Liste des tableaux**

<b><u>TABLEAUX :</u></b>	<b>Page</b>
<b>Tableau 1.1</b> Modèles d'angiogenèse thérapeutique chez les petits animaux	35
<b>Tableau 3.1</b> Ratios de perfusion en fonction de l'agent anesthésique utilisé (Expérience 1).	58
<b>Tableau 3.2</b> Ratios moyens des quatre groupes à l'étude (expérience 2): a) valeurs brutes; b) valeurs inflammatoires ou aberrantes exclues.	61
<b>Tableau 3.3</b> Densité vasculaire du quadriceps gauche de souris de l'expérience 6 au jour 45.	69

## Liste des figures et graphiques

<b><u>FIGURES :</u></b>	<b>Page</b>
1.1 Schéma de fonctionnement du Laser Doppler Imager.	43
2.1 Image FLUX de la perfusion des pattes de derrière de souris obtenue par LDI.	49
2.2 Image FLUX initiale (a); image "traitée" (b); région d'intérêts choisie.	51
3.1 Code d'identification des rongeurs.	55
3.2 Image FLUX d'un déficit de perfusion (patte gauche).	57
3.3 Image FLUX au jour 7 de la patte opérée: a) ischémique b et c) avec signes inflammatoires.	59
3.4 Image FLUX au jour 14 de la patte opérée: a) sans signe inflammatoire b) avec signes inflammatoires	61
3.5 Ratios moyens de perfusion en fonction du temps (expérience 4).	65
3.6 Ratios moyens de perfusion en fonction du temps (expérience 5).	67
3.7 Ratios moyens de perfusion en fonction du temps (expérience 6).	69
<b><u>GRAPHIQUES :</u></b>	
3.1 Ratios moyens de perfusion en fonction du temps (expérience 1).	57
3.2 Ratios moyens de perfusion en fonction du temps (expérience 2).	60
3.3 Ratios moyens de perfusion selon le vecteur étudié (expérience 3).	63

**Liste des photos**

<b><u>PHOTO :</u></b>	<b>Page</b>
<b>2.1</b> Artère fémorale superficielle de souris.	48
<b>2.2</b> Ligature et résection de l'artère fémorale superficielle.	48
<b>2.3</b> Injection intramusculaire de solution plasmidique ou virale.	48
<b>2.4</b> <i>Laser Doppler Imager</i> .	49
<b>2.5</b> Prise d'images au <i>Laser Doppler Imager</i> .	50
<b>3.1</b> Ischémie aiguë sévère.	56
<b>3.2</b> Ischémie chronique sévère:	56
a) avec gangrène sèche;	
b) amputation digitale.	

### Liste des sigles et abréviations

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	Acide désoxyribonucléique complémentaire
<b><i>Ang-1</i></b>	Angiopoïétine 1
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>ARNT</b>	<i>Arylhydrocarbon nuclear translocator</i>
<b><i>b-FGF</i></b>	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
<b><i>bHLH</i></b>	<i>Basic Helix-Loop-Helix</i>
<b>FC</b>	Facteur de croissance
<b>FDA</b>	<i>Federal and Drug Administration</i>
<b><i>FGF-2</i></b>	<i>Fibroblast Growth Factor 2</i>
<b>Flk = KDR</b>	Récepteur 2 de VEGF
<b>Flt-1 et 4</b>	Récepteurs 1 et 3 de VEGF
<b><i>GM-CSF</i></b>	<i>Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor</i>
<b><i>h-HGF</i></b>	<i>Human Hepatocyte Growth Factor</i>
<b><i>HIF-1 et 2</i></b>	<i>Hypoxic -Inductible Factor 1 et 2</i>
<b>HRE</b>	<i>Hypoxia Response Element</i>
<b><i>IL-6</i></b>	Interleukine 6
<b>Két.-midaz.</b>	Kétamine-midazolam
<b>kD</b>	KiloDalton
<b>kb</b>	Kilobase
<b>MW</b>	MégaWatt

**Liste des sigles et abréviations**

<b>µg</b>	Microgramme
<b>µL</b>	Microlitre
<b>mg/kg</b>	Milligramme par kilogramme
<b>mL</b>	Millilitre
<b><i>MCP-1</i></b>	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
<b>ng</b>	Nanogramme
<b><i>NO</i></b>	Oxyde nitrique
<b><i>NOS-2</i></b>	<i>Nitric Oxide Synthase 2</i>
<b>ng/kg/min</b>	Nanogramme par kilogramme par minute
<b><i>PAF</i></b>	<i>Platelet-Activating Factor</i>
<b><i>PAI-1</i></b>	<i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i>
<b><i>PAS</i></b>	PER-ARNT-SIM
<b><i>PDGF</i></b>	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
<b><i>Tie-2</i></b>	Récepteur de l'angiopoïétine 1
<b><i>TNFα</i></b>	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
<b><i>VEGF</i></b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

**Dédicace**

*En souvenir du des Docteurs Michel Martin et Jeffrey Isner, deux médecins ayant consacré leur temps à la cause de la maladie coronarienne et à la recherche sur l'angiogénèse qui nous ont laissé précocement en 2001.*

## Remerciements

*Je tiens à remercier l'aide, le support et la patience de mon directeur, D<sup>R</sup> Guy Leclerc, de son chargé de projet, D<sup>R</sup> Louis-Georges Guy, et de mon co-directeur de recherche, D<sup>R</sup> Normand Poirier, qui m'ont dirigée tout au long de mon année de recherche.*

## Avant-propos

*Ce mémoire de maîtrise est le résultat d'une année de recherche fondamentale dans le cadre de ma formation d'études spécialisées en chirurgie cardiaque. La revascularisation coronarienne est un traitement ayant déjà fait ses preuves dans la maladie coronarienne athérosclérotique; toutefois, elle possède également ses limites. Avec le vieillissement de la population, la cohorte de patients change, c'est-à-dire qu'ils se présentent avec une maladie plus diffuse. Parfois, la chirurgie n'est pas ou plus envisageable. Ainsi, j'ai choisi l'angiogénèse thérapeutique comme sujet de recherche puisque je crois qu'elle deviendra sous peu une alternative ou un complément au traitement actuel et j'espère pouvoir l'utiliser pour traiter mes patients dans quelques années.*

# 1. INTRODUCTION

## 1.1 Angiogenèse et artériogenèse

### 1.1.1 Terminologie

Tout être vivant est constitué d'organes dont le fonctionnement est possible grâce au système de conduits qui leur amènent les nutriments et l'oxygène nécessaires à la survie et qui leur permet de se débarrasser des déchets résultant de leur travail. Ce réseau de conduits ou système vasculaire est constitué d'artères, de veines et de capillaires. La croissance de ces vaisseaux est un phénomène complexe qui se produit à la fois durant le développement embryonnaire et au cours de la vie adulte<sup>1</sup>. Par *vasculogenèse* on entend le développement *in situ* de structures vasculaires par des cellules "précurseurs" nommées *angioblastes*. Les termes *artériogenèse* et *angiogenèse* sont utilisés pour décrire toute croissance vasculaire en réponse à des stimuli physiologiques et à des mécanismes adaptatifs en situation pathologique. Spécifiquement, l'*artériogenèse* se définit par la formation de vaisseaux collatéraux à partir d'artérioles inter-connectantes pré-existantes alors que l'*angiogenèse* est le développement d'un réseau de capillaires à partir de veinules et de capillaires pré-existants.<sup>2</sup> Les mécanismes sous-jacents à ces deux processus ont été largement étudiés. En les examinant de près, on constate que l'artériogenèse et l'angiogenèse diffèrent à plusieurs niveaux.

### 1.1.2 Mécanismes

Les mécanismes respectifs de l'angiogenèse et de l'artériogenèse se distinguent par le type de cellules impliquées. L'*angiogenèse* résulte de l'activation, de la migration et de la prolifération de cellules endothéliales alors que l'*artériogenèse* nécessite en plus la présence de cellules musculaires lisses, de monocytes et de fibroblastes. Aussi,

l'*angiogenèse* peut se produire tant en situations physiologiques (guérison des plaies, embryogenèse) qu'en conditions pathologiques (tumorigenèse, rétinopathie diabétique).<sup>2,3</sup>

Examinons-les plus en détails.

L'*angiogenèse*<sup>2,4,5,6</sup> débute par l'activation des cellules endothéliales par un stimulus précis, le plus connu étant l'hypoxie. Cette activation entraîne la relâche d'enzymes protéolytiques et de divers facteurs de croissance (FC). Les protéases sécrétées causent la dégradation de la matrice extracellulaire. Un FC important dans les étapes de l'angiogenèse est le "*Vascular Endothelial Growth Factor*" (VEGF). Il induit d'abord une vasodilatation artérielle et une augmentation de la perméabilité vasculaire qui, associées à la dégradation de la matrice, amènent un relâchement du support péri-endothélial et une extravasation de protéines plasmatiques. Celles-ci serviront d'échafaudage à la migration des cellules endothéliales. À l'aide d'autres FC, le VEGF stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales qui formeront de nouvelles structures tubulaires.<sup>4</sup> Finalement, ces réseaux de capillaires seront stabilisés par d'autres molécules angiogéniques dont l'*angiopoïétine 1* (Ang-1).<sup>7,8,9,10,11</sup>

Les mécanismes de l'*artériogenèse*<sup>2,5,6,8</sup> ont été étudiés dans deux modèles animaux, celui de la sténose coronarienne progressive chez le chien et celui de l'occlusion de l'artère fémorale chez le rat. Quatre grandes phases ont été identifiées.

La *phase initiale* se produit quelques minutes après une occlusion artérielle. Le gradient de pression occasionné par l'occlusion crée une force de cisaillement ("*shear stress*") qui active les cellules endothéliales. Ceci se traduit par une sécrétion accrue de plusieurs cytokines (*Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1), *Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor* (GM-CSF), *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF- $\alpha$ ) et l'oxyde

nitrique (NO)) et par une surexpression de molécules d'adhésion de manière à attirer les monocytes circulants le long du gradient chimiotactique vers l'endothélium activé. S'en suivent l'adhésion et l'invasion de la paroi artérielle par les monocytes qui se transformeront en macrophages. Ceux-ci produiront une multitude de cytokines, dont le *fibroblast growth factor 2* (FGF-2), nécessaires aux étapes subséquentes de l'artériogénèse.

Cette invasion de la paroi artérielle par les monocytes est suivie par la *phase proliférative* entre le premier et le troisième jour d'occlusion. Il se produit une prolifération de cellules endothéliales, de cellules musculaires lisses et de fibroblastes.

Entre le troisième et le quatorzième jour après l'occlusion a lieu la *phase de synthèse*. On peut observer la digestion et la dégradation de la limitante élastique interne par les enzymes relâchées principalement par les macrophages. De cette façon, les cellules musculaires lisses croissent et migrent le long des vaisseaux pré-existants pour former des collatérales.

Le processus d'*artériogénèse* se termine par la *phase de maturation* entre le quatorzième et le vingt-et-unième jour post-occlusion. Elle se caractérise par une baisse de l'activité proliférative, migratoire et protéolytique. Les cellules musculaires lisses reprennent leur phénotype initial (contractile). Finalement, il y a reconstruction de la limitante élastique interne.

Au cours des *phases de synthèse et de maturation*, il se produit un remodelage continu des vaisseaux en croissance. À l'histologie, on peut observer à la fois des figures de mort cellulaire et de mitose à l'intérieur de l'ancienne média. Le phénomène de prolifération est essentiel à la croissance du nombre de cellules vasculaires nécessaire à l'augmentation

de la taille du vaisseau alors que la mort cellulaire sert à éliminer les cellules musculaires lisses superflues, prévenant ainsi une augmentation trop importante de la grandeur du vaisseau.

Dans la suite de ce texte, le terme *angiogenèse* sera utilisé pour parler d'angiogenèse et d'artériogenèse.

### 1.1.3 Facteurs stimulateurs de l'angiogenèse

Comme nous l'avons vu précédemment, le processus de néovascularisation se produit dans des conditions autant physiologiques que pathologiques et requiert la participation de plusieurs types de cellules qui coordonnent leurs activités par l'intermédiaire de molécules appelées cytokines. Plusieurs de ces protéines telles FGF-2, VEGF, *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), angiopoïétines, interleukine 6 (IL-6), NO, *Platelet-Activating Factor* (PAF), etc. stimulent le processus d'angiogenèse<sup>12</sup>. De même, deux molécules dont les résultats ont été récemment publiés, le *human Hepatocyte Growth Factor* (h-HGF)<sup>13-5</sup> et la kallikréine<sup>16</sup>, auraient également des propriétés angiogéniques. Certains de ces facteurs agissent sur les cellules musculaires lisses, d'autres sur les cellules endothéliales ou les monocytes, mais aucun n'est aussi spécifique que le VEGF. Cette spécificité mitogénique du VEGF envers les cellules endothéliales s'explique par la présence presque exclusive de ses récepteurs à leur surface.<sup>17</sup> Ce dernier facteur fut largement étudié et est actuellement utilisé en thérapie angiogénique humaine.<sup>18-32</sup> L'injection de sa protéine ou de son gène directement ou par voie intravasculaire stimule la production de nouveaux vaisseaux dans les tissus concernés. Ce phénomène est amplifié en conditions hypoxiques.

En plus de l'administration de FC sous forme de gène ou de protéine, il existe un autre

moyen d'augmenter la production de facteurs angiogéniques. Il s'agit de protéines appelées facteurs de transcription. En se fixant dans la région du promoteur de gènes spécifiques, ces molécules peuvent mener à la synthèse et à la relâche d'une variété de facteurs angiogéniques. C'est le cas pour les facteurs "*Hypoxia-inductible factors alpha 1* et 2" (HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$ )<sup>33</sup> qui activent la transcription de plusieurs gènes régulés par l'hypoxie dont celui de VEGF.

## **1.2 Facteurs de croissance**

### **1.2.1 *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)***

Un des plus importants FC et de survie de l'endothélium vasculaire est le VEGF.<sup>34</sup> Il induit l'angiogenèse et la prolifération de cellules endothéliales en plus de jouer un rôle primordial dans la vasculogenèse. En ce sens, de récentes études ont démontré que des mutations hétérozygotes inactivant le gène du VEGF chez l'embryon de souris entraînaient des failles dans la vasculogenèse et dans la formation d'îlots sanguins menant à la mort intra-utérine.<sup>35,36</sup>

#### **a) Gène et structure**

Le gène du VEGF humain est situé sur le chromosome 6.<sup>37,38</sup> Il est organisé en huit exons séparés par sept introns et sa région codante totalise environ 14 kb. Suite à l'épissage de certains exons, quatre isoformes différentes sont produites. Elles contiennent respectivement 121, 165, 189 et 206 acides aminés suite au clivage de la séquence de signalisation et se nomment VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> et VEGF<sub>206</sub>. Le VEGF<sub>165</sub> est l'espèce moléculaire prédominante. VEGF<sub>206</sub> est rarement exprimé et se retrouve dans les cellules hépatiques fœtales. Les isoformes contenant 165, 189 et 206 acides aminés possèdent des domaines pouvant lier l'héparine leur permettant de s'ancrer à la matrice

extracellulaire et à des domaines participant à la liaison aux "heparan sulfates" et aux récepteurs du VEGF.

### **b) Récepteurs**

À la surface des cellules endothéliales, on peut retrouver trois récepteurs de la famille des récepteurs de VEGF: VEGF R1 (Flt-1), VEGF R2 (KDR ou Flk-1) et VEGF R3 (flt-4).<sup>37-</sup>

<sup>9</sup> Ils possèdent tous une activité tyrosine kinase. Les cellules endothéliales expriment également d'autres récepteurs de VEGF: neuropiline-1 et neuropiline-2<sup>40,41</sup>. Il existe également des récepteurs de VEGF à la surface de cellules appartenant à la lignée monocytes-macrophages.<sup>42</sup>

### **c) Fonctions**

Le VEGF possèdent plusieurs activités biologiques. Ses propriétés angiogéniques résultent de sa capacité à stimuler la prolifération de cellules endothéliales, à favoriser la chimiotaxie des cellules endothéliales et des monocytes et à promouvoir l'expression de molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1) à la surface des cellules impliquées dans le processus d'angiogenèse.<sup>37,38</sup> Dans les modèles *in vitro* tridimensionnels, il induit les cellules endothéliales microvasculaires confluentes à envahir des gels de collagène et à former des structures ressemblant à des capillaires.<sup>43</sup> Le VEGF peut également stimuler la croissance de vaisseaux dans les modèles expérimentaux incluant la membrane allantoïque de poule, la cornée de lapin, la patte de lapin ischémique et le myocarde ischémique de porc.<sup>44</sup> En plus de ses propriétés angiogéniques, lorsqu'infusé dans l'espace intravasculaire en grande quantité ou directement dans les artères coronaires, le VEGF peut engendrer une hypotension, une tachycardie et une chute du débit cardiaque transitoires en raison de ses propriétés vasodilatatrices en partie engendrées par le NO.<sup>45</sup>

De la même façon, par sa capacité d'augmenter la perméabilité vasculaire médiée par le PAF et la prostacycline, le VEGF peut causer un oedème des tissus dans lesquels il a été administré.<sup>46</sup>

#### **d) Bio-activité**

Le VEGF est détecté dans le sang et le plasma des patients.<sup>47</sup> Les plaquettes sécrètent du VEGF lors de leur agrégation et seraient le moyen de livraison du VEGF aux tumeurs.<sup>48</sup>

En ce sens, des études ont démontré que l'association de taux élevés de VEGF et un mauvais pronostic chez certains patients cancéreux pouvait corrélérer avec un décompte plaquettaire élevé. Le VEGF est associé à d'autres conditions pathologiques où l'angiogenèse est amplifiée telles que le psoriasis, la tumorigenèse, l'arthrite rhumatoïde et la rétinopathie diabétique.<sup>49</sup>

### **1.2.2 Basic Fibroblast Growth Factor (b-FGF)**

#### **a) Structure, gène et récepteurs**

Le b-FGF fut le deuxième membre de la famille des FGF qui comprend maintenant 22 facteurs.<sup>50</sup> Cette protéine de 16,5 kD dont le gène se situe sur le chromosome 4 possède des domaines de liaison pouvant lier l'héparine et les "*heparan sulfates*". L'interaction avec son récepteur tyrosine kinase à haute affinité engendre la transduction d'un signal et l'expression d'une multitude de gènes.

#### **b) Distribution et actions biologiques**

Le b-FGF est produit et excrété par plusieurs types de cellules tels les macrophages et les cellules endothéliales. Ses actions biologiques sont nombreuses. Il est un des facteurs angiogéniques les plus puissants en raison de ses effets prolifératifs, mitogéniques et chimiotactiques sur les cellules endothéliales. *In vitro*, selon les conditions d'étude et par

son effet anti-apoptotique, il peut retarder le vieillissement. *In vivo*, il participe à l'angiogenèse, à la régénération des neurones et à la guérison des plaies.<sup>51</sup>

### 1.2.3 Hypoxia - Inducible Factor 1 et 2 (HIF-1 et HIF-2)

#### a) Structure

HIF-1 est un complexe protéique hétérodimère composé des sous-unités HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$  (aussi connu sous le nom de "*arylhydrocarbon nuclear translocator*" (ARNT)). Chaque sous-unité possède un domaine "*basic Helix-Loop-Helix*" (bHLH) et un domaine d'homologie PER-ARNT-SIM (PAS). Les domaines HLH et PAS servent à leur dimérisation alors que le domaine basique entre en contact avec l'ADN. Le domaine PAS permettrait aussi la liaison de co-activateurs de la transcription.<sup>52-55</sup>

HIF-2 fait également partie de la famille des protéines bHLH-PAS.<sup>56, 57</sup> HIF-2 $\alpha$  partage 48 % d'homologie avec HIF-1 $\alpha$  et s'hétérodimérise également avec ARNT dans le noyau.<sup>58</sup>

HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  sont dégradés par des protéases en normoxie et stabilisés en hypoxie.<sup>52</sup>

Leur dimérisation à leur sous-unité  $\beta$  permet une association stable dans le compartiment nucléaire et une reconnaissance de séquences précises de l'ADN pour activer la transcription de plusieurs gènes induits par l'hypoxie dont le VEGF.<sup>54</sup>

#### b) Expression, fonctions et gènes cibles

HIF-2 est exprimé principalement dans les tissus humains hautement vascularisés et spécifiquement par les cellules endothéliales alors que HIF-1 se retrouve dans la plupart des tissus extravasculaires.<sup>59</sup>

La principale fonction de HIF-1 est de signaler l'existence d'une situation hypoxique à la machinerie transcriptionnelle du noyau cellulaire alors que HIF-2 aurait un rôle plus

spécialisé dans l'homéostasie de l'oxygène.<sup>52</sup>

Le nombre de gènes activés par HIF-1 ayant été identifiés ne cesse de croître. La plupart sont impliqués dans les processus d'angiogenèse, du métabolisme énergétique, du remodelage vasculaire et de la réponse vasomotrice. Dans l'angiogenèse, les gènes de VEGF et de son récepteur flt-1 ainsi que la "*Nitric Oxide Synthase 2*" (NOS 2) sont activés par HIF-1.<sup>52</sup>

Dans les cellules d'embryons de souris, HIF-2 active à la fois la transcription de VEGF et de Tie-2 encodant le récepteur de l'Ang-1 qui est sélectivement rencontré à la surface des cellules endothéliales et celle de VEGF.<sup>33,59,60</sup> Il est possible que HIF-2 induise l'expression d'autres gènes impliqués dans la tumorigenèse dont le gène "*Plasminogen Activator Inhibitor-1*" (PAI-1), protéine impliquée dans l'angiogenèse tumorale.<sup>61</sup>

### **1.3 Régulation du gène de VEGF**

La modulation de l'expression de gènes par l'oxygène est un phénomène bien connu. En conditions hypoxiques, la synthèse d'ARNm de la cellule chute de 50-70 % alors qu'il se produit une augmentation de la transcription de gènes impliqués dans la glycolyse, l'érythropoïèse et l'angiogenèse. Au cours de ce dernier processus, l'hypoxie cellulaire stimule la relâche de plusieurs facteurs de croissance dont le VEGF.<sup>55</sup>

La régulation hypoxique du gène de VEGF se produit tout d'abord au niveau de la transcription. Par exemple, l'exposition des certains types de cellules en culture à une chute de la tension en oxygène engendre une expression rapide et réversible de l'ARNm de VEGF. De même, une ischémie secondaire à l'occlusion de l'artère descendante antérieure chez le porc cause une augmentation substantielle des niveaux d'ARNm de VEGF au niveau du myocarde en souffrance.<sup>37,38</sup> Ce dernier exemple suggère que la

revascularisation spontanée par des collatérales se produisant au niveau d'un myocarde ischémique pourrait être médiée par le VEGF. Le mécanisme senseur par lequel la cellule perçoit le stimulus de faible tension en oxygène demeure toujours inconnu. De récentes études stipulent qu'il pourrait s'agir d'une protéine contenant un noyau hémique.<sup>62</sup>

La régulation hypoxique du gène de VEGF se réalise également par une stabilisation accrue de son ARNm. Cette stabilisation est possible grâce à la liaison de protéines à des séquences ayant été identifiées dans la région 3' de l'ARNm.<sup>37,38</sup>

La régulation hypoxique du gène de l'érythropoïétine est connue depuis plusieurs années.<sup>63</sup> C'est grâce aux similitudes de la régulation existant entre le gène de l'érythropoïétine et celui de VEGF que les scientifiques ont pu déterminer comment était modulé le gène de VEGF. À l'intérieur du gène de l'érythropoïétine, dans la région 3' du gène, il existe une séquence nommée "*hypoxia response element*" (HRE) où se lie des protéines régulatrices dont HIF-1.<sup>52,54,55</sup> C'est cette séquence qui confère au gène de l'érythropoïétine la possibilité d'être induite par l'hypoxie. La liaison de la protéine, possiblement en présence de co-facteurs additionnels<sup>52</sup>, au niveau de cette séquence permet la transcription du gène de l'érythropoïétine. Il existe une séquence similaire sur le gène de VEGF humain et l'activation transcriptionnelle se produit de la même façon. En conditions hypoxiques et normoxiques, Forsythe a démontré que le complexe HIF-1 $\alpha$ /HIF-1 $\beta$  se lie à la séquence HRE du gène de VEGF, qui se situe toutefois dans la région 5' du gène, et active sa transcription. HIF-2 agirait par le même mécanisme.<sup>52</sup>

### **1.3.1 Portée scientifique**

Dans le traitement de la maladie cardiaque ischémique chronique, la thérapie angiogénique actuellement utilisée dans les études cliniques est constituée d'un seul

facteur à la fois, tel le VEGF, sous forme d'ADN ou de protéine. Une thérapie qui utiliserait un régulateur de l'hypoxie comme HIF-1 et HIF-2 aurait l'avantage théorique d'induire simultanément l'expression de plusieurs facteurs de croissance impliqués dans chacune des étapes de l'angiogenèse.

## **1.4 Angiogenèse thérapeutique**

### **1.4.1 Contexte actuel**

En ce début de 21<sup>e</sup> siècle, la maladie coronarienne est la principale cause de mortalité en Amérique du Nord. Au Canada, la prévalence des cardiopathies ischémiques chroniques est élevée et varie selon l'âge et le sexe. En 1997, elles touchaient 8,5 % des Canadiens et 2,5 % des Canadiennes de moins de 65 ans alors que la prévalence s'élevait à 17 % et 11 % respectivement pour les 65 ans et plus.<sup>64</sup> Et puisqu'au Canada et au Québec près de 13 % de la population a plus de 65 ans<sup>65</sup> et que cette proportion ne cessera de croître en raison du vieillissement de la population, on peut prévoir un nombre grandissant d'individus atteints de cette maladie.

Malgré les nombreux progrès scientifiques en médecine, la maladie coronarienne demeure une entité incurable. Les thérapies actuellement disponibles s'avèrent palliatives, contrôlent les symptômes et retardent la progression de la maladie. En plus du traitement médical, on a parfois recours à l'angioplastie coronarienne ou la chirurgie de pontages comme procédures de revascularisation. Les deux méthodes améliorent la qualité de vie des patients en diminuant leurs symptômes et la chirurgie amène un bénéfice sur la survie à long terme dans certaines situations<sup>66-74</sup>. Malheureusement, certains patients demeurent inadmissibles à ces thérapies conventionnelles de revascularisation en raison du caractère diffus de leur maladie ou en raison de co-

morbidités augmentant leur risque procédural. Ainsi, seule la thérapie médicale leur est offerte. Malheureusement, leur qualité de vie et leur survie n'en demeurent pas moins limitées.

#### **1.4.2 Nouvelles stratégies de revascularisation**

La maladie coronarienne se caractérise par la présence de plaques athérosclérotiques à l'intérieur des vaisseaux épicaux du cœur et diminue considérablement l'apport sanguin aux myocytes, les rendant ischémiques. Pour compenser cette baisse de flot sanguin, une néovascularisation se développe par les processus d'artériogénèse et d'angiogénèse.<sup>75</sup>

Vers le milieu des années 80, une série de FC responsables du processus d'angiogénèse physiologique et pathologique ont été purifiés et séquencés. Par leur capacité mitogénique envers les cellules endothéliales, ces FC pouvaient induire une néovascularisation dans les tissus ischémiques. Le VEGF est un de ces facteurs angiogéniques et des études ont montré que son expression (et celle de son récepteur) était régulée à la hausse dans les tissus soumis à une baisse du flot sanguin.<sup>76</sup> Le VEGF devenait ainsi une substance intéressante dans le traitement du myocarde ischémique pour induire l'angiogénèse et en améliorer la perfusion. De même, une étude récente réalisée sur un modèle canin d'ischémie myocardique a montré que cette collatéralisation coronarienne serait médiée par le VEGF en présence du NO.<sup>77</sup>

Suite à ces nombreuses découvertes, les scientifiques ont débuté des études animales sur le transfert de gènes codant pour des FC ou des protéines recombinantes (fabriquées en laboratoire) dans l'optique de favoriser le développement de vaisseaux collatéraux.<sup>78-91</sup>

Le succès des études animales ont permis la réalisation d'études cliniques dont certaines

sont en cours actuellement. Cette approche novatrice appelée *angiogenèse thérapeutique* a pour but de rétablir le flot sanguin au myocarde ischémique par l'intermédiaire de multitudes de "passerelles" biologiques autour des artères occluses. Elle s'avère également une nouvelle stratégie de revascularisation pour les patients qui ne sont pas admissibles aux techniques de revascularisation conventionnelles.

### **1.4.3 Thérapie angiogénique ou artériogénique ?**

Il a été démontré que les processus d'angiogenèse et d'artériogenèse se produisent dans le myocarde ischémique dans les modèles animaux<sup>92,93</sup> et chez l'être humain<sup>94,95</sup>. Toutefois, ce sont les collatérales résultant de l'artériogenèse qui sont les plus physiologiquement importantes puisqu'elles sont les seules possédant la capacité d'amener une quantité suffisante de sang nécessaire à la structure et à la fonction cardiaque. Ces collatérales peuvent augmenter leur diamètre par un facteur de vingt et leur capacité de flot par un facteur de dix avec une compensation pouvant s'élever jusqu'à trente pourcent au-dessus du flot sanguin maximal normal dans les modèles animaux expérimentaux.<sup>2</sup> Les réseaux de capillaires formés par angiogenèse ne possèdent pas de cellules musculaires lisses. Ceci les rend fragile et enclin à la rupture et ces vaisseaux seraient incapables à eux seuls d'irriguer une région en déficit de flot.<sup>96</sup> Ainsi, théoriquement, l'artériogenèse serait le type de néovascularisation privilégié par la thérapie génique afin de restaurer la perfusion myocardique.

### **1.4.4 Méthodes de livraison**

L'angiogenèse thérapeutique peut être stimulée par l'administration de protéines recombinantes ou par transfert de gènes via un plasmide d'ADN (molécule circulaire fait d'ADN servant de vecteur; c.f. p. 50-1) ou un vecteur viral. Le plasmide et le virus

contiennent le gène en question accompagné de séquences régulant la transcription. Par transfection ou infection, ces vecteurs livrent leur séquence d'ADN aux cellules cibles afin qu'elles puissent produire la protéine désirée.<sup>97</sup>

Contrairement à la thérapie par protéine recombinante, la thérapie génique utilisant le VEGF a l'avantage d'une production soutenue du facteur angiogénique à des niveaux élevés et ce, malgré un faible taux de transfection des cellules, puisque le plasmide intracellulaire produit des protéines qui sont sécrétées par la cellule<sup>98</sup>. Elle a également l'avantage d'être livrée localement avec une exposition systémique moindre du facteur et d'être accomplie en une seule administration. De même, la production et la sécrétion du facteur angiogénique peuvent être dirigées à un type spécifique de cellule, par exemple les myocytes cardiaques. Toutefois la thérapie génique possède des inconvénients. Tout d'abord, elle implique une introduction de matériel étranger et l'exposition à des vecteurs viraux avec risques concomitants de réponse inflammatoire, de persistance et de mutations virales. De même, la modulation de l'expression génique et les niveaux de facteurs angiogéniques sont impossibles à préciser. Il y a aussi une possibilité de livraison du gène à d'autres cellules que celles qui étaient ciblées et d'une inactivation et/ou d'une réponse inflammatoire lors d'une ré-administration.<sup>96</sup> Finalement, même si une exposition systémique de facteurs angiogéniques sécrétés à de faibles concentrations est théoriquement possible à long terme, il semble que l'expression de gènes médiée par les plasmide et les adénovirus de première génération (qui ne s'incorporent pas à l'ADN de la cellule et qui ne se réplique pas) soit d'une durée limitée, c'est-à-dire une à deux semaines.<sup>99,100</sup>

La thérapie par protéine recombinante a également ses avantages. Contrairement à la

thérapie génique, elle se caractérise par une exposition temporelle finie et par des niveaux titrables du facteur angiogénique et elle n'expose pas l'individu à du matériel étranger ou à des vecteurs viraux. Aussi, le risque de la production d'une réaction inflammatoire ou d'une inactivation immunitaire lors d'une ré-administration est diminué. Les limites de la thérapie par protéine recombinante sont la courte demi-vie sérique du facteur angiogénique et le caractère restreint de sa demi-vie tissulaire occasionnant des périodes d'exposition écourtées. Aussi, lors d'une injection intravasculaire, elle expose l'individu à de fortes concentrations à court terme. Enfin, cette thérapie pourrait nécessiter une administration répétée.<sup>96</sup>

#### **1.4.5 Voies d'administration**

Il existe plusieurs modes d'administration de FC angiogéniques. Il y a les injections par voie systémique, intracoronarienne ou directe (intramyocardique) et elles seront détaillées. Il existe également l'injection intramyocardique par cathéter endovasculaire et l'injection intrapéricardique.<sup>97</sup>

L'injection intraveineuse est très attrayante en raison de son côté pratique, de son faible coût et est praticable chez tous les patients. De plus, elle peut être répétée facilement et n'exige pas d'équipement de haute technologie.<sup>96</sup> Toutefois, son efficacité est limitée par la courte demi-vie des FC et par les effets secondaires systémiques potentiellement toxiques comme l'hypotension systémique médiée par le NO.<sup>45</sup> De plus, elle engendre des risques de tumorigenèse.

L'injection intracoronarienne est facilement réalisée dans un laboratoire d'hémodynamique et est aussi praticable chez la plupart des patients atteints de maladie coronarienne. Toutefois, la nécessité d'un cathétérisme du cœur gauche limite cette

approche à une seule session ou, au plus, à des fréquences éloignées. Malgré son caractère plus local comparativement à l'injection intraveineuse, l'injection intracoronarienne résulte quand même en une exposition systémique du FC et peut engendrer une hypotension systémique significative.<sup>96</sup>

L'évaluation détaillée de la captation, de la rétention dans le myocarde et la distribution systémique de FC marqué par un radio-traceur après injections intraveineuse et intracoronarienne a montré que les deux formes de livraison étaient caractérisées par un faible taux de captation dans les régions cibles (ischémiques) du cœur. Ainsi, après une injection intracoronarienne d'une heure, 0,9 % de bFGF injecté était retrouvé dans le myocarde ischémiques et ce pourcentage n'était que de 0,26 % lorsqu'une telle injection était effectuée de façon systémique.<sup>101</sup>

L'administration intramyocardique est attrayante puisqu'elle permet de cibler les régions désirées du cœur. Aussi, son efficacité est probablement plus grande et la rétention tissulaire serait prolongée. En ce sens, la captation et la rétention de FC marqué par un radio-traceur seraient meilleures par administration intramyocardique qu'intraveineuse ou intracoronarienne.<sup>102</sup> Mais le caractère invasif, la nécessité d'équipements de haute technologie et de l'expertise technique de cette voie d'administration limite son emploi.

96

#### **1.4.6 Profil d'effets secondaires**

Les études animales et les premières études cliniques ont permis d'identifier certaines toxicités caractéristiques associées à l'exposition du bFGF et du VEGF. Une insuffisance rénale causée par une néphropathie membraneuse accompagnée par une protéinurie fut un effet secondaire sévère et à long terme associé à l'administration de bFGF.<sup>103</sup> Un autre

effet secondaire bien documenté est l'hypotension sévère associée avec le bFGF<sup>104</sup> et surtout avec le VEGF qui résulte d'une vasodilatation artérielle engendrée par la relâche de NO<sup>45</sup>. D'ailleurs, une étude récente sur le VEGF de Li et al.<sup>105</sup> a démontré que ces effets vasodilatateurs et hypotenseurs seraient transmis principalement par le récepteur KDR ou VEGF R2.

Une inquiétude théorique associée avec l'administration de tout FC angiogénique est le développement d'une angiogenèse de la plaque athérosclérotique qui pourrait précipiter sa croissance ou la déstabiliser en raison de leur mitogénicité et de leur activité chimiotactique élargies, spécialement envers les macrophages. Cette dernière possibilité serait pertinente étant donné la capacité de bFGF et VEGF d'induire l'angiogenèse dans les vasa vasorum<sup>106</sup> et en raison de l'association entre l'angiogenèse de la plaque, sa croissance<sup>107,108</sup> et sa stabilité<sup>109,110</sup>. Ceci a été démontré par Celletti et al.<sup>111</sup> Dans un modèle in vivo de lapin nourris avec une diète riche en cholestérol. En effet, les animaux ayant reçu une injection de protéines recombinantes rhVEGF étaient caractérisés par une croissance plus rapide et une sévérité plus grande des plaques athérosclérotiques au niveau de l'aorte thoracique comparativement aux animaux non-traités. Chez l'humain, ceci pourrait mener à des conséquences cliniques graves pouvant aller jusqu'à l'infarctus du myocarde et la mort subite.

D'autres inquiétudes concernent la rétinopathie proliférative et les néoplasies occultes. La rétinopathie proliférative a été associée avec l'expression et la présence de FC angiogéniques, notamment le VEGF, dans le liquide orbitaire.<sup>112,113</sup> Le rôle de l'angiogenèse dans la croissance tumorale et des métastases est bien documenté<sup>114</sup> et la facilitation de ce processus pourrait théoriquement mener à une croissance tumorale

accélérée ou à la stimulation de métastases dormantes. Toutefois, jusqu'à maintenant, l'expérience clinique avec une variété de FC n'a pas soutenu ces craintes.<sup>20,21,27</sup>

### 1.4.7 Modèles animaux

Il existe plusieurs modèles animaux pour étudier l'angiogenèse thérapeutique. On peut les diviser en deux grandes classes, soit les modèles de petits et grands animaux.

Les modèles *in vivo* chez les petits animaux ont l'avantage d'être rapides, peu dispendieux et permettant d'obtenir en relativement peu de temps des résultats significatifs ou non. Le tableau 1.1 liste les forces et les faiblesses de certains modèles.

MODÈLES	ANIMAUX	FORCES	FAIBLESSES
Implants sur Matrigel <sup>115</sup>	Souris, rats	Simple Compatibilité avec la culture et la croissance cellulaire	Réaction inflammatoire autour de l'implant (fibrose)
Implants Cornéens <sup>116</sup>	Lapins	Angiogenèse facilement mesurée (cornée = tissu avasculaire) Instrumentations de quantification peu dispendieux	Impossibilité de procéder à de la culture cellulaire Très invasif
Implants faits d'éponge <sup>117</sup>	Souris, rats	Choix de méthodes de livraison des substances étudiées (intraveineux, périvasculaire ou incorporées)	Réaction inflammatoire chronique avec formation d'une coque fibreuse (danger pour la fonction et la viabilité cellulaire)
Membrane Chorioallantoïque <sup>118</sup>	Poules	Instrumentations de quantification peu dispendieux	Évaluation limitée des substances angiogéniques car angiogenèse de base importante
Ischémie de la patte de derrière <sup>119,120</sup>	Souris Lapins	Grosses structures anatomiques (lapins) Quantifications de l'angiogenèse à l'aide de plusieurs outils	Long (lapins) Instrumentations dispendieuses Animaux fragiles (souris)

Tableau 1.1 Modèles d'angiogenèse thérapeutique chez les petits animaux.

Le *Matrigel* ressemble à une membrane basale qui est implantée en sous-cutanée chez l'animal choisi. La substance étudiée est incorporée à la membrane ou livrée localement ou par voie intraveineuse. La néovascularisation au niveau de la membrane est mesurée ultérieurement.<sup>115</sup>

Le modèle réalisé avec des implants cornéens utilisent des substances angiogéniques contenues dans des pilules à libération prolongée<sup>116</sup> alors que les implants faits d'éponges sont constitués de polymères chimiques inertes à l'intérieur desquelles peuvent être incorporées les molécules étudiées.<sup>117</sup>

Dans le modèle de poules, les substances testées sont introduites dans la membrane chorioallantoïque embryonnaire et immobilisées sur des gels de collagène. L'angiogenèse est monitorisée par photographie et analyse d'images.<sup>118</sup>

L'ischémie de la patte de derrière est une modèle intéressant pour étudier l'angiogenèse thérapeutique. Il est utilisé surtout chez la souris<sup>119</sup> et le lapin<sup>120</sup>. Le modèle murin sera celui avec lequel ce travail fut effectué et sera détaillé plus loin. Essentiellement, il s'agit d'occlure la principale source d'apport sanguin à la patte de derrière de l'animal, d'injecter la substance angiogénique dans le quadriceps et de mesurer dans le temps l'angiogenèse obtenue.

En plus des modèles sur petits animaux mentionnés dans le tableau 1.1, l'angiogenèse peut s'étudier chez le rat ayant subit une occlusion de la coronaire gauche.<sup>121</sup>

Il existe plusieurs modèles d'angiogenèse thérapeutique chez les grands animaux. Ceux permettent aux chercheurs d'étudier le phénomène à l'aide d'une analyse plus détaillée, i.e. qu'un plus grand nombre de résultats peuvent être recueillis. Toutefois, l'entretien de ces grands animaux ainsi que la technologie utilisée pour fins d'études sont beaucoup plus dispendieux. Le modèle souvent utilisé est l'ischémie myocardique chez le porc par occlusion de l'artère circonflexe.<sup>122</sup>

## 1.5 Études sur l'angiogenèse thérapeutique

### 1.5.1 Études pré-cliniques animales avec VEGF

Pour tester la faisabilité d'une thérapie angiogénique à l'aide de FC recombinants, des études animales ont d'abord été entreprises. Les premiers FC étudiés furent ceux de la famille du FGF.<sup>123-9</sup> Plus tard, d'autres études animales ont prouvé l'efficacité angiogénique *in vivo* du VEGF. Dans un modèle d'ischémie unilatérale de la patte arrière de lapin, Jeffrey Isner a montré que l'administration intra-artérielle<sup>130</sup> et intramusculaire<sup>131</sup> du VEGF<sub>165</sub> recombinant augmentait significativement le nombre de collatérales visibles à l'angiographie et le nombre de capillaires identifiables à l'histologie et améliorait les paramètres hémodynamiques du membre des animaux traités comparativement aux animaux contrôles. D'autres études employant le même modèle chez la souris ont montré que l'âge altérait significativement l'angiogenèse par la dysfonction endothéliale associée au vieillissement et l'expression réduite de VEGF.<sup>132</sup> Aussi, elles ont prouvé que le diabète perturbait la néovascularisation des tissus ischémiques par une expression réduite de VEGF<sup>85</sup> et que l'hypercholestérolémie inhibait l'angiogenèse par diminution de la bio-activité du NO.<sup>133-5</sup>

Subséquentement, les études animales sur l'angiogenèse thérapeutique dans le traitement de l'ischémie cardiaque furent rapportées. Dans un modèle d'ischémie myocardique chez le chien, Banai et coll.<sup>136</sup> ont démontré que l'administration de VEGF<sub>165</sub> intracoronarien sous forme de protéine recombinante augmentait le débit sanguin du réseau de collatérales du cœur et un accroissement du nombre de vaisseaux sanguins intramyocardiques. Des résultats similaires dans un modèle porcin d'ischémie myocardique ont été rapportés.<sup>122,137,138</sup> Dans ces études, une augmentation de la

collatéralisation myocardique associée à une amélioration de la fonction ventriculaire globale suite à l'administration intramyocardique et intracoronarienne de VEGF<sub>165</sub> furent observées.

### **1.5.2 Études cliniques chez les humains**

Suite à la démonstration de l'efficacité de l'angiogenèse thérapeutique dans plusieurs modèles animaux et à la tenue d'expériences sur la tolérabilité et la sécurité toxicologiques des principaux FC étudiés, la compagnie américaine *Genentech Inc.* reçut l'approbation de la *Federal and Drug Administration (FDA)* pour débiter les premières études cliniques chez l'humain.

#### **a) Études de phase I**

L'objectif de la première étude de phase I <sup>28</sup> était de déterminer si l'administration intracoronarienne de VEGF<sub>165</sub> pouvait être tolérée et administrée de façon sécuritaire. Quinze patients avec angine sévère et jugés non éligibles aux techniques de revascularisation conventionnelles ont participé à cette étude. Les patients diabétiques ou avec des antécédents de cancer furent exclus en raison des incertitudes concernant le rôle du VEGF dans la rétinopathie diabétique et l'angiogenèse tumorale. Il en fut de même pour les patients avec une angine instable, un infarctus du myocarde récent ou une fraction d'éjection ventriculaire gauche inférieure à 25 %. Les résultats de cette étude démontrèrent qu'une infusion intracoronarienne de VEGF<sub>165</sub> de 5, 17 et 50 ng/kg/min pendant vingt minutes pouvait être tolérée. D'autres paramètres, comme par exemple des études de perfusion nucléaire, ont été également évalués chez certains de ces patients. Toutefois, même si ces informations additionnelles allaient dans le sens d'un bénéfice sur le myocarde, aucune conclusion ne put être tirée puisque aucun groupe placebo n'avait

été inclus.

Pour la deuxième étude de phase I <sup>139</sup>, vingt-huit patients furent enrôlés avec des critères de sélection semblables à la première étude. L'objectif était de déterminer la vitesse et la durée totale maximale tolérable de l'infusion intraveineuse de la protéine VEGF<sub>165</sub>. La plus haute dose tolérée fut celle comprenant trois infusions de quatre heures à une vitesse de 50 ng/kg/min. aux jours 1, 3 et 7. Aucune complication associée au traitement ne fut rapportée.

Ces études ont démontré que l'administration intracoronarienne et intraveineuse de la protéine VEGF<sub>165</sub> était sécuritaire. Deux autres études de phase I ont été concluantes en terme de sécurité et tolérabilité du VEGF. L'une examinait l'injection myocardique directe de plasmide VEGF<sub>165</sub><sup>27</sup> et l'autre, l'administration intramyocardique d'un adénovirus exprimant le gène du VEGF<sub>121</sub> seule ou combinée à une chirurgie de pontages<sup>24</sup>.

Un groupe de Boston dirigé par Laham<sup>140</sup> a publié une étude sur la livraison périvasculaire FGF-2 chez des patients subissant une chirurgie de revascularisation coronarienne. Des capsules relâchant du FGF-2 de façon soutenue étaient implantées au niveau de l'épicarde d'un territoire myocardique non-revascularisable. Les résultats de cette étude ont démontré un soulagement complet de l'angine et une augmentation significative de la taille des défauts de perfusion mesurés au scanner nucléaire à 3 mois.

Deux études récentes sur le VEGF dirigées par Jeffrey M. Isner ont montré des résultats intéressants. Dans la première, on a démontré la faisabilité et la sécurité du transfert d'un plasmide VEGF-2 par cartographie électromécanique de ventricule gauche.<sup>141</sup> Il s'agit d'une nouvelle technique percutanée de livraison locale par cathéter moins invasive que

la chirurgie. De la même façon, l'injection intracoronarienne de protéines VEGF recombinante s'est avérée sécuritaire à une dose maximale de 0.050 mg/kg/min chez 15 patients coronariens avec ischémie myocardique objectivée mais non-revascularisable.<sup>142</sup>

Malheureusement, les études de phase I ne répondent pas à la question de l'efficacité de l'angiogenèse thérapeutique. Pour cela, il fallait mettre en place des études comparant un groupe traité à un groupe placebo.

### **b) Études de phase II**

La première étude de phase II sur l'utilisation du VEGF<sub>165</sub> dans le traitement de l'ischémie myocardique chronique vît le jour au début de l'année 1998. Elle fut nommée "*VIVA trial*" pour "*VEGF in Ischemia for Vascular Angiogenesis*"<sup>23</sup>. Il s'agit d'une étude randomisée à double insu contrôlée avec placebo voulant évaluer l'efficacité et la sécurité de la protéine VEGF<sub>165</sub> de stimuler l'angiogenèse myocardique chez des patients avec angine sévère non éligibles aux techniques de revascularisation usuelles. Pour maximiser la probabilité d'obtenir des résultats probants, la protéine était infusée à quatre occasions: infusion intracoronarienne de 20 minutes au jour 0 suivie de trois infusions intraveineuses de quatre heures aux jours 3, 6 et 9. Un total de 178 patients fut randomisé dans trois groupes selon qu'ils recevaient le placebo, une infusion à faible taux (17 ng/kg/min.) ou à taux élevé (50 ng/kg/min.). Le premier devis de cette étude était une différence entre les groupes dans la durée de l'épreuve d'effort à 60 jours. Aussi, des changements dans la perfusion nucléaire, la classe angineuse et les indices de qualité de vie devaient être mesurés.

Au jour 60, tous les patients ont présenté une amélioration dans la durée de l'épreuve à l'effort, la classe angineuse et les indices de qualité de vie mais aucune différence

significative ne fut décelée entre les groupes. Au jour 120, l'amélioration du groupe placebo était moins frappante et une légère différence significative dans le groupe à taux élevé en ce qui concerne la classe angineuse ( $p=0,04$ ) par rapport au groupe placebo apparut. Devant ces résultats décevants, les principaux investigateurs ont émis l'hypothèse qu'il faudrait plus de temps pour observer des différences cliniques significatives entre les groupes. Un important effet placebo semble donc se manifester dans cette étude, mais cet effet pourrait s'estomper avec le temps. Néanmoins cette étude a encore une fois démontré la sécurité et la tolérabilité du VEGF.

Pour évaluer l'efficacité et la sécurité de cette thérapie à long terme, 103 patients ont accepté de demeurer dans le protocole jusqu'à un an. Malheureusement, la classe angineuse des trois groupes s'est légèrement détériorée faisant disparaître la différence significative entre les groupes.<sup>142</sup>

Deux études sur le FGF-2 ont été récemment publiées. La première était multicentrique, randomisée, à double issue, contrôlée avec placebo et intitulée "*FIRST study*" (*FGF Initiating Revascularization Trial*).<sup>143</sup> Elle évaluait les effets de la thérapie angiogénique par l'injection intracoronarienne unique de FGF-2 (3.0 µg) chez 337 patients coronariens non-admissibles aux techniques de revascularisation usuelles. Malheureusement, même si une tendance vers une amélioration de la symptomatologie a pu être démontrée à 90 jours (mais pas à 180 jours), l'injection intracoronarienne de FGF-2 n'a pu améliorer la tolérance à l'exercice et la perfusion myocardique. La seconde étude utilisait une autre méthode de livraison du FGF-2, soit l'utilisation de capsules relâchant la protéine de façon soutenue. Ces capsules étaient implantées dans l'épicarde d'un territoire myocardique ischémique au moment d'une chirurgie de pontages. Malgré le nombre

restreint de patients dans cette étude, Ruel a démontré une amélioration de la classe angineuse et de la perfusion dans les zones ischémiques non-revascularisables chez les individus traités par rapport à ceux ayant reçu le placebo.<sup>144</sup>

Le principal problème des études cliniques chez des patients ayant simultanément un traitement de revascularisation chirurgicale et la thérapie angiogénique (*VIVA et FIRST*) sera de démontrer hors de tout doute que l'amélioration de la symptomatologie et de la perfusion myocardique est causée par la protéine ou le gène et non pas par la chirurgie.

### **1.6 Limites de l'angiogenèse thérapeutique**

Malgré les progrès majeurs dans ce domaine de recherche, plusieurs questions demeurent sans réponse. Quel est le meilleur véhicule pour transporter le gène dans les cellules: protéine, plasmide ou virus? Quelle est la meilleure région à cibler: ischémique, péri-ischémique ou non ischémique? Quelle devrait être la meilleure vitesse (bolus ou perfusion) et la fréquence optimale d'administration (dose unique ou répétée)? Devrait-on utiliser un seul FC ou plusieurs à la fois? Et, finalement, devrait-on l'administrer seul ou en combinaison avec une technique de revascularisation conventionnelle? C'est en continuant de mettre des efforts dans cette avenue de recherche que nous pourrions y voir plus clair.

### **1.7 Mesure de l'angiogenèse thérapeutique**

#### **1.7.1 Laser Doppler Imager**

Les techniques de Doppler Laser mesure le débit sanguin de petits vaisseaux sanguins de la microcirculation, comme les flots à basse vitesse associés au débit sanguin des capillaires de la surface de la peau et le flot des artérioles et veinules sous-jacentes impliquées dans la régulation de la température cutanée. L'épaisseur de tissu

échantillonné est d'environ 1 millimètre, le diamètre capillaire est de 10 microns et le spectre de vélocité se situe entre 0.01 à 10 mm/s.<sup>145</sup> L'appareil utilisé pour ce travail était un *Laser Doppler Imager* (MoorLDI, modèle MLDI5111).

### a) Principes

Le fonctionnement du *Laser Doppler Imager* est illustré à la figure X. Un rayon laser à infrarouges balaye une surface tissulaire dans un mouvement de va-et-vient à l'aide d'un miroir rotatoire. Il est diffusée dans un tout petit volume de tissu et n'est pas directement en contact avec le tissu étudié.

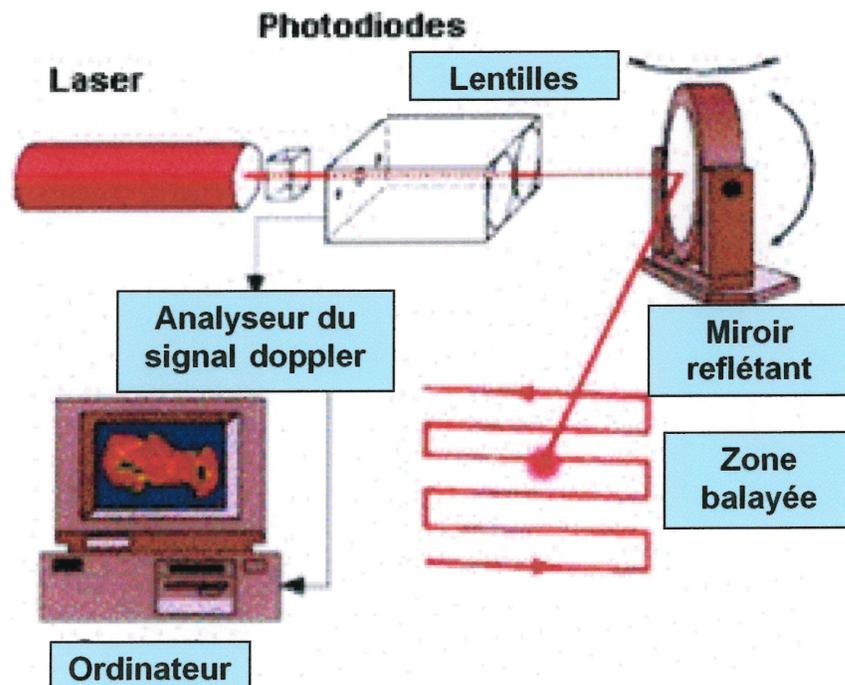


Figure 1.1 Schéma de fonctionnement du Laser Doppler Imager.<sup>145</sup>

Une partie de cette énergie lumineuse est absorbée par les tissus, l'autre partie est réfléchiée par les structures fixes ou mobiles. La lumière réfléchiée par les structures fixes ne subit pas d'effet Doppler. À l'inverse la lumière réfléchiée par les structures en mouvements, principalement les globules rouges, subit un décalage de sa longueur d'onde

que l'on appelle décalage Doppler ou effet Doppler. La magnitude et les changements de longueur d'onde sont proportionnels au nombre et à la vitesse des globules rouges, mais dans ce cas sans relation avec la direction de leurs mouvements. Cette information recueillie par la fibre de réception est convertie en un signal électronique lui-même traité et analysé.<sup>145-6</sup>

### **b) Unités de mesure**

Le terme communément utilisé pour décrire le débit sanguin par la technique du Laser Doppler se nomme *flux*, i.e. la quantité proportionnelle au produit de la vitesse moyenne des globules rouges et de leur concentration.<sup>146</sup> Ceci est arbitrairement exprimé en unités de perfusion (PU). La valeur de la PU est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Perfusion} = \text{Nombre de cellules en mouvement} \times \text{Vitesse moyenne.}$$

La perfusion est aussi appelée Flux Capillaire. Dans la littérature scientifique le nombre de cellules en mouvement se cache souvent derrière le sigle CMBC qui est l'abréviation anglaise de "*Concentration of Moving Blood Cells*". La vitesse est donnée en Unité de Vitesse ( V ).

L'unité de Perfusion est ainsi donnée par la formule suivante :

$$\text{PU} = \text{CMBC} \times \text{V}$$

### **c) Limites**

#### **1- Pénétration limitée dans les tissus**

Comme mentionné précédemment, le LDI reflète le débit sanguin superficiel à la surface de la peau. Toutefois, ceci ne représente pas nécessairement la situation dans les tissus plus profonds.<sup>147</sup>

## **2- Sensibilité aux variations de température :**

Ceci a été démontré par Francis Ring dans une étude de perfusion et température de la peau utilisant le LDI à rayons infrarouges. Selon cette dernière étude, la perfusion et la température cutanée seraient interreliées. Lorsque le débit sanguin régional est augmenté, comme dans un cas d'inflammation, une région plus chaude de la peau peut être observée par une image thermique. Inversement, un débit sanguin diminué, comme au niveau des doigts de patients atteints du phénomène de Raynaud, sera caractérisé par une région de température réduite.<sup>148</sup>

## **3- Haute variabilité :**

À l'intérieur d'un petit volume de tissu échantillonné par le LDI et dénué de mouvement relié au débit sanguin, la variabilité de mesure serait causée par la variation de densité vasculaire et dans l'orientation des vaisseaux. La principale source de variabilité serait le mouvement de balayage de la source lumineuse.<sup>149</sup>

## **4- Changements dus à l'irritation du tissu étudié:**

Une étude récente publiée dans *Circulation*<sup>147</sup> a démontré que le fait d'enlever la fourrure de la région étudiée au LDI augmentait très légèrement la valeur de *flux* en raison des changements de la circulation cutanée attribuables à l'irritation chimique causée par la crème dépilatoire et l'irritation mécanique lors du retrait de cette crème.

## **1.8 Description du projet**

### **1.8.1 Objectif**

L'objectif initial de ce projet était d'étudier le potentiel angiogénique de HIF-2 $\alpha$ , protéine régulatrice de la transcription de VEGF, dans un modèle d'ischémie périphérique *in vivo* afin d'en évaluer le potentiel thérapeutique dans les maladies ischémiques. Le second

objectif consistait à combiner HIF-2 $\alpha$  avec d'autres FC pour amplifier la réponse angiogénique dans un modèle d'ischémie myocardique *in vivo*.

### 1.8.2 Problématique

Dans les études animales, une des grandes difficultés rencontrée par les chercheurs est de quantifier l'angiogenèse et d'en mesurer la portée. Les mesures de quantification usuelles sont l'angiographie, le débit sanguin local, le ratio de pression et la densité capillaire à l'histologie. Elles sont utilisées dans les modèles *in vivo* chez les grands animaux (lapin, chien et porc), expériences qui sont souvent longues et coûteuses. La première étape de mon projet de recherche voulait répondre à une telle problématique. Je recherchais un modèle *in vivo* simple avec une méthode non invasive, rapide, juste et efficace pour mesurer l'angiogenèse de molécules seules ou en combinaison avant d'entreprendre les études chez les grands animaux. Le *Laser Doppler* est l'instrument de mesure de perfusion étudié dans ce projet. L'appareil émet un rayon laser qui est envoyé sur le tissu étudié. Lorsque le rayon rencontre une cellule en mouvement (globule rouge dans le sang), il se produit un changement d'intensité lumineuse qui est détecté par un capteur. L'information est ensuite traduite en image. Le *Laser Doppler* permet ainsi de quantifier la perfusion d'un membre de petit animal et d'en suivre la progression dans le temps. Devant des résultats concluants, il permettrait de sauver temps, énergies et argent.

## **2. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **2.1 Modèle murin d'ischémie de la patte arrière**

Le modèle utilisé pour ce travail de recherche fut initialement décrit par Couffinhal.<sup>119</sup>

#### **2.1.1 Souches animales**

Pour la réalisation de ce projet, trois souches de souris ont été utilisées. Les C57BL/6 (CHARLES-RIVER, St-Constant, Québec, Canada) étaient des souris mâles à pelage noir âgées de huit semaines et pesaient entre vingt et vingt-cinq grammes (expériences 1, 2, 3 et 6). Les NOD/Ltj (JAX MICE, Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, É.-U.) sont des souris diabétiques non obèses. Elles ont développé un diabète auto-immun insulino-dépendant les rendant hypo-insulinémiques et hyper-glucagonémiques. De plus, ces souris possèdent plusieurs immunophénotypes aberrants occasionnant une baisse importante de la réponse de certaines cellules immunitaires (macrophages, cellules présentatrices de l'antigène, lymphocytes T). Des souris mâles à pelage blanc âgées entre cinq et sept semaines et pesant entre vingt-deux et vingt-six grammes ont été utilisés pour le projet (expérience 4). Les C57BL/6-*ApoE* (JAX MICE) sont des souris homozygotes pour la mutation *ApoE*. Elles possèdent des niveaux de cholestérol totaux élevés qui ne sont affectés ni par l'âge ni par le sexe. Dès l'âge de trois mois, elles présentent des stries lipidiques à la surface de l'aorte qui se transformeront avec le temps en lésions pré-athérosclérotiques. Les souris du projet étaient de sexe mâle, à pelage noir, âgées entre sept et neuf semaines et pesaient entre vingt-et-un et vingt-huit grammes (expérience 5).

#### **2.1.2 Procédure chirurgicale**

Après une anesthésie au midazolam (Versed®, Sabex, Boucherville, Québec) (3,75 mg/kg) et kétamine (Ketelean®, Bimeda-MTC, Cambridge, Ontario) (75 mg/kg), les pattes de derrière ainsi que la région abdominale inférieure de la souris étaient épilées avec une lotion dépilatoire. S'en suivait une désinfection des aires épilées à la Proviodyne®. L'intervention

chirurgicale était réalisée dans des conditions stériles. Une incision de la peau était faite au niveau de la région moyenne de la patte de derrière gauche (photo 2.1). L'artère iliaque circonflexe était réséquée avec un amas graisseux localisé près de l'abdomen. Par la suite, il s'agissait de ligaturer la portion proximale de l'artère fémorale et la portion distale de l'artère saphène (photo 2.2). Une figure illustrant l'anatomie vasculaire de lapin et reproductible chez la souris est annexée à la page 98.

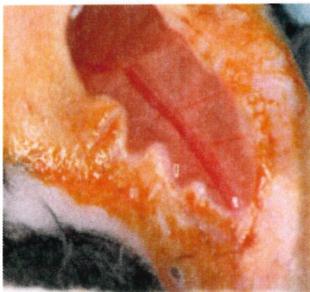


Photo 2.1 Artère fémorale superficielle de patte de souris.

La portion du vaisseau comprise entre les deux ligatures était réséquée et ses branches attenantes disséquées. La solution étudiée (total de 40  $\mu$ L) était injectée dans quatre endroits différents de la cuisse à l'aide d'une seringue de 0,3 mL munie d'une aiguille 30G (photo 2.3). La procédure se terminait par la fermeture de la peau avec une agrafe chirurgicale.



Photo 2.2 Ligature et résection de l'artère fémorale superficielle.



Photo 2.3 Injection intramusculaire de solution plasmidique ou virale.

La procédure chirurgicale de l'expérience 6 fut modifiée. Au lieu de ligaturer proximale l'artère fémorale, la ligature était réalisée légèrement en amont au niveau de l'artère iliaque externe avec exérèse complète de l'artère fémorale jusqu'à la ligature distale (inchangée) de façon à créer une ischémie plus sévère.

Une injection intramusculaire supplémentaire de solution fut administrée aux souris des expériences 5 et 6 aux jours 9 et 10 respectivement.

## 2.2 Laser Doppler Imager

Le "*Laser Doppler Imager*" (LDI) (Moor Instruments Limited, Devon, Royaume-Uni) est un appareil utilisé pour mesurer le flot sanguin à l'intérieur de petits vaisseaux (photo 2.4). Pour ce projet, il a servi à quantifier le débit sanguin dans les membres de derrière des souris.

### 2.2.1 Principes d'imagerie

Tel que mentionné dans la section précédente (voir pages 42 à 45), une lumière laser à rayons infrarouges (780-830 nm) et à 200 MW de puissance est dirigée par un miroir rotatif qui exécute un mouvement de va-et-vient d'un côté à l'autre de la surface tissulaire à mesurer. La profondeur du tissu sondé dépend du tissu lui-même et de sa pigmentation. La lumière est dispersée par le tissu statique et par le sang en mouvement. Par "*effet doppler*", la lumière du sang en mouvement et la lumière non transformée venant du tissu est alors redirigée vers le même miroir en mouvement vers deux détecteurs. Ceux-ci analysent et transforment les signaux lumineux d'intensité diverses en des paramètres de flux qui sont proportionnels au débit sanguin tissulaire (figure 2.1).



Photo 2.4 Laser Doppler Imager (LDI)

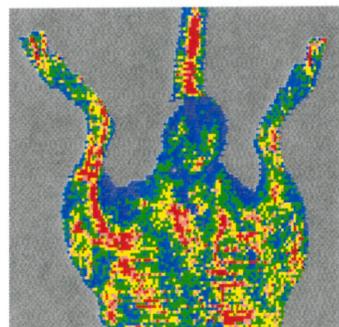


Figure 2.1 Image FLUX de la perfusion des pattes de derrière de souris obtenue par LDI.

### 2.2.2 Prise d'images

Pour exécuter la prise d'images, les souris étaient anesthésiées et épilées au niveau des deux pattes arrières ainsi qu'au niveau de la région abdominale basse. L'agent anesthésique utilisé pour l'expérience 1 était l'agencement kétamine (75 mg/ kg) et midazolam (3,75 mg/kg) et fut modifié pour le penthiobarbital (45 mg/kg) pour l'expérience 2 et les suivantes. Pour éviter les variations de la perfusion périphérique d'une semaine à l'autre, les souris des expériences 2 à 6 furent placées dans un incubateur à une température de 24 °C de douze à vingt-quatre heures avant la prise de mesure et la température du local où se déroulait la prise de mesure était réglée à 20 °C.

Une souris était placée en décubitus dorsal au-dessous de la source laser avec les deux pattes postérieures à l'intérieur d'une région déterminée (6 cm × 6 cm). Lorsque l'animal était complètement immobile, le laser était enclenché et balayait la région par un mouvement de va-et-vient (photo 2.5). L'image était complète en une trentaine de secondes. Les mesures de perfusion furent prises à des fréquences différentes selon les groupes.



Photo 2.5 Prise d'image au LDI.

### 2.2.3 Analyse des images et calcul des ratios de perfusion

Le logiciel moorLDI-V3.0 permet le traitement des images prises par le LDI. L'image FLUX enregistrée était d'abord raffinée à l'aide de la touche "*Equalize*" (figures 2.2a et b) et ensuite, une région d'intérêts correspondant à la patte arrière était découpée (figure 2.2c) de manière à reproduire le plus possible le membre en cause. Par la suite, le nombre moyen de flux de cette région, proportionnel au débit sanguin tissulaire et calculé par le logiciel, était retenu et

transcrit dans un tableau. Le calcul du ratio se faisait en divisant le nombre moyen de flux du membre opéré sur le nombre moyen de flux du membre normal.

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Nombre moyen de flux du membre ischémiq}ue}{\text{Nombre moyen de flux du membre normal}} \sim \frac{\text{Débit sanguin du membre ischémiq}ue}{\text{Débit sanguin du membre normal}}$$

Par exemple, le flux moyen de la région d'intérêts de la région circonscrite dans la figure 2.2c est de 397,7 et celui d'une région similaire de la patte non opérée (à gauche) est de 488,9, résultant en un ratio de 0,81.

Le tableau des ratios obtenus était transmis au directeur de programme qui connaissait l'identité par groupe de chacune des souris et calculait le ratio moyen de chaque groupe. Ces ratios moyens servirent à la comparaison entre les groupes et permirent de suivre l'évolution de la récupération de la perfusion dans le temps.

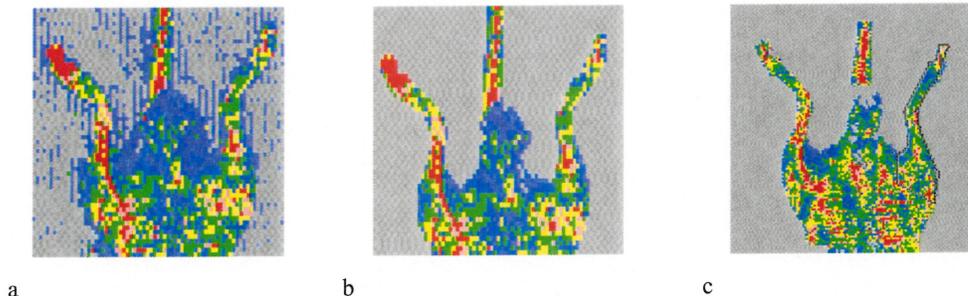


Figure 2.2 : Image FLUX initiale (a) ; image "traitée" (b) ; région d'intérêts choisie

### 2.3 Préparations des vecteurs plasmidiques et des vecteurs viraux

Pour ce projet, des vecteurs viraux et non viraux ont été utilisés pour réaliser le transfert de gènes désirés.

Le vecteur viral employé pour l'expérience 4 fut l'adéno-VEGF<sub>165</sub>. Il s'agit d'un virus recombinant qui, à l'intérieur de son génome viral, contient la cassette d'expression du VEGF. Les régions E<sub>1</sub> et E<sub>3</sub> du génotype de l'adénovirus furent éliminées pour empêcher la propagation du virus, ainsi une seule ronde d'infection est permise. Il infecte à la fois les cellules quiescentes et les cellules en division sans intégration de son génome à l'ADN de celles-ci<sup>42</sup>. La préparation des vecteurs d'expression fut réalisée selon une méthode

précédemment décrite.<sup>150</sup> Les souris furent transfectées avec 10 µg d'adéno-VEGF<sub>165</sub> à l'aide de quatre injections intramusculaires au niveau des muscles de la cuisse.

Le plasmide (voir en annexe à la page 99) fut le vecteur non viral utilisé pour ce travail. Il s'agit d'une chaîne circulaire d'ADN qui contient un gène codant pour une protéine pré-déterminée. Les plasmides VEGF<sub>165</sub>, HIF-1 α, HIF-2 α et "vide" (sans gène) furent employés. Les cellules transfectées par le plasmide synthétisent la protéine ciblée qui peut demeurer soit à l'intérieur de la cellule ou qui peut être sécrétée vers le milieu extracellulaire selon le type de protéine produite. Les plasmides contiennent un promoteur viral, le "*human cytomegalovirus (CMV) immediate-early promoter and enhancer*", qui assure des niveaux de transcription élevés<sup>151</sup>.

Le plasmide VEGF fut préparé selon une méthode précédemment décrite<sup>42,152</sup>.

Les plasmides HIF-1 et HIF-2 ont été préparée par l'équipe du Docteur Louis-Georges Guy, Ph.D. chargé de projet au sein de la compagnie *Angiogene Inc.*. L'ADNc de HIF-1 α et de HIF-2 α a été gracieusement fourni par S.L. McKnight<sup>153</sup>. Les séquences étaient insérées dans un vecteur d'expression, pcDNA3 (InVitroGen) qui permet l'expression des gènes grâce à un promoteur ubiquitaire provenant du CMV. HIF-1 α a été modifié de la façon suivante: après digestion enzymatique avec des enzymes de restriction pour retirer les séquences d'activation de la transcription et d'instabilité mais conserver les séquences de liaison à l'ADN et d'hétérodimérisation<sup>154-5</sup>, un insert encodant VP16, un puissant domaine d'activation de la transcription provenant du plasmide pVP16 (ClonTech) a été inséré de telle sorte que les deux séquences sont en phase et qu'une protéine hybride est produite (voir annexe à la page 87). Théoriquement, la protéine produite ne devrait plus être régulée par l'hypoxie et devrait être un très fort transactivateur de la transcription. Pour HIF-2 α, les séquences encodant les domaines de liaison à l'ADN et d'hétérodimérisation ont été introduites dans le plasmide HIF-1 α /VP16, remplaçant les séquences de HIF-1 α par celle de HIF-2 α de telle sorte qu'un

hybride HIF-2 $\alpha$  /VP16 soit produit. L'intégrité des plasmides a été confirmée par séquençage et les plasmides ont été purifiés sur des colonnes Concert Maxi-preps (Life Sciences Technologies). Les souris ont été transfectées avec les différents plasmides à l'aide de quatre injections intramusculaires au niveau des muscles de la cuisse.

## **2.4 Densité vasculaire**

La densité vasculaire, tout comme le LDI, est une méthode de mesure d'angiogenèse. Pour ce projet, elle fut réalisée chez un nombre restreint d'animaux parce que nous voulions uniquement la comparer avec les résultats obtenus au LDI. Deux souris de chaque groupe de l'expérience 6 et deux souris non traitées étaient sélectionnées, pour un total de dix. Au dernier jour de l'expérience 6, après le sacrifice des souris choisies, chaque patte à l'étude fut disséquée (peau et pelage réséqués) et placée dans un contenant de plastique contenant du « Tissu Fix » (solution de conservation). Vingt-quatre heures plus tard, après exérèse du fémur de chacune des pattes, deux coupes transverses du muscle quadriceps par pattes furent réalisées au bistouri. Les vingt coupes musculaires furent placées dans une cassette identifiée replongée dans le « Tissu Fix ».

### **2.4.1 Préparation des lames histologiques**

Les lames sur lesquelles ont été colorés les vaisseaux sanguins au CD31 selon une méthode précédemment décrite<sup>132</sup>.

### **2.4.2 Calcul**

Chacune des pattes correspondait à une lame histologique. Pour chacune de ces lames, trois champs distincts ont été étudiés par deux observateurs aveugles pour le traitement. Sur chacun des champs d'une patte, le nombre de vaisseaux était compté et la valeur moyenne obtenue des deux observateurs était retenue.

## 2.5 Statistiques

Les résultats de ces expériences sont présentés sous forme de moyenne +/- écart-type. Le test d'ANOVA fut utilisé pour la comparaison entre les groupes.

### 3. RÉSULTATS

#### 3.1 Expérience 1

L'objectif de cette première expérience était de comparer le potentiel angiogénique de trois gènes, soit VEGF, HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$ , à l'aide du LDI. Un plasmide d'ADN servait de vecteur pour ces gènes. Quarante souris C57BL/6 furent divisées en quatre groupes de dix chacun de la façon suivante:

**Groupe plasmide VEGF (10  $\mu$ g)      n = 10**

**Groupe plasmide HIF-1 $\alpha$  (10  $\mu$ g)      n = 10**

**Groupe plasmide HIF-2 $\alpha$  (10  $\mu$ g)      n = 10**

**Groupe plasmide vide (10  $\mu$ g)      n = 10**

Les solutions furent numérotées de 1 à 40 et les souris portèrent le numéro de la solution administrée selon un code d'identification des rongeurs (figure 3.1). Le contenu des solutions n'était pas connu et leur allocation a été faite au hasard.

Les interventions chirurgicales se sont étalées sur trois jours et les lectures au LDI furent prises aux jours 0, 7, 14 et 21.

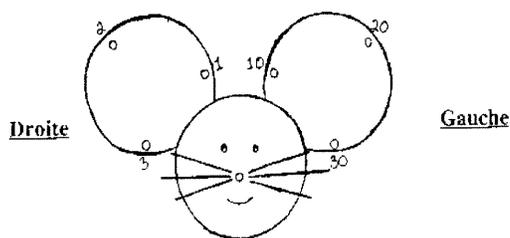


Figure 3.1 Code d'identification des rongeurs

##### 3.1.1 Complications

Durant la première semaine suivant la chirurgie, la plupart des souris évitaient de se déplacer sur leur patte de derrière gauche. Au dixième jour, elles avaient repris une démarche normale sauf pour quelques-unes aux prises avec une complication ischémique sévère. La majorité

d'entre elles ont développé un léger œdème, de l'érythème de la patte et des ongles noirs qui sont demeurés uniquement durant les deux semaines suivant l'intervention chirurgicale.

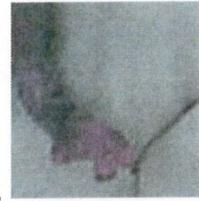
Le taux de mortalité pour la durée totale de l'expérience fut de 20 % (huit souris). Une souris mourût par surdose d'agents anesthésiques au moment de la lecture alors que les sept autres durent être euthanasiées en raison d'une manifestation d'ischémie sévère de la patte de derrière gauche. Cette complication s'est manifestée en période aiguë, c'est-à-dire de deux à trois jours après la chirurgie, et plus tard, deux semaines après l'intervention. L'ischémie aiguë se caractérisait par une coloration violacée de la patte de derrière, par un érythème et un œdème des doigts et par la nécrose de quelques doigts (photo 3.1). L'ischémie tardive se caractérisait par une gangrène sèche avec perte de doigt(s) et ongles noirs (photos 3.2a et b).



Photo 3.1 Ischémie aiguë sévère



a



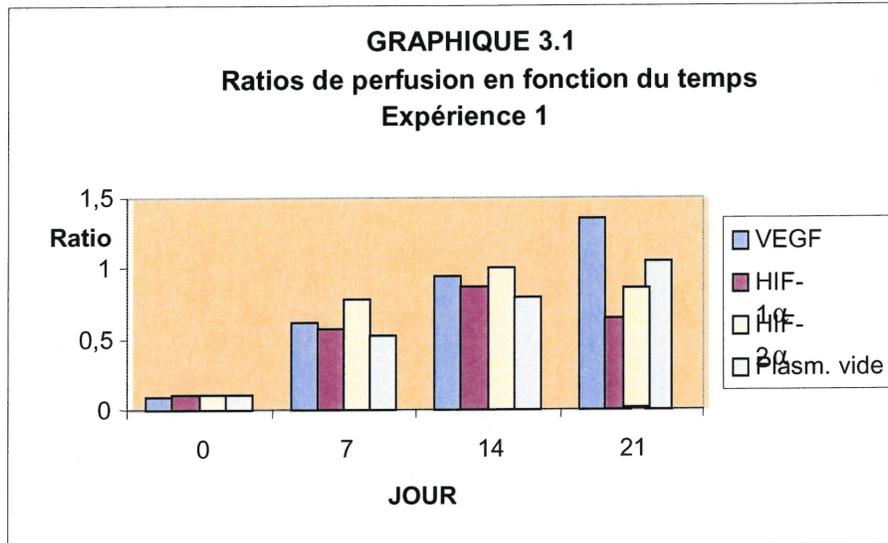
b

Photo 3.2 Ischémie chronique sévère avec gangrène sèche (a) et amputation digitale (b).

### 3.1.2 Résultats de l'analyse des images obtenues par LDI

Pour cette expérience les images ont été prises au jour 0 afin de s'assurer du succès de la technique chirurgicale et aux jours 7, 14 et 21. Le jour de la chirurgie, les ratios de perfusion obtenus furent en moyenne de 10 % sans différence significative entre les quatre groupes (annexe A).

Au jour 7, le ratio moyen de tous les groupes s'élevaient au-dessus de 50 %, ceux des groupes traités étant plus élevés que celui du groupe contrôle. Le groupe HIF-2 $\alpha$  dominait avec un ratio moyen de  $0,78 \pm 0,44$ , suivi en ordre décroissant des groupes VEGF ( $0,61 \pm 0,35$ ), HIF-1 $\alpha$  ( $0,57 \pm 0,44$ ) et contrôle ( $0,53 \pm 0,41$ ). Aucune différence statistiquement significative ne put être décelée entre les groupes.



Voir annexe tableau A

Au jour 14, les ratios moyens des quatre groupes augmentèrent d'environ 50 % sauf pour celui du groupe HIF-2 $\alpha$  qui n'augmenta que de 28 %. La même tendance perdura entre les groupes avec HIF-2 $\alpha$  ayant le ratio moyen le plus élevé suivi de VEGF, HIF-1 $\alpha$  et finalement le groupe contrôle. Aucune différence statistiquement significative ne put être décelée entre les groupes.

Au jour 21, la tendance observée durant les deux premières semaines ne tenait plus. Les ratios moyens des groupes HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  se sont abaissés de 25 %, c'est-à-dire de  $0,87 \pm 0,48$  à  $0,65 \pm 0,35$  pour HIF-1 $\alpha$  et de  $1,00 \pm 0,59$  à  $0,76 \pm 0,32$  pour HIF-2 $\alpha$ . Le ratio moyen du groupe VEGF continuait à monter et dominait tous les groupes avec une valeur de  $1,35 \pm 1,41$  suivi du groupe contrôle avec un ratio moyen de  $1,05 \pm 0,54$ . De même, les écarts types des valeurs de chaque groupe étaient très élevés (tableau 3.1). Au moment de la prise de l'image de la perfusion au LDI, plusieurs des souris présentaient une perfusion déficiente de la patte non opérée (à gauche sur l'image) (figure 3.2).

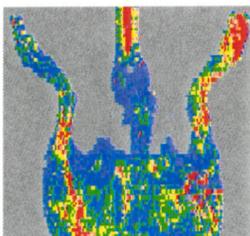


Figure 3.2 Image FLUX d'un déficit de perfusion (patte gauche).

Les pattes étaient froides au toucher. Nous avons repris quelques images le lendemain et nous avons constaté une grande variation de la perfusion périphérique d'une journée à l'autre. Ces grandes variations de la perfusion périphérique occasionnaient d'énormes changements dans les valeurs de ratio.

Celles-ci avaient tendance à s'élever de façon importante sans pour autant refléter une perfusion améliorée par le traitement. Pour résoudre ce problème, nous avons communiqué avec le personnel du laboratoire du Docteur Jeffrey Isner qui a mis au point le modèle et trois changements ont été apportés. Tout d'abord, l'agent anesthésique fut changé pour le penthiobarbital (45 mg/kg) ayant moins de propriétés vasoplégiques que le mélange kétamine-midazolam<sup>142</sup>. Ensuite, les souris furent placées dans un incubateur à une température de 24 °C pour au moins douze heures avant la lecture. Finalement, la température de la pièce où les mesures furent prises fut réglée à 20 °C. Nous avons comparé les deux solutions anesthésiques en contrôlant les variables environnementales par une lecture chez quelques souris (tableau 3.1).

Tableau 3.1 Ratios de perfusion en fonction de l'agent anesthésique utilisé. (Expérience 1)

Anesthésie	HIF-2 $\alpha$		Plasmide vide	
	Két.-midaz.	Penthiobarbital	Két.-midaz.	Penthiobarbital
Nombre (n)	5	4	3	4
Moy. $\pm$ écart-t.	<b>1,06 <math>\pm</math> 0,84</b>	<b>0,78 <math>\pm</math> 0,05</b>	<b>0,51 <math>\pm</math> 0,24</b>	<b>0,52 <math>\pm</math> 0,13</b>

Voir annexe tableau B

Les valeurs de ratio obtenues chez les souris ayant été anesthésiées avec le penthiobarbital étaient moins dispersées que celles de souris ayant été endormies avec le mélange kétamine-midazolam (tableau 3.1). L'expérience a donc été recommencée dans de nouvelles conditions. La grande variation obtenue lors de l'expérience 1 pouvait être expliquée par les conditions expérimentales initiales.

## 3.2 Expérience 2

Le cadre et l'objectif de cette deuxième expérience furent les mêmes qu'à l'expérience 1 à l'exception de l'agent anesthésique utilisé et des conditions environnementales mentionnées précédemment. Les interventions chirurgicales se sont déroulées sur deux jours et les lectures de perfusion au LDI ont été prises aux jours 7, 14, 21 et 28. La lecture au jour 0 fut omise pour cette expérience puisque les résultats de ratios similaires entre les quatre groupes obtenus à l'expérience 1 (environ 0,1 de ratio) permirent de confirmer le succès de la technique chirurgicale.

### 3.2.1 Complications

Une seule souris est décédée quatorze jours après la chirurgie et la cause du décès n'a pu être identifiée. Parmi les souris ayant été opérées la première journée, plusieurs d'entre elles ont présenté des signes inflammatoires de la patte opérée (rougeur et œdème) qui sont apparus une semaine après la chirurgie et qui ont perduré jusqu'à la fin de l'expérience. La patte cible des vingt autres souris opérées la deuxième journée était tout à fait normale. Aucune souris n'a dû être sacrifiée en raison d'une complication ischémique.

### 3.2.2 Résultats de l'analyse des images obtenues par LDI

Au jour 7, la plupart de images montraient une patte avec un bout distal ischémique (bleuté) (figure 3.3a). Les images des souris présentant des signes inflammatoires cliniques se caractérisaient soit par une coloration diffuse jaune et verte de la patte ou par une tache rouge (figure 3.3b et c).

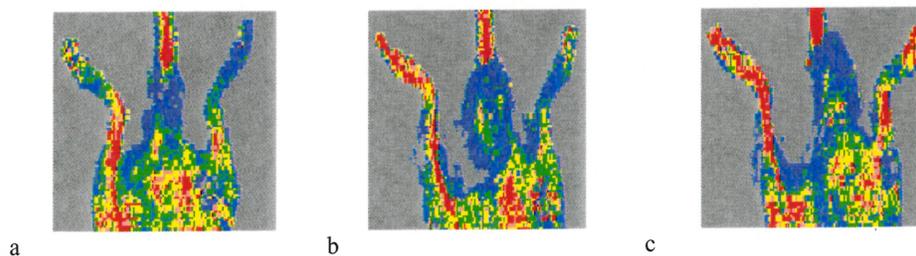
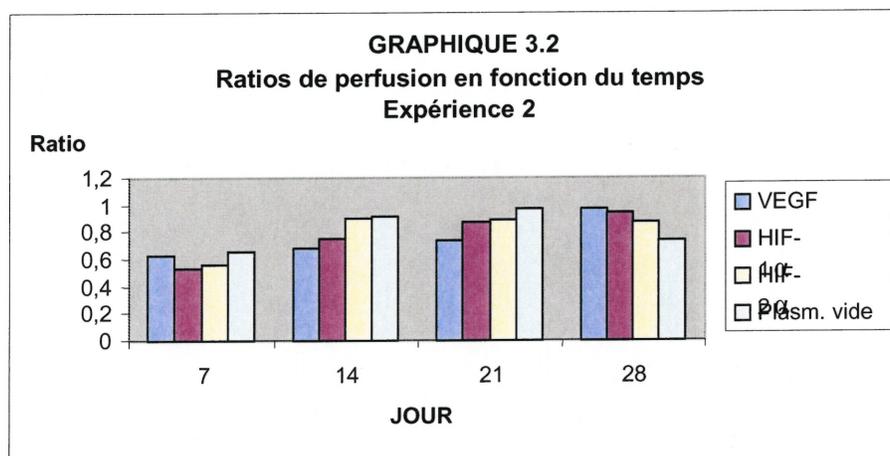


Figure 3.3 Image FLUX au jour 7 avec la patte opérée (à droite) ischémique (a) et avec signes inflammatoires (b et c).

Le ratio de ces dernières images s'approchait et dépassait parfois la valeur 1 (voir tableau C; souris 6). Le ratio moyen du groupe contrôle était supérieur aux trois autres avec une valeur de  $0,65 \pm 0,28$  suivi dans l'ordre des groupes VEGF avec  $0,63 \pm 0,28$ , HIF-2 $\alpha$  avec  $0,56 \pm 0,23$  et HIF-1 $\alpha$  avec  $0,53 \pm 0,31$ . En omettant les valeurs aberrantes (supérieures à 1), les valeurs de ratios diminuaient légèrement mais la tendance demeurait la même (tableau C).

Au jour 14, les signes inflammatoires des souris touchées étaient aggravés, c'est-à-dire plus d'œdème et de rougeur, sans nécrose évidente de la patte. De façon générale, les images



Voir annexe tableau C

montraient des pattes diffusément colorées (figure 3.4a). Les images des souris avec signes inflammatoires se caractérisaient par une rougeur de la partie proximale de la patte ainsi que d'une fine rougeur de son bout distal (figure 3.4b). Les ratios moyens des groupes HIF-2 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$  et contrôle augmentèrent de 61 %, 42 % et 40 % respectivement alors que celui du groupe VEGF n'augmenta que de 8 % (graphique 3.2). Les groupes contrôle et HIF-2 $\alpha$  dominaient avec des valeurs de ratio moyen de  $0,91 \pm 0,52$  et  $0,90 \pm 0,50$  suivi derrière des groupes HIF-1 $\alpha$  avec  $0,75 \pm 0,42$  et VEGF avec  $0,68 \pm 0,20$ . En enlevant les valeurs aberrantes (tableau C), l'ordre des groupes demeurait le même et aucune différence statistiquement significative entre les groupes ne put être décelée.

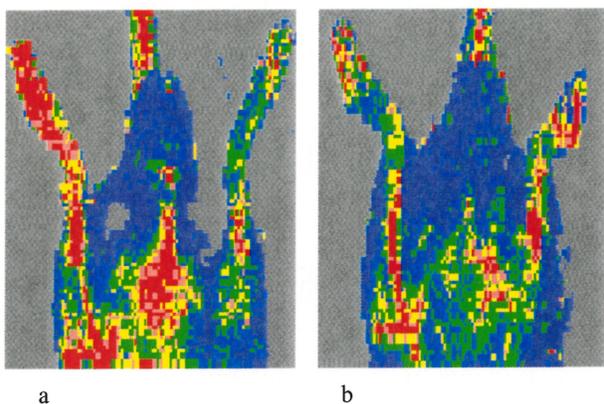


Figure 3.4 Image FLUX au jour 14 de la patte opérée sans (a) et avec signes inflammatoires (b).

Au jour 21, la plupart des images montraient une rougeur distale de la patte. Le ratio moyen des groupes contrôle, VEGF et HIF-1 $\alpha$  ont légèrement augmenté alors que celui du groupe HIF-2 $\alpha$  est demeuré sensiblement le même. Le groupe plasmide vide domine toujours

avec une valeur de  $0,97 \pm 0,95$ , suivi des groupes HIF-2 $\alpha$  et HIF-1 $\alpha$  avec  $0,88 \pm 0,42$  et  $0,87 \pm 0,95$  respectivement et finalement du groupe VEGF avec  $0,73 \pm 0,24$ .

En omettant les cas aberrants, on observe la dominance des groupes traités par rapport au groupe contrôle toutefois sans différence significative entre les groupes.

Au jour 28, plusieurs souris démontraient toujours des signes inflammatoires associés à des valeurs de ratio allant de 1,04 à 2,96. En les retirant, aucune différence significative entre les quatre groupes ne fut décelée.

Tableau 3.2 Ratios moyens des quatre groupes à l'étude (expérience 2) avec les valeurs brutes (a) et sans les valeurs inflammatoires ou aberrantes (b).

Groupes	Jour 7	Jour 14	Jour 21	Jour 28
<b>VEGF</b>	0,63 $\pm$ 0,28	0,68 $\pm$ 0,20	0,73 $\pm$ 0,24	0,97 $\pm$ 0,61
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	0,53 $\pm$ 0,31	0,75 $\pm$ 0,42	0,87 $\pm$ 0,95	0,94 $\pm$ 0,72
<b>HIF-2<math>\alpha</math></b>	0,56 $\pm$ 0,23	0,90 $\pm$ 0,50	0,88 $\pm$ 0,42	0,87 $\pm$ 0,38
<b>Plasmide vide</b>	0,65 $\pm$ 0,28	0,91 $\pm$ 0,52	0,97 $\pm$ 0,95	0,73 $\pm$ 0,22

Groupes	Jour 7	Jour 14	Jour 21	Jour 28
<b>VEGF</b>	0,57 $\pm$ 0,22	0,68 $\pm$ 0,20	0,63 $\pm$ 0,10	0,76 $\pm$ 0,26
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	0,45 $\pm$ 0,23	0,55 $\pm$ 0,25	0,63 $\pm$ 0,10	0,73 $\pm$ 0,16
<b>HIF-2<math>\alpha</math></b>	0,56 $\pm$ 0,23	0,66 $\pm$ 0,24	0,69 $\pm$ 0,22	0,75 $\pm$ 0,26
<b>Plasmide vide</b>	0,59 $\pm$ 0,22	0,71 $\pm$ 0,23	0,53 $\pm$ 0,06	0,77 $\pm$ 0,20

En résumé, cette deuxième expérience a mis en évidence une récupération de plus de 50 % dès la première semaine de lecture, la présence de signes cliniques inflammatoires associés à des valeurs de ratios aberrantes, une dominance du groupe contrôle dès la deuxième semaine

et jusqu'à la fin de l'expérience et finalement, aucune différence statistiquement significative entre les groupes avec des valeurs d'écart-types très élevées.

Pour expliquer la récupération rapide des souris, les signes cliniques et les valeurs aberrantes des ratios, deux hypothèses de travail ont été formulées et vérifiées par les expériences subséquentes de ce projet.

### **3.3 Expérience 3**

#### **3.3.1 Première hypothèse: Solution plasmidique inflammatoire ?**

Cette troisième expérience se voulait rapide et consistait à vérifier si la solution plasmidique, soit ses constituants ou l'ADN, engendrait une réaction inflammatoire des tissus pouvant masquer la réelle réponse angiogénique du produit administré. Vingt souris C57BL/6 furent divisées en cinq groupes de la manière suivante :

**Groupe plasmide vide (1 µg)                      n = 4**

**Groupe plasmide vide (4 µg)                      n = 4**

**Groupe plasmide vide (10 µg)                      n = 4**

**Groupe plasmide VEGF (1 µg)                      n = 4**

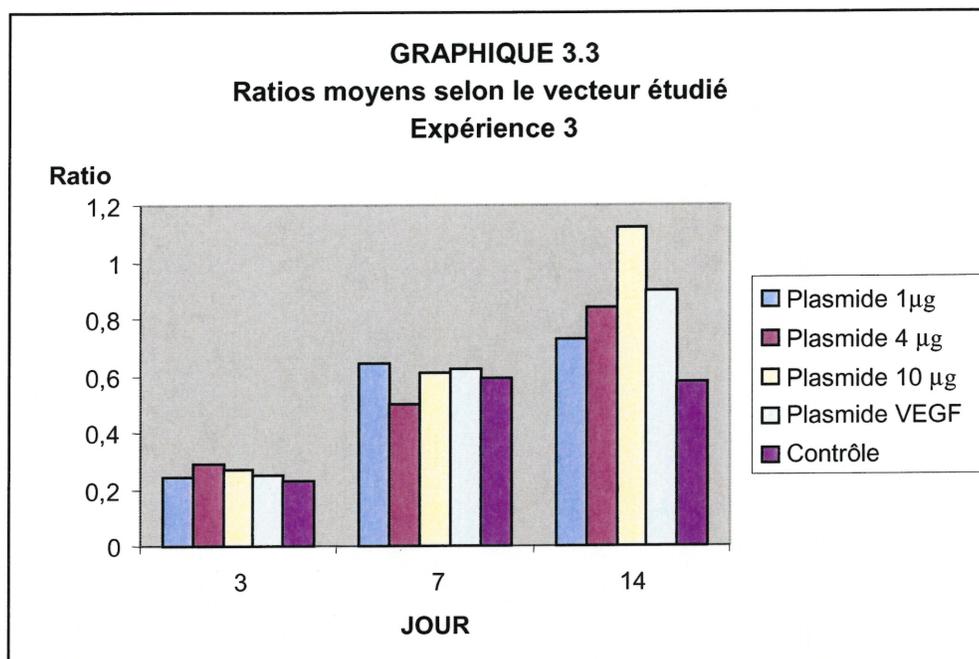
**Groupe contrôle (salin 0,9%)                      n = 4**

En utilisant le même modèle d'ischémie de la patte, trois doses croissantes du plasmide furent testées et comparées à une faible dose de plasmide VEGF de manière à comparer leurs effets à un groupe ne recevant aucun ADN. Les interventions chirurgicales ont été réalisées en une seule journée et l'expérience s'est échelonnée sur deux semaines avec des lectures prises aux jours 3, 7 et 14.

#### **3.3.2 Résultats de l'analyse des images obtenues par LDI**

Au jour 3, le ratio moyen du groupe contrôle et des deux groupes contenant 1 µg de plasmide (vide et VEGF) étaient sensiblement les mêmes (graphique 3.3) alors que les deux groupes

avec une quantité plus importante d'ADN avaient des ratios moyens légèrement plus élevés, c'est-à-dire plasmide vide 4 et 10  $\mu\text{g}$ .



Voir annexe tableau D

Au jour 7, tous les ratios s'élevaient au-dessus de 50 % sans différence statistiquement significative entre les groupes.

Au jour 14, le ratio moyen des groupes ayant reçu de l'ADN était plus élevé que celui du groupe contrôle avec une valeur moyenne de  $0,58 \pm 0,25$ . Le groupe avec la plus grande quantité d'ADN dominait avec  $1,12 \pm 0,59$  suivi du groupe de VEGF (1  $\mu\text{g}$ ) avec  $0,90 \pm 0,34$  et des groupes de plasmide vide (1 et 4  $\mu\text{g}$ ) inférieurs avec  $0,73 \pm 0,30$  et  $0,84 \pm 0,26$  respectivement.

Les résultats de cette brève expérience montrent qu'il existe probablement une réaction inflammatoire plus importante en présence d'une plus grande quantité d'ADN. Toutefois, ceci n'a pu être prouvé étant donné le petit nombre d'animaux dans chaque groupe. La dose d'ADN choisie pour les expériences ultérieures fut fixée à 4  $\mu\text{g}$  pour éviter une trop grande réaction inflammatoire et pour travailler avec une quantité suffisante afin d'obtenir l'effet désiré.

### 3.4 Expérience 4

#### 3.4.1 Deuxième hypothèse: récupération endogène rapide de la souche C57BL/6 ?

Une autre difficulté rencontrée dans ce projet était la récupération rapide de la souche de souris utilisée pouvant possiblement empêcher l'observation d'une réelle réponse angiogénique des gènes à l'étude. Afin de répondre à cette deuxième hypothèse de travail, nous avons fait appel à deux souches de souris caractérisées par leur réponse angiogénique diminuée. La première souche utilisée fut celle des souris NOD/Ltj, c'est-à-dire diabétiques non obèses. Dans la littérature, leur ratio moyen de perfusion à 14 jours n'est que de 0,45 par rapport à 0,70 pour les C57BL/6<sup>85</sup>. La deuxième souche utilisée fut celle des C57BL/6-*ApoE* qui sont des souris hypercholestérolémiques et sera examinée en détails à l'expérience 5.

Pour cette quatrième expérience, nous avons modifié les groupes à l'étude. Un groupe avec adéno-VEGF<sub>165</sub> fut inclus comme contrôle positif et comparé de la manière suivante:

**Groupe plasmide vide (4 µg)                      n = 6**

**Groupe plasmide VEGF (4 µg)                      n = 6**

**Groupe adéno-VEGF (10 µg)                      n = 6**

En raison de l'entreposage des virus dans un congélateur et dans des contenants différents de celui des plasmides, il fut malheureusement impossible de diviser les groupes à l'aveugle.

Les interventions chirurgicales se sont déroulées sur une journée et la fréquence des lectures au LDI fut modifiée pour suivre l'évolution de la récupération plus étroitement, c'est-à-dire aux jours 3, 7, 10, 14, 18, 24, 28 et 37.

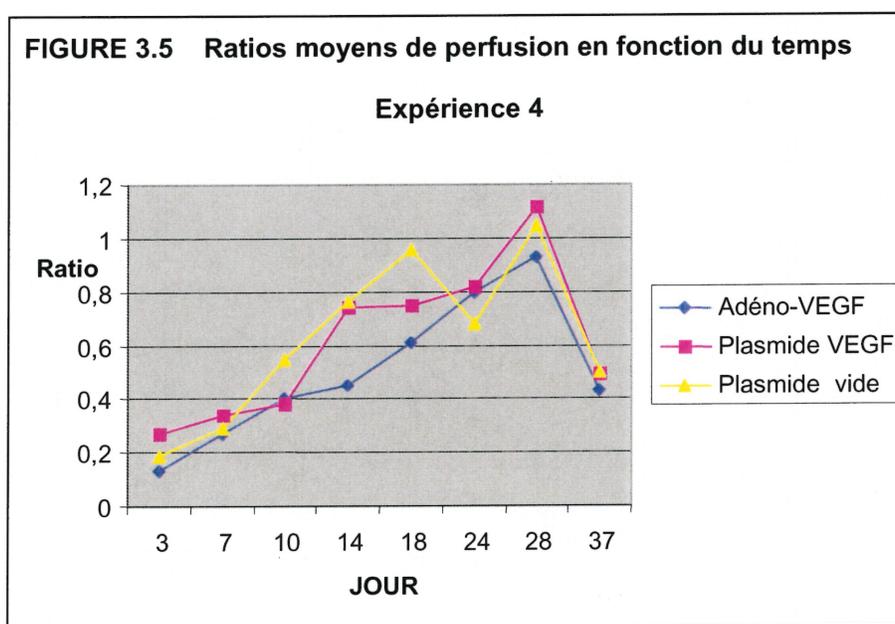
#### 3.4.2 Complications

L'anesthésie de cette souche de souris fut difficile à obtenir. Les souris semblaient être tolérantes aux doses usuelles. Il fallut doubler les doses et quatre d'entre elles succombèrent à une dépression respiratoire causée par une surdose d'agents anesthésiques. De plus, deux souris du groupe adéno-VEGF démontrèrent des signes d'ischémie sévère de la patte dont une

dût être euthanasiée au cours de l'expérience. Les souris du groupe ayant reçu le plasmide vide ont démontré des signes inflammatoires cliniques (œdème et érythème).

### 3.4.3 Résultats de l'analyse des images obtenues par LDI

Au jour 7, le ratio moyen des trois groupes était beaucoup moins élevé que lors des expériences 1 et 2 avec les souris C57BL/6. Sa valeur était de  $0,25 \pm 0,10$  pour le groupe adéno-VEGF,  $0,29 \pm 0,06$  pour le groupe plasmide vide et de  $0,33 \pm 0,03$  pour le groupe plasmide VEGF (figure 3.5).



Voir annexe tableau E

Pour le reste de la durée de l'étude, la réponse de groupe plasmide vide (figure 3.5) fut élevée et plus importante que les deux autres groupes. Le ratio moyen s'est élevé jusqu'au dix-huitième jour pour par la suite chuter jusqu'à la fin de l'étude. Le groupe plasmide VEGF présenta le même type de réponse que le groupe plasmide vide, avec toutefois des ratios moyens un peu moins élevés et un pic de réponse un peu plus tard, c'est-à-dire vers le vingt-huitième jour. De même, le ratio moyen chuta drastiquement à la fin de l'étude. La réponse du groupe adéno-VEGF atteignit un plateau au vingt-quatrième jour et chuta comme les deux

autres groupes par la suite. Au jour 37, aucune différence significative entre les trois groupes ne fût décelée.

### 3.5 Expérience 5

Cette cinquième expérience voulait également répondre à l'hypothèse de travail d'une récupération endogène rapide de la souche C57BL/6. Des souris C57BL/6-*ApoE* hypercholestérolémiques, caractérisées par leur réponse angiogénique diminuée, ont été utilisées. Dans la littérature, il a été démontré que leur ratio moyen de perfusion à vingt-et-un jours n'est que de  $0,40 \pm 0,03$  par rapport à  $0,81 \pm 0,1$  pour les C57BL/6<sup>135</sup> Un total de dix-huit souris fut divisé à l'aveugle avec quatre ou cinq souris dans chacun des groupes suivants:

**Groupe plasmide vide**

**Groupe plasmide VEGF**

**Groupe plasmide HIF-2 $\alpha$**

**Groupe contrôle (Salin 0,9 %)**

L'adéno-VEGF n'a pas été utilisé en raison des résultats négatifs de l'expérience 4 et un groupe recevant le plasmide HIF-2 $\alpha$ , dont l'efficacité *in vitro* a été vérifiée, fut rajouté pour fins de comparaison avec le groupe VEGF. Aussi, un groupe contrôle permettait d'observer la récupération endogène de cette souche.

Cette étude voulait également répondre à une troisième hypothèse de travail découlant de l'expérience 4. Cette hypothèse se posait ainsi: **Se pourrait-il que la quantité totale de gène administrée soit insuffisante et que l'administration après le passage de la réaction inflammatoire, celle qui se produit suite à l'exérèse de l'artère fémorale, soit plus efficace?** Une modification fut donc apportée au modèle qui consistait à injecter une dose additionnelle de la solution dans le muscle quadriceps de la patte opérée au jour 9 immédiatement après la lecture au LDI. Les interventions chirurgicales furent réalisées en une seule journée. De même qu'à l'expérience 4, la fréquence de la prise des images au LDI fut

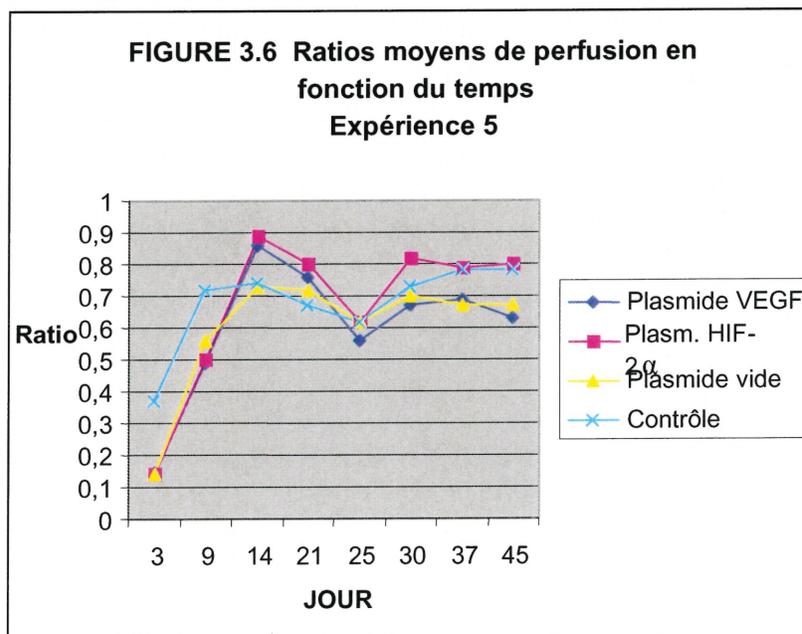
rapprochée, c'est-à-dire aux jours 3, 9, 14, 21, 25, 30, 37 et 45 de manière à observer étroitement la récupération de la perfusion de cette souche de souris.

### 3.5.1 Complications

Une seule souris succomba d'une dépression respiratoire à l'anesthésie le jour de la chirurgie. Quelques-unes ont montré des signes de rougeur et un léger œdème au niveau de la patte opérée mais aucune nécrose précoce ou tardive ne fut observée.

### 3.5.2 Résultats de l'analyse des images obtenues par LDI

Déjà au neuvième jour après la chirurgie, le ratio moyen des groupes ayant reçu de l'ADN se situaient près de 50 % (figure 3.6) alors que celui du groupe contrôle était encore plus élevé avec une valeur de  $0,72 \pm 0,17$ . Par la suite, le ratio de tous les groupes plafonna vers le quatorzième jour pour finalement diminuer plus le temps avançait. Au dernier jour de lecture le ratio moyen du groupe HIF-2 $\alpha$  dominait les deux autres groupes ayant reçu de l'ADN, avec une valeur de  $0,80 \pm 0,13$  comparativement à  $0,63 \pm 0,22$  pour le groupe plasmide VEGF et  $0,67 \pm 0,07$  pour le groupe plasmide nu sans différence significative entre les deux groupes.



Voir annexe tableau F

### 3.6 Expérience 6

#### 3.6.1 Troisième hypothèse: dose insuffisante de gènes ?

Cette sixième expérience fut réalisée simultanément avec l'expérience précédente et a également testé la troisième hypothèse de travail, c'est-à-dire l'addition d'une dose supplémentaire de solution. Nous voulions raffiner le modèle d'ischémie de la patte arrière qui, selon un article publié par Pu<sup>120</sup>, engendre une ischémie aiguë plus sévère afin de tenter de ralentir la récupération endogène. Pour ce faire, la modification consistait à faire une ligature plus proximale au niveau de l'artère iliaque externe et de procéder à l'exérèse complète de l'artère de la patte jusqu'à ce niveau (figure 2.1). Vingt souris C57BL/6 ont été divisées à l'aveugle de la manière suivante:

<b>Groupe plasmide vide (4 µg)</b>	<b>n = 5</b>
<b>Groupe plasmide VEGF (4 µg)</b>	<b>n = 5</b>
<b>Groupe plasmide HIF-2α (4 µg)</b>	<b>n = 5</b>
<b>Groupe contrôle (Salin 0,9 %)</b>	<b>n = 5</b>

La dose supplémentaire de solution fut administrée au jour 10 et les lectures au LDI furent prises aux jours 3, 10, 17, 24, 30, 37 et 45.

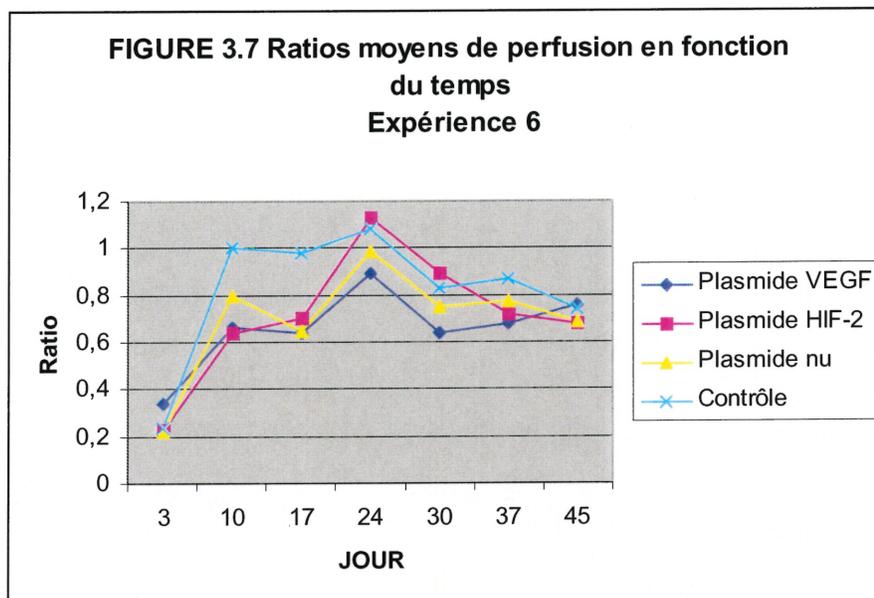
#### 3.6.1 Complications

Lors de cette expérience, deux souris décédèrent de dépression respiratoire causée par l'anesthésie un jour de lecture et une souris du groupe contrôle dût être euthanasiée en raison de la présence de doigts nécrotiques au niveau de la patte opérée. Au milieu de l'étude, un peu plus de la moitié de souris ont présenté des signes inflammatoires locaux (œdème et érythème de la patte) qui se sont estompés par la suite.

#### 3.6.2 Résultats de l'analyse des images obtenues par LDI

Déjà au jour 10, la valeur du ratio moyen de tous les groupes est très élevée (tableau G), le groupe contrôle avec  $1,00 \pm 0,27$  suivi du groupe plasmide vide avec  $0,80 \pm 0,22$ , du groupe

plasmide VEGF  $0,66 \pm 0,13$  et du groupe HIF-2 $\alpha$  avec  $0,64 \pm 0,20$ . La tendance générale fut une augmentation des valeurs de ratio moyen jusqu'au jour 24 suivi d'un déclin lent jusqu'à la fin de l'étude (figure 3.7). Et au jour 45, aucune différence significative entre les quatre groupes ne fut décelée et ce, même en omettant les cas aberrants (tableau G, annexe).



Voir annexe tableau G

### 3.7 Densité vasculaire

L'étude de la densité vasculaire fut réalisée dans un optique de confirmer le phénomène d'angiogenèse qui n'a pu être observé au LDI.

Les résultats démontrent près de deux fois plus de vaisseaux dans le groupe HIF-2 $\alpha$  par rapport aux groupes plasmide vide et salin. Les résultats du groupe VEGF montrent 30 % plus de vaisseaux que les groupes plasmide vide et salin.

	VEGF	HIF-2 $\alpha$	Plasmide	Contrôle	Normal
<b>Densité vasculaire</b>	$3,84 \pm 0,56$	$5,21 \pm 1,34$	$2,92 \pm 0,35$	$3,00 \pm 1,65$	$3,50 \pm 1,60$

Tableau 3.3 Densité vasculaire du quadriceps gauche de souris de l'expérience 6 au jour 45. N = 4 coupes histologiques par groupe; 2 animaux par groupe étudié.

En raison du nombre d'échantillons petit (n), les différences entre les groupes HIF-2 $\alpha$  et VEGF versus le groupe contrôle n'étaient pas statistiquement significatives. On peut toutefois parler de tendance vers une plus grande angiogenèse.

#### 4. DISCUSSION

L'angiogénèse thérapeutique est une voie d'avenir prometteuse dans le traitement des maladies vasculaires coronarienne et périphérique de nature ischémique. Par l'injection de protéines ou de gènes stimulant une néovascularisation, l'objectif consiste à rétablir un apport sanguin suffisant pour le bon fonctionnement de l'organe atteint de manière à empêcher toute souffrance ischémique et ultimement la nécrose cellulaire.

L'angiogénèse est un processus organisé, complexe. Plusieurs scientifiques ont développé des modèles *in vivo* et utilisé certaines méthodes de mesure afin de mieux comprendre le phénomène et afin d'étudier l'efficacité de molécules angiogéniques. Ces modèles utilisent souvent des animaux de grande taille ainsi que de l'instrumentation augmentant considérablement le coût de la recherche.

L'objectif premier de mon travail était de développer un modèle *in vivo* d'angiogénèse simple, rapide, précis et peu coûteux afin de tester le potentiel angiogénique de nouvelles molécules, seules ou en combinaison. Ce modèle permettrait de déterminer les gènes susceptibles de stimuler la production de nouveaux vaisseaux et de les appliquer dans un second temps à un modèle d'ischémie myocardique chez le porc et ultérieurement chez l'humain.

La quantification de l'angiogénèse dans un modèle d'animaux de grande taille est déterminée par l'index brachio-huméral, la mesure du débit intravasculaire, l'angiographie et la mesure de la densité vasculaire à l'histologie. Ces méthodes invasives consomment temps, énergie, argent et nécessite une expertise technique non-négligeable.

Le "*Laser Doppler Imager*" (LDI) est un appareil utilisé par certains chercheurs dans les

modèles d'angiogénèse chez les petits animaux. Isner et Rivard ont démontré qu'il permettait de mesurer aisément le déficit angiogénique associé à certains phénotypes (âge et diabète)<sup>85,132</sup>. Malgré son coût initial élevé, il demande peu de support technique (ordinateur), consomme peu d'énergie et il est non-invasif. Toutefois, sa sensibilité et sa spécificité ne sont pas très bien connues.

L'expérience 1 montre une augmentation significative des ratios de tous les groupes au jour 7, c'est-à-dire une valeur supérieure à 50 %. De plus, jusqu'au jour 14, on assiste à une augmentation graduelle des ratios des groupes traités avec un effet plus marqué pour le groupe plasmide HIF-2 $\alpha$ . Toutefois, cette tendance ne s'est maintenue que pour le groupe plasmide VEGF alors que les deux groupes HIF ont vu leur ratios s'abaissé. Un fait intéressant est la dominance du groupe contrôle plasmide au jour 21. Il ne semble donc ne pas y avoir de supériorité angiogénique des plasmides VEGF, HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$ .

Lors de cette expérience, nous avons remarqué que lors de la prise de lecture, certaines souris démontraient un déficit de perfusion de la patte non-opérée. À l'examen, le membre était froid. Après réchauffement de la patte, nous obtenions des ratios différents de ceux obtenus quelques minutes plus tôt. L'hypothèse émise pour expliquer ces prises de mesure erronées et les variations des valeurs de ratio est celle d'une hypothermie intrinsèque, telle une hypoperfusion périphérique induite par l'anesthésie, ou extrinsèque, en raison de la température non-contrôlée de la salle de lecture.

Afin d'optimiser notre modèle, nous avons comparé deux types d'agents anesthésiques chez quelques-unes des souris des groupes HIF-2 $\alpha$  et plasmide contrôle. L'utilisation du mélange kétamine-midazolam utilisé pour l'expérience 1 engendrait de plus importantes

variations de ratio comparativement au penthiobarbital. Ceci s'explique par les propriétés vasodilatatrices du midazolam, causant une hypotension sévère et une vasoconstriction périphérique. Ce facteur température pouvait expliquer les résultats obtenus. Ainsi, nous avons repris la même expérience en faisant deux modifications lors de la prise de lecture. L'agent anesthésique utilisé fut changé pour le pentobarbital, la température du local fut contrôlée à vingt degrés Celcius et les animaux furent dorénavant placés dans un incubateur à une température de vingt degrés Celcius vingt-quatre heures avant la lecture. Lors de l'expérience 2, nous avons encore une fois observé une élévation significative des ratios dès la première semaine après l'injection. Aussi, nous avons observé des signes cliniques suggérant une réaction inflammatoire au niveau des pattes opérées tels une rougeur, un œdème, une chaleur. Ces souris ne portaient pas leur poids sur la patte atteinte, signe suggérant la douleur. Les valeurs de ratios de ces pattes inflammatoires dépassaient souvent la valeur 1,00 et demeuraient la plupart du temps ainsi jusqu'à la fin de l'expérience. Même en omettant ces valeurs aberrantes (supérieure à 1,00), cette deuxième expérience n'a pu démontrer la supériorité d'un plasmide sur un autre. Il existe de grandes variations qui masquent l'effet angiogénique que nous tentions de mesurer. Pour expliquer les résultats de la deuxième expérience, nous avons émis deux hypothèses. Tout d'abord, la réaction inflammatoire de la patte opérée chez un grand nombre d'animaux pourrait-elle résulter d'une purification sous-optimale du plasmide ? Ensuite, le fait d'obtenir des ratios de perfusion très élevés au jour 7 pourrait-il s'expliquer par une récupération endogène rapide de cette souche de souris ? L'hypothèse selon laquelle la solution plasmidique utilisée, c'est-à-dire ses constituants ou son ADN, provoque une réaction inflammatoire du membre où elle fut injectée fut

adressée par l'expérience 3. Nous avons observé une augmentation significative des ratios dès le jour 7 et ce même pour les souris ayant reçu la solution saline. Ceci penche encore une fois dans le sens d'une réaction endogène rapide de la souche de souris C57BL/6 ou d'une réaction inflammatoire causée par la simple injection. À la fin de l'étude, ce sont les groupes ayant été exposés à une plus grande quantité d'ADN qui possédaient les plus grands ratios de perfusion.

Malgré le petit nombre de souris dans chacun des groupes, la courte période d'étude et la grande variabilité inter-individuelle qui ne put mettre en évidence de différence significative entre les groupes, il semble exister une tendance selon laquelle une réaction inflammatoire serait engendrée par une quantité croissante d'ADN. Nous avons donc réduit la dose d'ADN de 10 à 4 µg et adressé notre deuxième hypothèse.

Le phénomène d'élévation rapide du ratio de perfusion dès la première semaine nous faisait croire que les souris C57BL/6 récupéraient très rapidement après l'ischémie aiguë en formant des collatérales venant de l'artère fémorale profonde. Si tel était le cas, cette « guérison naturelle » nous empêcherait de voir l'effet de nos molécules angiogéniques et de le quantifier avec le LDI. C'est pour cette raison que nous avons tenté d'étudier l'effet angiogénique de certaines molécules sur des souris caractérisées par une récupération endogène ralentie, soit des souris diabétiques et des souris hypercholestérolémiques. Des études ont démontré une angiogénèse diminuée chez ces deux types mentionnés<sup>85,135</sup>.

Les molécules étudiées chez les souris diabétiques furent changées. Nous voulions comparer l'effet angiogénique du plasmide VEGF à l'adéno-VEGF utilisé chez Angiogene inc. qui venait du laboratoire de Jeffrey Isner et qui a donné des résultats concluant en terme d'angiogénèse dans l'étude de Voisine<sup>157</sup>. L'expérience 4 a démontré

une augmentation lente, graduelle et croissante des ratios de perfusion des trois groupes à l'étude jusqu'au trentième jour pour par la suite baisser de moitié. Ainsi, nous n'avons pu observer de réponse angiogénique par l'adéno-VEGF ou le plasmide VEGF chez ce groupe de souris diabétiques.

L'adéno-VEGF était conservé au congélateur depuis deux ans. Avant de les tester *in vivo*, nous n'avons pas confirmé la virulence de ces virus *in vitro*. Il se peut que l'échantillon utilisé n'était pas efficace. La prédominance de la courbe du groupe plasmide vide et la chute drastique des ratios de perfusion des trois groupes entre les jours 28 et 37 nous porte à croire qu'une réaction inflammatoire causée par l'ADN empêche l'observation de toute angiogénèse thérapeutique.

L'objectif de l'expérience 5 était d'évaluer le potentiel angiogénique des plasmides VEGF et HIF-2 $\alpha$  chez une souche de souris caractérisées par une récupération endogène lente en raison de leur hypercholestérolémie. Effectivement, la hausse du cholestérol sérique inhibe l'angiogénèse par plusieurs mécanismes, dont la diminution de la bioactivité de l'oxyde nitrique.

Puisque l'expérience 4 n'est pas concluante avec la souche de souris diabétiques, nous avons émis une autre hypothèse avant de débiter la cinquième expérience. Nous avons remarqué une réaction inflammatoire non-spécifique dans la majorité des groupes étudiés. Nous avons attribué ce phénomène à l'ischémie aiguë. Cette inflammation s'est manifestée environ entre le septième et le vingt-cinquième jour postopératoire. Se pourrait-il que les cellules impliquées dans ce processus "inactivent" le gène étudié, partiellement ou complètement. Ceci pourrait expliquer l'absence d'effet angiogénique de VEGF, HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$ . Ainsi, nous avons décidé d'ajouter une seconde dose de la

même solution à toutes les souris étudiées au neuvième jour postopératoire, soit quelques jours après le pic de la réaction inflammatoire.

L'expérience 5 a démontré la même montée des ratios de perfusion entre le dixième et le vingt-cinquième jour postopératoire, phénomène attribuable possiblement à la réaction inflammatoire de la chirurgie. Par la suite, il s'est produit une élévation progressive du ratio de perfusion du groupe HIF-2 $\alpha$  par rapport au groupe VEGF et plasmide vide sans différence statistiquement significative néanmoins. Au jour 37, le groupe contrôle possédait le même ratio de perfusion que le groupe HIF-2 $\alpha$ , chose que nous n'arrivons pas à expliquer.

Les résultats des expériences 4 et 5 nous portent à croire que même en présence d'une récupération endogène ralentie, nous n'arrivons pas à mettre en évidence au LDI une supériorité angiogénique des plasmides VEGF et HIF-2.

Dans la dernière portion de l'étude, nous avons tenté à la fois d'amplifier le modèle d'ischémie périphérique et d'ajouter une dose supplémentaire de gène au jour 10.

Étant donné les résultats non-concluants des expériences 4 et 5, nous sommes revenus à notre souche initiale, soit les C57BL/6. L'expérience 6 a montré une élévation des ratios de perfusion de tous les groupes jusqu'au jour 24 pour par la suite redescendre et plafonner autour d'une valeur de 0,70 sans différence entre les groupes.

Au cours de cette étude, nous avons observé deux types de complications de la patte opérée. Tout d'abord, l'ischémie aiguë et chronique fut observée principalement chez des souris ayant reçu du salin ou de l'adéno-VEGF, solutions n'ayant pas engendré d'angiogénèse. Ensuite, la réaction inflammatoire fut observée chez un grand nombre de souris sans prédominance entre les groupes. Nous attribuons ce phénomène à la

procédure chirurgicale.

Cette étude répartie en six expériences n'a pu mettre en évidence une supériorité angiogénique des plasmides VEGF, HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  au LDI dans un modèle d'ischémie périphérique chronique chez des souris de type C57BL/6, diabétiques ou hypercholestérolémiques.

Nous avons émis deux hypothèses pour expliquer de tels résultats. Premièrement, il se peut que les solutions plasmidiques VEGF, HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  n'aient aucun potentiel angiogénique. En effet, l'efficacité du plasmide VEGF n'a pas été vérifiée dans notre laboratoire. Toutefois, des données *in vivo* récentes du laboratoire *Angiogene inc* indiquent que des cellules musculaires (myoblastes) humaines modifiées avec un adénovirus HIF-2 $\alpha$  implantées de façon sous-cutanée dans des souris nues immunosupprimées stimulent une prolifération de vaisseaux sanguins significativement plus élevée que des cellules non modifiées tel que mesuré par histologie de l'implant (travaux pas encore publiés). Donc, le gène semble angiogénique. C'est plutôt le transfert de plasmide qui ne donne pas une angiogenèse suffisamment forte pour se distinguer du bruit de fond par le LDI. Cet appareil est caractérisé par une grande sensibilité. Toute variation de température de l'animal occasionne de fausses lectures. Par exemple, l'hypothermie secondaire à l'agent anesthésique change le ratio de perfusion réelle en diminuant significativement la perfusion de la patte non opérée. Aussi, toute cause d'augmentation de chaleur hausse et fausse la valeur de perfusion de la patte opérée. C'est ce que nous avons observé chez certaines des souris qui présentaient des signes cliniques inflammatoires, dont les valeurs de perfusion s'élevaient au-dessus de la valeur 1,00. Le LDI ne semble pas suffisamment spécifique pour démontrer le potentiel

angiogénique des plasmides utilisés et ne peut discerner l'angiogénèse thérapeutique de la réaction inflammatoire induite par la chirurgie. Les données récentes avec l'adénovirus HIF-2 $\alpha$  et la tendance observée d'une plus importante densité vasculaire obtenue dans les groupes HIF-2 $\alpha$  et VEGF nous portent à penser que les gènes utilisés avaient un potentiel angiogénique. Et, le LDI fonctionne probablement, mais n'est pas assez sensible dans les conditions utilisées parce que le vecteur (plasmide) est trop peu efficace.

Quelques études ont démontré l'utilisation avec succès du LDI pour mesurer une diminution d'angiogénèse associée à certains facteurs<sup>85,124</sup>. Avec la récupération rapide des souris, une diminution d'angiogénèse pourrait être beaucoup plus facile à détecter qu'une augmentation.

En guise de conclusion, cette étude n'a pu démontrer de potentiel angiogénique des plasmides HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  et VEGF par le LDI dans le modèle murin d'ischémie périphérique chronique. Plusieurs hypothèses de travail ont été émises et vérifiées, telle la récupération endogène rapide de la souche de souris C57BL/6, l'effet inflammatoire des solutions plasmidiques et la quantité insuffisante de gènes administrés. Nous croyons que le modèle utilisé était efficace, simple, peu coûteux et rapide. Toutefois, le LDI demeure un appareil trop sensible et insuffisamment spécifique pour mesurer une réponse angiogénique chez la souris. Conséquemment, le second objectif de cette étude ne pût être rempli avec le modèle utilisé. Or, d'autres instruments de mesure pourraient être envisagés. Par exemple, le "*PET-Scan*" est un appareil utilisant des particules émettrices de positrons pour mesurer la perfusion, le métabolisme et la contractilité d'un organe étudié. Cette technologie est la voie d'avenir dans l'étude et la thérapie génique touchant l'ischémie myocardique chronique et la défaillance cardiaque. D'ailleurs, nous étudions

présentement l'effet de nos plasmides au "*PET-Scan*" dans un modèle d'ischémie myocardique chez le rat. Une étude-pilote est en cours et les résultats suivront.

## SOURCES DOCUMENTAIRES

1. **Risau W.** Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-674.
2. **Deindl E, Fernandez B, Höfer I, et al.** Arteriogenesis, Collateral Blood Vessels, and Their Development. In: Rubanyi, GM. *Angiogenesis in Health and Disease. Basic Mechanisms and Clinical Applications.* New York, Marcel Dekker, Inc, 2000:31-46.
3. **Griffioen AW, Molema G.** Angiogenesis: Potentials for Pharmacologic Intervention in the Treatment of Cancer, Cardiovascular Disease, and Chronic Inflammation. *Pharmacological Reviews* 2000;52(2):237-268.
4. **Tomanek RJ, Schatteman GC.** Angiogenesis: New Insights and Therapeutic Potential. *Anat Rec (New Anat)* 2000;261:126-135.
5. **Carmeliet P.** Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medecine* 2000;6(3):389-395.
6. **Schaper W, Buschmann I.** Collateral Circulation and Diabetes. *Circulation* 1999;99:2224-2226.
7. **Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, et al.** Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nature Medecine* 2000;6(4):460-463.
8. **Jain RK, Munn LL.** Leaky Vessel ? Call Ang 1! *Nature Medecine* 2000;6(2):131-132.
9. **Thurston G, Suri C, Smith K, et al.** Leakage-Resistant Blood Vessels in Mice Transgenically Overexpressing Angiopoietin-1. *Science* 1999;286:2511-2514.
10. **Peters KG.** Vascular Endothelial Growth Factor and the Angiopoietins. Working Together to Build a Better Blood Vessel. *Circ Res* 1998;83:342-343.
11. **Folman J, D'Amore PA.** Blood Vessel Formation: What Is Its Molecular Basis ? *Cell* 1996;87:1153-1155.
12. **Ware JA.** Cellular Mechanisms of Angiogenesis. In: Ware JA, Simons M. *Angiogenesis and Cardiovascular Disease.* New York, Oxford University Press, 1999: 30-59.

13. **Taniyama Y, Morishita R, Horaoka K, et al.** Therapeutic angiogenesis induced by hepatocyte growth factor gene in rat diabetic hindlimb ischemia model: molecular mechanisms of delayed angiogenesis in diabetes. *Circulation* 2001;104(19):2344-50.
14. **Taniyama Y, Morishita R, Aoki M, et al.** Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hindlimb ischemia models: pre-clinical study for treatment of peripheral arterial disease. *Gene Ther* 2001;8(3):181-9.
15. **Morishita R, Sakata M, Yamamoto K, et al.** Impairment of collateral formation in lipoprotein(a) transgenic mice: therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene. *Circulation* 2002;105(12):1491-6.
16. **Emanuelli C, Minasi A, Zacheo A, et al.** Local delivery of human kallikrein gene accelerates spontaneous angiogenesis in mouse model of hindlimb ischemia. *Circulation* 2001;103:125-32.
17. **Flamme I.** Molecular Biology of Vasculogenesis and Early Angiogenesis. In: Rubanyi, GM. *Angiogenesis in Health and Disease. Basic Mechanisms and Clinical Applications.* New York, Marcel Dekker, Inc, 2000: 1-30.
18. **Vale, PR, Losordo DW, Milliken CE, Maysky M, Esakof DD, Symes JF, Isner, JM.** Left Ventricular Electromechanical Mapping to Assess Efficacy of phVEGF<sub>165</sub> Gene Transfer for Therapeutic Angiogenesis in Chronic Myocardial Ischemia. *Circulation* 2000;102:965-974.
19. **Hendel RC, Henry TD, Rocha-Singh K, et al.** Effect of intracoronary recombinant human vascular endothelial growth factor on myocardial perfusion: evidence for a dose-dependent effect. *Circulation* 2000;101:118-121.
20. **Laitinen M, Hartikainen J, Hiltunen MO, et al.** Catheter-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer to human coronary artery after angioplasty. *Hum Gene Ther* 2000;11:263-270.

21. **Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, et al.** Angiogenesis gene therapy: phase I assesment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation* 1999;100:468-474.
22. **Rosengart TK, Lee LY, Port JL, et al.** Video assisted epicardial delivery of angiogenic gene therapy to the human myocardium utilising an adenovirus vector encoding for VEGF<sub>121</sub>. *Circulation* 1999;100(suppl I):I-770A.
23. **Henry T, Aanex B, Azrin M, et al.** Double-blind placebo controlled trial of recombinant human vascular endothelial growth factor: the VIVA trial. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:384A.
24. **Patel SR, Lee LY, Mack CA, et al.** Safety of direct myocardial administration of an adenovector coding for vascular endothelial growth factor 121. *Hum Gene Ther* 1999;10:1331-1348.
25. **Symes JF, Losordo DW, Vale PR, et al.** Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease. *Ann Thorac Surg* 1999;68:830-836.
26. **Arveschoug A, Christensen KS.** Constitutive Expression of phVEGF<sub>165</sub> After Intramuscular Gene Transfer Promotes Collateral Vessel Development in Patients With Critical Limb Ischemia. *Circulation* 1999;99:2967-2968.
27. **Losordo DW, Vale PR, Symes JF, et al.** Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF<sub>165</sub> as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 1998;98:2800-2804.
28. **Henry T, Rocha-Singh K, Isner JM, et al.** Results of intracoronary recombinant human vascular endothelial growth factor (rhVEGF) administration trial. *J Am Coll Cardiol* 1998;31(suppl A):64A.

29. **Springer ML, Chen AS, Kraft PE, et al.** VEGF gene delivery to muscle: potential role for vasculogenesis in adults. *Mol Cell* 1998;2:549-558.
30. **Mack CA, Magovern CJ, Budenbender KT, et al.** Salvage angiogenesis induced by adenoviral-mediated gene transfer of vascular endothelial growth factor protect against ischemic vascular occlusion. *J Vasc Surg* 1998;27:699-709.
31. **Isner JM, Baumgartner I, Rauh G, et al.** Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: preliminary clinical results. *J Vasc Surg* 1998;28(6):964-973.
32. **Baumgartner I, Pieczek A, Manor O et al.** Constitutive expression of phVEGF<sub>165</sub> after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998;97:1114-1123.
33. **Elvert G, Lanz S, Kappel A, Flamme I.** mRNA cloning and expression studies of the quail homologue HIF-2alpha. *Mec of Develop* 1999;87(1-2):193-197.
34. **Ferrara, N.** Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;237:1-30.
35. **Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, et al.** Abnormal blood vessel development in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996;380:435-439.
36. **Ferrara N, Carver Moore K, Chen H, et al.** Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996;380:439-442.
37. **Ferrara N.** The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Angiogenesis. In: Rubanyi, GM. *Angiogenesis in Health and Disease. Basic Mecanisms and Clinical Applications.* New York, Marcel Dekker, Inc, 2000:47-73.
38. **Ferrara N, Gerber HP.** The Vascular Endothelial Growth Factor Family. In: Ware JA, Simons M. *Angiogenesis and Cardiovascular Disease.* New York, Oxford University Press, 1999:101-127.

39. **Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, et al.** Expression of the Fms-Like Tyrosine Kinase 4 Gene Becomes Restricted to Lymphatic Endothelium During Development. *PNAS* 1995;92:3566-3570.
40. **Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z.** Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999;13(1):9-22.
41. **Soker S, Takashima S, Miao HQ, et al.** Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998;92(6):735-45.
42. **Ehsan A, Mann MJ, Dzau VJ.** Gene Therapy for Cardiovascular Disease and Vascular Grafts. In: Templeton NS, Lasic DD. *Gene Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies*. New York, Marcel Dekker, Inc, 2000:421-438.
43. **Pepper MS, Ferrera N, Orci L, Montesano R.** Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;189:824-831.
44. **McCluskey ER.** Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Protein Therapy for Ischemic Coronary Disease. In: Kornomski R, Epstein SE, Leon MB. *Handbook of Myocardial Revascularisation*. London, Martin Dunitz Inc, 2000:119-124.
45. **Lopez J, Laham RJ, Carrozza JC, et al.** Hemodynamic effects of intracoronary delivery VEGF delivery: evidence of tachyphylaxis and NO dependence of response. *Am J of Physiol.* 1997;273:H1317-H1323.
46. **Murohara T, Horowitz JR, Silver M, et al.** Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 1998;97:99-107.

47. **Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, et al.** Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer* 1998;77(6):956-964.
48. **Pinedo HM, Verheul HM, D'Amato RJ, Folkman J.** Involvement of platelets in tumour angiogenesis? *Lancet* 1998;352(9142):1775-1777.
49. **O'Byrne KJ, Dobbs N, Propper D, et al.** Vascular endothelial growth factor platelet counts, and prognosis in renal cancer. *Lancet* 1999;353(9163):1494-1495.
50. **Laham RJ, Simons M.** Basic Fibroblast Growth Factor Protein for Coronary Artery Disease. In: Kornowski R, Epstein SE, Leon MB. *Handbook of Myocardial Revascularisation*. London, Martin Dunitz Inc, 2000:175-187.
51. **Baird A.** Fibroblast Growth Factors and Their Receptors. In: Rubanyi, GM. *Angiogenesis in Health and Disease. Basic Mechanisms and Clinical Applications*. New York, Marcel Dekker, Inc, 2000:75-88.
52. **Semenza GL.** HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J appl Physiol* 2000;88:1474-1480.
53. **Semenza GL.** The human hypoxia-inducible factor-1 alpha gene: HIF-1a structure and evolutionary conservation. *Genomics* 1998;52(2):159-165.
54. **Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al.** Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transcription by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Mol and Cell Biol* 1996;16(9):4604-4613.
55. **Fandrey J.** Hypoxia-inducible gene expression. *Resp Physiol* 1995;101:1-10.
56. **Tian YM, Ratcliffe PJ, Pugh CW.** Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: comparison with hypoxia-inducible factor 1 alpha. *J of Biol Chem* 1999;274(4):2060-2071.

- 57. Maemura K, Hsieh CM, Jain Mk et al.** Generation of dominant-negative mutant of endothelial PAS domain protein 1 by deletion of a potent C-terminal transactivation domain. *J Biol Chem* 1999;274(44):31565-31570.
- 58. Conrad PW, Freeman TL, Beitner-Johnson D.** EPAS1 trans-activation during hypoxia requires p42/p44 MAPK. *J of Biol Chem* 1999;274(47):33709-33713.
- 59. Tian H, McKnight SL, Russel DW.** Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes and Development* 1997;11:72-82.
- 60. Ema M, Taya S, Yokotani N, et al.** A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *PNAS* 1997;94(9):4273-4278.
- 61. Sato M, Tanaka T, Akiyama H, et al.** Endothelial PAS-1 (EPAS-1) Mediates Hypoxic Induction of the PAI-1 Gene Expression: Potential role of EPAS-1 in Tumor Angiogenesis. *Circulation* 2000;102(18):II-328.A
- 62. Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF.** Regulation of the erythropoietin gene: Evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 1988;242:1412-1415.
- 63. Jelkmann W.** Erythropoietin: Structure, control of production and function. *Physiol Rev* 1992;72:449-489.
- 64. Société canadienne de cardiologie.** CONFÉRENCE CONSENSUELLE DE LA SCC SUR LES CARDIOPATHIES ISCHÉMIQUES. *Conférence consensuelle 1997 de la Société canadienne de cardiologie sur l'évaluation et le traitement des cardiopathies ischémiques chroniques*, [En ligne]. <http://www.ccs.ca/index.cfm> (Page consultée le 19 décembre 2000)

- 65. Statistique Canada.** *Le Canada en statistique: population selon l'âge et le sexe*, [En ligne]. [http://www.statcan.ca/francais/Pgdb/People/Population/demo31a\\_f.htm](http://www.statcan.ca/francais/Pgdb/People/Population/demo31a_f.htm) (Page consultée le 19 décembre 2000)
- 66. Yusuf S, Zucker D, Peduzzi P, et al.** Effect of coronary artery bypass graft surgery on survival: Overview of ten-year results from randomized trials by the Coronary Artery Bypass Graft Surgery Trialist Collaboration. *Lancet* 1994;344(8922):563-570.
- 67. Varnauskas E.** European Coronary Surgery Study Group: Twelve-year follow-up of survival in the randomized European Coronary Surgery Study. *N Engl J Med* 1988; 319(6):332-337.
- 68.** Eleven-year survival in the Veterans Administration Randomized Trial of Coronary Bypass Surgery for Stable Angina: Veterans Administration Coronary Artery Bypass Cooperative Study Group. *N Engl J Med* 1984;311(21):1333-1339.
- 69. CASS Principal Investigators and Their Associates.** Coronary Artery Surgery Study (CASS): A randomized trial of coronary artery bypass surgery; survival data. *Circulation* 1983;68: 939-950.
- 70. Norris RM, Agnew TM, Brandt PWT, et al.** Coronary surgery after recurrent myocardial infarction: Progress of a trial comparing surgical and nonsurgical management for asymptomatic patients with advanced coronary disease. *Circulation* 1981; 63(4):785-792.
- 71.** Prospective randomised study of coronary artery bypass surgery in stable angina pectoris. Second interim report by the European Coronary Surgery Study Group. *Lancet* 1980;2(8193):491-495.
- 72. Kloster FE, Kremkau EL, Ritzman LW, et al.** Coronary bypass for stable angina. *N Engl J Med* 1979;300(4):149-157.

- 73. Murphy ML, Hultgren HN, Detre K, et al.** Treatment of chronic stable angina: A preliminary report of survival data of the randomized Veterans Administration Cooperative Study. *N Engl J Med* 1977;297:621-629.
- 74. Mathur VS, Guinn GA.** Prospective randomized study of the surgical therapy of stable angina. *Cardiovasc Clin* 1977;8:131-144.
- 75. Schaper W, Piek JJ, Munoz-Chapuli R, et al.** Collateral Circulation of the Heart. In: Ware JA, Simons M. *Angiogenesis And Cardiovascular Disease*. New York, Oxford University Press, 1999:159-198.
- 76. Isner JM.** *Manipulating Angiogenesis Against Vascular Disease*, [On line], <http://www.hospract.com/issues/1999/06/isner.htm> (Page consultée le 20 décembre 2000)
- 77. Matsunaga T, Waltier DC, Weihrauch DW, et al.** Ischemia-Induced Coronary Collateral Growth Is Dependent on Vascular Endothelial Growth Factor and Nitric Oxide. *Circulation* 2000;102:3098-3103.
- 78. Vincent KA, Shyu KG, Luo Y, et al.** Angiogenesis Is Induced in a Rabbit Model of Hindlimb Ischemia by Naked DNA Encoding an HIF-1/VP16 Hybrid Transcription Factor. *Circulation* 2000;102:2255-2261.
- 79. Gowdak LH, Poliakova L, Wang X, et al.** Adenovirus-mediated VEGF(121) gene transfer stimulates angiogenesis in normoperfused skeletal muscle and preserves tissue perfusion after induction of ischemia. *Circulation* 2000;102(5):565-571.
- 80. Aoki M, Morishita R, Taniyama Y, et al.** Angiogenesis induced by hepatocyte growth factor in non-infarcted myocardium and infarcted myocardium: up-regulation of essential transcription factor for angiogenesis. *Gene Ther* 2000;7(5):417-427.

- 81. Lee LY, Patel SR, Hackett NR, et al.** Focal angiogen therapy using intramyocardial delivery of an adenovirus vector coding for vascular endothelial growth factor <sub>121</sub>. *Ann Thorac Surg* 2000;69(1):14-23.
- 82. Hayashi S, Morishita R, Nakamura S, et al.** Potential Role of Hepatocyte Growth Factor, a Novel Angiogenic Growth Factor, in Peripheral Arterial Disease: Downregulation of HGF in Response to Hypoxia in Vascular Cells. *Circulation* 1999;100:II-301-II-308.
- 83. Safi J, DiPaula AF, Riccioni T, et al.** Adenovirus-mediated acidic fibroblast growth factor gene transfer induces angiogenesis in the nonischemic rabbit heart. *Microvasc Res* 1999;58(3):238-249.
- 84. Garcia-Martinez C, Opolon P, Trochon, et al.** Angiogenesis induced in muscle by a recombinant adenovirus expressing functional isoforms of basic fibroblast growth factor. *Gene Ther* 1999;6(7):1210-21.
- 85. Rivard A, Silver M, Chen D, et al.** Rescue of diabetes-related impairment of angiogenesis by intramuscular gene therapy with adeno-VEGF. *Am J Pathol* 1999;154:355-363.
- 86. Shyu KG, Manor O, Magner M, et al.** Direct intramuscular injection of plasmid DNA encoding angiopoietin-1 but not angiopoietin-2 augments revascularisation in the rabbit ischemic hindlimb. *Circulation* 1998;98:2081-2987.
- 87. Tabata H, Silver M, Isner JM.** Arterial gene transfer of acidic fibroblast growth factor for therapeutic angiogenesis in vivo: critical role of secretion signal in use of naked DNA. *Cardiovasc Res* 1997;35(3):470-479.
- 88. Lopez JJ, Simons M.** Local extravascular growth factor delivery in myocardial ischemia. *Drug Delivery* 1996;3:143-147.

- 89. Takeshita S, Weir L, Chen D, et al.** Therapeutic angiogenesis following arterial gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of hindlimb ischemia. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;227(2):628-635.
- 90. Takeshita S, Tsurumi Y, Couffinahl T, et al.** Gene transfer of naked DNA encoding for three isoforms of vascular endothelial growth factor stimulates collateral development in vivo. *Lab Invest* 1996;75(4):487-501.
- 91. Muhlhauser J, Merrill MJ, Pili R, et al.** VEGF<sub>165</sub> expressed by a replication-deficient recombinant adenovirus vector induces angiogenesis in vivo. *Circ Res* 1995;77(6):1077-1086.
- 92. White F, Carroll S, Magnet A, et al.** Coronary collateral growth development in swine after coronary artery occlusion. *Circ Res* 1992;71:1490-1500.
- 93. Wolf C, Cai WJ, Volschute R, et al.** Vascular remodeling and altered protein expression during growth or coronary collateral circulation. *J Moll Cell Cardiol* 1998;30:2291-2305.
- 94. Gibson CM, Ryan K, Sparano A, et al.** Angiographic methods to assess human coronary angiogenesis. *Am Heart J* 1999;137:169-179.
- 95. Sasayama S, Fujita M.** Recent insights into coronary collateral circulation. *Circulation* 1992;85:1197-1204.A
- 96. Simons M, Bonow RO, Chronos NA, et al.** Clinical Trials in Coronary Angiogenesis: Issues, Problems, Consensus. *Circulation* 2000;102:e73-e86.
- 97. Kornowski R, Fuchs S, Leon M, et al.** Delivery Strategies to Achieve Therapeutic Myocardial Angiogenesis. *Circulation* 2000;101:454-458.
- 98. Losordo DW, Vale PR, Isner JM.** Gene therapy for myocardial angiogenesis. *Am Heart J* 1999;138:s132-s141.

- 99. Giordano FJ, Ping P, McKirnan MD, et al.** Intracoronary transfer of fibroblast growth factor-5 increases blood flow and contractile function in an ischemic region of the heart. *Nat Med* 1996;2:534-539.
- 100. Mulhhauser J, Jones M, Yamada I, et al.** Safety and efficacy of in vivo gene transfer into the porcine heart with replication-deficient, recombinant adenovirus vectors. *Gene Ther* 1996;3:145-153.
- 101. Laham RJ, Rezaee M, Post M, et al.** Intracoronary and intravenous administration of basic fibroblast growth factor: myocardial and tissue distribution. *Drug Metab Dispos* 1999;27:821-826.
- 102. Laham RJ, Rezaee M, Garcia L, et al.** Tissue and myocardial distribution of intracoronary, intravenous, intrapericardial and intramyocardial I<sub>115</sub>-labeled basic fibroblast growth factor (bFGF) favor intramyocardial delivery. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:10A.
- 103. Mazue G, Bertolero F, Jacob C, et al.** Preclinical and clinical studies with recombinant human basic fibroblast growth factor. *Ann N Y Acad Sci* 1991;638:329-340.
- 104. Cuevas P, Carcellar F, Ortega S, et al.** Hypotensive activity of fibroblast growth factor. *Science* 1991;254:1208-1210.
- 105. Li B, Ogasawara AK, Yang R, et al.** KDR (VEGF receptor 2) is the mediator for the **Hypotensive effect of VEGF.** *Hypertension* 2002;39(6):1095-1100.
- 106. Nabel EG, Yang ZY, Plautz G, et al.** Recombinant growth factor-1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries in vivo. *Nature* 1993;362:844-846.
- 107. Sueishi K, Kumamoto M, Sakuda H, et al.** Angiogenic processes in the pathogenesis of human coronary atherosclerosis. *Curr Top Pathol* 1993;87:47-58.

- 108. Moulton KS, Heller E, Konerding MA, et al.** Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularisation and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 1999;99:1726-1732.
- 109. Libby P, Sukhova G, Lee RT, et al.** Cytokines regulates vascular functions related to stability of the atherosclerosis plaque. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;25:s9-s12.
- 110. O'Brien ER, Garvin MR, Dev R, et al.** Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 1994;145:883-894.
- 111. Celletti FL, Hilfiker PR, Ghafouri, et al.** Effect on human recombinant vascular endothelial growth factor 165 on progression of atherosclerosis plaque. *J Am Coll Cardiol* 2001;37(8):2126-30.
- 112. Aiello LP, Bursell SE, Clermont A, et al.** Vascular endothelial growth factor-induced retinal permeability is mediated by protein kinase C in vivo and suppressed by an orally effective beta-isoform-selective inhibitor. *Diabetes* 1997;46:1473-1480.
- 113. Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, et al.** Increased endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1994;118:445-450.
- 114. Folkman J.** Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nat Med* 1995;1:27-31.
- 115. Passaniti A, Taylor RM, Pili R, et al.** A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest* 1992;67:519-28.
- 116. Jain RK, Schlenger K, Hockel M, et al.** Quantitative angiogenesis assays: progress and problems. *Nat Med* 1997:1203-8.

117. **Hooper KA, Nickolas TL, Yurkov EJ, et al.** Characterization of the inflammatory response to biomaterials using a rodent air pouch model. *J Biomed Mater Res* 2000;50:365-74.
118. **Ribatti D, Qualandris A, Bastaki M, et al.** New model for the study of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane: the gelatin sponge/chorioallantoic membrane assay. *J Vasc Res* 1997;34:455-63.
119. **Couffinhal T, Silver M, Lu P, et al.** Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol* 1998;152:1667-79.
120. **Pu LQ, Jackson S, Lachapelle KJ, et al.** Persistent Hindlimb Ischemia Model in the Rabbit. *J Invest Surg* 1994;7:49-60
121. **Ye J, Yang L, Sethi R, et al.** A new technique of coronary ligation: Experimental myocardial infarction in rats *in vivo* with reduced mortality. *MolCell Biochem* 1997;176:227-33.
122. **Lopez JJ, Laham RJ, Stamler A, et al.** VEGF administration in chronic myocardial ischemia in pigs. *Cardiovasc Res* 1998;40(2):272-81.
123. **Rosengart TK, Budenbenker KT, Duenas M, et al.** Therapeutic angiogenesis: a comparative study of the angiogenic potential of acidic fibroblast growth factor and heparin. *J Vasc Surg* 1997;26:302-312.
124. **Yang HT, Deschesnes MR, Ogilvie RW, Terjung RT.** Basic fibroblast growth factor increases collateral blood flow in rats with femoral artery ligation. *Cir Res* 1996;79:62-69.
125. **Asahara T, Bauters C, Zheng LP, et al.** Synergic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis *in vivo*. *Circulation* 1995;II-365-II-371.
126. **Chleboun JO, Martins RN.** The development and enhancement of the collateral circulation in an animal model of lower limb ischemia. *Aust N Z J Surg* 1994;64:202-207.

127. **Harada K, Grossman W, Fridman M, et al.** Basic fibroblast growth factor improves myocardial function in chronically ischemic porcine heart. *J Clin Invest* 1994;94:623-630.
128. **Battler A, Scheinowitz M, Bor A, et al.** Intracoronary injection of basic fibroblast growth factor enhances angiogenesis in infarcted swine myocardium. *J Am Coll Cardiol* 1993;22:2001-2006.
129. **Baffour R, Berman J, Garg JL, et al.** Enhanced angiogenesis and growth of collaterals by *in vivo* administration of basic fibroblast growth factor in a rabbit model of acute lower limb ischemia: dose-response effect of basic fibroblast growth factor. *J Vasc Surg* 1992;161:181-191.
130. **Takeshita S, Weir L, Chen D, et al.** Therapeutic angiogenesis following arterial gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of hindlimb ischemia. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 14;227(2):628-635.
131. **Takeshita S, Pu LQ, Stein LA, et al.** Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induces dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia. *Circulation* 1994;90:II228-234.
132. **Rivard A, Fabre JE, Silver M, et al.** Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation* 1999;99(1):111-20.
133. **Couffinhal T, Silver M, Kearney M, et al.** Impaired collateral vessel development associated with reduced expression of vascular endothelial growth factor in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Circulation* 1999;99(24):3188-98.
134. **Duan J, Murohara T, Ikeda H, et al.** Hypercholesterolemia Inhibits Angiogenesis in Response to Hindlimb Ischemia : Nitric Oxide-Dependent Mechanism. *Circulation* 2000;102[Suppl III]:III-370-III-376.

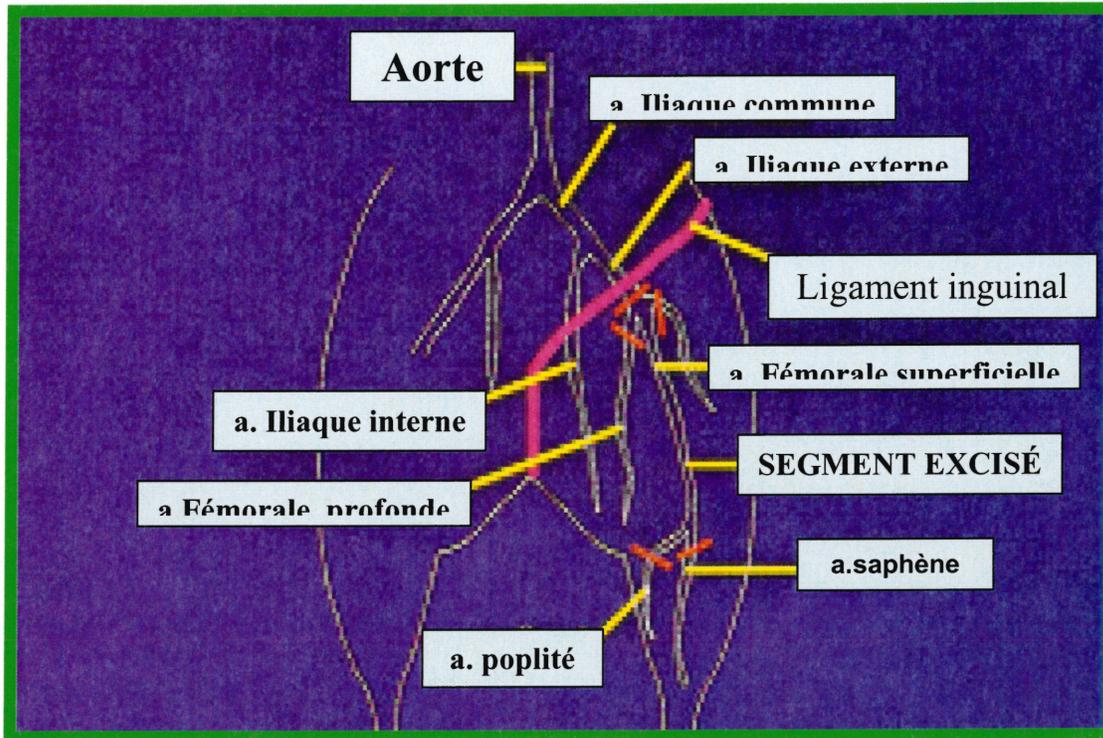
- 135. Jang JJ, Ho HV, Kwan HH, et al.** Angiogenesis Is Impaired by Hypercholesterolemia : Role of Asymmetric Dimethylarginine. *Circulation* 2000;102:1414-1419.
- 136. Banai S, Jaklitsch MT, Shou M, et al.** Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation* 1994;89(5):2183-9.
- 137. Pearlman JD, Hibberd MG, Chuang ML, et al.** Magnetic resonance mapping demonstrates benefits of VEGF-induced myocardial angiogenesis. *Nat Med* 1995;1(10):1085-9.
- 138. Giorgano F, Ross JJ, Peterson K, et al.** Intravenous or intracoronary VEGF ameliorates chronic myocardial ischemia. *Circulation* 1998;98:I-455.A
- 139. McCluskey ER.** VEGF protein for coronary artery disease. At: Clinical Angiogenesis: The Mini-Summit. Dallas, Texas: Cleveland Clinic Foundation, 1998.
- 140. Laham RJ, Sellke FW, Edelman ER, et al.** Local perivascular delivery of basic fibroblast growth factor in patients undergoing coronary bypass surgery: results of a phase I randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Circulation* 1999; 100:1865-71.
- 141. Vale PR, Losordo DW, Milliken CE, et al.** Randomized, single-blind, placebo-controlled pilot study of catheter-based myocardial gene transfer for therapeutic angiogenesis using left ventricular electromechanical mapping in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2001;103:2138-43.
- 142. Henry TD, McKendall GR, Azrin MA, et al.** VIVA trial: One year follow-up. *Circulation* 2000;102:II-309. A
- 143. Simons M, Annex BH, Laham RJ, et al.** Pharmacological treatment of coronary artery

disease with recombinant fibroblast growth factor-2 : double-blind, randomized, controlled trial. *Circulation* 2002;105:788-93.

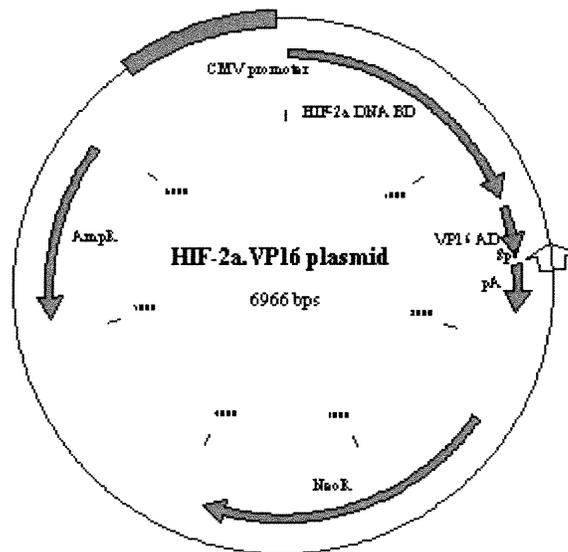
- 144. Ruel M, Laham RJ, Anthony Parker J, et al.** Long-term effects of surgical angiogenic therapy with fibroblast growth factor 2 protein. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;124:28-34.
- 145. Theory of Laser Doppler Imagers and Monitors.** *Basic Theory and Operating Principles of Laser Blood Flow Monitoring and Imaging*, [En ligne].  
[http://www.moor.co.uk/laser doppler theory.htm](http://www.moor.co.uk/laser%20doppler%20theory.htm). (Page consultée le 6 juillet 2002)
- 146. Scanner Laser LISCA.** *Comment fonctionne un Laser Doppler*, [En ligne].  
<http://www.perimed.fr/>. (Page consultée le 6 juillet 2002)
- 147. Hoefler IE, van Royen N, Rectenwald JE, et al.** Direct evidence for tumor necrosis factor-alpha signaling in arteriogenesis. *Circulation* 2002;105:1639-41.
- 148. Ring F.** Infrared Laser Doppler Imaging - Skin Temperature and Perfusion Study. *7th European Congress of Thermology* 2002 (Abstract Poster).
- 149. Gugleta K, Orgul S, Flammer I, et al.** Reliability of confocal choroidal laser Doppler flowmetry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:723-8.
- 150. Gilbert R, Nalbantoglu J, Massie B, et al.** Efficient utrobin expression following adenovirus gene transfer in dystrophic muscle. *Biochem Biophys Res Comm* 1998;242:244-247.
- 151. Lasic DD, Templeton NS.** Bioorganic Colloids: Macromolecules, DNA, Self-Assembled Particles, and Their Complexes. In: Templeton NS, Lasic DD. *Gene Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies*. New York, Marcel Dekker, Inc, 2000:241-266.
- 152. Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, et al.** Clinical evidence of angiogenesis following arterial gene transfer of phVEGF<sub>165</sub>. *Lancet* 1996;348:370-374.

- 153. Tian H, McKnight SL, Russell.** Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS 1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes & Dev* 1997;11: 72-82.
- 154. Pugh CW, O'Rourke JF, Nagamo M, et al.** Activation of Hypoxia-inducible Factor-1; Definition of Regulatory Domains within the  $\alpha$ -Subunit. *J Biol Chem* 1997;272:11205-11214.
- 155. Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW.** Transactivation and Inhibitory Domains of Hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$ . Modulation of Transcriptional Activity by Oxygen Tension. *J Biol Chem* 1997;272:19253-19260.
- 156. Couffignal T, Silver M, Kearny M, et al.** Angiogenesis is Impaired in ApoE Knock Out Mice Due to Reduced Expression of Vascular Endothelial Growth Factor. *Circulation* 1996;94(8):I-589A.
- 157. Voisine P, Kermani P, Bigras G, et al.** Direct intramyocardial administration of AdVEGF, TMR or both to induce angiogenesis in ischemic myocardium, soumis.
- 158. Kornowski R, Epstein SE, Leon MB.** Handbook of Myocardial Revascularization and Angiogenesis. London, Martin Dunitz Ltd, 2000:169.

## Annexes

Anatomie vasculaire de la patte de derrière de lapin.<sup>158</sup>

## Annexes

Plasmide HIF-2 $\alpha$ VP16

## Annexes

Expérience 1 :

Tableau A

VEGF					HIF-1 $\alpha$				
Souris	R0	R7	R14	R21	Souris	R0	R7	R14	R21
3	0,09	0,94	<b>1,95</b>	<b>1,11</b>	6	0,09	0,13	0,34	0,27
5	0,21	<b>1,61</b>	0,76	<b>3,17</b>	11	0,03	0,29	<b>1,10</b>	0,96
8	0,07	0,20	<b>1,01</b>	<b>3,94</b>	19	0,1	0,61	0,49	0,41
10	0,07	nd	nd	nd	24	0,05	0,19	0,62	0,63
15	0,06	0,19	0,95	0,47	27	0,17	0,71	0,52	<b>1,18</b>
16	0,04	0,26	0,26	0,42	29	0,12	0,76	0,83	nd
17	0,1	0,12	nd	0,90	30	0,24	<b>1,50</b>	<b>1,76</b>	<u>0,36</u>
22	0,06	0,16	<b>1,33</b>	0,49	32	0,06	0,14	0,76	0,99
35	0,12	<b>1,14</b>	nd	nd	36	0,09	nd	nd	nd
37	0,05	0,89	0,29	0,27	38	0,05	0,80	<b>1,45</b>	<u>0,38</u>
Moy.	<b>0,09</b>	<b>0,61</b>	<b>0,94</b>	<b>1,35</b>	Moy.	<b>0,10</b>	<b>0,57</b>	<b>0,87</b>	<b>0,65</b>
É.-t.	<b>0,05</b>	<b>0,55</b>	<b>0,59</b>	<b>1,41</b>	É.-t.	<b>0,06</b>	<b>0,44</b>	<b>0,48</b>	<b>0,35</b>

HIF-2 $\alpha$					PLASMIDE VIDE				
Souris	R0	R7	R14	R21	Souris	R0	R7	R14	R21
4	0,05	<b>1,11</b>	0,93	nd	1	0,07	1,37	nd	nd
9	0,15	0,19	<b>1,61</b>	0,95	2	0,05	nd	nd	nd
18	0,08	0,67	0,25	<u>0,19</u>	7	0,22	0,14	0,99	<b>0,92</b>
21	0,08	<b>1,21</b>	<b>1,34</b>	0,88	12	0,05	0,26	0,34	0,33
23	0,09	<b>1,24</b>	0,75	0,98	13	0,14	0,25	0,91	<b>1,42</b>
25	0,13	<b>1,34</b>	0,49	0,64	14	0,07	0,40	0,40	nd
26	0,08	0,43	<b>1,78</b>	<b>1,07</b>	20	0,05	0,26	0,58	<b>2,04</b>
33	0,12	0,99	0,24	0,31	28	0,1	0,84	<b>1,37</b>	0,91
34	0,15	0,34	<b>1,74</b>	0,82	31	0,09	0,37	0,88	0,85
39	0,1	0,32	0,91	<b>1,00</b>	40	0,15	0,88	0,95	0,87
Moy.	<b>0,10</b>	<b>0,78</b>	<b>1,00</b>	<b>0,76</b>	Moy.	<b>0,10</b>	<b>0,53</b>	<b>0,80</b>	<b>1,05</b>
É.-t.	<b>0,03</b>	<b>0,44</b>	<b>0,59</b>	<b>0,32</b>	É.-t.	<b>0,06</b>	<b>0,41</b>	<b>0,34</b>	<b>0,54</b>

(En gras ou rouge: cas répertoriés d'inflammation; Souligné: aberrations)

## Annexes

**Expérience 1 : suite****Tableau B**

	HIF-2 $\alpha$		Plasmide vide	
	Két.-midaz.	Penthiobarbital	Két.-midaz.	Penthiobarbital
Anesthésie	2,41 (9)	0,72 (18)	0,51 (20)	0,63 (7)
	0,56 (26)	0,84 (21)	0,75 (28)	0,34 (12)
	1,11 (33)	0,76 (23)	0,28 (31)	0,52 (13)
	0,7 (34)	0,78		0,58 (40)
	0,53 (36)	--		
Moyenne $\pm$ écart-type	1,06 $\pm$ 0,84	0,78 $\pm$ 0,05	0,51 $\pm$ 0,24	0,52 $\pm$ 0,13

Entre parenthèses: numéro de la souris

## Annexes

Expérience 2 :

Tableau C

Souris	VEGF				HIF-1 $\alpha$				
	R7	R14	R21	R28	Souris	R7	R14	R21	R28
5	0,43	0,47	0,75	<u>2,57</u>	1	0,87	<b>1,61</b>	0,74	0,39
6	0,43	0,71	<b>1,04</b>	<b>1,04</b>	11	0,27	0,37	0,72	0,78
7	0,92	0,74	0,66	0,74	15	0,40	<b>1,15</b>	0,67	<u>2,96</u>
9	0,98	<b>1,09</b>	0,73	0,42	17	0,19	0,88	<b>0,41</b>	0,75
10	0,47	0,71	<b>1,25</b>	0,79	20	<b>1,16</b>	0,90	<u>3,51</u>	0,65
12	0,38	0,48	0,68	<b>1,03</b>	23	0,74	0,88	0,53	0,70
13	<b>1,16</b>	0,73	0,54	0,51	31	0,24	0,39	0,40	0,62
26	0,63	0,59	0,47	0,81	33	0,52	0,62	0,89	0,89
28	0,43	0,39	0,66	0,58	35	0,42	0,33	0,47	0,88
32	0,50	0,84	0,51	<b>1,19</b>	36	0,44	0,38	0,32	0,79
Moy.	<b>0,63</b>	<b>0,68</b>	<b>0,73</b>	<b>0,97</b>	Moy.	<b>0,53</b>	<b>0,75</b>	<b>0,87</b>	<b>0,94</b>
É.-t.	<b>0,28</b>	<b>0,20</b>	<b>0,24</b>	<b>0,61</b>	É.-t.	<b>0,31</b>	<b>0,42</b>	<b>0,95</b>	<b>0,72</b>

Souris	HIF-2 $\alpha$				Plasmide vide				
	R7	R14	R21	R28	Souris	R7	R14	R21	R28
2	0,82	0,84	0,63	0,47	14	0,46	<b>1,04</b>	<b>1,37</b>	0,88
3	0,51	<b>1,20</b>	<b>1,10</b>	0,78	16	<b>1,17</b>	<u>2,18</u>	<u>0,35</u>	0,79
4	0,70	nd	nd	nd	19	0,81	<b>1,28</b>	<b>1,29</b>	<u>0,39</u>
8	0,63	<u>2,05</u>	<b>1,69</b>	<b>1,67</b>	22	0,52	0,70	<b>3,47</b>	0,62
18	0,90	0,86	<b>1,34</b>	0,88	27	0,35	0,53	0,56	0,83
21	0,24	0,74	0,62	0,67	29	0,68	0,75	0,60	<b>1,11</b>
24	0,44	0,50	0,59	<b>1,01</b>	30	0,87	0,69	0,43	0,96
25	0,44	0,50	0,40	0,58	37	0,30	0,54	0,58	0,64
34	0,71	1,00	0,77	<b>1,19</b>	38	0,47	0,39	0,52	0,64
39	0,24	0,39	0,75	0,58	40	0,85	<b>1,00</b>	0,48	0,46
Moy.	<b>0,56</b>	<b>0,90</b>	<b>0,88</b>	<b>0,87</b>	Moy.	<b>0,65</b>	<b>0,91</b>	<b>0,97</b>	<b>0,73</b>
É.-t.	<b>0,23</b>	<b>0,50</b>	<b>0,42</b>	<b>0,38</b>	É.-t.	<b>0,28</b>	<b>0,52</b>	<b>0,95</b>	<b>0,22</b>

En gras ou rouge: cas répertoriés d'inflammation. Souligné: aberrations)

## Annexes

**Expérience 3 :****Tableau D**

<b>Groupes</b>	<b>Jour 3</b>	<b>Jour 7</b>	<b>Jour 14</b>
<b>Plasmide 1 µg</b>	0,24 ± 0,12	0,64 ± 0,32	0,73 ± 0,30
<b>Plasmide 4 µg</b>	0,29 ± 0,06	0,50 ± 0,23	0,84 ± 0,26
<b>Plasmide 10 µg</b>	0,27 ± 0,09	0,61 ± 0,35	1,12 ± 0,59
<b>Plasmide VEGF</b>	0,25 ± 0,10	0,62 ± 0,04	0,90 ± 0,34
<b>Contrôle</b>	0,23 ± 0,08	0,59 ± 0,32	0,58 ± 0,25

**Expérience 4 :****Tableau E**

<b>Groupes</b>	<b>Jour 3</b>	<b>Jour 7</b>	<b>Jour 10</b>	<b>Jour 14</b>
<b>Pl. VEGF</b>	0,27 ± 0,13	0,33 ± 0,03	0,38 ± 0,14	0,74 ± 0,59
<b>Plasm. vide</b>	0,24 ± 0,13	0,29 ± 0,06	0,55 ± 0,40	0,76 ± 0,18
<b>Adéno-VEGF</b>	0,13 ± 0,09	0,25 ± 0,10	0,40 ± 0,24	0,45 ± 0,21
<b>Groupes</b>	<b>Jour 18</b>	<b>Jour 24</b>	<b>Jour 28</b>	<b>Jour 37</b>
<b>Pl. VEGF</b>	0,75 ± 0,20	0,82 ± 0,22	1,12 ± 0,56	0,49 ± 0,05
<b>Plasm. vide</b>	0,96 ± 0,09	0,68 ± 0,12	1,05 ± 0,97	0,50 ± 0,06
<b>Adéno-VEGF</b>	0,61 ± 0,23	0,80 ± 0,13	0,93 ± 0,32	0,43 ± 0,09

## Annexes

**Expérience 5 :**

Tableau F

Groupes	Jour 3	Jour 9	Jour 14	Jour 21
Pl. VEGF	0,15 ± 0,03	0,49 ± 0,19	0,86 ± 0,22	0,76 ± 0,27
Pl. HIF-2 $\alpha$	0,14 ± 0,03	0,50 ± 0,05	0,89 ± 0,12	0,80 ± 0,12
Plasm. vide	0,14 ± 0,06	0,56 ± 0,08	0,73 ± 0,24	0,72 ± 0,12
Contrôle	0,37 ± 0,37	0,72 ± 0,17	0,74 ± 0,15	0,67 ± 0,16

Groupes	Jour 25	Jour 30	Jour 37	Jour 45
Pl. VEGF	0,56 ± 0,09	0,67 ± 0,05	0,69 ± 0,08	0,63 ± 0,22
Pl. HIF-2 $\alpha$	0,62 ± 0,16	0,82 ± 0,36	0,79 ± 0,06	0,80 ± 0,13
Plasm. vide	0,62 ± 0,22	0,70 ± 0,15	0,67 ± 0,14	0,67 ± 0,07
Contrôle	0,62 ± 0,16	0,73 ± 0,27	0,78 ± 0,24	0,78 ± 0,29

**Expérience 6 :**

Tableau G

Groupes	Jour 3	Jour 10	Jour 17	Jour 24
Pl. VEGF	0,34 ± 0,06	0,66 ± 0,13	0,64 ± 0,31	0,89 ± 0,22
Pl. HIF-2 $\alpha$	0,23 ± 0,07	0,64 ± 0,20	0,70 ± 0,33	1,13 ± 0,45
Plasm. Vide	0,22 ± 0,06	0,80 ± 0,22	0,65 ± 0,23	0,99 ± 0,19
Contrôle	0,24 ± 0,10	1,00 ± 0,27	0,98 ± 0,44	1,08 ± 0,31

Groupes	Jour 30	Jour 37	Jour 45
Pl. VEGF	0,64 ± 0,11	0,68 ± 0,23	0,76 ± 0,31
Pl. HIF-2 $\alpha$	0,89 ± 0,28	0,72 ± 0,14	0,68 ± 0,23
Plasm. Vide	0,75 ± 0,12	0,77 ± 0,14	0,69 ± 0,08
Contrôle	0,83 ± 0,14	0,87 ± 0,11	0,74 ± 0,12

## Annexes

Densité vasculaire:

Tableau H

Groupes	Normale	Salin	Plasm.vide	Pl.VEGF	HIF- 2 $\alpha$
	4	2,67	3	3,17	6,5
	5,33	3	2,83	4,5	5,67
	1,5	1,17	3,33	4	3,33
	3,17	5,17	2,5	3,67	5,33
<b>Moyenne</b>	3,50	3,00	2,92	3,84	5,21
<b>Écart-type</b>	1,60	1,65	0,35	0,56	1,34

Valeurs: nombre de vaisseaux (moyenne des trois champs et des deux observateurs).