

Université de Montréal

Rôle de VEGF<sub>165</sub> dans l'ischémie myocardique et  
lors de radiation ionisante des cellules endothéliales

Par

Pouneh Kermani

Programme de biologie moléculaire  
Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
En vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)  
En biologie moléculaire



Septembre 2001©

QH  
506  
U54  
2001  
v. 019

□

○

RECEIVED

∪

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Rôle de VEGF<sub>165</sub> dans l'ischémie myocardique et  
lors de radiation ionisante des cellules endothéliales

Présentée par:  
Pouneh Kermani

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Président de jury: Dr. Anne-Marie Mes-Masson

Membre de jury: Dr. Denis DeBlois

Examineur externe: Dr. Lorraine Chalifour

Directeur de recherche: Dr. Guy Leclerc

Co-directeur: Dr. Bernard Massie

Thèse acceptée le:

## Sommaire

Les maladies cardiovasculaires en général, et l'athérosclérose, en particulier, sont parmi les principales causes de mortalité et de morbidité dans les pays industrialisés. Cette maladie est actuellement traitée à l'aide de différents agents pharmaceutiques ou d'interventions telles que l'angioplastie coronarienne et enfin le pontage coronarien. Cependant, dans la majorité des cas, la récurrence engendrée par ces traitements nécessite des réinterventions souvent beaucoup plus complexes. L'occlusion graduelle des artères coronaires engendre le développement de nouveaux vaisseaux sanguins appelés les vaisseaux collatéraux, représentant une réponse adaptative à un environnement ischémique. Ce phénomène est appelé angiogénèse. On définit l'angiogénèse comme l'ensemble des processus menant à la formation de nouveaux capillaires sanguins par l'excroissance ou le bourgeonnement de vaisseaux préexistants. Il fait intervenir la migration, la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales sous le contrôle de facteurs de croissance tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) et les molécules de la matrice extracellulaire.

Le facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF), facteur agissant exclusivement sur les cellules endothéliales en activant les récepteurs Flk-1/KDR (VEGFR2) et Flt-1 (VEGFR1), est impliqué activement dans l'angiogénèse en réponse aux conditions ischémiques ainsi que dans la reconstitution de l'intégrité de l'endothélium vasculaire suite à un traumatisme telle que l'angioplastie. Des

études expérimentales et cliniques ont démontré que l'administration extrinsèque du VEGF, sous forme protéinique ou génique, pouvait d'une part remédier aux effets de l'ischémie et d'autre part avoir un effet préventif sur la réendothélisation post-angioplastie. Une nouvelle procédure thérapeutique qui a récemment été appliquée dans des études cliniques est l'utilisation du laser transmyocardique ou TMR. Le principe de la technique du TMR implique l'utilisation de laser à haute énergie afin de créer des canaux transmyocardique dans le tissu ischémique.

Mis à part le rôle de VEGF dans les conditions d'hypoxie et d'ischémie, il a également été démontré que ce facteur pouvait jouer un rôle important dans la survie des cellules hématopoïétiques lors d'une irradiation. Le but de cette thèse consiste à : 1) étudier le rôle angiogénique de VEGF<sub>165</sub> et l'effet thérapeutique potentiel du TMR dans des conditions d'ischémie myocardique dans le modèle porcine. 2) d'évaluer le rôle de VEGF<sub>165</sub> sur la prolifération, la différenciation ainsi que l'expression du récepteur VEGFR2 chez les cellules endothéliales exposées à une irradiation (particules bêta).

Nous avons ainsi montré que l'adénovirus humain rendu déficient pour la réplication, peut servir de vecteur pour le transfert de gènes thérapeutiques, comme le VEGF. Ces vecteurs peuvent être amplifiés à des titres élevés et administrés directement *in vivo*. L'administration des adénovirus exprimant le gène VEGF<sub>165</sub> a conduit au développement de nouveaux vaisseaux collatéraux sans cependant améliorer la fonction et la perfusion myocardique dans un modèle porcine d'ischémie myocardique. Cependant, nos résultats n'ont démontré aucune

augmentation significative de la densité capillaire ainsi que de l'amélioration de la fonction myocardique dans le groupe traité avec le TMR.

D'autre part, nous avons démontré que les radiations bêta inhibent la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales et augmentent l'expression du récepteur VEGFR2 sur ces cellules. VEGF<sub>165</sub>, exprimé par les vecteurs adénoviraux, est capable d'améliorer la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales dans les conditions de radiations bêta.

Nos résultats suggèrent que les maladies acquises telles que les maladies cardiovasculaires pourraient bénéficier d'une thérapie par adénovirus.

De plus, dans les conditions environnementales stressantes, telle que l'exposition aux radiations ionisantes, VEGF<sub>165</sub> semble activer la prolifération des cellules endothéliales, entraînant un maintien de la fonction endothéliale.

**Table des matières**

<b>Sommaire</b> .....	I
<b>Liste des tableaux</b> .....	IX
<b>Liste des figures</b> .....	X
<b>Liste des abréviations</b> .....	XIII
<b>Chapitre 1 : Introduction</b> .....	2
<b>A. Pathogénèse de l'athérosclérose</b> .....	2
<b>B. Développement vasculaire</b> .....	5
B.1. Vasculogénèse .....	5
B.2. Angiogénèse .....	8
B.2.1. Dégradation de la matrice extracellulaire .....	10
B.2.2. Migration des cellules endothéliales .....	11
B.2.3. Prolifération des cellules endothéliales: Principaux facteurs de croissance impliqués dans le phénomène d'angiogénèse.....	14
B.2.3.1. Transforming Growth Factors .....	15
B.2.3.2. Platelet Derived Growth Factor .....	16
B.2.3.3. Famille des peptides FGFs.....	17
B.2.3.3a. Récepteurs de FGF .....	18

B.2.3.4. Famille des peptides VEGF .....	19
B.2.3.4a. Structure du gène de VEGF .....	21
B.2.3.4b. Autres membres de la famille des VEGFs.....	23
B.2.3.4c. Structure des récepteurs de VEGF .....	25
B.2.3.4d. Interaction entre les récepteurs VEGF et leurs ligands .....	28
B.2.3.4e. Fonctions cellulaires des récepteurs VEGF .....	28
B.2.3.4f. Distribution et expression des récepteurs de VEGF.....	29
B.2.3.4g. Régulation de VEGF dans les conditions d'hypoxie.....	31
B.2.3.4h. Récepteur Neuropiline-1 .....	33
B.2.3.5. Angiopoïétine-1 .....	35
B.2.3.6. Angiopoïétine-2 .....	36
B.2.3.7. Récepteurs Tie-1 et Tie-2/TEK .....	38
B.2.4. Molécules d'adhésion .....	39
B.2.5. Inhibiteurs de l'angiogénèse .....	41
B.2.6 Effet des facteurs angiogéniques dans les conditions d'ischémie ....	42
B.2.6.1. Études animales .....	42
B.2.6.2 Études cliniques .....	45
<b>C. Thérapie des maladies ischémiques .....</b>	<b>47</b>
C.1. Approche biologique : thérapie génique.....	48
C.1.1. Adénovirus : vecteur de gènes .....	49
C.1.1.1 Principes d'obtention d'un vecteur adénoviral .....	51
C.2. Approche mécanique : Laser transmyocardique ou TMR .....	54



<b>D. Fonction endothéliale et radiation ionisante</b> .....	57
D.1. Resténose.....	57
D.1.1. Hyperplasie intimale.....	58
D.1.2. Remodelage vasculaire.....	61
D.1.3. Retour élastique « Elastic recoil » .....	62
D.1.4. Dépôt de la matrice extracellulaire.....	62
D.2. Thérapie de la resténose .....	63
D.2.1. Approche pharmaceutique.....	63
D.2.2. Prothèse endovasculaire « Stent » .....	64
D.2.3. Livraison locale d'oligonucléotides antisens.....	64
D.2.4. Radiothérapie.....	65
<b>Hypothèses de travail</b> .....	71
 Chapitre 2: Directintraamyocardial administration of AdVEGF, TMR or both to induce angiogenesis in ischemic myocardium.....	75
Abstract .....	76
Introduction .....	79
Methods.....	80
Results .....	88
Discussion .....	92
References .....	100

<b>Chapitre 3 : Cellular Effects of <math>\beta</math>-Particle Delivery on Vascular Smooth Muscle Cells and Endothelial Cells A Dose-Response Study .....</b>	<b>112</b>
Abstract .....	114
Introduction .....	115
Methods .....	116
Results .....	121
Discussion .....	124
Acknowledgements .....	128
References .....	129
Figure legends .....	135
<b>Chapitre 4 : Effect of Ionizing Radiation on Thymidine uptake, Differentiation, and VEGFR2 Receptor Expression in Endothelial Cells: The Role of VEGF<sub>165</sub>.....</b>	<b>146</b>
Acknowlegments .....	146
Abstract .....	147
Introduction .....	148
Methods and materials.....	149
Results .....	154
Discussion .....	157

References .....	160
Figure Legends .....	166
<b>Chapitre 5: Discussion .....</b>	<b>174</b>
<b>Chapitre 6 : Conclusions et perspectives.....</b>	<b>189</b>
<b>Références .....</b>	<b>192</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>217</b>

**Liste des tableaux**

Tableau I: Facteurs impliqués dans la migration, la prolifération et la différentiation des cellules endothéliales .....	13
Tableau II: Différents systèmes de transfert génique.....	53

## Liste des figures

### Chapitre 1

Figure 1: Phénomène de l'athérosclérose.....	4
Figure 2: Différents mécanismes impliqués dans la formation des vaisseaux sanguins .....	7
Figure 3: Étapes impliquées dans le phénomène d'angiogénèse .....	10
Figure 4: Différentes isoformes de VEGF-A .....	23
Figure 5: Structure des récepteurs de VEGF.....	27
Figure 6: Présentation schématique de la relation entre le VEGF et l'Angiopoïétine-1 .....	37

### Chapitre 2

Figure 1: Distribution pattern for the 12 sites of treatment.....	106
Figure 2: Voronoi polygons represent the geometrical influence of a point (blue dot) within the plane.....	107
Figure 3: Change in angiogenic score post treatment. ....	108
Figure 4: Myocardial sections from pigs treated with different modalities. ....	109
Figure 5: Representative examples of Voronoi polygon analysis results of immunostained sections outlining Factor VIII presence in TMR treated hearts (A) and AdVEGFtreated hearts (B).....	110
Figure 6: Histopathological evaluation of Factor VIII density. ....	111

### **Chapitre 3**

Figure 1 : Stability of $^{32}\text{P}$ -oligonucleotides in the presence of VSMCs 1 to 7 days after transfection.....	137
Figure 2 : Uniform localization of FITC oligonucleotides in transfected VSMCs. ....	138
Figure 3 : Dose-response effects of $\beta$ irradiation on cell proliferation of human and porcine VSMCs (A) and ECs (human coronary artery endothelial cells)(B). ....	139
Figure 4 : VSMC regrowth after $^{32}\text{P}$ -labeled oligonucleotide removal.....	140
Figure 5 : Effects of $\beta$ irradiation on cell cycle progression of VSMCs.....	141
Figure 6 : Statistical effect of $\beta$ irradiation on cell cycle distribution of VSMCs. ....	142
Figure 7 : DNA fragmentation after local and external irradiation.....	143
Figure 8 : Micrographs of morphology features of $\beta$ -irradiated cells. ....	144
Figure 9 : Immunostaining of $\alpha$ -actin in $\beta$ -irradiated VSMCs (left) with 0 (A), 0.4 (B), and 1 Gy (C) during 72 hours. ....	145

### **Chapitre 4**

Figure 1: Expression of VEGF <sub>165</sub> protein.....	169
Figure 2: Effect of VEGF <sub>165</sub> on endothelial cell proliferation under beta irradiation condition.....	170
Figure 3: Endothelial cell differentiation during beta-irradiation. ....	171

Figure 4: Effect of beta-irradiation on VEGFR2 gene expression.....	172
Figure 5: Beta-irradiation-induced up-regulation of VEGFR2 protein is time- dependent.....	173

## Liste des abréviations

AAV : Adeno-associated Virus

ADN : Acide DesoxyriboNucléotide

Ang-1 : Angiopoïétine-1

Ang-2 : Angiopoïétine-2

ARNm : Acide Ribonucléotide messenger

bFGF : basic Fibroblast Growth Factor

CABG : Coronary Artery Bypass Graft

CAM :ChorioAllantoic Membrane

CAR : Coxsakievirus Adenovirus Receptor

CMV : Cytomégalovirus

EDRF : Endothelial Relaxant Factor

EGF : Epidermal Growth Factor

FGF : Fibroblast Growth Factor

Flk-1/ KDR : Fetal liver kinase-1/ Kinase insert Domain Region

Flt-1 : Fms-like-tyrosine kinase

G<sub>0</sub> : Phase quiescente du cycle cellulaire

G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub> : Phase de croissance cellulaire

GAP : GTPase activating protein

Grb-2 : Growth factor receptor –bound protein-2

HAF : Human angiogenic factor



HB-EGF : Heparin Binding-Epidermal Growth Factor

HGF : Hepatocyte Growth Factor

HIF : Hypoxia Inducible Factor

HnRNP-L : Heterogenous nuclear Ribo NucleoProtein-L ?

Ig : Immunoglobuline

IGF : Insulin-like Growth Factor

IL-1 : Interleukine-1

IL-6 : Interleukine-6

IL-8 : Interleukine-8

IRS1 : Insulin Receptor Substrate

Kd : Constante d'affinité

kDa : kilo Dalton

kpb : Kilo paire de base

MAP : Mitogenic Activated Protein

M-CSF-1 : Macrophage-Colony Stimulating Factor-1

ml : millilitre

MMP : Matrix metalloproteinase

NK : Natural Killer

NO : Nitric Oxide

PAF : Platelet Activating Factor

PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor-1

pb : Paire de base

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PECAM : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule

pfu : plaque forming unit

PLC $\gamma$  : Phospholipase C  $\gamma$

PIGF : Placenta Growth Factor

pM : Pico Molaire

Pol : Polymérase

PTCA : Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty

RAS : Rous Sarcoma

SH2 : Src homology

SHC : Src homologue oncogene

SHP-1 : SH-2 domain protein-1

SHP-2 : SH-2 domain protein-2

SPECT : Single Photon Emission Computed Tomography

TGF $\alpha$  : Transforming Growth Factor alpha

TGF $\beta$  : Transforming Growth Factor beta

Tie-1 : Tyrosine kinase avec Ig et epidermal growth factor homology domain

Tie-2/Tek : Tunica interna endothelial cell kinase

TIMP : Tissue Inhibitor Metalloproteinase

TNF : Tumor Necrosis Factor

t-PA : tissue-Plasminogen Activator

u-PA : urokinase-Plasminogen Activator

UTR : Untranslated Region

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR1, 2, 3: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1, 2, 3

VPF :Vascular Permeability Factor

*Cette thèse est dédiée à mes parents, mon mari, Sina et mon garçon, Jonathan*

# **CHAPTER 1**

## **Introduction**

## **Chapitre 1 : Introduction**

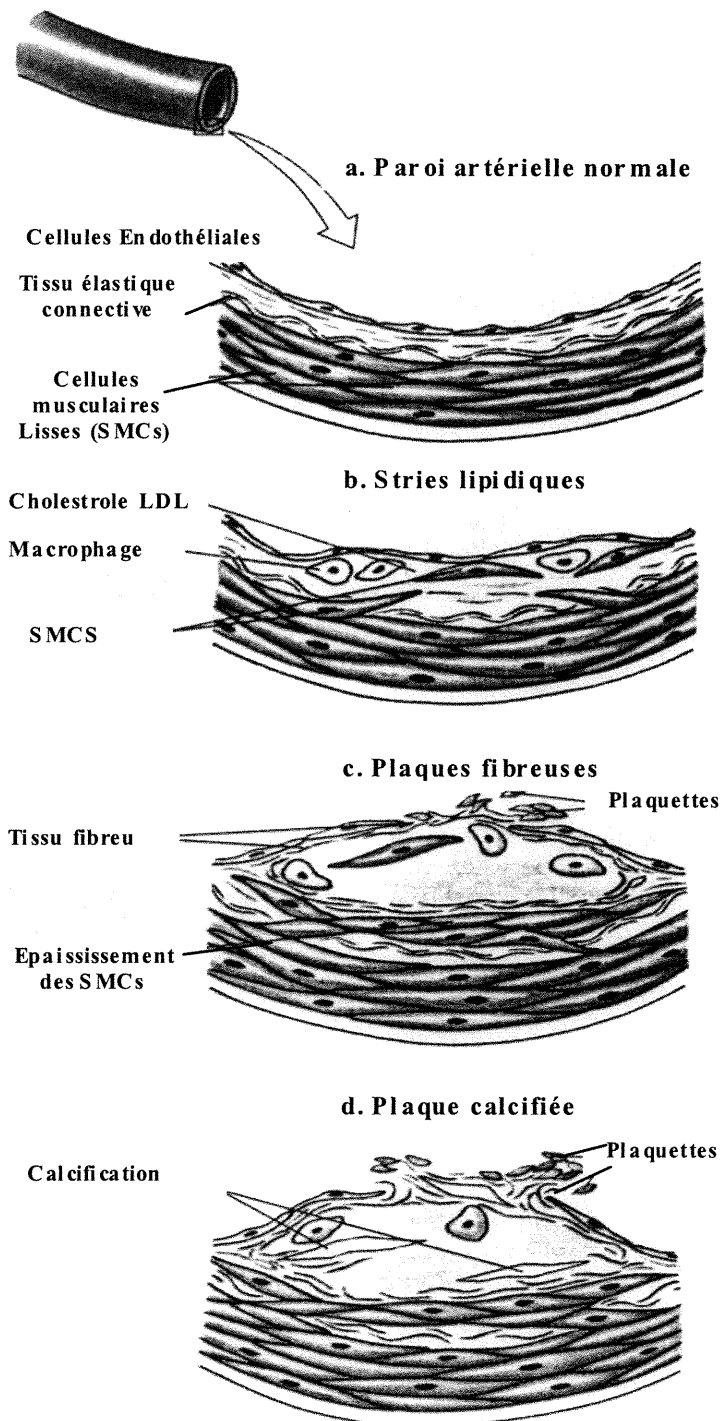
### **A. Pathogénèse de l'athérosclérose**

L'athérosclérose, principale cause des crises cardiaques, de l'accident cérébrovasculaire et de la gangrène des membres est responsable de 50% de la mortalité aux États-Unis, en Europe et au Japon (Ross, 1993). L'athérosclérose est caractérisée par un épaissement lipidique, cellulaire et fibreux de l'intima des artères. La lésion athéromateuse est le résultat d'une réponse inflammatoire excessive aux agressions survenues aux cellules endothéliales et aux cellules musculaires lisses des artères. Les agressions répétées entraînent la perte de la capacité de se répliquer des cellules autour de la lésion, ce qui aboutit à une altération de la surface de l'artère, suivie d'une augmentation du transport de macromolécules plasmatiques, de cellules inflammatoires et de lipides (cholestérol et esters de cholestérol) dans l'espace sous-endothélial. De manière plus générale, toute dérégulation de la prolifération des cellules endothéliales participe au développement de l'athérosclérose, notamment en favorisant le dépôt de lipides dans l'espace sous-endothélial. La plaque peut être recouverte d'endothélium ou bien être le site d'une désendothélialisation localisée. L'étape précoce de la lésion de l'athérosclérose consiste en une accumulation de lipides au sein des macrophages et une aggrégation avec les lymphocytes T, ce qui contribue à la formation de cellules spumeuses (foam cells) (Figure 1). Les observations animales ont démontrées que la formation des stries lipidiques précède le développement des lésions intermédiaires qui sont composées de couches de

macrophages et de cellules musculaires lisses, cette structure correspond à des plaques fibreuses. À mesure que les macrophages chargés de lipides repoussent l'endothélium dans la strie lipidique, ils peuvent causer une rupture de cette couche, exposant ainsi les cellules musculaires lisses de la media au sang périphérique. Les plaques fibreuses augmentent en volume et bloquent la lumière artérielle et peuvent alors entraver le flux sanguin. Les plaquettes, les lymphocytes et les monocytes adhèrent à ces cellules et libèrent des facteurs de croissance tel le PDGF, qui va stimuler la prolifération des cellules musculaires. Les cellules musculaires vont alors synthétiser de la matrice du tissu connectif comprenant des protéines de la fibre élastique, du collagène et des protéoglycans qui s'accumulent dans la substance fondamentale de la plaque (Ross, 1976 ; Ross, 1993) (Figure 1). L'occlusion de l'artère par l'athérosclérose amène une perfusion insuffisante du tissu nourri par cette artère, créant une condition d'hypoxie.

Dans une situation d'ischémie sévère, l'un des moyens d'adaptation de l'organisme est le développement d'une circulation collatérale. Au niveau du myocarde, le développement d'une telle circulation peut minimiser les conséquences de l'occlusion d'une artère importante du cœur. Dans de rares cas, l'existence de ce type de circulation peut même entraîner une revascularisation complète du territoire qui dépend du ou des vaisseaux occlus. Bien que l'existence d'une telle circulation améliore les symptômes cliniques, l'effet est rarement suffisant pour une compensation complète de l'occlusion des artères coronaires. Cette circulation collatérale, bien connue des cliniciens est le plus souvent insuffisante pour assurer une vascularisation satisfaisante du tissu ischémique.

**Figure 1: Phénomène de l'athérosclérose**



(Modifié de Silverthon *et al.*, 1998)



## **B. Développement vasculaire**

Il n'y a pas très longtemps, l'étude des mécanismes moléculaires de l'angiogénèse se limitait aux premières étapes du bourgeonnement capillaire à partir de vaisseaux préexistants. Plus récemment, les expériences *in vivo* ainsi que *in vitro* ont permis d'explorer d'avantage la morphogénèse de l'arbre vasculaire et de proposer ainsi des mécanismes moléculaires qui la contrôlent (Fishman et Stainier, 1994 ; Flamme *et al.*, 1997 ; Risau, 1997 ; Beck et D'Amore, 1997). De nouvelles molécules ont été mises en évidence pour leur capacité à contrôler la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales. De nouveaux facteurs, récemment identifiés, participent à des étapes plus tardives du développement vasculaire en stabilisant les interactions entre les cellules endothéliales et les molécules de la matrice extracellulaire ou les péricytes. L'étude du développement embryonnaire a permis de distinguer deux mécanismes différents qui président la formation des vaisseaux sanguins : la vasculogénèse et l'angiogénèse.

### **B.1. Vasculogénèse**

La vasculogénèse correspond à la naissance de vaisseaux sanguins suite à la différenciation et la prolifération des précurseurs des cellules endothéliales, les angioblastes, et semble se produire uniquement durant le développement embryonnaire (Figure 2). Durant ce stade de développement, les hémangioblastes, progéniteurs communs des cellules endothéliales et des cellules hématopoétiques, apparaissent dans les îlots sanguins de l'aire extra-embryonnaire et sur la paroi

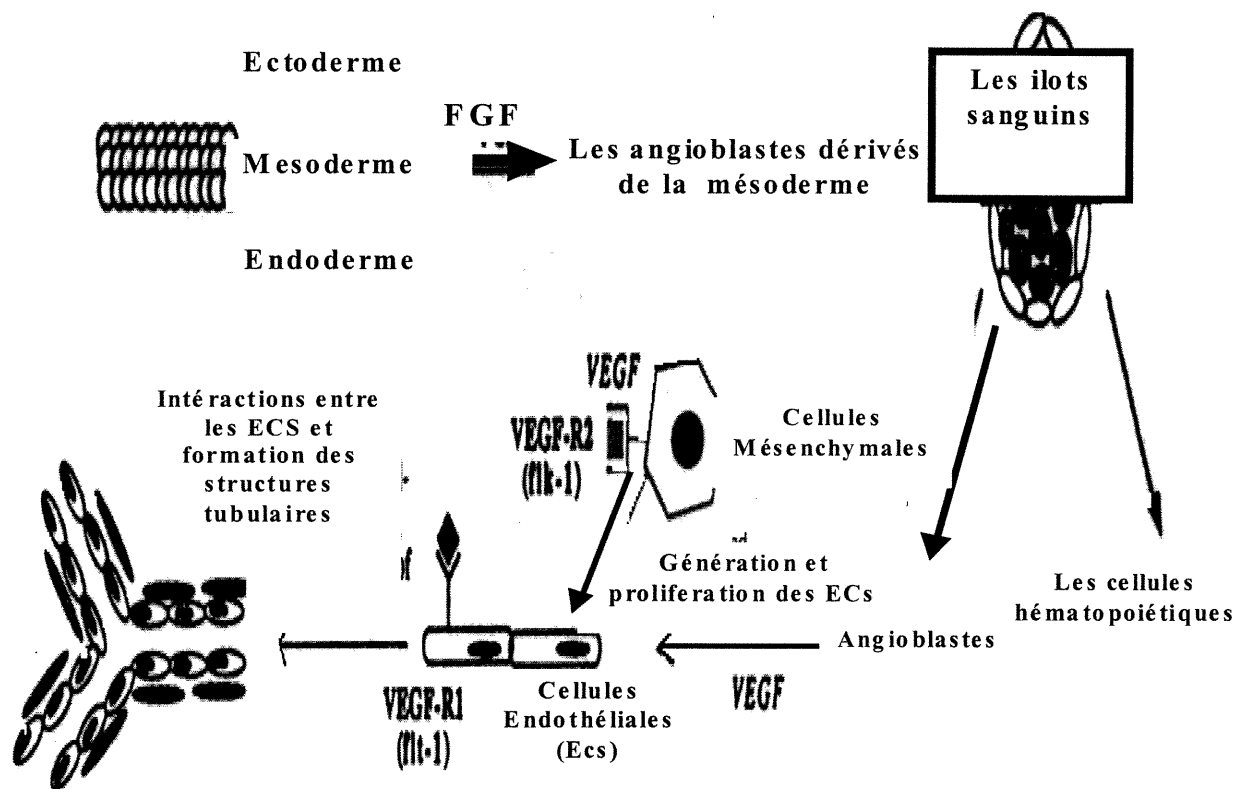
ventrale de l'aorte mésodermique d'où elles migrent, prolifèrent et se différencient en tubes capillaires (Risau et Flamme, 1995). Les hémangioblastes impliqués dans la vasculogénèse, ont été mise en évidence à partir des données sur les souris déficientes pour les récepteurs Flk-1/KDR (Fetal liver kinase-1/ Kinase insert Domain Region) ou VEGFR2. Chez ces souris, ces récepteurs sont absents sur les cellules endothéliales ainsi que les cellules hématopoétiques. Ces souris démontrent des défauts dans la différenciation des cellules endothéliales (Shalaby *et al.*, 1997). L'autre récepteur de VEGF, Flt-1 (Fms-like-tyrosine kinase) ou VEGFR1, joue un rôle dans un stade plus tardif dans le processus de vasculogénèse, puisque les souris déficientes pour le récepteur VEGFR1, produisent des angioblastes mais présentent une désorganisation dans l'assemblage des cellules endothéliales (Fong *et al.*, 1995). Il semble donc que, l'induction du récepteur VEGFR2 semble initier la différenciation des angioblastes, alors que la quantité et l'activité du VEGF détermine la survie de ces cellules.

Suite à la formation du premier réseau vasculaire, les cellules endothéliales continuent à proliférer et former des nouveaux capillaires. Des fibroblastes recrutés par les capillaires viennent ensuite se différencier au contact de leurs parois. Ils correspondent vraisemblablement à des péricytes ou à des cellules musculaires lisses. Enfin, la structure de la paroi des vaisseaux s'adapte au débit et à la pression du flux sanguin. La diminution du flux sanguin inhibe la progression de l'arbre vasculaire. Ces données concordent bien avec de récentes études *in vitro* où il a été démontré que la diminution du flux sanguin, ou de la quantité

d'oxygène, peut effectivement induire l'apoptose des cellules endothéliales (Kaiser *et al.*, 1997).

Malgré toutes les données sur la vasculogénèse, il reste encore à déterminer les mécanismes et la nature du signal qui induit l'expression des récepteurs de VEGF ainsi que les facteurs qui déterminent la différenciation des cellules hématopoïétiques et les angioblastes

**Figure 2: Différents mécanismes impliqués dans la formation des vaisseaux sanguins**



(Modifié de Douglas *et al.*, 1998)

## B.2. Angiogénèse

L'angiogénèse se définit comme l'ensemble des processus menant à la formation de nouveaux capillaires sanguins par l'excroissance de vaisseaux déjà existants. Le phénomène d'angiogénèse est un processus fort complexe mais bien orchestré, qui fait intervenir de nombreux facteurs tels que les métalloprotéinases et les enzymes protéolytiques ainsi que différents facteurs de croissance et des molécules d'adhésions cellulaires.

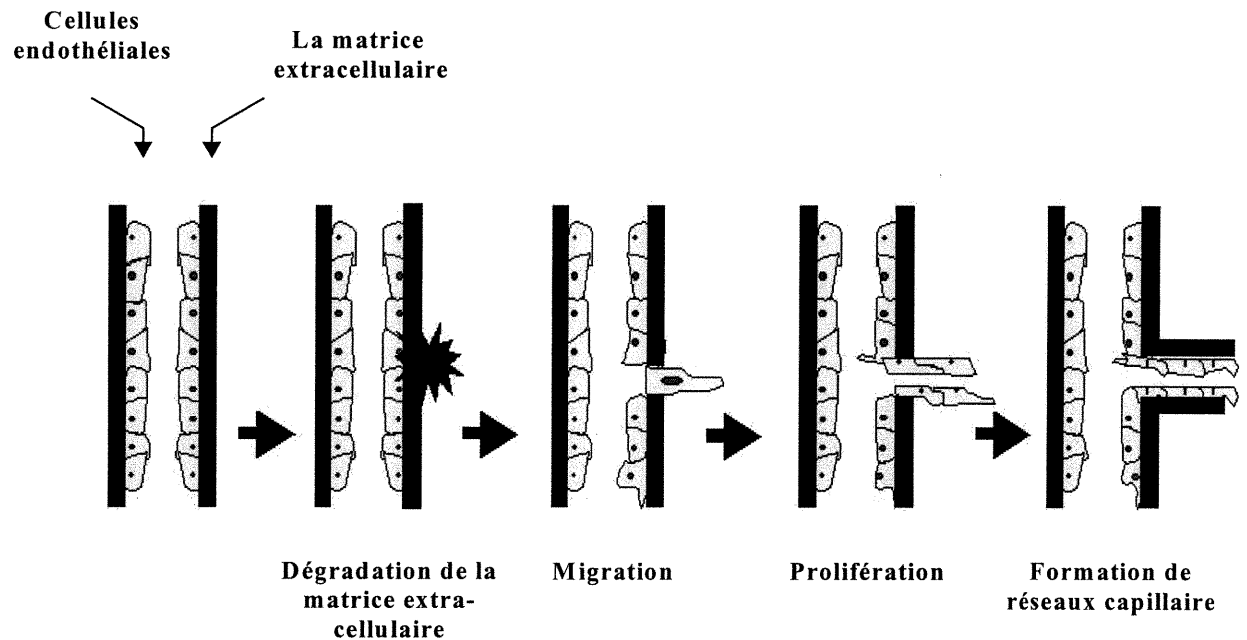
Dans les conditions normales, les cellules endothéliales au repos croissent en monocouche et leur prolifération est maintenue à un taux très faible puisqu'elles sont attachées à la lame basale *via* les protéines de la matrice extracellulaire et entre elles par les molécules intercellulaires. Les cellules endothéliales sont parmi les plus stables de l'organisme ; leur temps de division peut excéder 1000 jours, mais cette durée peut être réduite à seulement cinq jours lors de l'angiogénèse (Denekamp, 1993).

Le phénomène d'angiogénèse est un phénomène séquentiel comportant en premier lieu de la dégradation de la matrice extracellulaire par induction de la production de protéases, suivie de la migration des cellules endothéliales induite par les facteurs chimotactiques tels que, les composants de la matrice extracellulaire, les facteurs de coagulation, thrombospondine et enfin la prolifération de ces mêmes cellules permettant la progression vasculaire (Presta *et al.*, 1986). Les cellules endothéliales migrent et prolifèrent pour ensuite être assemblées en tubes (Figure 3). Les cellules péri-endothéliales sont alors recrutées

autour des cellules endothéliales afin de maintenir et maturer les vaisseaux sanguins (Folkman et D'Amore, 1996). Les cellules de support sont des péricytes pour les capillaires et les vaisseaux de petits calibres, alors que les cellules musculaires lisses représentent les cellules de support pour les vaisseaux de gros calibre. Les cellules endothéliales sont activement impliquées dans les deux phénomènes, l'angiogénèse et la vasculogénèse.

Dans l'organisme sain, le système vasculaire est stable et il est finement contrôlé en dehors des situations pathologiques, telles que la rétinopathie, l'ischémie cardiaque et périphérique ou le développement tumoral, où une angiogénèse non régulée se met en place. Le processus d'angiogénèse est essentiel pour la formation de nouveaux vaisseaux sanguins nécessaires au développement embryonnaire, à la réparation tissulaire et aux fonctions reproductrices comme la régénération de l'utérus et la formation du corps jaune (*corpus luteum*) et du placenta.

**Figure 3: Étapes impliquées dans le phénomène d'angiogénèse**



(Modifié de Bussolino *et al.*, 1997)

### B.2.1. Dégradation de la matrice extracellulaire

Les cellules sont attachées les unes aux autres grâce à la présence de molécules d'adhésion liées aux protéines de la matrice extracellulaire. Lors de la migration des cellules endothéliales durant le phénomène d'angiogénèse, la matrice extracellulaire est dégradée par l'induction de la sécrétion d'enzymes protéolytiques appartenant à différentes familles, dont celles des métalloprotéinases matricielles (MMP : Matrix Metalloproteinase). Les MMPs,

synthétisées sous forme inactive, doivent être activées par de la plasmine ou des facteurs de croissance, pour franchir les membranes basales et créer des brèches dans la matrice extracellulaire. Les métalloprotéinases sont naturellement associées avec des inhibiteurs spécifiques (TIMPs : Tissu Inhibitor Metalloproteinases). Une sur-expression des métalloprotéinases ou une sous-expression de leurs inhibiteurs conduit à un déséquilibre favorisant la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Good *et al.*, 1990 ; Dameron *et al.*, 1994 ; Christofori, 1996).

Il existe actuellement 14 membres distincts de la famille des métalloprotéinases, généralement sécrétés sous forme inactive (Revue dans Stetler-Stevenson *et al.*, 1996). Ces différentes métalloprotéinases ont des substrats spécifiques pour chaque composant de la matrice extracellulaire. Dans de nombreux cas, les métalloprotéinases peuvent avoir le même substrat. La collagénase interstitielle (MMP-1), collagénase 3 (MMP-13), les gélatinases A et B (MMP-2), et la collagénase de type IV (MMP-9) sont quelques membres de la famille des métalloprotéinases.

### **B.2.2. Migration des cellules endothéliales**

Plusieurs chémokines sont impliquées dans la migration des cellules endothéliales. La plupart de ces molécules ont également un effet mitogénique ou sont impliquées dans le processus de différenciation des cellules endothéliales (Tableau I). Deux facteurs ayant des effets chémotactiques prédominants ont été

identifiés: le facteur HAF (Human Angiogenic Factor) et l'angiotropine. Leur effet migratoire est suffisant pour initier la néovascularisation des cellules endothéliales qui peuvent former des branches sans proliférer (Sholley *et al.*, 1984).

Le facteur HAF, également détecté dans les macrophages *in vivo* (Frubeis *et al.*, 1988), a d'abord été isolé d'une lignée cellulaire de mélanome (Stenzinger *et al.*, 1983 ; Schulze-Osthoff *et al.*, 1987). HAF a démontré un effet angiogénique mais pas d'activité mitogénique dans l'essai de CAM (ChorioAllantoic Membrane) (Schulze-Osthoff *et al.*, 1987 ; Olivo *et al.*, 1992).

Le facteur angiotropine, isolé des myocytes porcins, est capable de stimuler la migration des cellules endothéliales d'origine capillaire (Hockel *et al.*, 1987). L'angiotropine provoque la néovascularisation dans les modèles de cornée de lapin ainsi que dans le modèle CAM (Hockel *et al.*, 1987). Cependant ces résultats ne semblent pas être très concluants sur le fait que l'angiotropine peut conduire à une stimulation directe de l'angiogénèse *in vivo* puisque la néovascularisation induite par ce facteur est précédée par une infiltration d'origine inflammatoire (Hockel *et al.*, 1988).



**Tableau I: Facteurs impliqués dans la migration, la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales**

Facteurs	Stimule la migration des Cellules endothéliales ( <i>in vitro</i> )	Stimule la prolifération des cellules endothéliales ( <i>in vitro</i> )	Stimule la différenciation des cellules endothéliales en tubes capillaires ( <i>in vitro</i> )	Inhibe la migration, la prolifération des cellules endothéliales ( <i>in vitro</i> )
aFGF/ bFGF	+	+	+	-
GM-/G-CSF	+	+	+	-
VEGF	+	+	+	-
IL-8	+	+	-	-
Angiotropine	+	-	+	-
HAF	+	-	-	-
PDGF	+ ?	+ ?	-	-
IL-6	+ ?	-	-	+ ?
IL-1	+ /	+ ?	-	+
TGF- $\beta$	+ (faible)	+ (faible)	-	+
TGF- $\alpha$	-	+	-	-
TNF- $\alpha$	+ (faible)	-	-	+
IGF-I	-	+	+	-
Interféron- $\alpha$	-	-	-	+
Interféron- $\gamma$	-	-	-	+

(Modifié de Sunderkötter *et al.*, 1994)

### **B.2.3. Prolifération des cellules endothéliales: Principaux facteurs de croissance impliqués dans le phénomène d'angiogénèse**

Dans une revue, Folkman et Shing (1992) ont dressé la liste des facteurs angiogéniques définis à ce jour. Certains de ces facteurs de nature peptidique tels que TGF- $\alpha$  (Transforming Growth Factor alpha), TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha), angiogénine sont capables d'induire leur activité *in vivo*, mais ne sont pas capables d'exercer de nets effets mitogènes sur les cellules endothéliales en culture, voire même induisent une inhibition de croissance. On suppose que leurs actions soient indirectes, après l'induction des facteurs paracrines directement angiogéniques tels que HGF (Hepatocytes Growth Factor) qui agirait par le biais de la surexpression du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Van Belle *et al.*, 1998). Cependant, des facteurs capables à la fois de stimuler l'angiogénèse *in vivo* et la prolifération des cellules endothéliales *in vitro* ont été identifiés: il s'agit des facteurs de croissance aFGF (acidic Fibroblast Growth Factor ou FGF1, selon la nouvelle nomenclature) et bFGF (basic Fibroblast Growth Factor ou FGF2), du VEGF et du platelet-derived growth factor (PDGF).

L'expression des facteurs angiogéniques ainsi que les facteurs anti-angiogéniques n'est pas restreinte dans les tissus normaux. Ce qui suggère qu'il existe une balance entre les facteurs angiogéniques et anti-angiogéniques dans les tissus. Dans les tissus normaux, les inhibiteurs de l'angiogénèse seraient majoritaires et empêcheraient la formation de nouveaux vaisseaux; l'angiogénèse

serait alors initiée par une augmentation du taux des facteurs activateurs et / ou une diminution des facteurs inhibiteurs.

### **B.2.3.1. Transforming Growth Factors**

Ces cytokines sont des polypeptides largement distribués dans l'organisme. Le contact entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses mène à l'activation de l'expression du TGF- $\beta$  (Antonelli-Orlidge *et al.*, 1989). Le TGF- $\beta$  a de multiples fonctions biologiques et peut être inhibiteur ou stimulateur de la croissance cellulaire selon le type de cellules. TGF- $\beta$  inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Orlidge et D'Amore, 1987 ; Sato et Rifkin, 1989), et induit la différenciation des cellules musculaires lisses et les péricytes (Rohovsky *et al.*, 1996). Le TGF- $\beta$  induit également la formation de matrice extracellulaire (Basson *et al.*, 1992) et réprime l'expression du récepteur VEGFR2 dans les cellules endothéliales (Mandriota *et al.*, 1996). Ce qui est consistant avec le fait que quelques nanogrammes de TGF- $\beta$  sont capables d'inhiber l'angiogénèse induite par le facteur de croissance VEGF (Pepper, 1997). Les souris déficientes pour le gène TGF- $\beta$  (« knock out ») meurent autour du jour E10.5 de la vie embryonnaire et possèdent des défauts de vasculogénèse et d'hématopoïèse, essentiellement dans le sac vitellin (Oshima *et al.*, 1996). Les cellules endothéliales sont présentes mais les capillaires sont peu différenciés. Les contacts intercellulaires sont également affectés (Dickson *et al.*, 1995).

Le TGF- $\alpha$ , autre agent mitogène pour les cellules endothéliales, est relargué par les macrophages activés (Madtes *et al.*, 1988 ; Rappolee *et al.*, 1988). Son effet prolifératif sur les cellules endothéliales a été démontré *in vitro* (Sato *et al.*, 1993) ainsi qu'*in vivo* (Schreiber *et al.*, 1986). Le TGF- $\alpha$  agit également sur la libération d'autres facteurs angiogéniques tels que FGF et t-PA (tissue-Plasminogen Activator) (Sato *et al.*, 1993).

### **B.2.3.2. Platelet Derived Growth Factor**

Le PDGF est sécrété par les granules des plaquettes activées durant la coagulation. Les monocytes, spécialement lorsqu'ils sont activés, ainsi que les cellules musculaires lisses sont une autre source majeure de production de PDGF. Le PDGF est constitué de deux chaînes A et B qui s'associent par un pont disulfure pour former une protéine homodimérique (AA, BB) ou hétérodimérique (AB). Une expression élevée des isoformes de PDGF a été associée avec une ischémie myocardique (Ogawa *et al.*, 1992 ; Ogawa *et al.*, 1993). Bell et ses collaborateurs (1989) ont montré que le PDGF était capable d'augmenter la formation de capillaires *in vitro*. Mais, d'autres auteurs ont dénié l'effet angiogénique directe de ce facteur sur les cellules endothéliales en culture (Sato *et al.*, 1993 a). L'effet contradictoire du PDGF peut être dû à l'hétérogénéité des cellules endothéliales. En effet, les cellules d'origine capillaire exprimant le récepteur de type PDGF-B, répondent ainsi au PDGF (Smits *et al.*, 1989) alors que

les cellules endothéliales provenant des vaisseaux de gros calibres ne répondent pas à l'action du PDGF (Bell *et al.*, 1989). Le PDGF possède également un effet chimotactique sur les cellules endothéliales (Westermarck *et al.*, 1990). Récemment, il a été démontré que l'induction de PDGF dans les cellules endothéliales d'origine cardiaque joue un rôle important dans le phénomène d'angiogénèse (Edelberg *et al.*, 1998). Outre son effet sur les cellules endothéliales, PDGF agit également sur des cellules impliquées dans le processus de la réparation tissulaire (Raines et Ross, 1993).

### **B.2.3.3. Famille des peptides FGFs**

Parmi les nombreux facteurs connus comme angiogéniques, la famille des FGFs (Fibroblast Growth Factor) joue un rôle déclenchant dans le phénomène de l'angiogénèse (Rosengart *et al.*, 1988 ; Hondermarck *et al.*, 1990 ; Presta *et al.*, 1986). La famille des FGFs comprend actuellement seize membres issus probablement d'un gène ancestral commun (Revue dans Elyazidi, 1998). Ils ont la particularité de lier l'héparine, «Heparin Binding Protein». De nombreux travaux portant sur leur localisation tissulaire et cellulaire ont montré que ces facteurs possèdent un large spectre de distribution. Les facteurs FGFs, plus particulièrement aFGF (FGF1) et bFGF (FGF2), sont exprimés par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les cardiomyocytes, les macrophages et plusieurs cellules tumorales (Rifkin et Moscatelli, 1989). Les FGFs, caractérisés par un large spectre d'action, ils sont impliqués dans divers

processus fondamentaux tels que la prolifération et la différenciation cellulaire, la réparation tissulaire, le développement embryonnaire et dans de nombreux processus pathologiques comme la cancérogénèse. Les FGFs sont hautement mitogènes pour les cellules endothéliales vasculaires et comptent parmi les inducteurs les plus puissants de la néovascularisation (Gospodarowicz, 1976 ; Gospodarowicz *et al.*, 1984 ; Deroanne *et al.*, 1997).

### **B.2.3.3a. Récepteurs de FGF**

Les activités biologiques des FGFs sont assurées par deux classes de sites de liaison : de haute affinité et de basse affinité. Les sites de haute affinité sont des glycoprotéines transmembranaires liant spécifiquement les FGFs et sont nommés FGFR1 à FGFR4 (Revue dans Elyazidi, 1998). Ces récepteurs sont codés par quatre gènes différents dont les ARNm épissés alternativement génèrent plusieurs variants. Les récepteurs de FGFs sont exprimés à la surface des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses, des fibroblastes, des myoblastes et de différentes cellules tumorales (Rifkin et Moscatelli, 1989). Après la liaison du FGF, le récepteur transmembranaire assure la transmission du signal à la cellule grâce à son activité tyrosine kinase. Par contre, les sites de basse affinité sont des glycosaminoglycans présents dans la matrice extracellulaire. Les FGFs se lient plus particulièrement aux héparans sulfates (Yayon *et al.*, 1991 ; Quarto, 1994).

#### **B.2.3.4. Famille des peptides VEGF**

Le facteur VEGF a été à l'origine isolé par Senger et ses collaborateurs (1983) comme une protéine capable de contrôler la perméabilité vasculaire. Cette activité, définissant ce facteur le Vascular Permeability factor (VPF) est définie par une augmentation de la perméabilité vasculaire suivant l'injection sous-cutanée du facteur chez le rat. Simultanément, deux groupes (Ferrara *et al.*, 1989 ; Leung *et al.*, 1989) ont purifié un nouveau facteur stimulant spécifiquement la prolifération des cellules endothéliales à partir de milieu de culture conditionné de cellules de la glande pituitaire de bovin. Ce facteur, nommé VEGF, n'était pas capable de stimuler la prolifération des fibroblastes ni des cellules épithéliales. Cependant, le clonage moléculaire de VPF et VEGF a révélé que ces deux activités provenaient en fait d'une seule protéine codée par le même gène (Leung *et al.*, 1989 ; Keck *et al.*, 1989 ; Ferrara *et al.*, 1991a, 1992). Ce facteur a aussi été appelé vasculotropine (VAS) (Plouet *et al.*, 1989).

Le facteur VEGF, ou plutôt VEGF-A, puisqu'il est le membre fondateur de la famille, est une glycoprotéine de 23 kDa sécrétée, exerçant son action sous forme homodimérique grâce à un pont disulfure reliant les deux molécules (Leung *et al.*, 1989).

La distribution du VEGF-A dans l'organisme est très large et on peut ainsi l'isoler dans les myocytes cardiaques, la glande pituitaire, le rein, le foie et l'ovaire (Ferrara and Henzel, 1989 ; Ferrara *et al.*, 1992). Le facteur VEGF-A est aussi exprimé par les macrophages, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, les

cellules endothéliales et plusieurs autres cellules (Frank, 1995). L'expression de l'ARNm du VEGF-A se juxtapose dans le temps et dans l'espace avec la prolifération vasculaire. Le facteur VEGF-A a été également purifié à partir de milieux conditionnés de différentes lignées cellulaires tumorales : glioblastome de rat et neuroblastome de souris (Plate *et al.*, 1992).

Blann et ses collaborateurs (2001) ont récemment démontré que le niveau de VEGF est augmenté dans le plasma des patients atteint d'athérosclérose. Le même groupe a également évalué le niveau de la forme soluble du récepteur VEGFR1 chez les mêmes patients et ils ont observé aucune différence.

Parmi de nombreux facteurs de croissance impliqués dans l'initiation du phénomène de l'angiogénèse, VEGF joue un rôle important. Le myocarde est une source importante de VEGF dans l'organisme et la synthèse de VEGF par des myocytes cardiaques est fortement stimulée par l'hypoxie *in vivo* et *in vitro* (Levy *et al.*, 1995 a, b ; Ladoux et Frelin, 1993). D'autre part, le facteur VEGF est produit par l'endoderme et agit de façon paracrine sur les cellules dérivées de la mesoderme, des angioblastes. Le niveau d'expression de VEGF est important pour le maintien de la différenciation des angioblastes. Les souris déficientes pour le gène de VEGF meurent dans l'utérus caractérisées par une malformation des vaisseaux sanguins dans le sac vitelin et dans l'embryon (Carmeliet *et al.*, 1996 ; Ferrara *et al.*, 1996).

Enfin, il a été récemment démontré que l'expression du facteur de croissance VEGF dépend également de l'âge de l'animal. En effet, Rivard et ses collaborateurs (1999) ont démontré que le phénomène d'angiogénèse est réduit



dans les conditions d'ischémie chez les lapins et les souris âgées. Cette réduction d'angiogénèse est en corrélation avec une plus faible expression de VEGF chez ces animaux. Par contre, lorsque le VEGF exogène est administré aux animaux jeunes et âgés, une augmentation de néovascularisation, déterminée par l'évaluation de la densité capillaire et le score angiographique, est observée aussi bien chez les animaux juveniles que âgés.

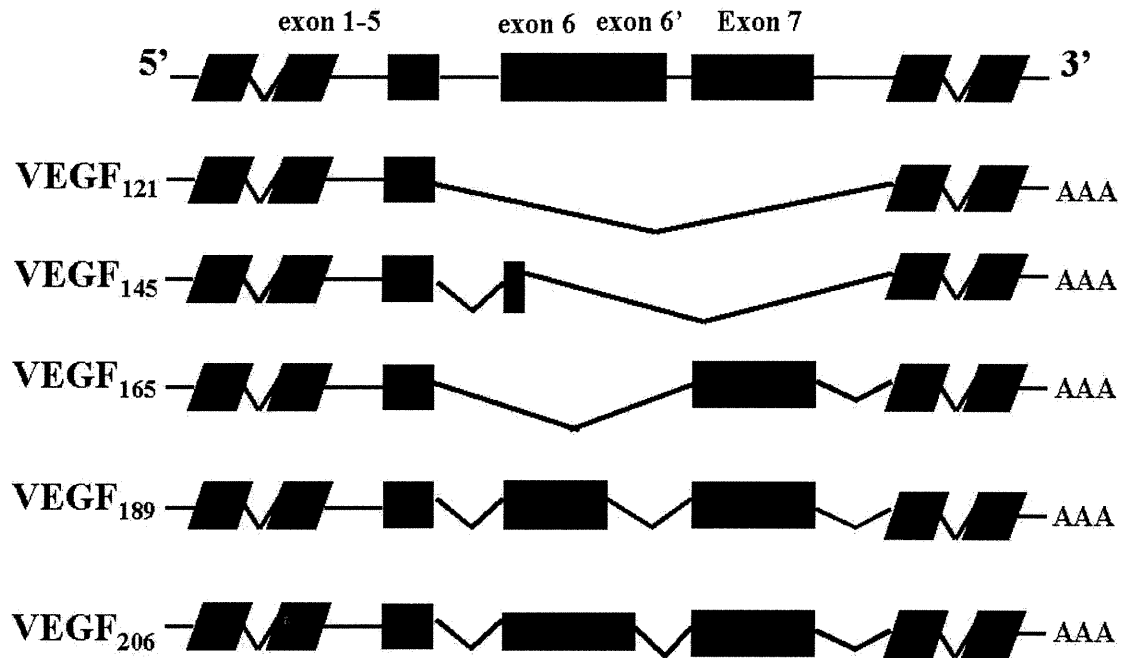
#### **B.2.3.4a. Structure du gène de VEGF**

Le facteur VEGF-A fait partie de la famille des protéines liant l'héparine dont la séquence présente de faibles homologies avec les chaînes A et B du PDGF. Le gène du VEGF-A humain, localisé sur le chromosome 6, se compose de 8 exons, codant pour 5 isoformes de 121, 145, 165, 189 et 206 acides aminés résultant d'un épissage alternatif de l'ARNm à partir d'un gène commun (Houck *et al.*, 1991 ; Ferrara *et al.*, 1991 b). Les formes murines possèdent un acide aminé en moins. Les deux isoformes 121 et 165 sont sécrétées dans le compartiment extracellulaire, tandis que les autres restent associées à la membrane cellulaire par le biais de la région carboxy-terminale, riche en arginine et en lysine et codée par l'exon 6 (Houck *et al.*, 1991). Les formes liées de VEGF-A sont libérées sous une forme active par les héparinases et la plasmine. Les cinq isoformes de VEGF-A partagent les acides aminés dans leur partie amino-terminale incluant la séquence du peptide signal, codée par les exons 1-5 et aussi les acides aminés de l'extrémité carboxy-terminale codés par l'exon 8. L'isoforme VEGF<sub>206</sub> possède un court exon

désigné exon 6' qui est une extension de l'exon 6 (Figure 4). Il y a très peu de données sur la distribution et le rôle des isoformes 121, 145, 189 et 206. Cependant, Houck et ses collaborateurs (1991) ont démontré que l'isoforme 121 était majoritairement exprimée dans les tissus placentaires. L'isoforme 206 représentait la forme la plus rare des cinq et elle a été identifiée seulement dans une banque d'ADNc préparée à partir du foie fœtal humain (Houck *et al.*, 1991). L'expression de l'isoforme 206 semble être limitée à la période embryonnaire. L'analyse d'une variété de banques d'ADNc dérivées de différentes cultures cellulaires et tissulaires a révélé que l'isoforme VEGF<sub>165</sub> représente la forme la plus abondante du gène VEGF-A.

La région « core » de l'extrémité amino-terminale du facteur VEGF-A, codée par les exons 1-5, possède 8 cystéines qui contribuent à la formation des dimères. Comme dans le cas du PDGF, le VEGF est une glycoprotéine et cette glycosylation n'est pas requise pour l'activité biologique de la protéine mais plutôt pour sa stabilité et sa sécrétion (Yeo *et al.*, 1991 ; Peretz *et al.*, 1992).

**Figure 4: Différentes isoformes de VEGF-A**



(Modifié de Ferrara *et al.*, 1992)

#### **B.2.3.4b. Autres membres de la famille des VEGFs**

Récemment, plusieurs facteurs ont été identifiés par leur homologie de structure avec VEGF-A. Parmi ceux-ci, quatre nouveaux VEGFs : VEGF-B (21 kDa) (Olofsson *et al.*, 1996), VEGF-C (23 kDa) (Joukov *et al.*, 1996), VEGF-D (13 kDa) (Achen *et al.*, 1998), VEGF-E (20 kDa) (Ogawa *et al.*, 1998) et finalement le facteur PlGF (Placenta Growth Factor) (23 kDa) (Maglione *et al.*, 1991).

La protéine VEGF-B possède une séquence de 167 acides aminés après le clivage de la séquence signal. Elle présente 30 à 43% d'identité avec VEGF-A, basé sur la séquence en acides aminés. Ce facteur est exprimé dans plusieurs tissus adultes, en particulier le cœur, le muscle squelettique et le pancréas. Il est capable de s'associer avec le VEGF<sub>165</sub> pour former des hétérodimères fonctionnels. La régulation de son expression ainsi que son récepteur ne sont pas encore caractérisés. Le facteur VEGF-B est un facteur mitogénique pour les cellules endothéliales originaires de la veine ombilicale. La liaison de VEGF-B aux récepteurs induit l'expression de l'urokinase de type PA (Plasminogen) et PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) (Olofsson *et al.*, 1996).

La séquence amino-terminale de VEGF-C est homologue à celle des autres formes de VEGF. Le facteur VEGF-C possède une région carboxy-terminale riche en cystéine dont le rôle est inconnu (Joukov *et al.*, 1996). Il a été récemment démontré que VEGF-C a un effet synergique avec bFGF ou VEGF dans l'induction de l'angiogénèse *in vitro* (Pepper *et al.*, 1998). Également, Witzenbichler et ses collaborateurs (1998) ont démontré que l'administration de VEGF-C sous forme de plasmide dans une région ischémique des membres inférieurs de lapin induit d'angiogénèse, 30 jours suivant le traitement.

Les analyses d'alignement de séquences ont démontré que le facteur VEGF-D est plus homologue au facteur VEGF-C que les autres facteurs, en vertu de la présence des extensions dans les régions amino et carboxy-terminales qui ne sont pas présentes chez les autres membres de la famille des VEGFs. Chez l'humain, l'ARNm de VEGF-D est plus abondant dans le cœur, les poumons, le

muscle squelettique, le colon et le petit intestin. L'homologue de VEGF-D chez la souris, récemment identifié, correspond au facteur « *c-fos-induced growth factor* » (Orlandini *et al.*, 1996).

Le facteur VEGF-E code pour une protéine présentant 25% d'homologie avec le VEGF-A, basée sur la séquence en acides aminés. Il a été démontré que VEGF-E ne possède pas d'affinité pour l'héparine, caractéristique similaire à VEGF<sub>121</sub>. VEGF-E lie seulement le récepteur VEGFR2 et induit sa phosphorylation. Ce facteur est mitogénique pour les cellules endothéliales (Ogawa *et al.*, 1998).

Enfin, Le gène de PlGF humain code pour les glycoprotéines de 131 (PlGF-1) et 152 (PlGF-2) acides aminés (Maglione *et al.*, 1991 ; Park *et al.*, 1994). Il partage 46% d'homologie avec le facteur VEGF-A, basée sur la séquence en protéine (Maglione *et al.*, 1991). Le facteur PlGF est capable de former des homodimères ainsi que des hétérodimères VEGF-A/PlGF (DiSalvo *et al.*, 1995 ; Cao *et al.*, 1996). La fonction biologique de PlGF n'est pas encore connue.

#### **B.2.3.4c. Structure des récepteurs de VEGF**

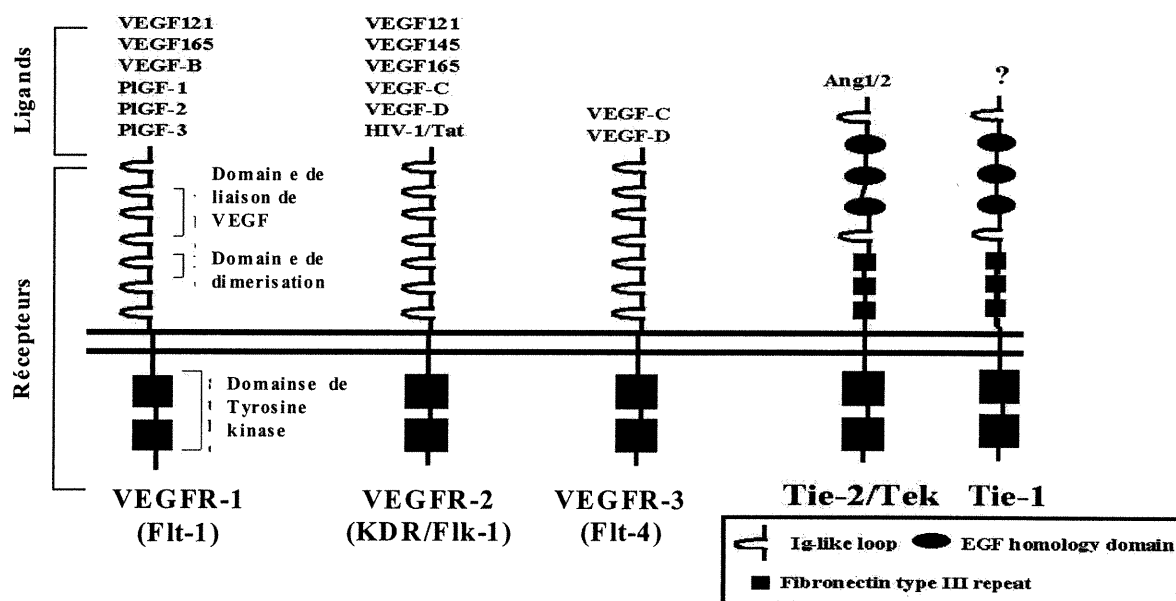
La famille des récepteurs de VEGF comprend 3 membres : VEGFR1 ou Flt-1 (DeVeries *et al.*, 1992a ; Shibuya *et al.*, 1990), VEGFR2 ou Flk-1/KDR (Mathews *et al.*, 1991 ; Millauer *et al.*, 1993 ; Oelrichs *et al.*, 1992 ; Terman *et al.*, 1992) et VEGFR3 ou Flt-4 (Galland *et al.*, 1993) (Figure 5). KDR est l'homologue murin de Flk-1 qui partage 85% d'homologie avec la forme humaine,

basée sur la séquence en acides aminés. Ces trois récepteurs ont seulement 30% d'identité en acides aminés dans leur domaine extracellulaire, mais sont similaires à 80% dans leur domaine tyrosine kinase. Les trois gènes correspondants sont localisés sur trois chromosomes différents, à proximité des gènes des récepteurs au PDGF et des récepteurs tyrosine kinase hématopoïétiques (Flt3, KIT et FMS) (Spritz *et al.*, 1994 ; Nagle *et al.*, 1994 ; Imbert *et al.*, 1994 ; Armstrong *et al.*, 1993 ; Pèbusque *et al.*, 1993). Les récepteurs humains VEGFR1 et VEGFR3 sont retrouvés sous deux isoformes qui diffèrent dans leur queue cytoplasmique par la présence ou l'absence de 65 acides aminés (Pajusola *et al.*, 1993 ; Borg *et al.*, 1995 ; Fournier *et al.*, 1997).

Les récepteurs de VEGF sont présents à la surface des cellules endothéliales et sont dotés d'une activité tyrosine kinase. Ces protéines possèdent un domaine extracellulaire de sept sous-unités présentant des analogies avec les chaînes d'immunoglobulines, responsables de la liaison des ligands, un domaine hydrophobique transmembranaire et une région cytoplasmique portant l'activité tyrosine kinase. VEGFR1 et VEGFR2 partagent 30% d'homologie de séquence avec *c-fms*, un récepteur tyrosine kinase connu pour M-CSF-1 (Shibuya *et al.*, 1990). La liaison de VEGF à ses récepteurs provoque la dimérisation de ces derniers, ce qui déclenche l'activité catalytique et conduit ainsi la phosphorylation de résidus tyrosine présents sur le récepteur lui-même et sur les substrats cytoplasmiques (Waltenberger *et al.*, 1990 ; Heldin, 1995 ; Fuh *et al.*, 1998). L'activation des récepteurs de VEGF conduit à des changements morphologiques, comme la réorganisation de l'actine chez les cellules endothéliales aortiques

d'origine porcine, surexprimant le récepteur VEGFR2 (Waltenberger *et al.*, 1994). La voie exacte de signalisation de ces récepteurs n'est pas tout à fait connue mais des interactions complexes ont lieu après cet événement enzymatique, essentiellement régulé par des phosphorylations/déphosphorylations de protéines cytoplasmiques (voir section sur les fonctions cellulaires des récepteurs VEGF : B.2.3.4e).

**Figure 5: Structure des récepteurs de VEGF**



(Modifié de Neufeld *et al.*, 1999)

#### **B.2.3.4d. Interaction entre les récepteurs VEGF et leurs ligands**

La spécificité de l'interaction entre les VEGFs et leurs récepteurs ressemble en complexité à celle trouvée dans les familles des FGFs et des PDGFs. Les récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 sont des récepteurs de haute affinité pour le VEGF-A (Kd : 1-20 et 750-770 pM, respectivement) (DeVries *et al.*, 1992a ; Millauer *et al.*, 1993 ; Terman *et al.*, 1992 ; Waltenberger *et al.*, 1994). Le facteur PlGF lie VEGFR1 (Kd 200 pM) apparemment sur le même site que le VEGF-A, mais n'a pas d'affinité pour VEGFR2 ou VEGFR3 (Park *et al.*, 1994). Le VEGF-C interagit avec le récepteur VEGFR3 et, à un moindre degré, avec VEGFR2 (Joukov *et al.*, 1996 ; Lee *et al.*, 1996). Le facteur VEGF-D lie les deux récepteurs VEGFR2 et VEGFR3 (Achen *et al.*, 1998) (Figure 5).

#### **B.2.3.4e. Fonctions cellulaires des récepteurs VEGF**

Bien que les récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 partagent le même ligand, ils induisent des réponses cellulaires différentes. Les fonctions spécifiques de VEGFR1 et VEGFR2 ne sont pas clairement définies au niveau cellulaire. Il semble que le récepteur VEGFR2 soit responsable de l'activité mitogénique de VEGF dans la prolifération des cellules endothéliales alors que le récepteur VEGFR1 interviendrait plutôt dans la migration de ces mêmes cellules (Waltenberger *et al.*, 1994).

La cascade de signalisation des récepteurs VEGF commence à être explorée. Jusqu'à présent, les cibles décrites pour ces récepteurs sont communes à plusieurs tyrosine kinases et comprennent les molécules GAP (GTPase Activating



Protein), Src et PLC $\gamma$  (Phospholipase C gamma) (Waltenberger *et al.*, 1994 ; Pajusola *et al.*, 1994 ; Guo *et al.*, 1995 ; Cunningham *et al.*, 1995 ; Seetharam *et al.*, 1995). VEGFR2 et VEGFR1 sont capables d'activer la voie de signalisation RAS (Rous Sarcoma). Par ailleurs, une telle activité pour le récepteur VEGFR1 dépend de la protéine adaptatrice SHC (Src homologue oncogene) (Fournier *et al.*, 1996). De plus, il a été démontré que VEGF est capable d'activer les protéines adaptatrices SHC, Nyc, Grb-2 (Growth factor receptor bound-2) et la voie de signalisation de MAP (Mitogen Activated Protein) kinase dans les cellules endothéliales aortiques d'origine porcine, transfectées avec VEGFR2. Au contraire, MAP kinase n'est pas activée par le VEGF dans les cellules transfectées avec VEGFR1 (Seetharam *et al.*, 1995 ; Kroll et Waltenberger, 1997). Il a été également démontré que les protéines tyrosines phosphatases, SHP-1 (SH2 domain protein-1) et SHP-2 (SH2 domain protein-2) sont activées et associées au récepteur VEGFR2 suite à une stimulation par VEGF (Kroll et Waltenberger, 1997). Il est probable que les trois récepteurs de VEGF interagissent à la fois avec des substrats communs et distincts, et induisent différentes réponses dans les cellules endothéliales.

#### **B.2.3.4f. Distribution et expression des récepteurs de VEGF**

Les gènes VEGFR1, 2 et 3 sont exprimés de façon prédominante dans les cellules du compartiment endothélial et leurs progénitures. Cette expression restreinte s'accorde avec l'activité spécifique des promoteurs des gènes des

récepteurs de VEGF (Morishita *et al.*, 1995). En plus de leur expression endothéliale, les récepteurs de VEGF sont également retrouvés sur différentes cellules telles que les cellules hématopoïétiques et les monocytes. Cependant, malgré l'expression sur ces types cellulaires, aucune activité mitogénique de ligands VEGF n'a été mise en évidence (Katoh *et al.*, 1995).

Les gènes des récepteurs de VEGF sont exprimés dans les cellules endothéliales dès les stades initiaux du développement embryonnaire. VEGFR1 est exprimé à partir de jour E7.5 dans tout le compartiment endothélial de l'embryon. Son expression persiste à l'état adulte. Quant à VEGFR2, il est exprimé de façon précoce dans le sac vitellin et le mésoderme embryonnaire dès le jour E7, puis dans le système vasculaire (Eichmann *et al.*, 1993 ; Yamaguchi *et al.*, 1993 ; Peters *et al.*, 1993). Les études d'inactivation génique chez les souris déficientes « knock out » pour le gène VEGFR2 ont démontré que ces souris se caractérisent par de profonds défauts dans la vasculogénèse, la différenciation des cellules endothéliales et la formation des îlots sanguins (Shalaby *et al.*, 1997 ; Flamme *et al.*, 1995). Par contre, le phénotype des souris déficientes pour VEGFR1, se manifeste par une dilatation vasculaire et une désorganisation de l'assemblage des cellules endothéliales, et agirait donc à un stade plus tardif dans le processus de vasculogénèse (Fong *et al.*, 1995). L'inactivation de VEGFR2 ou de VEGFR1 est létale au 9<sup>e</sup> jour de la vie embryonnaire chez les animaux homozygotes (Shalaby *et al.*, 1995).

Quant à l'expression du récepteur VEGFR3, elle apparaît être plus restreinte que l'expression des récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 (Kaipainen *et al.*,

1993). L'expression de VEGFR3 est détectée par hybridation *in situ* dans les angioblastes du mésenchyme de la tête et les veines d'embryon. Durant les étapes plus tardives du développement, l'ARNm de VEGFR3 est restreint aux vaisseaux lymphatiques en formation. Seuls l'endothélium lymphatique et quelques veinules expriment l'ARNm de VEGFR3 dans les tissus adultes (Kaipainen *et al.*, 1995).

#### **B.2.3.4g. Régulation de VEGF dans les conditions d'hypoxie**

L'un des éléments qui régule l'expression de VEGF-A est sa sensibilité à des conditions hypoxiques. La synthèse des autres membres de la famille VEGF, comme VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et PlGF ne semblent pas être influencée par la tension d'oxygène (Jeltsch *et al.*, 1997 ; Enholm *et al.*, 1997). En fait, le VEGF fait partie d'une large famille de protéines ou dont l'expression des gènes est induite dans des conditions de stress hypoxique. Cette induction fait intervenir des éléments de réponse à l'hypoxie localisés au niveau du promoteur du gène. Une période de faible tension en oxygène conduit à une cascade de signaux intracellulaires analogues à la transmission du signal mitogénique. L'induction hypoxique de l'érythropoétine est bien documentée. Les éléments de réponse à l'hypoxie ont été identifiés au niveau d'un activateur « enhancer » dans la région 3' de ce gène. Ces éléments sont des sites de liaison pour un facteur de transcription spécifique, HIF (Hypoxia Inducible Factor) qui a été purifié, séquencé et dont l'ADNc a été cloné. Le facteur HIF est un hétérodimère constitué de deux protéines de la famille BHLH-PAS ( Basic Helix-Loop-Helix-Per ARNT

Single-minded). L'une de ces protéines, Hif1 $\alpha$ , est rapidement dégradée en présence d'oxygène mais stabilisée en condition d'hypoxie (Semenza *et al.*, 1991).

Les éléments de réponse à l'hypoxie pour VEGF présentent de fortes analogies de séquence avec les éléments de réponse à l'hypoxie du gène de l'érythropoétine (Goldberg et Schneider, 1994). L'induction de transcription de l'ARNm de VEGF est médié au moins en partie par la liaison de la protéine HIF-1 à un site de liaison de HIF sur le promoteur de VEGF (Levy *et al.*, 1995 a ; Liu *et al.*, 1995). L'induction hypoxique de VEGF semble faire intervenir le proto-oncogène c-Src et Raf-1 (Mukhopadyay *et al.*, 1995). Cette action serait inhibée par le gène suppresseur de tumeurs, p53 (Mukhopadyay *et al.*, 1995). En plus d'induire la transcription de VEGF, l'hypoxie joue un rôle important dans la stabilisation de l'ARNm de VEGF par le biais des protéines qui lient des séquences localisées dans la région 3' UTR (Untranslated Region) de l'ARNm de VEGF (Stein *et al.*, 1995 ; Damert *et al.*, 1997 ; Claffey *et al.*, 1998). Récemment, il a été démontré que les protéines HuR et hnRNP-L (heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein L) lient des régions du messager, connues comme importantes pour la stabilisation en hypoxie. Des expériences indiquent que ces protéines jouent un rôle dans la stabilité des ARNms (Levy *et al.*, 1998 ; Shih et Claffey, 1999). Il est clair que d'autres protéines interviennent dans la stabilisation de l'ARNm de VEGF mais leur identité n'a pas encore été élucidée. Des évidences récentes indiquent que l'augmentation de la transcription du gène VEGF est également médiée par des sites localisés dans les séquences encodant la région

non-traduites de 5'UTR de l'ARNm de VEGF, cette dernière étant particulièrement longue (Stein *et al.*, 1998 ; Akiri *et al.*, 1998). L'hypoxie stimule directement la production de VEGF au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires (Brogi *et al.*, 1994) et des cellules musculaires myocardiques (Hashimoto *et al.*, 1994), ainsi que l'expression du récepteur de VEGF au niveau des cellules endothéliales (Brogi *et al.*, 1996).

#### **B.2.3.4h. Récepteur Neuropiline-1**

Les cellules endothéliales contiennent d'autres récepteurs que VEGFR1 et VEGFR2. Le récepteur neuropiline-1 est identifié comme un récepteur pour plusieurs types de semaphorines. Les semaphorines ont été initialement caractérisés comme des facteurs agissant sur la croissance des neurones (He et Tessier-Lavigne, 1997 ; Kolodkin *et al.*, 1997). Des recherches additionnelles ont démontré que certaines lignées cellulaires de cancer de la prostate et du sein, expriment de façon anormale une grande quantité de neuropiline-1 (Soker *et al.*, 1996).

Le récepteur neuropiline-1 est capable de lier l'isoforme VEGF<sub>165</sub> mais pas VEGF<sub>121</sub>. La liaison de VEGF<sub>165</sub> au récepteur neuropiline-1 est médiée par les acides aminés de l'extrémité carboxyl-terminale de l'exon 7 de la protéine VEGF<sub>165</sub> (Soker *et al.*, 1996 ; Soker *et al.*, 1997). Il a été également démontré que le récepteur neuropiline-1 est capable de lier le facteur de croissance PlGF-2 mais pas l'isoforme PlGF-1 (Migdal *et al.*, 1998). Les études de mutagenèse indiquent

que le récepteur neuropiline-1 peut agir comme un régulateur important dans le développement des vaisseaux sanguins chez la souris. Les souris déficientes pour le gène neuropiline-1 meurent parce que leur système cardiovasculaire n'est pas développé (Kitsukawa *et al.*, 1997). De plus, la neuropiline-1 constitue un co-récepteur pour le récepteur VEGFR2. En effet Soker et ses collaborateurs (1998) ont démontré que le VEGF<sub>165</sub> lie VEGFR2 plus efficacement dans les cellules exprimant le gène neuropiline-1 et cet effet se traduit par une augmentation de la prolifération cellulaire. L'identification de neuropiline-1 comme un co-récepteur pour le récepteur VEGFR2 peut expliquer pourquoi le système cardiovasculaire des embryons neuropiline-1<sup>-/-</sup> ne se développe pas normalement (Kitsukawa *et al.*, 1997). Tout récemment, par l'approche de clonage, un autre récepteur de VEGF<sub>165</sub> a été identifié et est très similaire au produit du gène neuropiline-2 (Soker *et al.*, 1998 ; He et Tessier-Lavigne, 1997).

À la lumière de la description de l'activité de tous les facteurs impliqués dans le phénomène d'angiogénèse, il est possible de dire que ce processus est réalisé en deux phases : la phase d'activation et la phase de résolution. La phase d'activation inclue les étapes suivantes :

- 1) la dégradation de la membrane basale et la matrice extracellulaire ;
- 2) la migration et différenciation cellulaire ;
- 3) la prolifération des cellules endothéliales
- et 4) la formation de capillaires.

La phase de résolution, consistant principalement à la maturation des vaisseaux sanguins, est donc caractérisée par les étapes suivantes : 1) l'arrêt de migration cellulaire ; 2) l'arrêt de prolifération cellulaire ; 3) la reconstitution de la

membrane basale et la matrice extracellulaire et 4) la maturation de la jonction inter-cellulaire et le recrutement de cellules périendothéliales.

Bien qu'il y ait beaucoup de données sur les facteurs impliqués dans la phase de l'activation, très peu d'informations sont connues sur les molécules impliquées dans la phase de résolution, mais un des candidats potentiels impliqués dans cette phase serait l'angiopoïétine-1.

### **B.2.3.5. Angiopoïétine-1**

Une nouvelle génération de molécules qui participent à l'angiogénèse ont été identifiées: l'angiopoïétine 1 (Ang-1) et l'angiopoïétine 2 (Ang-2). Le gène codant pour Ang-1, premier ligand de Tie-2/Tek (Tyrosine kinase avec Ig et epidermal growth factor homology domains-1/Tunica interna endothelial cell kinase), est largement exprimé dans les tissus embryonnaires et également chez l'adulte (Maisonpierre *et al.*, 1997 ; Davis *et al.*, 1996). Le facteur Ang-1 induit la phosphorylation du récepteur Tie-2/Tek en se fixant sur les cellules endothéliales, mais il n'induit pas leur prolifération ni la formation de réseaux capillaires dans des gels de collagène. Cependant, son expression à proximité des vaisseaux sanguins en formation et le phénotype des embryons Ang-1<sup>-/-</sup> suggèrent qu'il est impliqué dans le phénomène d'angiogénèse. Ces embryons ne dépassent pas le stade du jour E12 où la complexité du réseau vasculaire est réduite alors que le nombre total de cellules endothéliales n'est pas affecté. Les vaisseaux ont une taille relativement homogène. L'analyse ultrastructurale des embryons Ang-1<sup>-/-</sup>

montre un défaut d'étalement et d'apposition des cellules endothéliales sur la matrice sous-jacente ainsi qu'un déficit de cellules péri-endothéliales dans les zones de bourgeonnement de nouveaux vaisseaux (Suri *et al.*, 1996). De plus, les souris déficientes pour le gène Ang-1 (Ang-1<sup>-/-</sup>) possèdent les mêmes phénotypes que les souris déficientes pour le gène Tie-2 (Tie-2<sup>-/-</sup>), c'est à dire que leur système vasculaire présente un développement limité surtout au niveau de la tête et du cœur (Suri *et al.*, 1996). Toutes ces données suggèrent donc un rôle du facteur Ang-1 dans la stabilisation des cellules endothéliales lors de la formation des nouveaux vaisseaux.

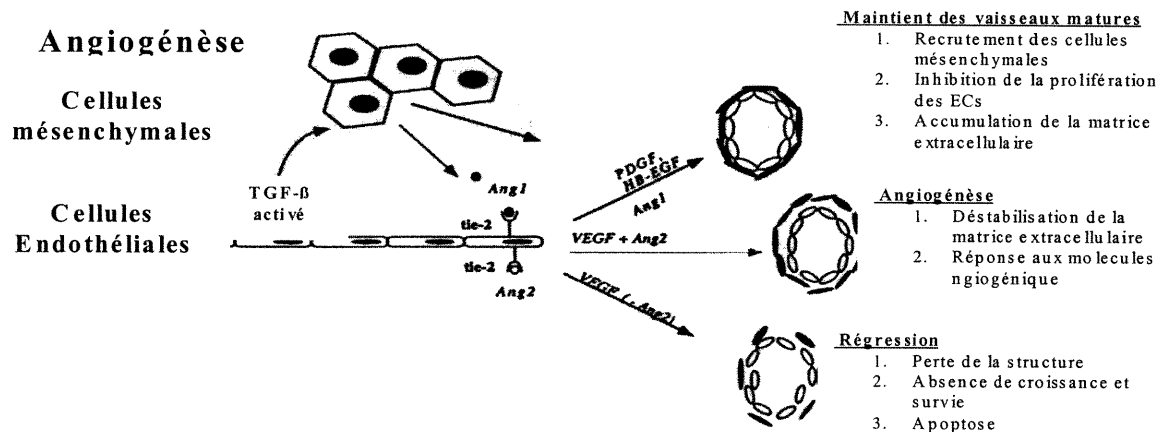
#### **B.2.3.6. Angiopoïétine-2**

Le facteur angiopoïétine-2 (Ang-2) présente 85% d'homologie en séquence d'acides aminés avec Ang-1. Le facteur Ang-2 est exprimé chez l'adulte où se produit une angiogénèse importante, comme dans l'ovaire, l'utérus et le placenta (Maisonpierre *et al.*, 1997). Comme Ang-1, Ang-2 est un ligand pour le récepteur Tie-2 mais pas Tie-1. Dans les cellules endothéliales, Ang-2 bloque la phosphorylation de Tie-2 induite par Ang-1. L'expression de Ang-2, ciblée dans les cellules endothéliales par transgénèse avec le promoteur de Tie-2, induit des défauts vasculaires identiques ou parfois plus sévères que ceux observés chez les souris Tie2<sup>-/-</sup> ou Ang-1<sup>-/-</sup> (Maisonpierre *et al.*, 1997). Ces résultats suggèrent que Ang-2 est un antagoniste naturel de Ang-1.



Le modèle proposé pour expliquer une relation entre le facteur VEGF et Ang-1 dans l'induction d'angiogénèse suggère que Ang-2 coopère avec le facteur VEGF pour induire l'angiogénèse en empêchant Ang-1 de maintenir l'intégrité de l'endothélium. En revanche, en absence de VEGF, l'inhibition de l'activité de Ang-1 par Ang-2 conduirait à un détachement des cellules endothéliales de la matrice et des péricytes, à leur mort et à la régression des vaisseaux (Suri *et al.*, 1996) (Figure 6).

**Figure 6: Présentation schématique de la relation entre le VEGF et l'Angiopoïétine-1**



(Modifié de Douglas *et al.*, 1998)

### **B.2.3.7. Récepteurs Tie-1 et Tie-2/TEK**

Les récepteurs Tie-1 et Tie-2/Tek sont deux autres récepteurs appartenant à la famille des récepteurs tyrosine kinase spécifiques aux cellules endothéliales. L'expression du gène Tie-2 a été détectée dans les îlots sanguins du sac vitellin, là où se trouvent les précurseurs communs aux cellules endothéliales et aux premiers érythroblastes (Dumont *et al.*, 1995). Elle est ensuite observée dans l'endocarde et dans les cellules endothéliales, aussi bien à l'intérieur de l'embryon et que dans les annexes extra-embryonnaires. Cette expression persiste chez l'adulte à un niveau plus faible, alors que les cellules endothéliales ne prolifèrent plus. Les embryons Tie2<sup>-/-</sup> ne survivent pas au-delà du stade E9.5 et E10.5 (Sato *et al.*, 1995). Leur système vasculaire présente un développement limité surtout au niveau de la tête et du cœur. La taille des vaisseaux est homogène : on ne distingue pas de gros et de petits vaisseaux. Le nombre de cellules endothéliales est normal et elles sont assemblées en forme de tube mais les vaisseaux sont immatures et dépourvus d'embranchements et d'organisation (Dumont *et al.*, 1994 ; Sato *et al.*, 1995). Donc, il semble que le récepteur Tie2 joue un rôle important dans la maturation et la stabilisation de la structure des vaisseaux sanguins.

Le récepteur Tie1 possède une structure similaire à celle de Tie2 et est également impliqué dans le maintien de l'intégrité des vaisseaux. Les embryons «knock out» pour le gène Tie1 meurent à partir de jour E14, en raison d'un défaut de recrutement des péricytes et des cellules musculaires lisses (Sato *et al.*, 1995 ; Puri *et al.*, 1995).

#### **B.2.4. Molécules d'adhésion**

L'angiogénèse est contrôlée à la fois par les cytokines et les molécules d'adhésion qui assurent en quelque sorte l'assemblage et l'étanchéité des vaisseaux sanguins. Des progrès considérables ont été faits dans l'identification des molécules d'adhésion cellulaire et leur modulation par les cytokines dans le phénomène d'angiogénèse. Il existe entre les cellules et la matrice extracellulaire des interactions complexes qui interviennent dans de nombreux processus biologiques tels que la prolifération, la différenciation cellulaire, l'embryogénèse, pour n'en citer que quelques uns (Revue dans Hynes, 1996). Ces interactions sont médiées par quatre principales familles de molécules d'adhésion cellulaire qui ont été identifiées sur la base de leur séquence en acides aminés: les intégrines, les cadhérines, les molécules de la superfamille des immunoglobulines et les sélectines. Les trois derniers groupes régulent certaines interactions durant le processus inflammatoire, entre les leucocytes d'une part et les cellules endothéliales d'autre part. Leur potentiel angiogénique a été principalement caractérisé dans les essais d'angiogénèse *in vivo* tels que le modèle de CAM ou le modèle de la cornée de lapin (Klagsburn *et al.*, 1990).

Les intégrines seraient impliquées dans un très grand nombre d'événements physiologiques importants comme le développement embryonnaire, l'hémostase, la thrombose, la guérison tissulaire, les mécanismes de la réponse immunitaire et l'angiogénèse, et aussi dans des événements pathologiques comme l'invasion tumorale et la dissémination métastatique (Folkman, 1990).

De nombreux travaux montrent l'importance des cadhérines dans le maintien de la cohésion et de l'organisation des tissus. Notamment, la VE-cadhérine (Vascular Endothelial Cadherin) participe spécifiquement aux contacts des cellules endothéliales entre elles (Gumbiner, 1996). Cette protéine est également impliquée dans la prolifération, la différenciation et la migration des cellules endothéliales (Dejana, 1996). La molécule VE-cadhérine semble participer au phénomène d'angiogénèse médiée par le VEGF. Il a également été démontré que la protéine VE-cadhérine jouait un rôle important dans la survie des cellules endothéliales puisque les souris dépourvues du gène VE-cadhérine (VEC<sup>-/-</sup>) étaient déficientes en vaisseaux matures (Carmeliet *et al.*, 1999).

Parmi les nombreuses molécules de la superfamille des immunoglobulines, PECAM (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule), qui a d'abord été mise en évidence sur les plaquettes, pour ensuite être clonée à partir des cellules endothéliales, est exprimée en un très grand nombre de copies par les cellules endothéliales et intervient dans les interactions homophyloques cellule-cellule (Breier *et al.*, 1996).

Quant aux sélectines, il est à noter qu'il n'y a pas d'évidences directes montrant un rôle pour les membres de la famille des sélectines dans le phénomène d'angiogénèse mais la fixation des cellules sanguines telles que les monocytes aux molécules d'adhésion permet de produire sur place des facteurs angiogéniques (Melder *et al.*, 1996).

### **B.2.5. Inhibiteurs de l'angiogénèse**

L'existence des inhibiteurs d'angiogénèse a suscité énormément d'intérêt notamment dans le domaine de la cancérologie. La liste des facteurs ayant une telle activité s'allonge régulièrement. Elle comprend notamment l'angiostatine, l'endostatine et les TIMPs (Revue dans Folkman et D'Amore, 1996). C'est dans les tissus non vascularisés qu'ont d'abord été recherchés des inhibiteurs de l'angiogénèse. Par exemple, l'activité du fragment de 140 kDa de la thrombospondine a été identifiée dans le surnageant de cellules non transformées (Good *et al.*, 1990). On trouve parmi les inhibiteurs de l'angiogénèse des fragments protéolytiques de protéines qui n'ont pas d'activité lorsqu'elles ne sont pas clivées. C'est le cas de l'angiostatine (fragment du plasminogène) et de l'endostatine, (fragment du collagène XVIII) qui sont principalement localisés à la périphérie des vaisseaux sanguins ou du fragment 16 de la prolactine (Clapp *et al.*, 1993) dont on trouve des quantités importantes dans le plasma. La coupure protéolytique du « platelet factor-4 » (PF-4) engendre un fragment qui inhibe beaucoup plus efficacement la prolifération des cellules endothéliales que PF-4 entier (Gupta *et al.*, 1995).

Les mécanismes d'action et les cibles moléculaires de ces facteurs anti-angiogéniques sont encore mal connus. Par exemple, le fragment 16 kDa de la prolactine inhibe la MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) activée par le VEGF et le FGF-2 (D'Angelo *et al.*, 1995) mais le récepteur de ce fragment n'a pas été identifié.

## **B.2.6 Effet des facteurs angiogéniques dans les conditions d'ischémie**

### **B.2.6.1. Études animales**

De nombreuses études expérimentales concernant l'effet de l'administration exogène de facteur de croissance dans diverses situations d'ischémie expérimentale sont en cours. L'administration de ces facteurs de croissance permet d'augmenter le nombre de vaisseaux collatéraux et la densité capillaire dans les tissus ischémiques. Il est intéressant de noter que ces résultats ont été retrouvés dans plusieurs espèces animales : rat, lapin, chien et porc, et dans différents sites vasculaires tels que les membres inférieurs et le myocarde.

Banai et ses collaborateurs (1994 a,b), ont démontré que l'administration intracoronarienne de la protéine recombinante de VEGF<sub>165</sub> dans un modèle de chien avec une ischémie myocardique augmente de 89% la densité de vaisseaux et que le développement des vaisseaux collatéraux est accompagné d'une augmentation de 40% du flux sanguin telle que déterminée par la méthode des microsphères radioactives. Également, Takeshita et ses collaborateurs (1994) ont démontré l'effet angiogénique de VEGF dans un modèle de lapin en donnant une seule injection intra-artérielle de la protéine recombinante de VEGF<sub>165</sub> dans les membres inférieurs ischémiques de lapin. Cette étude a démontré une augmentation de nouveaux vaisseaux capillaires.

Parallèlement à l'isoforme 165 de la famille VEGF-A, l'isoforme 121 a également été utilisée en thérapie angiogénique. Mack et ses collaborateurs (1998) ont rapporté que l'administration intramyocardique d'adénovirus exprimant le gène VEGF<sub>121</sub> au niveau d'un coeur ischémique chez le modèle porcin, induit le développement de vaisseaux collatéraux, ce qui améliore la fonction et la perfusion myocardique. Takeshita et ses collaborateurs (1996) ont comparé l'effet angiogénique des trois isoformes de VEGF-A, soient, 121, 165 et 189 dans un modèle d'ischémie des membres inférieurs de lapin. Les auteurs ont conclu que l'administration de chaque isoforme conduit au développement de nouveaux vaisseaux collatéraux ainsi qu'à l'augmentation de flux sanguin dans la région ischémique.

Patel et ses collaborateurs (1999) ont également démontré la faisabilité d'injection des adénovirus exprimant le gène VEGF<sub>121</sub> dans un coeur ischémique chez le porc. Un autre groupe (Kornowski *et al.*, 2000b) a démontré que l'utilisation des adénovirus exprimant le gène de VEGF<sub>121</sub> conduit à l'expression du transgène au site de l'injection. Cependant, ils ont présenté aucun résultats sur la fonction myocardique ni sur l'histologie.

Il y a également des études plus récentes sur l'utilisation d'un plasmide exprimant le gène VEGF<sub>165</sub>. Alors que le groupe de Tio et ses collaborateurs (1999) a démontré une amélioration de la fonction myocardique dans un coeur ischémique chez le modèle porcin, Schwartz et ses collaborateurs (2000) a démontré aucun changement dans ce paramètre chez le modèle de rat.

Un autre facteur de croissance dont l'activité angiogénique a été testée *in vivo*, est FGF. En effet, le groupe de Yanagisawa-Miwa (1992) a démontré que l'administration intracoronarienne de bFGF dans un modèle de chien d'infarction aiguë peut réduire la taille de la zone infarctie et ainsi conserver la fonction du ventricule gauche. Un autre groupe, Unger et ses collaborateurs (1994) ont rapporté que l'administration intracoronarienne de bFGF augmente le développement des vaisseaux collatéraux dans un modèle de coeur ischémique canin. L'administration par voie intracoronarienne de bFGF sur une période de quatre semaines n'a aucun effet significatif sur le flux myocardique mais elle augmente la formation de nouveaux vaisseaux collatéraux. Plus récemment, Giordano et ses collaborateurs (1996) ont démontré que l'injection intracoronarienne de FGF-5 dans un modèle porcin de myocarde ischémique, améliore la fonction cardiaque ainsi que le flux sanguin deux semaines après le traitement. Une seule étude a été faite pour comparer l'effet angiogénique de VEGF<sub>165</sub> et bFGF dans un modèle de coeur ischémique chez le chien : Lazarous et ses collaborateurs (1996) ont rapporté que le traitement par bFGF augmente le développement des vaisseaux collatéraux sans formation de néointima au site d'administration du facteur de croissance, alors que l'administration de VEGF était accompagnée de la formation d'une couche néointimale au site d'administration.

L'avantage théorique du VEGF est sa spécificité pour les cellules endothéliales et des résultats positifs ont été rapportés avec des modes d'administration variés soit local, soit intraveineux et ceci de façon unique ou répétée. Cependant, une des limites potentielles de l'utilisation des protéines



recombinantes est leur très courte demi-vie lorsqu'elles sont administrées dans la circulation. Ceci a conduit à l'élaboration de stratégies faisant appel à la thérapie génique.

Toutes ces données suggèrent que l'administration ou l'expression locale du gène VEGF est associée à une augmentation de la circulation collatérale liée à l'ischémie, aussi bien dans le tissu myocardique que dans les tissus périphériques.

### **B.2.6.2 Études cliniques**

Losordo et ses collaborateurs (1998) ont initié une étude clinique de phase I pour déterminer l'innocuité et la bioactivité d'injection directe de façon myocardique du plasmide codant pour le gène VEGF<sub>165</sub>. Cette étude a été réalisée sur 5 patients qui n'étaient pas éligibles à des thérapies conventionnelles, telles que l'angioplastie coronarienne, le pontage ou l'implantation de prothèse vasculaire. Chaque patient a reçu 4 injections de 125 µg d'un plasmide encodant pour le gène de VEGF<sub>165</sub>, pour un volume total de 2 ml *via* une mini-thoracothomie au niveau de la paroi antéro-latérale du ventricule gauche. Les 5 patients traités, ont montré aucune complications opérationnelles. Les résultats obtenus de cette étude suggèrent que l'injection myocardique de VEGF sous forme de plasmide est sécuritaire et conduit, chez les patients présentant une ischémie myocardique chronique, à une amélioration de la perfusion myocardique analysée par tomographie « SPECT : Single Photon Emission Computed Tomography ».

D'autre part, Baumgartner et ses collaborateurs (1997) ont récemment démontré que l'administration intramusculaire du plasmide exprimant le gène VEGF<sub>165</sub> dans les membres inférieurs ischémiques de patients, conduit au développement de nouveaux vaisseaux localisés au niveau du site d'injection dans la région ischémique, et une augmentation qualitative du flux sanguin. De plus, Schumacher et ses collaborateurs (1997) ont démontré que l'injection intramyocardique de la protéine recombinante de FGF-1 a conduit au développement de nouveaux réseaux capillaires.

Une autre étude clinique a été initiée afin d'étudier la sécurité d'injection de VEGF sous forme plasmidique chez l'humain. Cette étude examine l'effet de VEGF chez les patients avec une ischémie dans les membres inférieurs (Baumgartner *et al.*, 1998). Malgré une expression limitée de VEGF chez ces patients, la formation des vaisseaux collatéraux a été documentée chez 7 sur 10 patients traités avec amélioration du flux sanguin chez 8 sur 10. Aucun effets secondaires ont été rapportés. Cependant, dû à la nature non-controlée de ces études, il est juste possible de démontrer la faisabilité d'une telle thérapie pour traiter les maladies vasculaires périphériques.

D'autre part, Vale et ses collaborateurs (2000) ont démontré que l'utilisation de VEGF<sub>121</sub> sous forme plasmidique conduit à une diminution de l'angine de poitrine. Cependant, cette étude manque le groupe contrôle.

Toutes les études animales et cliniques suggèrent la faisabilité d'une thérapie par angiogénèse en utilisant des protéines angiogéniques. Cependant, de nombreux champs d'investigation restent à être explorés.

## **C. Thérapie des maladies ischémiques**

La maladie coronarienne et ses complications demeurent la principale cause de mortalité dans les pays industrialisés. Cette maladie est actuellement traitée à l'aide de différentes approches : agents pharmaceutiques, angioplastie coronarienne et enfin pontage coronarien. Cependant, dans la majorité des cas, la récurrence engendrée par ces traitements nécessite des réinterventions souvent beaucoup plus complexes. Ces complications ont incité les chercheurs à développer entre autre deux nouvelles stratégies thérapeutiques : 1) l'approche biologique basée sur la thérapie génique, est une forme de la thérapie par angiogénèse et 2) l'approche mécanique basée sur l'utilisation du laser transmyocardique (TMR).

Le champ potentiel d'application de la thérapie génique est vaste, portant à la fois sur les maladies héréditaires comme la mucoviscidose, l'hypercholestérolémie familiale et les maladies acquises telles que différents types de cancer et les maladies cardiovasculaires. La thérapie génique appliquée à la revascularisation d'une région myocardique ischémique, consiste à injecter des facteurs de croissance angiogéniques sous forme de gène ou de protéine recombinante. Les nouveaux vaisseaux permettraient une meilleure perfusion dans le tissu ischémique et amélioreraient la condition du patient.

## **C.1. Approche biologique : thérapie génique**

La thérapie génique a eu pour ambition initiale le traitement des maladies génétiques héréditaires, comme la myopathie de Duchênne ou la mucovicirose. Cette approche est maintenant envisagée pour le traitement de maladies acquises comme le cancer et les maladies cardiovasculaires. Aussi, les techniques de transfert de gènes se sont remarquablement développées ces dernières années et plusieurs types de vecteurs non-viraux et viraux ont été proposés.

La thérapie génique a connu un développement considérable et de nombreuses pathologies ont fait l'objet de travaux expérimentaux. Les résultats prometteurs chez l'animal ont incité plusieurs équipes à initier des essais cliniques chez l'humain.

La thérapie génique consiste à considérer un gène comme un médicament, qu'il s'agisse de remplacer la fonction d'un gène défectueux ou de commander la synthèse dans l'organisme d'une protéine thérapeutique. L'un des aspects essentiels du transfert de gènes à visée thérapeutique, est la vectorisation de l'ADN jusqu'à la cellule cible. Le transfert de gènes dans les cellules de mammifères peut s'effectuer soit sous forme d'ADN plasmidique, soit incorporé dans un vecteur viral recombinant. La liste de ces vecteurs est résumée dans le tableau II.

Les différentes étapes de transfert de gènes sont l'accès aux cellules cibles, l'interaction avec ces cellules, le transfert cytoplasmique, la libération et la stabilisation de l'ADN ou de l'ARN dans le noyau, et finalement la régulation de l'expression de la protéine.

Comme décrit dans le tableau II, les vecteurs non-viraux et les vecteurs viraux possèdent des avantages et des inconvénients qui font qu'ils ne peuvent remplir toutes les conditions pour un vecteur de transfert génique idéal dans le but de thérapie par angiogénèse. Cependant, les adénovirus pourraient être des candidats très intéressants pour atteindre un tel but.

En effet, les adénovirus sont des virus à ADN dont le génome compte 36 kb. Une cinquantaine d'adénovirus différents peuvent infecter l'homme ; ils appartiennent au genre Mastadénovirus. Certains sont pathogènes et déclenchent de graves entérites chez les nourrissons, mais ils sont souvent présents chez leur hôte sans se manifester. S'ils infectent tous les types cellulaires (Kirshenbaum *et al.*, 1993; Revue dans Walther et Stein, 2000), les adénovirus humains ont deux cibles privilégiées : les tissus respiratoires et les tissus oculaires. Les virions s'adsorbent sur la membrane des cellules *via* les récepteurs CAR (Coxsakiavirus Adenovirus Receptor) (Bergelson *et al.*, 1997), puis pénètrent par endocytose ; le virus perd alors progressivement les composants de sa capsid (Greber *et al.*, 1993). L'ADN viral associé à des protéines migre vers le noyau, y pénètre puis commence à être transcrit par les enzymes de l'hôte sans qu'il y ait insertion.

### **C.1.1. Adénovirus : vecteur de gènes**

Bien qu'historiquement les rétrovirus aient été les premiers utilisés dans la recherche pour la thérapie génique, un intérêt croissant s'est manifesté envers les vecteurs adénoviraux. Les avantages des adénovirus sur les rétrovirus sont

multiples. Contrairement aux rétrovirus sauvages, l'adénovirus est un agent infectieux bénin, responsable avant tout d'atteintes des voies aériennes supérieures. La souche sérotype 5 a été utilisée sans atténuation pour vacciner les soldats du corps expéditionnaire américain en Corée, sans effets secondaires particuliers. Par ailleurs, les adénovirus ont un tropisme pour divers types cellulaires de nombreuses espèces animales y compris l'homme. La caractéristique la plus séduisante est la possibilité d'obtenir un transfert génique également à l'intérieur de cellules incapables de se diviser (Revue dans Walther et Stein, 2000). Ils sont donc d'excellents candidats pour le transfert de gènes thérapeutiques évitant, à l'inverse des vecteurs rétroviraux, les manipulations *ex vivo* des cellules de patients. Contrairement au rétrovirus, l'ADN adénoviral reste en position extra-chromosomique et ne risque pas d'interférer avec le fonctionnement de gènes cellulaires par suite à une intégration dans l'ADN génomique (Revue dans Walther et Stein, 2000). Enfin, les adénovirus peuvent être obtenus à des titres plus élevés (de l'ordre de  $10^9$ - $10^{10}$  pfu/ml) que ceux observés avec les rétrovirus ( $10^5$ - $10^7$  pfu/ml) (Kelly, 1984).

Comme dans le cas des rétrovirus recombinants, les vecteurs adénoviraux sont modifiés de telle sorte qu'ils soient incapables de se répliquer et sont dépourvus de tout effet pathogène. Dans la première génération des vecteurs adénoviraux recombinants, les régions E1 (E1A et E1B) et E3 ont été délétées et remplacées par jusqu'à 7 kb d'ADN étranger thérapeutique. Jusqu'à présent, la faisabilité de l'approche thérapeutique, l'expérimentation animale et les premiers essais cliniques de phase I chez l'homme ont été réalisés à l'aide de vecteurs de

première génération. Des vecteurs de nouvelle génération sont en cours de développement dans les laboratoires (Revue dans Danthinne et Imperiale, 2000). Les vecteurs de deuxième génération ont été conçus pour réduire la réponse immunitaire, soit en mutant un gène de la région E2, ce qui inhibe l'expression des gènes tardifs (Zhou *et al.*, 1996). Des vecteurs de troisième génération présentent une délétion de certains cadres de lecture ouverts de la région E4 (Scaria *et al.*, 1995). Et plus récemment, des vecteurs de quatrième génération quasiment dépourvus de toute séquence codante appelés *gutless* ont été élaborés (Hammerschmidt, 1999 ; Kochanek, 1999). La production de ces vecteurs dépend d'un virus auxiliaire (helper) capable de compléter en *trans* les fonctions protéiques indispensables à l'empaquetage et à la réplication du virus thérapeutique. La grande difficulté avec cette génération de virus était de produire à des titres élevés le virus d'intérêt et se débarrasser du virus auxiliaire dans les préparations finales. Les générations récentes d'adénovirus recombinants permettent l'insertion des transgènes de taille allant jusqu'à 8 kb. Cependant, ces nouvelles générations de virus sont très peu documentés et leur efficacité dans la thérapie génique reste à être confirmée.

#### **C.1.1.1 Principes d'obtention d'un vecteur adénoviral**

Comme pour les rétrovirus, l'adénovirus recombinant est empaqueté par un système *ex vivo* ou complémentation en *trans* dans la lignée de cellules 293. Il s'agit de cellules de rein embryonnaire humaines transformées par la présence

d'ADN d'adénovirus de type 5, qui comportent au sein de leur génome les gènes E1a et E1b. La transfection, à l'intérieur de ces cellules, d'un plasmide adénoviral recombinant comportant le transgène permet d'obtenir par complémentarité, des virions vecteurs doués de la propriété d'infecter des cellules réceptives, mais incapables de se répliquer. Un risque de trans-complémentation par un adénovirus sauvage reste néanmoins théoriquement possible. L'insertion d'ADN étranger dans le génome viral s'effectue par recombinaison homologue entre le plasmide recombinant portant le transgène et le génome viral. Un inconvénient de ce type de vecteur retrouvé dans les cellules qui se divisent où le transgène est appelé à être rapidement perdu puisque l'ADN recombinant extrachromosomique ne se réplique pas et finit par disparaître des cellules filles. Mais l'état extrachromosomique du vecteur dans les cellules infectées fournit un transfert sans risque de transformation (maligne ou bénigne) par insertion (Stratford-Perricaudet *et al.*, 1992). Ceci constitue un avantage par rapport aux vecteurs rétroviraux. Un autre défaut de l'adénovirus en tant que vecteur de thérapie génique est sa capacité à déclencher chez l'hôte une réaction immunitaire tant humorale que cellulaire due à l'expression résiduelle de protéines virales.



**Tableau II: Différents systèmes de transfert génique**

<b>Vecteur</b>	<b>Cible potentielle</b>	<b>Avantages</b>	<b>Désavantages</b>
Liposome	Nombreux types cellulaires	- Encapsule diverses molécules de masse moléculaire élevée - Faible toxicité	- Efficacité de transfection très faible - L'expression transitoire
Plasmide	Nombreux types cellulaires, avec une meilleure efficacité dans le muscle et le derme	- Non immunogène - Production aisée - Facile à manipuler	- Efficacité de transfert très faible - Fréquence d'intégration basse
Rétrovirus	Cellules en division	- S'intègre au génome de l'hôte, expression génique plus stable	- Titre viral faible (10 <sup>7</sup> pfu/ml) - N'infecte que les cellules en croissance - Taille limitée du transgène
Adénovirus	Tous les types cellulaires sauf lymphocytes et cellules hématopoïétiques	- Titre viral élevé (10 <sup>10</sup> pfu/ml) - Infection efficace <i>in vivo</i> - Infecte les cellules différenciées quiescentes - Biologie bien comprise - Accepte 8 kb d'ADN étranger et plus	- Pas d'intégration dans le génome de l'hôte ; transfert génique peu stable - Peut se recombiner avec de l'adénovirus sauvage - Réponse inflammatoire et immune
Virus Herpes simplex	Cellules quiescentes comme les neurones et les hépatocytes	- Nombreuses cellules-hôtes - Infecte des cellules différenciées quiescentes - Accepte 30 kb d'ADN étranger	- Recombinaison possible avec les virus utilisés pour la production des particules virales - Cytotoxicité élevée - Génome viral plus difficile à manipuler - Régulation complexe de l'expression des gènes
Virus adéno-associés	Cellules hématopoïétiques, fibroblastes et épithéliales	- Intégration dans le chromosome - Peut adopter un état de latence - Structure simple	- Titre viral assez faible - Capacité d'accepter seulement 4 kb d'ADN étranger - Nécessite un adénovirus pour produire des particules virales - Biologie mal comprise

(Modifié de Walther et Stein, 2000)

## C.2. Approche mécanique : Laser transmyocardique ou TMR

L'utilisation du laser transmyocardique est une nouvelle procédure chirurgicale qui a récemment été appliquée dans des études cliniques. Les patients ayant reçu ce traitement, étaient réfractaires aux techniques de revascularisations conventionnelles telles que l'angioplastie coronarienne ou le pontage cardiaque principalement dû à la nature diffuse de leur maladie. Le principe de la technique du TMR implique l'utilisation de laser à haute énergie afin de créer des canaux transmyocardiques, de l'épicarde vers l'endocarde, dans le tissu ischémique. Les résultats préliminaires d'études utilisant le laser myocardique ont démontré que cette technique réduit les symptômes de l'angine de poitrine (Cooley *et al.*, 1994 ; Frazier *et al.*, 1995 ; Mirhoseini *et al.*, 1988, 1990) sans évidence solide d'amélioration de la perfusion. Cependant, le mécanisme exact de son fonctionnement n'est pas encore connu. Il a été spéculé que les canaux formés par le laser agissent comme des conduits qui amènent du sang oxygéné du ventricule gauche dans le plexus vasculaire intramyocardique. Cependant, il existe un grand débat sur la perméabilité de ces canaux. Fleicher et ses collaborateurs (1996) ont démontré que l'application de TMR dans un cœur non ischémique chez le modèle porcin conduit à une augmentation de vascularité sans cependant avoir des canaux perméables. Cependant, Mirhoseini et ses collaborateurs (1983) ont publié des évidences histologiques que les canaux demeurent perméables jusqu'à deux ans après l'opération. D'autres investigations ont également montré que les canaux formés par le laser sont endothélialisés plusieurs années après l'opération (Okada

*et al.*, 1986). Des études cliniques indiquent que les canaux créés par le laser restent ouverts après différents temps suivant l'intervention (Mirhoseini *et al.*, 1990 ; Cooley *et al.*, 1994). D'un autre côté, plusieurs études suggèrent que les canaux restent perméables pour une courte période, ou deviennent occlus deux semaines après l'opération (Hardy *et al.*, 1987 ; Owen *et al.*, 1984). Un mécanisme proposé serait que la cicatrisation ou l'inflammation au site des canaux induise une angiogénèse naturelle. Il est bien connu que lors d'une réponse inflammatoire, il y a une augmentation significative de différents facteurs de croissance. Chu et ses collaborateurs (1999) ont démontré que le traitement par le laser est associé avec une augmentation de facteurs angiogéniques tel que VEGF, bFGF et TGF $\beta$ , ainsi que la densité des vaisseaux une semaine post-traitement. Ces facteurs angiogéniques peuvent initier et promouvoir la néovascularisation dans le site de laser.

D'autre part entre 1995 à 1997, il y a eu plusieurs études cliniques rapportées (Frazier *et al.*, 1995 ; Horvath *et al.*, 1996 ; Vincent *et al.*, 1997 ; Horvath *et al.*, 1997). Les résultats de certaines de ces études étaient intéressants, mais elles manquent des groupes contrôles. Récemment, quatre études cliniques randomisées ont été publiées, comparant la thérapie médicale et TMR (Revue dans Horvath, 2000). Tous les patients ont été suivi pendant 12 mois. Toutes ces études ont démontré une amélioration significative dans la perfusion myocardique chez les patients traités par le laser.

*et al.*, 1986). Des études cliniques indiquent que les canaux créés par le laser restent ouverts après différents temps suivant l'intervention (Mirhoseini *et al.*, 1990 ; Cooley *et al.*, 1994). D'un autre côté, plusieurs études suggèrent que les canaux restent perméables pour une courte période, ou deviennent occlus deux semaines après l'opération (Hardy *et al.*, 1987 ; Owen *et al.*, 1984). Un mécanisme proposé serait que la cicatrisation ou l'inflammation au site des canaux induise une angiogénèse naturelle. Il est bien connu que lors d'une réponse inflammatoire, il y a une augmentation significative de différents facteurs de croissance. Chu et ses collaborateurs (1999) ont démontré que le traitement par le laser est associé avec une augmentation de facteurs angiogéniques tel que VEGF, bFGF et TGF $\beta$ , ainsi que la densité des vaisseaux une semaine post-traitement. Ces facteurs angiogéniques peuvent initier et promouvoir la néovascularisation dans le site de laser.

D'autre part entre 1995 à 1997, il y a eu plusieurs études cliniques rapportées (Frazier *et al.*, 1995 ; Horvath *et al.*, 1996 ; Vincent *et al.*, 1997 ; Horvath *et al.*, 1997). Bien que les résultats de certaines de ces études étaient intéressants mais elles manquent des groupes contrôles. Récemment, quatre études cliniques randomisées ont été publiées, comparant la thérapie médicale et TMR (Revue dans Horvath, 2000). Tous les patients ont été suivi pendant 12 mois. Toutes ces études ont démontré une amélioration significative dans la perfusion myocardique chez les patients traités par le laser.

Malgré toutes les études effectuées sur la thérapie par angiogénèse en utilisant le facteur angiogénique VEGF ainsi que le TMR, il reste encore beaucoup d'aspects à considérer. Dans la première partie de ma thèse de doctorat, nous avons étudié l'effet synergique de la thérapie génique soit l'utilisation du facteur angiogénique, le VEGF avec une approche mécanique soit l'utilisation de laser transmyocardique dans le coeur ischémié chez un modèle porcin.

## **D. Fonction endothéliale et radiation ionisante**

### **D.1. Resténose**

L'angioplastie coronaire percutanée (PTCA) s'est imposée comme une technique de revascularisation myocardique. La première angioplastie coronaire par ballonnet fut réalisée en septembre 1977 par Andréas Gruentzig. Depuis son introduction, l'angioplastie coronaire transluminale est devenue une méthode classique de revascularisation myocardique. L'adaptation optimale de l'environnement pharmacologique et les performances en constante amélioration des ballons expliquent l'excellence des résultats acquis aujourd'hui par la technique.

Le principe de l'angioplastie coronarienne percutanée consiste à rétablir la circulation sanguine dans les artères coronaires bloquées à l'aide d'un cathéter-ballon. L'angioplastie transluminale des vaisseaux par ballonnet réduit la sténose d'une part, par pression sur la plaque d'athérome en provoquant sa rupture ou son tassement, et d'autre part, par distension de la paroi vasculaire elle-même (Guenot et Terraube, 1991). Le cathéter ballon est introduit dans l'artère coronaire bloquée où il est dilaté afin d'écraser la lésion contre la paroi artérielle.

Malgré les progrès accomplis, des difficultés subsistent. L'apparition d'une resténose dans 40-50% des cas au cours des 6 mois suivant la dilatation coronaire constitue le talon d'Achille de la technique. La resténose reste la principale limite de l'angioplastie coronaire (Steg, 1996). Les données cliniques et expérimentales à partir des modèles animaux ont mis en évidence le caractère précoce, local et

transitoire de ce phénomène. Quatre paramètres ont été avancés pour en expliquer le mécanisme. 1) L'hyperplasie néo-intimale, liée à une prolifération dans l'intima de cellules musculaires lisses en provenance de la média et favorisée par de nombreux facteurs de croissance. 2) Le défaut de remodelage ou retour élastique chronique, caractérisé par une réduction du calibre de l'artère au site dilaté. 3) Le retour élastique aigu intervenant dans les premières minutes ou heures suivant l'angioplastie. 4) Le dépôt de matrice extracellulaire.

### **D.1.1. Hyperplasie intimale**

La paroi des artères est composée de trois tuniques avec, de l'intérieur vers l'extérieur, l'intima, la média et l'adventice. L'intima est constituée d'un endothélium et d'une couche sous-endothéliale inconstante. La média comporte des cellules musculaires lisses, des constituants extracellulaires faits des fibres conjonctives et de substance fondamentale. L'adventice est une tunique d'épaisseur variable selon le calibre du vaisseau, composée de tissu conjonctif lâche plus ou moins enrichi en fibres élastiques, en fibroblastes et en cellules contingentes (macrophages, mastocytes). Elle contient du tissu adipeux, des fibres nerveuses (*nervi vasorum*) et des vaisseaux sanguins et lymphatiques (*vasa vasorum*) (Silverthon *et al.*, 1987). L'hyperplasie intimale reste un élément important de la resténose chez l'homme, mais ne joue probablement pas un rôle exclusif. L'hyperplasie intimale post-angioplastie correspond à la prolifération et à la migration des cellules du muscle lisse vers l'espace intimal et coïncide avec une

transformation phénotypique de ces dernières. Les cellules passent d'un phénotype contractile (ou différencié) à un phénotype synthétique (ou activé). Elles prolifèrent et migrent de la média vers l'intima à travers la lame limitante élastique interne pour former un épaissement néo-intimal (Revue dans Bittl, 1996). Cette prolifération est extrêmement rapide et caractérisée par l'activation de divers gènes classiquement impliqués dans la régulation des phases initiales de la croissance cellulaire, comme les oncogènes nucléaires. La réponse des cellules musculaires lisses après l'angioplastie au niveau de la paroi vasculaire est un processus complexe et multifactoriel sous le contrôle de facteurs de croissance de plusieurs origines : plaquettes, cellules musculaires, cellules endothéliales, macrophages. Les principaux facteurs de croissance impliqués dans la resténose sont le PDGF, le FGF, l'EGF le TGF- $\beta$ , l'IGF (Insulin-like Growth Factor) mais également l'angiotensine II, la thrombine et l'endothéline qui ont une action mitogénique sur les cellules musculaires lisses activées. La phase de la formation de la néointima est accompagnée de la synthèse d'une abondante matrice extracellulaire riche en collagène (Ueda *et al.*, 1995).

L'endothélium sain joue un rôle essentiel dans l'inhibition de la croissance des cellules musculaires lisses grâce à la synthèse et à la sécrétion de facteurs tels que l'héparane sulfate, l'EDRF (Endothelial Relaxant Factor) ou le NO (oxyde nitrique) (Gravanis et Roubin, 1989 ; Garland *et al.*, 1995), prostacycline, bradykinine (Revue dans Goligorsky, 2000). L'apparition d'une réendothélialisation après l'angioplastie a aussi été documentée chez l'homme dès



la fin du premier mois, et dans certains cas de régénération incomplète étant observés jusqu'à cinq mois après le traumatisme initial (Ueda *et al.*, 1991). La régénération endothéliale se fait à partir des limites de la région dénudée (Lindner *et al.*, 1989).

L'administration, chez l'animal, des facteurs de croissances endothéliaux tels le bFGF ou le VEGF a été associée à une accélération de la réendothélialisation de segments artériels préalablement dénudés. En effet, Asahara et ses collaborateurs (1995) ont démontré que l'administration de VEGF<sub>165</sub> après une dénudation artérielle permettait non seulement d'entraîner une repousse très rapide de l'endothélium mais aussi de limiter de manière significative l'hyperplasie néo-intimale. Il est vraisemblable que cet effet inhibiteur soit une conséquence de repousse rapide de l'endothélium qui exerce des propriétés inhibitrices sur la croissance des cellules musculaires lisses. Des effets similaires ont été démontrés sur l'endothélialisation des endoprothèses vasculaires (Ombrellaro *et al.*, 1996).

L'effet de bFGF sur l'hyperplasie néo-intimale est plus controversé. Certaines études ont démontré une augmentation et d'autres une diminution, voire même une absence de l'hyperplasie (Meurice *et al.*, 1996 ; Linder *et al.*, 1990). À la différence du VEGF, le bFGF n'est pas un facteur de croissance spécifique des cellules endothéliales et il est aussi actif sur les cellules musculaires lisses.

### **D.1.2. Remodelage vasculaire**

Les théories traditionnelles concernant les mécanismes de resténose, accordent à l'hyperplasie des cellules musculaires lisses un rôle prédominant, voire exclusif. Des données expérimentales et cliniques récentes obtenues notamment grâce à l'échographie endocoronarienne, ont montré qu'indépendamment de la réponse hyperplasique néo-intimale, l'angioplastie pouvait induire des modifications morphologiques chroniques de l'ensemble de la paroi du vaisseau conduisant à une réduction du calibre de la lumière (Revue par Nikol et Huehns, 2001). Ce concept est indirectement issu des travaux décrits en 1987 par Glagov sur le remodelage artériel au stade précoce du développement de l'athérosclérose. Il repose sur une tendance à l'augmentation de la surface de section, donc la lumière artérielle, lorsque la plaque se développe. Il s'agit d'un phénomène adaptatif réduisant l'importance relative de la plaque par rapport à la lumière. Le mécanisme impliqué dans le remodelage pourrait être un processus actif lié à un signal de croissance engendré par la sténose ou un phénomène passif d'involution de la structure de la paroi artérielle qui se laisserait alors distendre. Le défaut de remodelage est une réduction de calibre de l'ensemble du vaisseau au site de dilatation aboutissant à une réduction du calibre de la lumière artérielle. Les mécanismes du défaut de remodelage sont encore mal connus.

### **D.1.3. Retour élastique « Elastic recoil »**

Le retour élastique immédiat après angioplastie est caractérisé par une perte rapide de gain survenant dans les 15 minutes suivant l'angioplastie, parfois immédiatement après la déflation du ballonnet. Son évaluation se fait par la différence entre le diamètre du ballon gonflé et le diamètre de la lumière artérielle après déflation (Kakuta *et al.*, 1994). Ce phénomène est essentiellement rencontré dans les lésions excentriques où l'augmentation initiale de la lumière est surtout liée à une expansion du segment sain. Comme le remodelage artériel, le retour élastique est prévenu ou traité par les endoprothèses qui forment une contention mécanique de la paroi.

### **D.1.4. Dépôt de la matrice extracellulaire**

L'accumulation substantielle des protéoglycanes dans la matrice extracellulaire a aussi été confirmée dans les lésions resténotiques (Nikkari *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1995). Plus spécifiquement, une augmentation de l'expression du biglycan et versican a été observée, tandis qu'aucun changement n'a été remarqué en ce qui concerne l'expression de décorin (Nikkari *et al.*, 1994; Riessen *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1995). Des études préliminaires suggèrent que le trasilast, un composé réduisant la déposition du collagène, atténue de façon significative le phénomène de la resténose 3 mois après l'angioplastie (Ueda *et al.*, 1995). En plus d'occuper l'espace extracellulaire, les molécules de la matrice extracellulaire peuvent modifier des fonctions biologiques dans la paroi vasculaire incluant la

rétenion des lipides, la prolifération des cellules musculaires lisses et la relâche des facteurs de croissance (Nikkari *et al.*, 1994). En soi, l'accumulation de la matrice extracellulaire survient en réponse aux facteurs de croissance, le plus puissant stimulus étant TGF- $\beta$ . L'expression de ce facteur corrèle avec l'accumulation de la matrice extracellulaire autant dans les modèles animaux de resténose que chez l'humain (Assali *et al.*, 1995 ; Feueurstein, 1996).

## **D.2. Thérapie de la resténose**

Les approches thérapeutiques potentielles pour prévenir la resténose incluent l'angioplastie coronarienne citée précédemment, l'utilisation de médicaments pharmaceutiques, l'implantation de prothèse endovasculaire, la stratégie d'antisens et plus récemment la radiothérapie endovasculaire.

### **D.2.1. Approche pharmaceutique**

L'approche pharmacologique à elle seule est incapable de démontrer un effet bénéfique quant au problème de resténose. Parmi les agents pharmacologiques utilisés cliniquement on compte les agents anticoagulants, les agents antiplaquettaires, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, les antagonistes du PDGF, les huiles de poissons, les agents diminuant les lipides ainsi que les stéroïdes (Revue dans Fleser et Leclerc, 1996).

### **D.2.2. Prothèse endovasculaire « Stent »**

Depuis quelques années, l'apparition de nouveaux outils, comme l'utilisation de prothèses endovasculaires « Stents », cherche à contourner les problèmes engendrés par l'angioplastie coronarienne.

Les prothèses endovasculaires, cylindres métalliques d'acier à mailles plus ou moins larges, sont destinées à être encastrées dans la paroi artérielle au niveau du site dilaté. Les stents sont transportés dans l'artère sur un ballon dégonflé et suite au déploiement du stent par une pression, la prothèse est ancrée dans la paroi endothéliale, permettant ainsi de recoller la dissection artérielle. La mise en place d'une prothèse endovasculaire semble prévenir l'élément du remodelage vasculaire (Anthony *et al.*, 1987 ; Revue dans Gruberg *et al.*, 2000).

### **D.2.3. Livraison locale d'oligonucléotides antisens**

Si les endoprothèses vasculaires semblent prévenir le remodelage, elles n'empêchent pas l'hyperplasie intimale qui joue un rôle important dans le développement de la resténose. La thérapie génique pourrait prévenir la composante proliférative de l'hyperplasie intimale. Elle repose sur la prévention de la prolifération des cellules musculaires lisses de la média vers l'intima. Le principe de la thérapie génique pour la prévention de la resténose consiste à inhiber l'expression des gènes impliqués dans la prolifération des cellules musculaires lisses (Ohno *et al.*, 1994). En absence d'identification claire des molécules biologiques ou de gènes impliqués dans la prolifération des cellules musculaires

lisses, de nouvelles thérapies, comme des oligonucléotides antisens (antisens c-myc, c-myb, etc) ont été étudiées (Steg *et al.*, 1997). Un autre exemple d'utilisation des oligonucléotides d'antisens c'est l'étude par Pollman et ses collaborateurs (1998). Ce group a démontré que l'administration des oligonucléotides d'antisens anti-bcl-x dans la paroi carotidienne chez le lapin inhibe la prolifération néo-intimale en induisant le phénomène d'apoptose.

Plusieurs équipes ont déjà démontré le potentiel des molécules antisens à prévenir l'hyperplasie néo-intimale dans différents modèles animaux. Cependant, ces études sont limitées par les méthodes de livraison utilisées qui sont inapplicables chez l'humain ou encore limitées par un faible taux de transfection et de rétention des oligonucléotides antisens dans la paroi vasculaire.

#### **D.2.4. Radiothérapie**

Malgré des avancées récentes concernant la thérapie de la resténose, soit par le déploiement d'un stent, l'utilisation des médicaments pharmaceutiques ou encore d'autres stratégies thérapeutiques, aucune approche n'a fait la preuve d'une nette efficacité dans la prévention de la resténose. Récemment, l'utilisation de la radiothérapie semble plus prometteuse dans la prévention de la resténose. Il y a deux types de particules radioactives : gamma ( $\gamma$ ) ou bêta ( $\beta$ ) (Revue dans Teirstein, 1998). L'isotope idéal pour une irradiation vasculaire doit pouvoir être administré à une dose adéquate à travers une faible épaisseur tissulaire pour obtenir un effet biologique maximal. Cette dose doit être homogène à tout le volume cible, tout en

épargnant les tissus sains. Ces critères seraient plutôt en faveur de l'irradiation bêta.

La radiothérapie peut être utilisée sous quatre formes pour effectuer une irradiation vasculaire: la radiothérapie externe, le cathéter porte-source (curithérapie), le ballonnet rempli d'une substance radioactive et le stent incorporant une molécule radioactive (Revue dans Kotzerke *et al.*, 2000).

La radiothérapie externe a été utilisée pour irradier des vaisseaux périphériques. Elle doit délivrer une dose à une faible épaisseur. La nécessité d'utiliser des champs d'irradiation de faibles dimensions avec leurs conséquences radiophysiques et les difficultés pour localiser précisément le volume cible rendent sa pratique difficile. (Dorros et Jaff, 1997).

Pour le cathéter porte-source, la source est fixée à l'extrémité d'un cathéter qui est guidé sous radioscopie jusqu'à la sténose à traiter. Des études ont évalué la possibilité d'un trajet de source radioactive le long d'un cathéter de 150 cm. Le cathéter porte-source a un inconvénient majeur: son accolement à la paroi vasculaire est à l'origine d'une répartition de dose non adéquate sur toute la circonférence du vaisseau (Condado *et al.*, 1997).

Si les sources solides sont les plus utilisées, une autre possibilité consiste à utiliser un liquide contenant une molécule radioactive. Le ballon comprimant la sténose est rempli de ce liquide. Ainsi, l'irradiation a lieu après la dilatation. Contrairement au cathéter porte-source, les ballonnets permettent d'obtenir une dose homogène sur toute la paroi vasculaire (Amols *et al.*, 1996). En cas de rupture du ballonnet, la source radioactive est diluée dans la circulation générale et

en choisissant une molécule radioactive à demi-vie courte, les risques pour le patient sont minimales (Weinberger *et al.*, 1998). Cependant, les problèmes de manipulation et de conservation de ce liquide empêchent son utilisation en pratique courante (Raizner, 1997).

L'utilisation des endoprothèses radioactives s'est développée en imprégnant les endoprothèses avec les molécules radioactives (Revue dans Fischell, 1998 ; Albiero et Colombo, 2000). Cette approche est utilisée sans avoir à augmenter la dose d'irradiation lorsque effectuée avec des sources émettrices  $\beta$  pour obtenir le même résultat que celui obtenu avec les rayonnements gamma, car l'endoprothèse est au contact de la paroi vasculaire. Un inconvénient a été décrit avec ce système: la lésion à l'endothélium par l'endoprothèse est plus importante aux extrémités de celle-ci, or c'est aussi à cet endroit que la dose d'irradiation est la plus faible ce qui conduit à l'effet de bord ou « edge effect ». Il en résulte que ces deux facteurs favorisent la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses, source de resténose sur endoprothèse (Wiederman *et al.*, 1995). Cependant, le même phénomène a été décrit avec l'utilisation de ballonnet ce qui permet de supposer le rôle majeur de la faible dose aux extrémités du système d'irradiation (Popowski *et al.*, 1996).

Plusieurs études expérimentales renforcent néanmoins la radiothérapie pour traiter la resténose. Le groupe de Wiedermann (1995) a démontré que l'utilisation de l'irridium 192 avant la procédure de l'angioplastie, dans un modèle porcin, diminue la formation de néointima de 63%. Cet effet bénéfique est maintenu



jusqu'à six mois. Également, Waksman et ses collaborateurs (1995) ont rapporté une diminution de la région néointimale en utilisant différentes doses de l'irridium 192, dans un modèle porcin. Ils ont démontré que le ratio de la zone néointimale est inversement proportionnel à la dose de la radiation donnée. De plus, l'utilisation de l'endoprothèse imprégnée d'irridium 192 a conduit à une réduction de la région néointimale. Fischel et ses collaborateurs (1994) ont démontré que les endoprothèses imprégnées de particules de  $^{32}\text{P}$  ont complètement inhibé la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses humaines et de rat. Finalement, utilisation de cathéter avec une source bêta ( $^{90}\text{Y}$ trium) a également mené à une réduction de la néointima (Verin *et al.*, 1995). Wilcox et ses collaborateurs (1996) quant à eux, ont étudié le mécanisme d'action de l'irradiation immédiatement après effraction par ballonnet d'un vaisseau de porc en injectant la bromodéoxyuridine (Brdu). Les résultats obtenus par cette étude semblent suggérer une action inhibitrice de l'irradiation sur la prolifération cellulaire de l'adventice, de la média et une réduction de la production de collagène par les myofibroblastes de l'adventice.

Bien qu'il y ait eu beaucoup d'intérêt sur le développement de nouvelles approches en radiothérapie pour prévenir la resténose, le mécanisme d'action et les conséquences à long terme n'ont pas été encore élucidés. Récemment, Fareh et ses collaborateurs (1999) ont étudié extensivement l'effet de la radiation bêta, basé sur l'utilisation d'un oligonucléotide marqué avec la molécule de  $^{32}\text{P}$  de façon interne, sur la viabilité cellulaire, la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses. Ils ont également étudié l'effet de la radiation bêta sur la progression du

cycle cellulaire, la cytotoxicité et l'induction du phénomène de l'apoptose sur le même type cellulaire. Ces études ont démontré que les radiations bêta inhibent la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses et induisent l'arrêt du cycle cellulaire à G0/G1 sans cependant induire la cytotoxicité et l'apoptose.

Les études cliniques préliminaires ont montré la faisabilité de l'approche de radiothérapie endoluminale, mais le faible nombre de patients traités et la courte période d'observation incitent à la prudence (Condado *et al.*, 1997; Popowski *et al.*, 1996). L'essai randomisé avec placebo publié récemment par Teirstein et ses collaborateurs (1997) a évalué le rôle d'une curiethérapie à l'irridium 192 après la mise en place d'une sonde chez une population de patients ayant une récurrence de sténose coronarienne après un premier traitement. Après 6 mois, la réduction de la lumière vasculaire était de 17% après la curiethérapie et de 37% dans le groupe placebo. Le taux de resténose était respectivement de 8% dans le groupe irradié et de 36% dans le groupe placebo. Toutes ces différences étaient significatives et suggèrent donc un bénéfice à la radiothérapie endoluminale.

Toutes ces études visent à inhiber la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses et il y a très peu d'information sur l'effet de radiation ionisante sur la fonction de l'endothélium. Après irradiation le risque de resténose n'est pas nul. À partir des expériences *in vitro*, Brenner *et al.*, (1996), ont conclu que la dose nécessaire pour éradiquer toute la prolifération de cellules musculaires lisses, devait être supérieure à 20 Gy. Cependant, les doses utilisées sont souvent inférieures. Donc, il serait intéressant d'envisager une approche thérapeutique alternative qui serait complémentaire à la radiothérapie telle que la stimulation de

la réendothélisation des artères dénudées en utilisant par exemple le facteur de croissance spécifique aux cellules endothéliales, le VEGF. Asahara et ses collaborateurs (1995) ont démontré que VEGF joue un rôle important dans la réendothélisation. Néanmoins, le rôle de VEGF sur la fonction endothéliale en conditions de radiations est inconnu.

## Hypothèses de travail

Les maladies cardiovasculaires et ses complications constituent une des principales causes de mortalité dans les sociétés industrialisées. À l'heure actuelle, en dépit de tous les travaux prometteurs réalisés chez les animaux et les humains, aucune thérapie conventionnelle, telles que l'angioplastie, le pontage coronarien ou les traitements médicamenteux n'a indiqué une efficacité sans équivoque pour la thérapie de l'athérosclérose chez l'humain. De façon naturelle, un cœur ischémique développe des vaisseaux collatéraux qui irriguent la zone devenue ischémique. Le développement de ces vaisseaux à partir des capillaires déjà existants, est appelé l'angiogénèse. Ce phénomène est régulé par plusieurs molécules dont les facteurs de croissance tels que la famille VEGFs et la famille FGFs. Contrairement aux facteurs de la famille FGFs, la famille VEGFs agit exclusivement sur les cellules endothéliales. Egalement, il a été démontré que le gène de VEGF<sub>165</sub> joue un rôle important dans le développement des vaisseaux sanguins lors du développement embryonnaire. De plus, il a été démontré que l'expression de l'ARNm de VEGF est induite dans les conditions d'hypoxie dans différents types cellulaires. Dans les conditions d'ischémie myocardique causée par l'occlusion de l'artère descendante antérieure, l'ARNm du gène VEGF<sub>165</sub> est induit dans le myocarde du modèle porcin et rat, suggérant ainsi que VEGF<sub>165</sub> est un médiateur important qui intervient dans la revascularisation du myocarde ischémique. Comme pour le VEGF, l'hypoxie joue un rôle important dans la

régulation de l'expression du gène des récepteurs de VEGF. Il a été démontré que l'exposition à l'hypoxie conduit à une augmentation de l'expression des gènes VEGFR1 et VEGFR2 dans les vaisseaux pulmonaires dans le modèle de rat. Egalement, l'ARNm de ces deux récepteurs a été augmenté dans le myocarde ischémique chez le modèle de rat. De plus, les études récentes ont démontré que VEGF est capable d'augmenter l'expression du gène du récepteur VEGFR2 dans les cellules endothéliales capillaires d'origine bovine. Toutes ces données suggèrent que le VEGF ainsi que ses récepteurs jouent un rôle dans le développement des vaisseaux sanguins dans les conditions d'ischémie.

Très récemment, il y a eu une avancée remarquable dans le développement des nouvelles modalités thérapeutiques pour traiter l'athérosclérose. D'une part, plusieurs groupes ont démontré le potentiel d'utiliser le VEGF sous forme protéique ou génique en utilisant différents vecteurs de transfert génique, dans le but de promouvoir le phénomène d'angiogénèse. D'autre part, des études cliniques récentes ont démontré que la revascularisation transmyocardique ou TMR est une nouvelle procédure chirurgicale efficace dans la réduction des symptômes d'angine de poitrine.

En se basant sur les données de la littérature, sur l'efficacité potentielle d'une thérapie génique, utilisant le vecteur adénoviral exprimant le gène du facteur angiogénique VEGF<sub>165</sub> pour traiter l'athérosclérose ainsi que l'application du laser transmyocardique, le but de cette thèse de doctorat consiste à : 1) d'étudier s'il y a un effet synergique entre une approche biologique soit l'administration de facteur VEGF<sub>165</sub> sur-exprimé par les vecteurs adénoviraux en combinaison avec une

approche mécanique, soit l'utilisation de laser transmyocardique, dans un cœur ischémique chez un modèle porcin et 2) d'évaluer le rôle de VEGF<sub>165</sub> sur la prolifération, la différenciation ainsi que l'expression du récepteur VEGFR2 chez les cellules endothéliales exposées à une irradiation (particules bêta) afin de prévenir le phénomène de la réstenose.

Le facteur VEGF<sub>165</sub> exerce son activité exclusivement sur les cellules endothéliales. Cette caractéristique rend ce facteur particulièrement intéressant. D'autre part, nous avons choisi de travailler avec le vecteur adénoviral à cause de ses multiples avantages, entre autre sa capacité d'infecter des cellules quiescentes et aussi parce qu'il est possible de le produire à des titres élevés. Ces caractéristiques font de l'adénovirus un outil idéal pour notre étude.

Dans cette perspective, nous avons d'abord cloné le gène du facteur de croissance VEGF<sub>165</sub> dans le vecteur adénoviral et caractérisé la sur-expression et la sécrétion de cette protéine. Ensuite, nous avons administré le vecteur adénoviral exprimant le gène VEGF<sub>165</sub> dans un cœur porcin rendu préalablement ischémique en implantant un constricteur améroïde sur l'artère descendante antérieure, en combinaison avec le laser transmyocardique. Le constricteur améroïde est un anneau métallique qui contient du matériel hydrophobique, capable d'absorber les liquides environnants et bloquer graduellement l'artère du cœur. Ce modèle représente le plus la maladie d'athérosclérose chez l'humain. De plus, le modèle porcin possède le système cardiovasculaire le plus proche de celui de l'homme. Ces travaux sont présentés dans le chapitre 2 de cette thèse.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons étudié le rôle de la radiation ionisante sur la fonction endothéliale. Malgré, le développement important de la radiothérapie endovasculaire pour prévenir la resténose, il y a très peu d'informations sur l'effet d'une telle thérapie sur la fonction endothéliale. Il a été démontré que les protéines mitogéniques telles que VEGF et bFGF jouent un rôle important dans la survie des cellules hématopoïétiques dans les conditions de radiation ionisante. Cependant, la protéine VEGF<sub>165</sub> n'a montré aucun effet mitogénique sur les cellules hématopoïétiques. L'objectif spécifique de la deuxième partie de ma thèse consiste à étudier le rôle de la radiation bêta sur la prolifération, et la différenciation des cellules endothéliales ainsi que sur l'expression du récepteur VEGFR2 dans ces mêmes cellules. Pour réaliser nos objectifs, nous avons utilisé un oligonucléotide marqué de façon interne avec un isotope de <sup>32</sup>P, comme moyen d'irradiation locale et homogène des cellules endothéliales en culture. Nous avons démontré que les radiations ionisantes inhibent la prolifération des cellules musculaires lisses ainsi que les cellules endothéliales. La radiation ionisante induit l'arrêt cellulaire à la phase G1 sans aucun signe de toxicité ou d'apoptose des cellules vasculaire. Ces travaux sont présentés dans le chapitre 3 de cette thèse. Ma contribution à ce papier consistait à étudier le rôle de radiation sur la prolifération des cellules endothéliales. Nous avons également étudié l'effet de VEGF<sub>165</sub> sur la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales ainsi que l'expression du récepteur VEGFR2 dans les conditions de radiation bêta. Ces travaux sont présentés dans le chapitre 4 de cette thèse.

**Chapitre 2 : Direct intramyocardial administration of AdVEGF, TMR or both to induce angiogenesis in ischemic myocardium.**

Pouneh Kermani PhD <sup>1\*</sup>, Pierre Voisine MD <sup>1,3\*</sup>, Gilbert Bigras MD PhD <sup>1</sup>, Céline Devaux MD <sup>1</sup>, Jeannette Fareh PhD <sup>1</sup>, Louis-Georges Guy PhD <sup>1</sup>, Jean Buithieu MD <sup>2</sup>, Francois Dagenais MD <sup>3</sup>, Normand L. Poirier MD<sup>3</sup>, Louis Normandin MD<sup>3</sup>, Michel Martin MD <sup>3</sup>, Guy Leclerc MD <sup>1,2</sup>

From the Laboratory of Molecular Cardiology 1, Division of Cardiology 2 and Division of Cardiovascular and Thoracic Surgery 3, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Canada H2L 4M1

*(Manuscrit soumis pour la publication)*

\*: Authors contributed equally to this communication.

**Address for correspondence:**

Guy Leclerc, MD, FRCPC, FACC  
Laboratory of Molecular Cardiology  
Louis-Charles Simard Research Center  
Centre Hospitalier de l'Université de Montréal  
1560, Sherbrooke East, Montréal, Québec, H2L 4M1  
Telephone : (514) 281-6084  
Fax : (514) 896-4926  
Email : glecler@attglobal.net



## **Abstract**

**Background :** Laser-mediated transmural revascularisation (TMR) and gene therapy are two strategies currently under evaluation in clinical trials aimed at treating patients in whom complete revascularization is not possible. Angiogenesis induction represents a potential mechanism by which these strategies may improve coronary circulation. We sought to evaluate and compare directly TMR and VEGF gene therapy and a combination of both approaches for their ability to induce myocardial angiogenesis.

**Methods and Results:** An ameroid constrictor was surgically implanted on the left anterior descending artery of 35 pigs. Animals were randomized 7 weeks later to either one of four groups: Group I: control (n=10) to receive intramyocardial injections of either saline or an adenovirus vector (Ad) expressing the reporter gene lacZ encoding for  $\beta$ Galactosidase (AdlacZ); Group II: intramyocardial injections of an Ad expressing the VEGF<sub>165</sub> complementary DNA (n=10); Group III: TMR and intramyocardial AdVEGF<sub>165</sub> (n=10); Group IV: TMR and intramyocardial AdlacZ (n=5). Another 7 weeks later, animals were evaluated for collateral vessel development by angiography, left ventricular function both by angiography and echocardiography (with and without pacing), and capillary density at histopathology by automated computer-assisted detection of Factor VIII in the ischemic myocardium. Cardiac function was not significantly improved in any of the treatment groups at the end of the study, as assessed by angiography or by echography, either stress or at rest. Coronary angiography 7 weeks post-

treatment did not show any significant increase in measurable vessel number in any of the four groups. Histopathological examination, however, disclosed a significant advantage for the gene therapy approaches (Groups II and III) in increased capillary density in the ischemic myocardium ( $p=0.006$ ) when compared to control animals. TMR alone did not result in any significant increase in myocardial angiogenesis.

**Conclusion:** AdVEGF<sub>165</sub> administered in an ischemic myocardium can induce significant angiogenesis but does not appear to improve, in the short term, myocardial function. TMR does not show any significant effect on angiogenesis induction and myocardial function.

**Overview summary**

Using a porcine ischemic myocardium model, we compared the angiogenic potential and the effect on myocardial function of VEGF cDNA-mediated gene therapy, transmyocardial revascularization or a combination of both. When compared to control groups, only strategies involving gene therapy significantly induced angiogenesis. There was no effect on myocardial function by any of the therapies examined. Altogether, these results support the potential of VEGF gene therapy in treating patients in whom complete revascularization is not possible.

*Key words* : Genes, lasers, angiogenesis

## **Introduction**

Despite optimal medical therapy, many patients with ischemic heart disease suffering from disabling angina are not amenable to coronary bypass surgery nor angioplasty because of diffuse atherosclerotic disease or poor distal runoff. The use of transmyocardial laser revascularization (TMR), first proposed in 1981 by Mirhoseini (Mirhoseini and Cayton, 1981), was based on the assumption that formation of transmural left ventricular channels could circumvent that problem by providing oxygenated blood to the underperfused myocardium through a network of sinusoids. Although this hypothesis was never clearly demonstrated (Whittaker *et al.*, 1993; Fleisher *et al.*, 1996; Fisher *et al.*, 1997; Dedic *et al.*, 1998), TMR has proven effective to significantly alleviate angina (Cooley *et al.*, 1996; Horvath *et al.*, 1997; Allen *et al.*, 1999; Frazier *et al.*, 1999). The mechanism of symptomatic relief, however, remains controversial. Denervation, the destruction of myocardial efferent innervation associated with local vasodilatation, could occur as a result of the thermoacoustic damage caused by TMR (Kwong *et al.*, 1997; Kwong *et al.*, 1998). Angiogenesis at the sites of the lasered channels has also been proposed to explain the beneficial effects of TMR (Horvath *et al.*, 1995; Mack *et al.*, 1997). The laser-induced increased vascularity could potentially represent an evolving, richly vascular cicatricial process (Fisher *et al.*, 1997), consistent with a non-specific inflammatory response to injury (Malekan *et al.*, 1997). Imaging studies have thus far failed to demonstrate

conclusively the occurrence of this phenomenon through an improvement in perfusion (Cooley *et al.*, 1996; Horvath *et al.*, 1997; Milano *et al.*, 1998; Allen *et al.*, 1999), except in one study (Frazier *et al.*, 1999). Alternatively, therapeutic angiogenesis mediated by the use of vascular endothelial growth factor (VEGF) (Engler, 1996), a potent angiogenic mediator that shows great specificity for endothelial cells (Thomas, 1996), represents another strategy that could be applicable for the treatment of these patients. VEGF has been shown to stimulate the development of new vessels in models of myocardial (Banai *et al.*, 1994) and peripheral (Takeshita *et al.*, 1994) ischemia. Direct intramyocardial administration of a replication-deficient adenovirus (Ad) encoding the human VEGF complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) has been successfully used to induce collateral vessel development and significantly improve myocardial perfusion and function in ischemic porcine hearts (Mack *et al.*, 1998). In view of these results, we sought to compare the angiogenesis induction and myocardial function changes resulting from either TMR, gene therapy by Ad-mediated delivery of VEGF<sub>165</sub> cDNA, or a combination of these two approaches, in a porcine model of chronic myocardial ischemia.

## **Methods**

***Cloning of human VEGF<sub>165</sub> in adenoviral vector.*** A replication deficient recombinant adenovirus based on human adenovirus serotype 5 was used. The full-length cDNA for human VEGF<sub>165</sub> was amplified by PCR, sequenced and

inserted into shuttle vector pCA14 plasmid (provided generously by P. Branton, McGill University, Montréal, Qc, Canada) under the control of constitutive CMV promoter. The plasmid carrying the cDNA for VEGF<sub>165</sub> was co-transfected (calcium phosphate) with plasmid pJM17 (provided generously by P. Branton) into human embryonic kidney 293 cells that complement E1 early viral promoter. Homologous recombination between the pCA14 and pJM17 plasmids in 293 cells replaced the E1 region of pJM17 with the VEGF<sub>165</sub> gene from the pCA14 plasmid. Fifteen days after transfection, individual viral plaques were isolated and amplified in 293 cells. Plaques containing recombinant adenovirus were screened for expression of the cDNA of VEGF<sub>165</sub> by PCR using primers corresponding to the sequence of the pCA14 plasmid. The control vector was AdlacZ (provided generously by P. Branton) which carries the cDNA for *E. coli* Lac Z gene under the control of constitutive CMV promoter, and encodes the enzyme  $\beta$ -galactosidase. Expression of VEGF<sub>165</sub> protein was determined by infecting rabbit smooth muscle cells (SMCs) with AdVEGF and AdlacZ at a MOI of 100 for 60 minutes at 37°C. After 48 hours the supernatants were collected and VEGF<sub>165</sub> protein was purified from the conditioned medium by using the HiTrap Heparin column (Pharmacia, Upsala, Sweden) and its presence was confirmed by Western blot using monoclonal antibodies raised against human VEGF<sub>165</sub> (R&D system, Minneapolis, MN). Plaque-purified virus were amplified on 293 cells and large-scale virus stocks were prepared by infecting  $6 \times 10^9$  293 cells in suspension cultures (293s) (In Dr. B. Massie's laboratory, Biotechnology Research

Institute/NRC, Montréal, Canada). Virus stocks were concentrated and purified by two cesium chloride ultracentrifugations and desalted by column filtration through Sephadex G-25 (Pharmacia) equilibrated with PBS. Final viral concentrations were determined by plaque titration assays in 293 cells, and stocks were stored at -80°C. For *in vivo* animal experimentation, frozen adenovirus stocks were thawed on ice and used within 30 minutes.

***In vitro efficacy of AdVEGF.*** Human Coronary Artery Endothelial Cells (HCAECs, Clonetics Corporation, San Diego, CA) were grown in MCDB131 medium (Sigma, St-Louis, MI) supplemented with 10% FBS, 10 ng/ml Human Recombinant Epidermal Growth Factor, 1 µg/ml Hydrocortisone and 12 µg/ml Bovine Brain Extract (Clonetics Corporation, San Diego, CA). Vascular Smooth Muscle Cells (VSMCs) were harvested from unused specimens of saphenous veins obtained after bypass surgery, following approval by the ethics committee of the Louis-Charles Simard Research Center and informed consent of patients. VSMCs were grown in DMEM medium (Gibco-BRL, Rockville, MD) supplemented with 20% FBS. Biological activity of VEGF<sub>165</sub> expressed by adenovirus was measured by thymidine incorporation assay. HCAECs ( $1.5 \times 10^4$ ) were seeded in 24 well plates in MCDB131 growth medium. Cells were synchronized by serum-deprivation medium for 48 hours and then stimulated with different concentrations of VEGF<sub>165</sub> and β-galactosidase purified from conditioned medium of VSMCs infected cells as described above. Twenty-four hours later sterile [methyl-3H]-

Thymidine (5  $\mu\text{Ci/ml}$ ) with specific activity of 6.7 Ci/mmol, (NEN Science products, Mississauga, Ontario, Canada) was added to the medium. Cells were then harvested and total activity assayed.

***Animal model.*** A model of chronic myocardial ischemia was created in Duroc pigs (21.7 $\pm$ 0.5 kg). All experimental protocols were approved by the Institutional Committee for Animal Care of the Louis-Charles Simard Research Center. Pigs were premedicated with ketamine (15 mg/kg), azoperone (4 mg/kg), atropine (0.5 mg) and pentobarbital (20 mg/kg), then intubated and maintained with 1% to 2% isoflurane. Lidocaine (1.5 mg/kg bolus followed by 1.5 mg/min perfusion) and penicillin (300,000 U) were also given as prophylaxis against, respectively, ventricular arrhythmia and infection. Under sterile conditions, a left anterior minithoracotomy was performed in the fifth intercostal space and the pericardium incised longitudinally to expose the left anterior descending artery (LAD). A 2.5 mm internal diameter ameroid constrictor (Research Instruments & MFG, Corvallis, OR) was then placed around the LAD, immediately distal to the origin of the first diagonal branch. After closure of the pericardium and chest, animals were allowed to recover for 7 weeks (52.3 $\pm$ 0.4 days) to ensure complete occlusion of the constrictor and stabilisation of collateral development.

***Angiographic and echographic assessment.*** Seven weeks later, 35 pigs that survived the ameroid constrictor placement were sedated and anaesthetised as



described above. The right femoral artery was surgically exposed before introduction of a 7F arterial sheath. A left ventriculography was performed in a 45° left anterior oblique incidence, using 40 ml of contrast media injected at 14 ml/second. Global ejection fraction of the left ventricle as well as regional wall motion were assessed using computer-assisted analysis (Ventrek, Quinton Imaging, Sunnyvale, CA). Right and left coronary angiograms were then obtained. Confirmation of complete closure of the ameroid constrictor was established and evaluation of baseline endogenous collateral formation was performed using the scoring system described by the Isner group (Takeshita *et al.*, 1994). Briefly, selective right coronary arteriograms in the right anterior oblique incidence with optimal coronary flow were collected. A transparent grid with 36 circles of 2.5 mm diameter per 7.8 cm<sup>2</sup> was placed on each image and used to draw a region of interest (ROI) covering the surface bordered on the left by the right coronary artery, on the right by the LAD, and by the junction of the LAD and the edge of the heart superiorly and inferiorly. The total number of circles for each ROI was determined, then the total number of circles crossed by visible collateral vessels within the ROI was assessed. Angiogenic scores were defined by the percentage of circles encompassing collateral vessels over the total number of circles in the corresponding ROI.

Through a median sternotomy, the heart was then exposed to allow direct epicardial echography at the papillary muscle level with a 5 MHz probe (Siemens, Erlangen, Germany). First, in the resting state, two-dimensional tomographic short

axis views were obtained at the base, mid-papillary and apex of the left ventricle. Regional wall motion was assessed at the mid-papillary level using the American Society of Echocardiography standard 6 segments. Measures of the LV internal diameter and anterior wall thickness were performed in diastole and systole with M-mode imaging. All echographic measurements were then repeated during ventricular pacing at 150 beats per minute. All pigs were thereafter randomly assigned to one of the four treatment groups described below. Every angiographic (LV global function, LV regional motion, collateral scoring) and echographic measure (regional wall motion with two-dimensional, M-mode, resting state and under pacing) were repeated as described above 7 weeks later ( $48.9 \pm 0.6$  days) and images stored for comparison. Animals were then sacrificed, hearts harvested and pressure-fixed in formaldehyde for further histopathological analysis. All angiographic and echographic measurements were done by an independent cardiologist blinded to treatment.

***Treatment groups.*** A total of 35 animals survived the ameroid constrictor placement procedure and were thus randomised to either one of the four following treatment strategies. Group I (controls, n=10) had 12 injections of either saline (100 $\mu$ l, n=5) or AdlacZ ( $10^8$  pfu/100 $\mu$ l, n=5) with a 30-gauge needle. These two groups have been pooled and will be further treated as one, since separate analysis for all parameters measured show no statistical differences between the two. Injections were made in the ischemic anterior wall according to the distribution pattern shown in Figure 1. Group II (AdVEGF, n=10) had 12 injections of

AdVEGF ( $10^8$  pfu/100 $\mu$ l) in the same manner. Group III (TMR-VEGF, n=10) underwent treatment with a nd:YAG laser ( $\lambda = 1.064 \mu\text{m}$ ; Medilas 4060N, MBB Medical Technology, Munich, Germany) in the same 12 sites shown in Figure 1. Nd:YAG lasers have been used successfully by others to perform TMR (Whittaker *et al.*, 1999). A 400  $\mu\text{m}$  diameter probe with a 20 W discharge was used to produce transmural channels, which were confirmed by pulsatile bleeding during systole. An injection of AdVEGF was then made with a 30-gauge needle, within 2 mm of each lased channel. Group IV (TMR, n=5) also had 12 channels created with a nd:YAG laser. To control for the adenovirus injection variable in group III, this TMR treated group also received a control injection of AdLacZ at each site. AdLacZ or AdVEGF were administered by a surgeon blinded to treatment. For each group, the 12 sites of treatment were marked with a metallic clip placed on the epicardium. The sternum and the femoral area were then closed and animals were allowed to recover for 7 more weeks ( $48.9 \pm 0.6$  days).

***Histopathological evaluation.*** Evaluation of the various therapeutic modalities effect on endothelial cell density in porcine myocardium was done by immunohistochemistry detection of Factor VIII (von Willebrand factor) expression. A section was taken from each heart, including a portion extending from the epicardium to the endocardium and always taken from the mid-anterior wall that received treatment. After processing the tissue, samples were embedded in paraffin. Sections were cut at 5 $\mu\text{m}$ , mounted on poly-L-lysine slides and

allowed to dry overnight at room temperature. Staining for factor VIII (using a polyclonal rabbit anti-human antibody) was performed using an avidin-biotin-peroxidase complex. After washing in PBS, the peroxidase was developed using diaminobenzidine with hydrogen peroxide. Finally, sections were counterstained with haematoxylin. All histology sections from every heart were treated in the same fashion during the same session. Positive controls were included in that immunostaining session and consisted of sections from skin fragments with richly vascularized dermal components.

In order to compare the different treatments, a Factor VIII marker density within the plane section was obtained by using automated computer-based image analysis (AutoCyte Inc., Elon College, NC) with a specific algorithm. Briefly, a composite image representing the entire heart section from contiguous low resolution images (2.5X) was first built from as many as necessary contiguous fields. Up to 299 fields per section were analyzed in this manner. The system then automatically scanned all the contiguous fields at high resolution (40X) and for each field, performed autofocus, determined marked area according to a predetermined tint levels, targeted Factor VIII marquage according to predetermined radius, drew Voronoi polygons (geometrical influence of a point within the plane) and, finally, computed Factor VIII density (Fig 2). This methodology has been previously used for histological quantification of specific event occurrences (Duyckaerts *et al.*, 1994; Bigras *et al.*, 1996).

**Statistical analysis.** Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. According to the treatment groups described above, a two-way ANOVA was appropriate to test first, the potential interaction between the two major treatments (TMR and VEGF) and second, if no interaction was observed, to evaluate the individual effect of both treatments. The null hypothesis was rejected when  $p < 0.05$ .

## Results

**Biological activity of AdVEGF *in vitro*.** To demonstrate the biological activity of VEGF<sub>165</sub> expressed by adenovirus, we determined the mitogenic effect of VEGF<sub>165</sub> on HCAECs. The effect of VEGF<sub>165</sub> on cell proliferation was presented as fold increase when compared to the effect of LacZ condition. The results showed that VEGF<sub>165</sub>, purified from AdVEGF<sub>165</sub>-SMCs infected cells, induced a 1.7 to 2.9-fold increase in proliferation of HCAECs at 1 to 10 ng/ml, compared to conditioned medium from AdLacZ infected cells. This induction was dose dependent with a maximal effect at 10 ng/ml and reached a plateau thereafter, in accordance with previous results (Van Belle *et al.*, 1998).

**Morbidity and mortality.** Forty-six animals underwent placement of an ameroid constrictor. Thirty-five survived the implantation at 7 weeks and were then randomized in the four different treatment groups. There was no acute procedural death. Two pigs died before scheduled assessment time. The first animal, from the AdVEGF group, died suddenly 24 hours after the administration of therapy. The

second animal was sacrificed prematurely at day 45 post treatment. This animal was part of the combined therapy group, TMR and AdVEGF, and showed at autopsy extensive mediastinitis which prevented adequate histopathological analysis of the treated heart.

### ***Angiogenesis.***

***Angiographic analysis.*** First, occlusion of the ameroid constrictor was confirmed angiographically, at a mean 52 days post placement. Then, we assessed the presence of collateral vessels reaching the ischemic territory at baseline (average 52.3 days post constrictor implantation) and after therapy (average 48.9 days post treatment). The initial angiogenic score was 17.0 +/- 1.3, 13.8 +/- 0.7, 14.2 +/- 1.1, 15.2 +/- 1.1% respectively for groups I to IV. There was no statistical difference between this baseline score amongst the groups. Post therapy score was evaluated with the same methodology and showed levels of 15.5 +/- 1.7, 14.0 +/- 1.2, 14.0 +/- 2.0, 16.8 +/- 2.7% respectively for groups I to IV. There was no statistical difference between the four groups in levels of angiogenic score at the post-treatment phase. We also evaluated the variation of angiogenic score amongst all groups in the course of the treatment period. As shown in Figure 3, there was no significant difference in the level of angiographically detectable collateral development between the four groups.

***Histopathological analysis.*** Since arteriograms cannot recognize smaller vessels and capillaries, histopathological analyses were made to more thoroughly evaluate angiogenesis (Fig. 4). A mean of 147 contiguous fields per tissue section were

assessed by computer-assisted image analysis at 40X magnification. Microscopic inspection revealed that most of the myocardial sections from animals that received recombinant adenovirus had scattered mononuclear cell infiltrate (Fig. 4c), most often near the epicardium. In addition, many capillaries were found associated with these infiltrates, especially when AdVEGF had been administered (Fig. 4c). In the cases where TMR alone was used, the treated areas with transmural punctures showed fibrous tissue with inflammatory cells surrounding occluded channels (Fig. 4b). No patent channel was observed in any all TMR alone treated hearts (n=15).

Objective assessment of Factor VIII expression occurrence was generated by analysis of large segments of treated hearts (Fig. 5). Mean Factor VIII density values (Fig. 6) were 0.65 unit for the control group, 1.57 units for the AdVEGF treated group, 1.55 units for the TMR-AdVEGF treated group and 0.98 unit for the TMR alone treated group. The observation that the AdVEGF treated groups (group II and III) showed a higher number of Factor VIII staining cells was confirmed by the two-way ANOVA statistical analysis as a significant effect was found for these groups when compared to groups that did not receive AdVEGF ( $p=0.006$ ). Units reflecting Factor VIII presence increased 106% in the AdVEGF-treated groups, from 0.75 average units in groups non-treated with AdVEGF to 1.55 in AdVEGF-treated groups. In contrast, no additive effect on Factor VIII density was seen for the TMR treated groups (groups III and IV) as the capillary density went from a mean 1.13 units in groups without laser to 1.37 in groups with

laser ( $p=0.669$ ). Analysis failed to demonstrate any positive interaction between AdVEGF and TMR therapy ( $p=0.521$ ).

***Myocardial function.***

***Left ventricular ejection fraction.*** A 45° left anterior oblique ventriculography was obtained for each pig just before and 7 weeks after treatment. Left ventricular ejection fraction (LVEF) was digitally measured and expressed as the percentage of end-diastolic volume ejected during systole. Pre- and post-treatment LVEF were respectively 49.7±4.4% and 57.6±4.6% for group I, 53.3±3.5% and 56.3±3.6% for group II, 51.4±4.4% and 55.0±1.9% for group III, and 48.5±3.2% and 54.3±3.6% for group IV. Neither the absolute LVEF values nor the post treatment change in LVEF within or among the treatment groups were found to be statistically different.

***Left anterior wall kinetics.*** Qualitative analysis of left ventricular wall motion revealed significant impairment of anterior wall kinetics in all pigs 7 weeks after ameroid placement, as expected with proximal occlusion of the LAD. The anterior wall was described as either severely hypokinetic or akinetic in all animals. Left anterior wall kinetics were specifically evaluated on the ventriculogram pre- and post-treatment. No significant difference was observed among the treatment groups at baseline and no significant modification of anterior wall motion following therapy were found in any of the groups.



***Echographic assessment of regional myocardial function.*** Wall motion can be normal at rest, even in the ischemic region. However, contractility abnormalities can be manifest under stress conditions, when myocardial oxygen demands are increased. Short axis images of two-dimensional echocardiograms performed at rest and under direct ventricular pacing at 150 beats/minute, both before and 7 weeks after treatment, were divided into 6 radial segments. Fractional wall thickening of the ischemic left anterior wall was assessed for the different treatment groups and conditions, and expressed as a percentage of wall thickening during systole compared to diastolic wall thickness. At rest, pre- and post-treatment fractional wall thickening were respectively  $22.7\pm 4.6\%$  and  $30.8\pm 4.9\%$  for group I,  $31.3\pm 3.5\%$  and  $32.1\pm 4.3\%$  for group II,  $29.3\pm 6.7\%$  and  $26.8\pm 7.9\%$  for group III, and  $33.1\pm 4.1\%$  and  $37.7\pm 3.9\%$  for group IV. Under pacing at 150 beats/minute, they were  $14.6\pm 4.6\%$  and  $21.1\pm 3.5\%$  for group I,  $17.9\pm 3.3\%$  and  $20.8\pm 4.5\%$  for group II,  $24.3\pm 7.7\%$  and  $11.8\pm 3.9\%$  for group III, and  $27.2\pm 4.6\%$  and  $24.7\pm 3.2\%$  for group IV. No statistically significant difference could be observed for fractional wall thickening under these conditions between groups I through IV, neither when absolute values nor changes in values were considered.

## **Discussion**

TMR and gene therapy using angiogenic factors constitute potential strategies to treat myocardial ischemic disease. Whereas pre-clinical (Banai *et al.*, 1994) and clinical (Symes *et al.*, 1999) studies tend to show an improvement in

the development of collateral blood vessels associated with the use of VEGF, the contribution of these newly formed vessels on the improvement of cardiac function has not been clearly nor repeatedly demonstrated. On the other hand, although evidence shows that TMR can alleviate symptoms of angina (Horvath *et al.*, 1996; Allen *et al.*, 1999; Frazier *et al.*, 1999), different studies have refuted its capacity to improve cardiac function (Frazier *et al.*, 1995; Cooley *et al.*, 1996; Agarwal *et al.*, 1999), exercise tolerance (Schofield *et al.*, 1999), or survival at one year (Allen *et al.*, 1999; Frazier *et al.*, 1999; Schofield *et al.*, 1999). The initial hypothesis that laser-created channels would remain patent is strongly contested (Whittaker *et al.*, 1993; Fleisher *et al.*, 1996; Fisher *et al.*, 1997; Dedic *et al.*, 1998; Sigel *et al.*, 1998). While some authors have advocated that TMR stimulates the expression of growth factors and promotes angiogenesis (Horvath *et al.*, 1999), others have reported that neovascularization associated with TMR was non-specific, not different than that expected in any scar tissue (Mack *et al.*, 1997; Hughes *et al.*, 1998). It has also been suggested that TMR relieves angina through a destruction of the afferent nerve fibres, shutting down pain influxes at their source (Kwong *et al.*, 1998). Arguments supporting that theory include the observation of silent myocardial ischemia in the immediate postoperative period (Hughes *et al.*, 1999b), asynchrony between the early relief of symptoms and the time required for the development of significant neovascularization, and the absence of improvement in left ventricular function and survival at one year.

Despite all these controversies and the absence of a clear explanation regarding the exact mechanism through which they exert their beneficial actions,

these approaches have recently entered the clinical arena (Allen *et al.*, 1999; Frazier *et al.*, 1999; Rosengart *et al.*, 1999; Symes *et al.*, 1999). Accordingly, this study was designed to compare the angiogenic potential of VEGF<sub>165</sub> and TMR, and explore the potential synergy between these two therapeutic modalities in a porcine model of chronic myocardial ischemia.

Our data corroborate previous findings that intramyocardial injections of a DNA construct leading to the expression of VEGF<sub>165</sub> can significantly increase the vascular density of chronically ischemic myocardium. Pigs treated with AdVEGF<sub>165</sub> demonstrated a significant increase in Factor VIII density compared to other groups, as assessed by two-way ANOVA. This did not translate, however, in a significant enhancement of angiographically observable vessels, as determined by the angiogenic assessment score. Angiograms are known to discriminate only vessels that are more than 200  $\mu\text{m}$  in diameter, whereas vessels produced in angiogenic responses are typically less than 180  $\mu\text{m}$  in diameter. The apparent disparity between results obtained from these two methods of analysis is thus probably attributable to the lack of sensitivity of the latter.

In contrast with angiogenesis assessment techniques usually reported in the literature, mainly light microscopic examination using different magnifications and stereological evaluation using electronic microscopes, an automated planimetric method of quantification was favored in this study. Light microscope examination can be imprecise for the direct detection of capillaries, which can be missed given their small diameter, and may be biased by sampling errors from the operator. Electronic microscopes allow for the analysis of several three-

dimensional unbiased variables (e.g. capillary density, capillary surface area per volume of muscle fibre), but unfortunately rely on a hypothetically isotropic distribution of these three-dimensional parameters. Because of these drawbacks, we selected an approach that offered both operator and vessel size independence, focusing on a specific cytoplasmic constituent of endothelial cells (factor VIII). Although the “Factor VIII density within a plane section” variable does not match a real three-dimensional analogue, its immediateness and reproducibility permit reliable comparisons between treatment groups.

We used an ultra-violet laser (neodymium:YAG), to effect transmural revascularization. Although there is no clear demonstration to date of the superiority of one type of laser over another, ultraviolet lasers may produce ablation that cause less thermal injury than do infrared lasers to adjacent tissue (Hartman and Whittaker, 1997). The mechanism by which laser-mediated TMR may improve the clinical status of patients remains unclear but angiogenesis represents one possible avenue. Malekan and colleagues (Malekan *et al.*, 1997) observed new vessels formation in myocardium treated either by CO<sub>2</sub> laser or a mechanical drill, suggesting that the new conduits were formed in the healing channels via a non specific response of the myocardial tissue to injury. The use of Nd:YAG laser alone or in combination with AdVEGF<sub>165</sub> did not, in this study, provide an additive increase of factor VIII density in the treated myocardium. If, as suggested, TMR promotes angiogenesis through an increase in the expression of growth factors, we would have expected that the addition of an exogenous source of VEGF could have resulted in a synergistic, additive or at least beneficial

effect on new vessels formation, compared with the use of AdVEGF<sub>165</sub> alone. The failure of this combination of approaches to show a synergy in neovascularization may be explained at least in two different manners. First, AdVEGF<sub>165</sub> and AdlacZ were administered through needle injections in the myocardium. If, as suggested by Chu and collaborators (Chu *et al.*, 1997), that the stimulation of growth factor expression associated with TMR was not different from that obtained with needle punctures, then the laser channels created in the close vicinity of the injection sites would bring no additional benefit. In fact, TMR with Nd:YAG could even be detrimental to the development of new vessels when used in combination with needle punctures. Although recombinant adenoviruses have emerged as the most efficient method of *in vivo* gene transfer in the cardiovascular system (Li *et al.*, 1997), work by Hughes and colleagues (Hughes *et al.*, 1999a) showed that adenoviral-mediated transgene expression was more transient and about 50% less efficient when performed in conjugation with TMR. Scarification, necrosis and inflammatory response due to the injury associated with the use of TMR may produce a tissue that is less favorable for the development of angiogenesis following adenoviral-mediated growth factor administration. Second, even if there is a significant increase in endogenous VEGF concentration following TMR, there may be a retroactive inhibitory mechanism preventing further expression of the molecule when high doses of exogenous VEGF are added. The experimental protocol used in this study may have increased the specificity of angiogenesis detection following administration of the various strategies tested. As opposed to several studies where the treatment (TMR or growth factor administration) was

synchronized with the implantation of the ameroid constrictor or within the few days following its placement, our protocol mandated a waiting period of seven weeks before treating the pigs. This allowed for the completion of the endogenous angiogenic response to ischemia, and therefore showed specifically the angiogenic potential of the treatments being tested, and not their ability to boost a naturally occurring phenomenon. This strategy has also been applied by others (Sayeed-Shah *et al.*, 1998) and may represent a more accurate model of long term ischemia often observed in the clinical setting. Technetium-99 sestamibi ( $\pm$  dobutamine) evaluation of perfusion in a similar model in our laboratory (unpublished data) has reproducibly shown persistent reversible ischemia with an average 30% perfusion deficit 7 weeks after ameroid implantation.

None of the treatment groups showed a significant improvement in cardiac function. Left ventricular ejection fraction assessed angiographically was not significantly improved after treatment for any of the groups. To eliminate the eventual bias of a hyperkinetic compensatory response of undiseased walls preserving global contractility, we also analysed segmental kinetics of the left ventricle. Again, no significant difference could be observed within and among the groups studied. Echographic studies were also conducted both at rest and under physiologic stress by ventricular pacing at 150 beats per minute. Even with the placement of a constrictor and the secondary development of ischemia, endogenous angiogenesis can be sufficient to assure normal left ventricular function at rest, despite relative hypoperfusion. We hypothesised that the increased demand in oxygen seen during stress could unmask a perfusion deficit

resulting in an altered contractility that would have otherwise appeared normal. However, pacing of the hearts in our study did not result in different systolic thickening of the anterior wall for the different treatment groups, revealing no beneficial effect of VEGF or TMR on left ventricular function as assessed at a mean of seven weeks post therapy. The newly formed vessels, significantly higher in number in AdVEGF treated pigs, thus seem to contribute very little to global ventricular function and segmental kinetics. This may be caused by an incomplete maturation of these vessels and/or with failure to organise in an efficient network. Prolonging the recovery period after treatment over seven weeks could yield different results regarding this aspect.

There has been one other study comparing the angiogenic effect of TMR and VEGF used individually or in combination (Sayed-Shah *et al.*, 1998). Using direct injections of a plasmid encoding the VEGF cDNA and a CO<sub>2</sub> laser, they reached the conclusions that TMR enhanced plasmid-mediated transgene expression, and that the combination of TMR and VEGF could reverse ventricular wall motion abnormalities induced by ischemia. However, important limitations regarding the interpretation of their results need to be addressed. First, ventricular contractility was assessed only qualitatively and expressed as either normal or abnormal wall motion, not considering the different degrees of wall motion defect (hypokinetic vs akinetic vs dyskinetic). This is of particular importance since myocardial function was evaluated immediately following ameroid implantation, and not after 6 weeks, when ischemia had developed. Wall motion abnormalities were thus never documented at baseline, and animals did not serve as their own

controls in the post-treatment compared to the pre-treatment settings. The alleged reversibility of wall motion defects was deducted by comparison of the treated groups with ischemic-untreated and non-ischemic control groups, and may have been biased by differing degrees of severity of ischemia among these groups, especially given their small size. Second, there has been no demonstration of neovascularization to account for the observed effects. Correction of contractile dysfunction was not been correlated with an angiogenic response by angiographic, histopathological or perfusion analyses in their study.

Our study demonstrates for the first time, in direct comparison, that gene therapy using adenovirus-mediated VEGF cDNA transfer induces a significantly higher angiogenic response than TMR or controls in an ischemic myocardium model. Moreover, not only did TMR fail to induce any significant myocardial angiogenesis when compared to controls, it did not enhance the development of new vessels expected from the administration of AdVEGF<sub>165</sub> in this combination strategy. Clinical trials comparing both therapeutic modalities, alone and in combination, will be essential in defining optimal therapy for the “no option” patients.



## References

1. Agarwal R, Ajit M, Kurian VM, Rajan S, Arumugam SB, Cherian KM. Transmyocardial Laser Revascularization: early results and one-year follow-up. *Ann Thorac Surg* 1999;67:432-6.
2. Allen KB, Dowling RD, Fudge TL, Schoettle GP, Selinger SL, Gangahar DM, Angel WW, Petracek MR, Shaar CJ, O'Neill WW. Comparison of transmyocardial revascularization with medical therapy in patients with refractory angina. *N Engl J Med* 1999;341:1029-36.
3. Banai S, Jaklitsch MT, Shou M, Lazarous DF, Scheinowitz M, Biro S, Epstein SE, Unger EF. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation* 1994;89:2183-9.
4. Bigras G, Marcelpoil R, Brambilla E and Brugal G: Cellular sociology applied to neuroendocrine tumors of the lung: quantitative model of neoplastic architecture. *Cytometry*, 1996;24 :74-82.
5. Chu VF, Giaid A, Kuang J, McGinn AN, Li CM, Pelletier MP, Chiu RCJ. Angiogenesis in Transmyocardial Revascularization: Comparison of laser versus mechanical punctures. *Ann Thorac Surg* 1999;68:301-8.
6. Cooley DA, Frazier OH, Kadipasaoglu KA, Lindenmeir MH, Pehlivanoglu S, Kolff JW, Wilansky S, Moore WH. Transmyocardial laser revascularization: clinical experience with twelve-month follow-up. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;111:791-9.
7. Dedic K, Klima T, Cooler DA, Frazier OH, Kadipasaoglu KA, Cihan HB. Transmyocardial laser revascularization: histopathological findings. *Cardiovasc Pathol* 1998;7:63-7.
8. Duyckaerts C, Godefroy G and Hauw JJ. Evaluation of neuronal numerical density by Dirichlet tessellation . *J Neuro Meth*;1994;51:47-69.
9. Engler DA. Use of vascular endothelial growth factor for therapeutic angiogenesis. *Circulation* 1996;94:1496-8.
10. Fisher PE, Khomoto T, DeRosa C, Spotnitz HM, Smith CR, Burkhoff D. Histologic analysis of transmyocardial channels: comparison of CO<sub>2</sub> and Holmium:YAG lasers. *Ann Thorac Surg* 1997;64:466-72.

11. Fleisher KJ, Goldschmidt-Clermont PJ, Fonger JD, Hutchins GM, Hruban RH, Baumgartner WA. One-month histologic response of transmymocardial laser channels with molecular intervention. *Ann Thorac Surg* 1996;62:1051-8.
12. Frazier OH, Cooley DA, Kadipasaoglu KA, Pehlivanoglu S, Lindenmeir M, Barasch E, Conger JL, Wilansky S, Moore WH. Myocardial revascularization with laser: preliminary findings. *Circulation* 1995;92: suppl II:58-65.
13. Frazier OH, Mack RJ, Horvath KA. The Transmyocardial Carbon Dioxide Laser Revascularization Study Group. Transmyocardial Revascularization with a carbon dioxide laser in patients with end-stage coronary artery disease. *N Engl J Med* 1999;341:1021-8.
14. Hartman RA, Whittaker P. The physics of transmymocardial laser revascularization. *J Clin Laser Med Surg* 1997;15:255-259.
15. Horvath KA, Chiu E, Maun DC, Lomasney JW, Greene R, Pearce WH, Fullerton DA. Up-regulation of Vascular Endothelial Growth Factor mRNA and angiogenesis after Transmyocardial Laser Revascularization. *Ann Thorac Surg* 1999;68:825-9.
16. Horvath KA, Cohn LH, Cooley DA, Crew JR, Frazier OH, Griffith BP, Kadipasaoglu KA, Lansing A, Mannting F, March R, Mirhoseini MR, Smith C. Transmyocardial laser revascularization: results of a multicenter trial with transmymocardial laser revascularization used as sole therapy for end-stage coronary artery disease. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997;113:645-54.
17. Horvath KA, Mansting F, Cummings N, Sherman SK, Cohn LH. Transmyocardial Laser Revascularization: operative techniques and clinical results at two years. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;111:1047-53.
18. Horvath KA, Smith WJ, Laurence RG, Schoen FJ, Appleyard RF, Cohn LH. Recovery and viability of an acute myocardial infarct after transmymocardial laser revascularization. *J Am Coll Cardiol* 1995;25:258-63.
19. Hughes GC, Annex BH, Yin B, Phippen AM, Lin P, Kypson AP, Peters KG, Lowe JE, Landolfo KP. Transmyocardial laser revascularization limits in vivo adenoviral-mediated gene transfer in porcine myocardium. *Cardiovasc Res* 1999a;44(1):81-90.
20. Hughes GC, Landolfo KP, Lowe JE, Coleman RB, Donovan CL. Diagnosis, incidence, and clinical significance of early postoperative ischemia after Transmyocardial Laser Revascularization. *Am Heart J* 1999b;137:1163-8.

21. Hughes GC, Lowe JE, Kypson AP, St Louis JD, Phippen AM, Peters KG, Coleman RE, DeGrado TR, Donovan CL, Annex BH, Landolfo KP. Neovascularization after Transmyocardial Laser Revascularization in a model of chronic ischemia. *Ann Thorac Surg* 1998;66:2029-36.
22. Kwong KF, Kaneilopoulos GK, Nickols JC, Pogwizd SM, Saffitz JE, Schuessler RB, Sundt TM 3rd. Transmyocardial laser treatment denervates canine myocardium. *J Thorac Surg* 1997;114:883-90.
23. Kwong KF, Schuessler RB, Kanelopoulos GK, Saffitz JE, Sundt TM 3<sup>rd</sup>. Nontransmural laser treatment incompletely denervates canine myocardium. *Circulation* 1998;98:II-67-II-72.
24. Li K, Buvoli M, Welikson RE, Vikstrom KL, Leinwand LA. Advances in cardiovascular gene transfer. *Cardiologia* 1997;42:39-46.
25. Mack CA, Magovern CJ, Hahn RT, Sanborn T, Lanning L, Ko W, Isom OW, Rosengart TK. Channel patency and neovascularization after transmyocardial revascularization using an excimer laser: results and comparisons to nonlased channels. *Circulation* 1997;96(Suppl):II-65-9.
26. Mack CA, Patel SR, Schwarz EA, Zanzonico P, Hahn RT, Ilercil A, Devereux RB, Goldsmith SJ, Christian TF, Sanborn TA, Kovesdi I, Hackett N, Isom OW, Crystal RG, Rosengart TK. Biologic bypass with the use of adenovirus-mediated gene transfer of the complementary deoxyribonucleic acid for vascular endothelial growth factor 121 improves myocardial perfusion and function in the ischemic porcine heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;115:168-77.
27. Malekan R, Reynolds CA, Kelley ST, Suzuki Y, Bridges CR. Angiogenesis in transmyocardial laser revascularization: a non-specific response to injury. *Circulation* 1997;96(Suppl):I564.
28. Milano A, Pratali S, Tartarini G, Mariotti R, DeCarlo M, Paterni G, Boni G, Bortolotti U. Early results of transmyocardial revascularization with a holmium laser. *Ann Thorac Surg* 1998;65:700-4.
29. Mirhoseini M, Cayton MM. Revascularization of the heart by laser. *J Microsc Surg* 1981;2:253-60.
30. Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, Sanborn TA, Parikh M, Bergman GW, Hachamovitch R, Szulc M, Kligfield PD, Okin PM, Hahn RT, Devereux RB, Post MR, Hackett NR, Foster T, Grasso TM, Lesser ML, Isom OW, Crystal RG. Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to

- individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation* 1999;100(5):468-74.
31. Sayeed-Shah U, Mann MJ, Martin J, Grachev S, Reimold S, Laurence R, Dzau V, Cohn LH. Complete reversal of ischemic wall motion abnormalities by combined use of gene therapy with transmyocardial laser revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;116:763-9.
  32. Schofield PM, Sharples LD, Caine N, Burns S, Tait S, Wistow T, Buxton M, Wallwork J. Transmyocardial Laser Revascularization in patients with refractory angina: a randomised controlled trial. *Lancet* 1999;353:519-24.
  33. Sigel JE, Abramovich CM, Lytle BW, Ratliff NB. Transmyocardial Laser Revascularization: three sequential autopsy cases. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;115:1381-5.
  34. Symes JF, Losordo DW, Vale PR, Lathi KG, Esakof DD, Mayskiy M, Isner JM. Gene therapy with Vascular Endothelial Growth Factor for inoperable coronary artery disease. *Ann Thorac Surg* 1999;68:830-7.
  35. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Therapeutic angiogenesis: a single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest* 1994;93:662-70.
  36. Thomas KA. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem* 1996;271:603-6.
  37. Van Belle E, Witzensbichler B, Donghui C, Silver M, Chang L, Schwall R, Isner JM. Potentiated angiogenic effect of scatter factor/hepatocyte growth factor via induction of vascular endothelial growth factor – the case for paracrine amplification of angiogenesis. *Circulation* 1998;97:381-90.
  38. Whittaker P, Kloner RA, Przyklenk K. Laser-mediated transmural myocardial channels do not salvage acutely ischemic myocardium. *J Am Coll Cardiol* 1993;22:302-9.
  39. Whittaker P, Spariosu K, Ho ZZ. Success of transmyocardial revascularization is determined by the amount and organization of scar tissue produced in response to initial injury: results of ultraviolet treatment. *Lasers Surg Med* 1999;24:253-260.

## Figure legends

*Figure 1 : Distribution pattern for the 12 sites of treatment.* Three laser and/or injection sites were concentrated in a triangular fashion near the apex, while the others were distributed in 3 rows extending from the LAD to the lateral wall of the left ventricle, and equidistant between the apex and the aortic constriction (Am.C.).

*Figure 2 : Voronoi polygons represent the geometrical influence of a point (blue dot) within the plane.* Immunostained heart sections are partitioned by assigning a region of influence to every factor VIII “event”, comprising all points in the Euclidean two-dimensional plane that are at least as close to this factor VIII event as to any other one. Factor VIII presence is then expressed in arbitrary density units.

*Figure 3: Change in angiogenic score post treatment.* Variations in density of angiographically observable collateral vessels 7 weeks after treatment are shown for the different therapeutic modalities. No statistically significant differences could be observed among the different treatment groups studied.

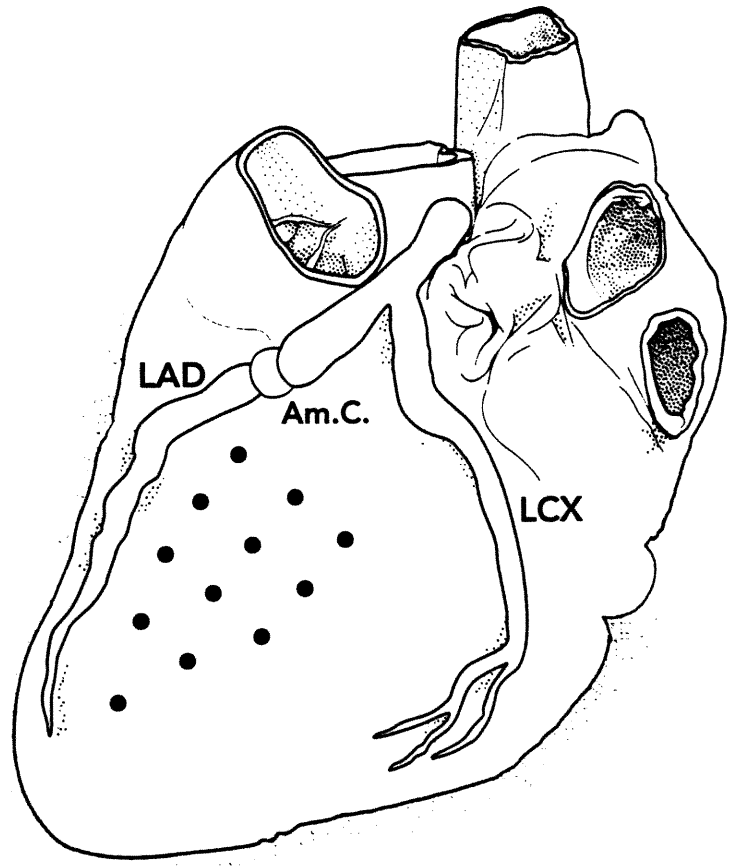
*Figure 4: Myocardial sections from pigs treated with different modalities.* A) Section from a control heart treated with saline injections (20X, scale = 100 $\mu$ m). B) Section from a TMR treated heart showing complete closure of channel with

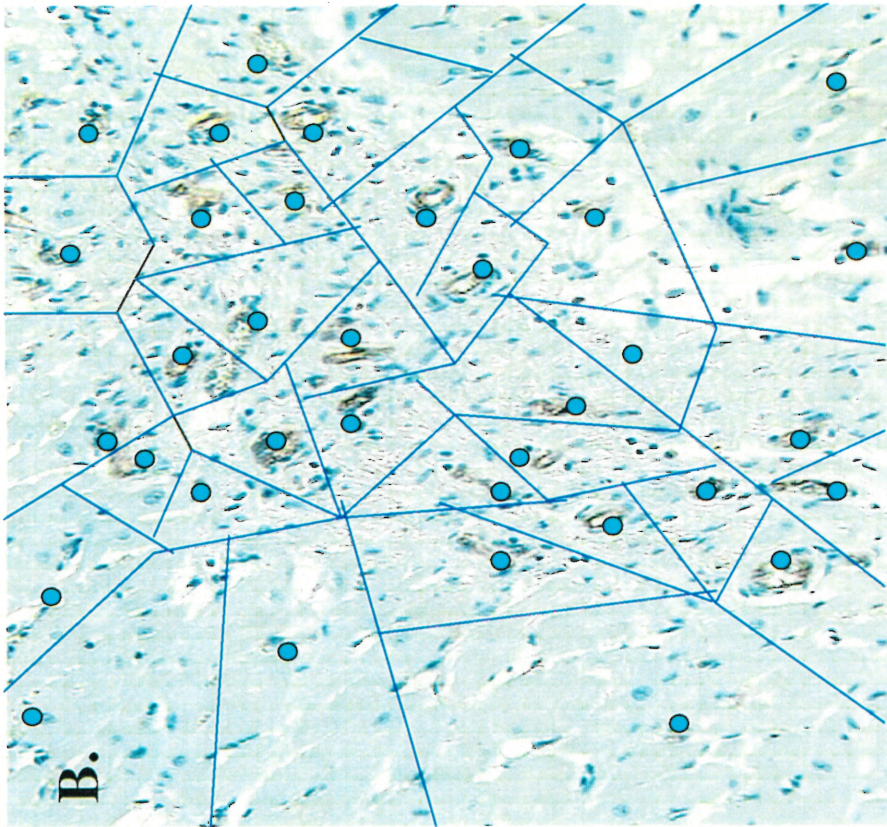
fibrous tissue and mononuclear cell infiltration (arrow) (20X, scale = 100 $\mu$ m). C and D) Immunostained sections from AdVEGF treated heart, with an important density of capillaries associated with (C) and without (D) the presence of important mononuclear cell infiltrates (20X, scale = 100 $\mu$ m). Higher power magnification (E: 50X, F:200X) of capillaries labelled with Factor VIII staining in AdVEGF treated hearts.

*Figure 5: Representative examples of Voronoi polygon analysis.* Immunostained sections outlining Factor VIII presence in TMR treated hearts (A) and AdVEGF treated hearts (B).

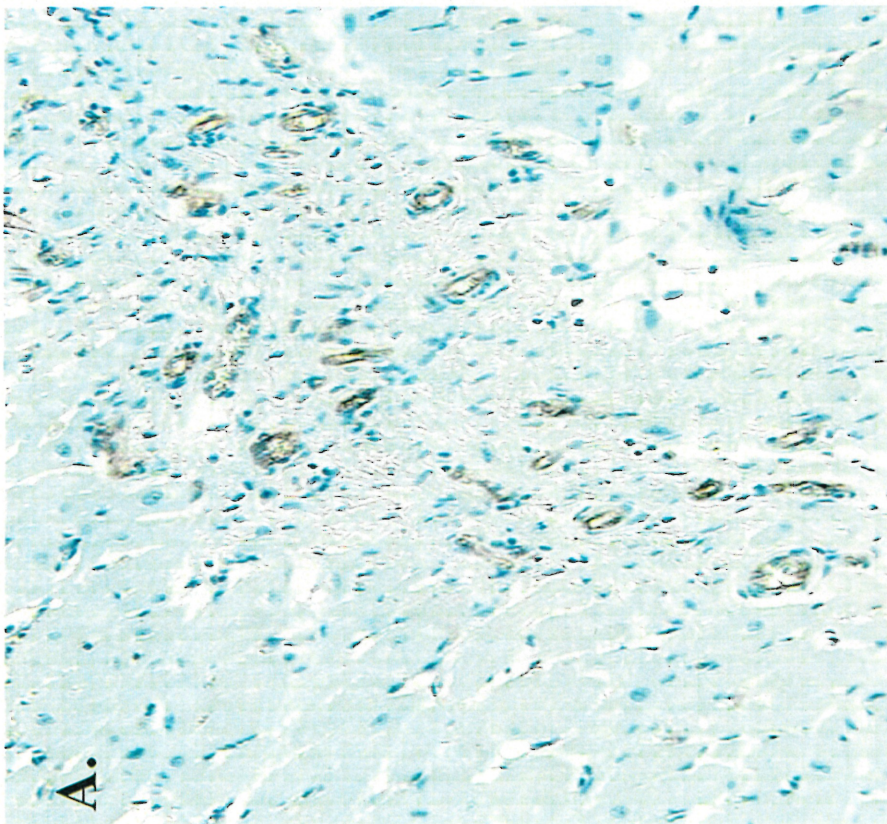
*Figure 6: Histopathological evaluation of factor VIII density.* Mean factor VIII density values derived from Voronoi polygons analysis are expressed in arbitrary units for the different treatment groups. Treatment groups, when considered globally, induced a significant rise in Voronoi units when compared to the control group ( $p=0.015$ ). Factor VIII presence was increased by 106% in AdVEGF-treated groups ( $p=0.006$ ), whereas there was no significant increase associated with the use of TMR ( $p=0.669$ ). No positive interaction was observed between TMR and AdVEGF ( $p=0.521$ ).

Figure 1





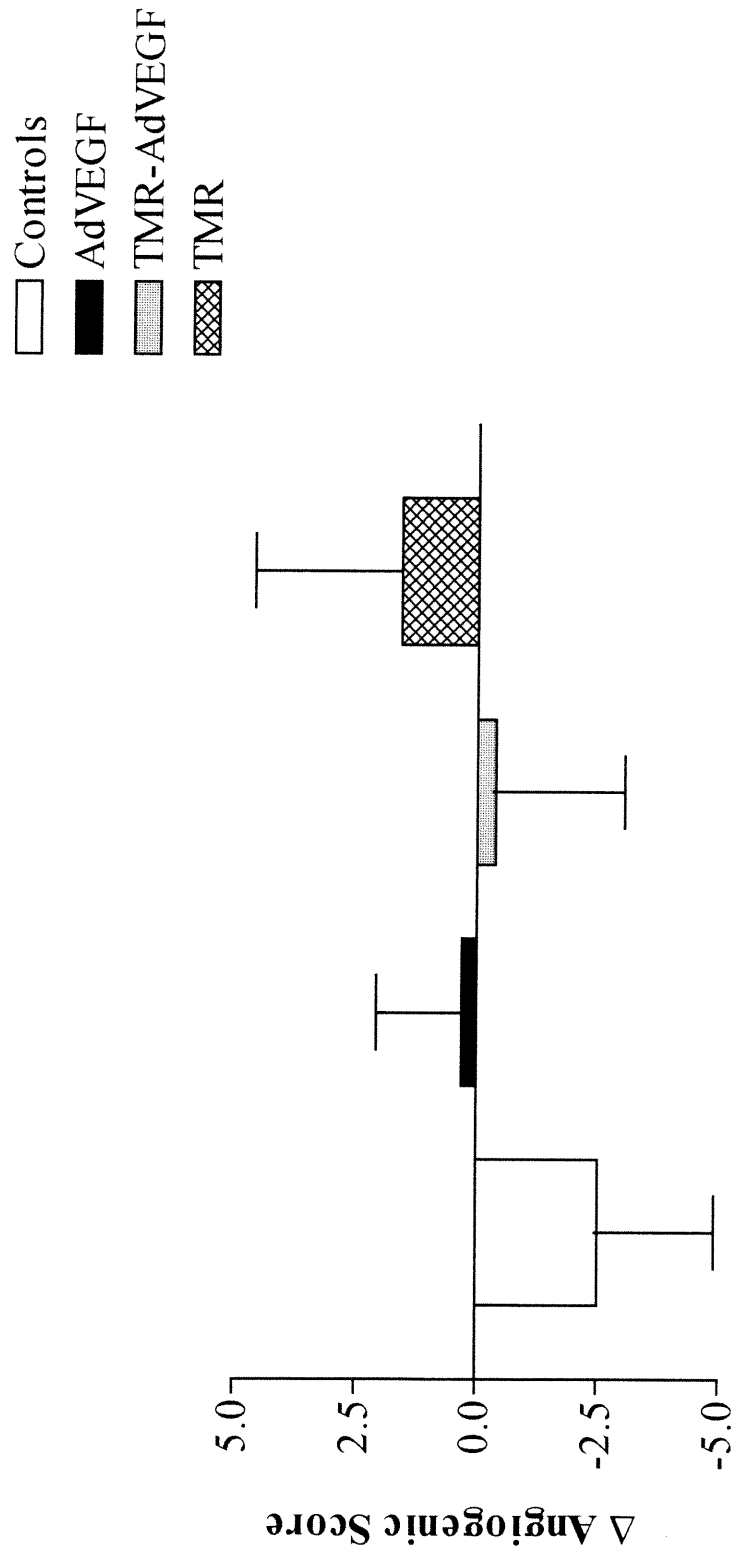
**B.**

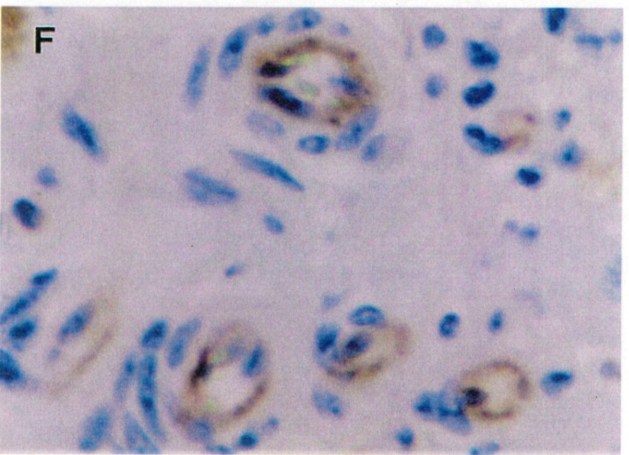
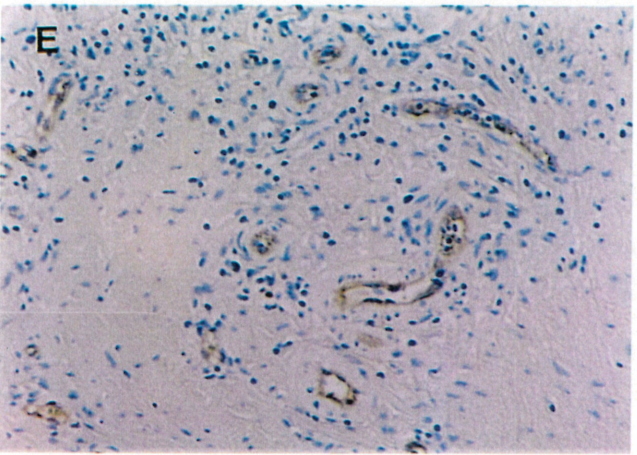
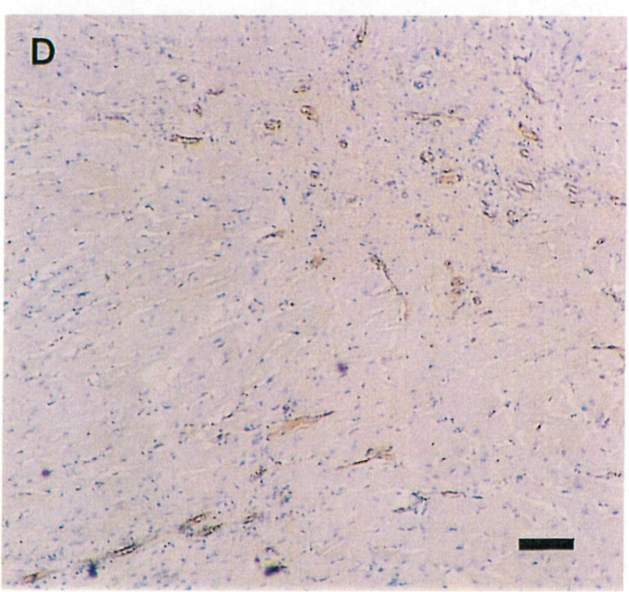
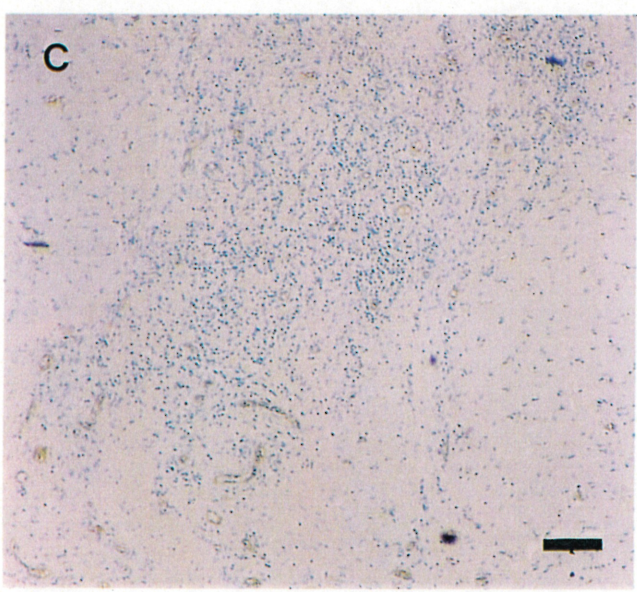
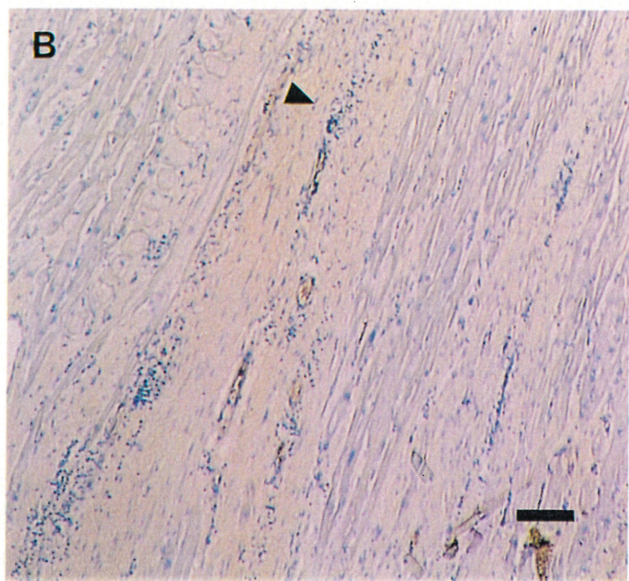
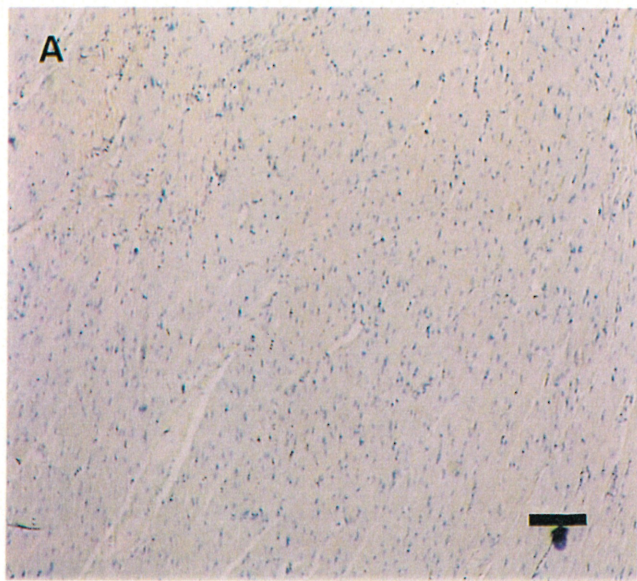


**A.**

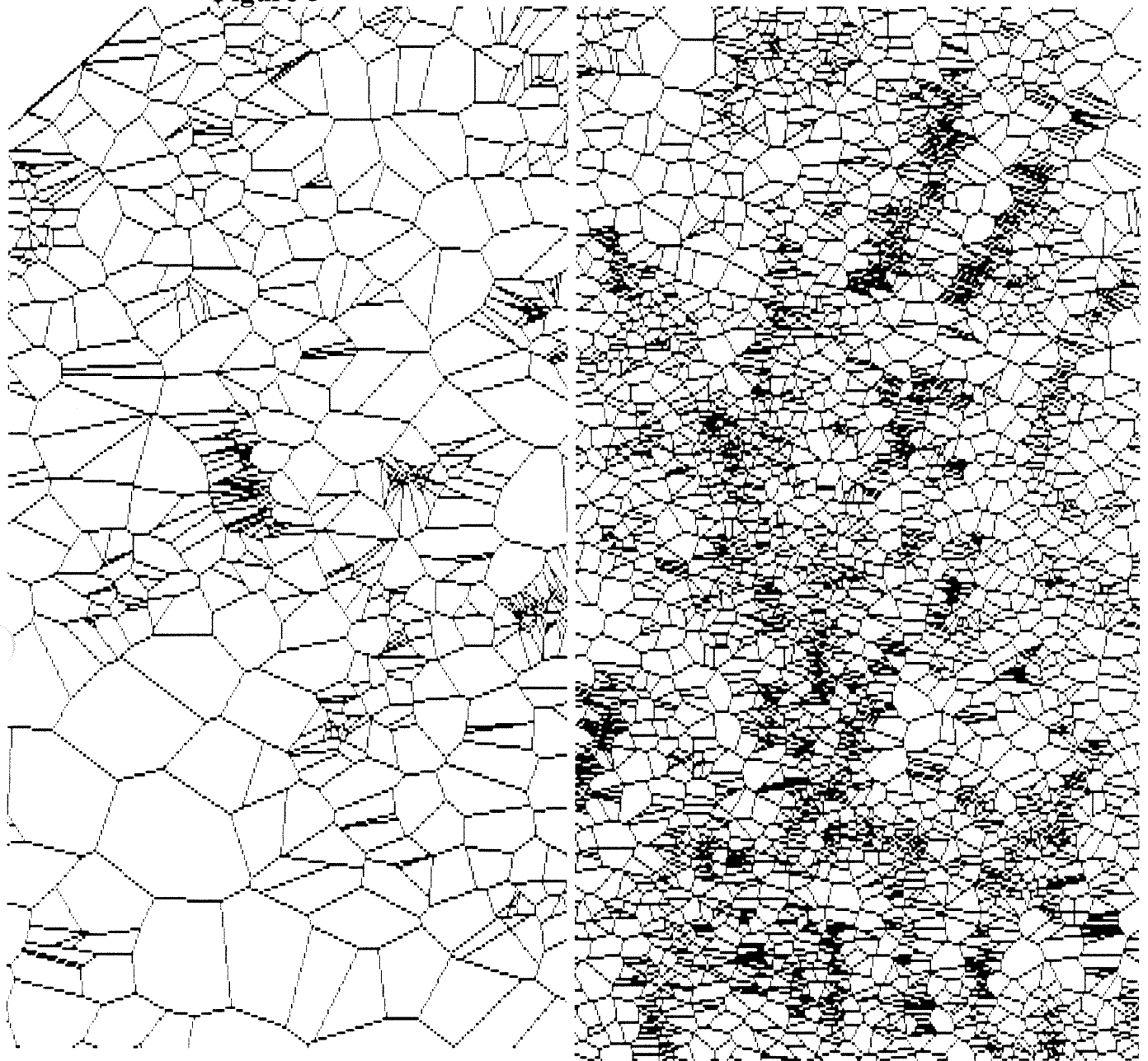


Figure 3





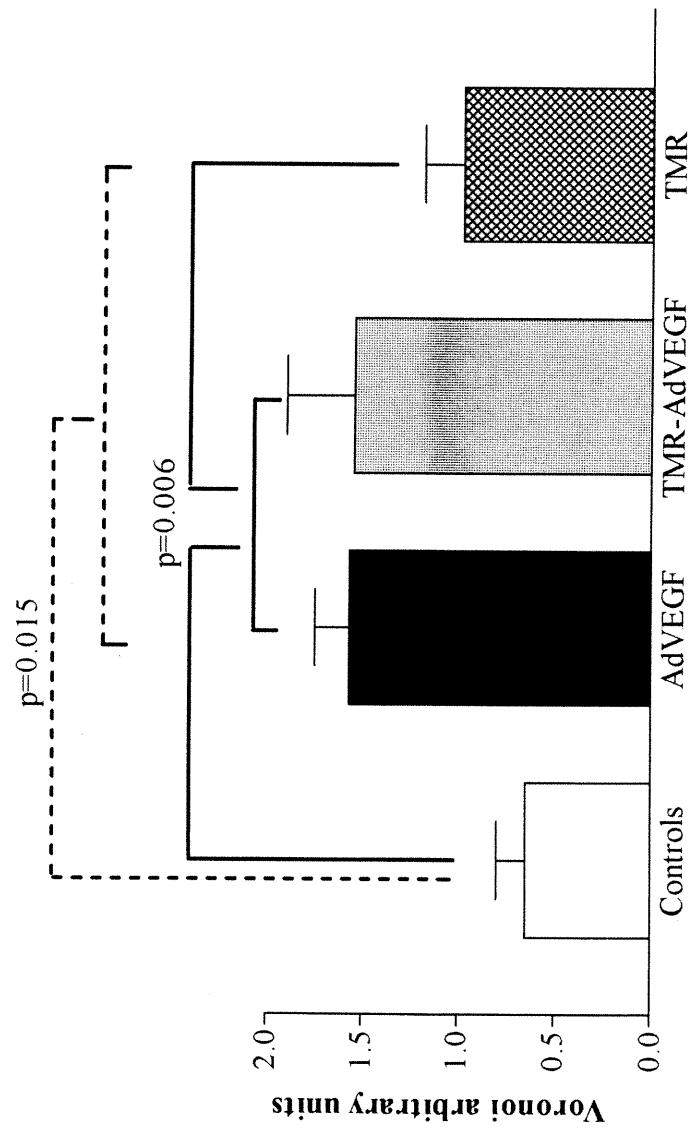
**Figure 5**



**A.**

**B.**

Figure 6



**Chapitre 3 : Cellular Effects of  $\beta$ -Particle Delivery on Vascular  
Smooth Muscle Cells and Endothelial Cells A Dose-Response  
Study**

Jeannette Fareh, PhD; Rémi Martel, PhD; Pouneh Kermani, Msc;

Guy Leclerc, MD

From the Laboratory of Molecular Cardiology, Centre Hospitalier de l'Université  
de Montréal, Québec, Canada

*(Manuscrit accepté dans circulation. 1999. 99: 1477-1484)*

**Condensed Abstract**

Using  $^{32}\text{P}$ -labeled-oligonucleotides, we report that local beta-particle delivery inhibited in a dose-dependent manner cell proliferation of vascular smooth muscle cells and endothelial cells by inducing a  $G_1/G_0$  arrest, with no alteration of cell viability or apoptosis appearance at low and high dose ranges. Irradiated VSMCs were characterized by a reduced migrative function associated with the appearance of a contractile phenotype. Altogether, these results reinforce the potential of ionizing radiation to prevent neointima formation following balloon angioplasty.

## **Abstract**

*Background* Although endovascular radiotherapy inhibits neointimal hyperplasia, the exact cellular alterations induced by beta-irradiation remain to be elucidated.

*Methods and Results* We investigated *in vitro* the ability of  $^{32}\text{P}$ -labeled-oligonucleotides to alter:(1) proliferation of human and porcine vascular smooth muscle cells (VSMCs) and human coronary artery endothelial cells (ECs), (2) cell cycle progression, (3) cell viability and apoptosis, (4) cell migration, (5) cell phenotype and morphological features. Beta-radiation significantly reduced proliferation of VSMCs ( $\text{ED}_{50}$ :1.10 Gy) and ECs ( $\text{ED}_{50}$ :2.15 Gy) in a dose-dependent manner. Exposure to beta-emission interfered with cell cycle progression, with induction of  $\text{G}_0/\text{G}_1$  arrest in VSMCs, without evidence of cell viability alteration, apoptosis or ultrastructural changes. This strategy also proved to efficiently inhibit VSMC migration by 80% and induce contractile phenotype appearance, as shown by the predominance of  $\alpha$ -actin immunostaining in beta-irradiated cells compared to control cells.

*Conclusions*  $^{32}\text{P}$ -labeled-oligonucleotide was highly effective in inhibiting proliferation of both VSMCs and ECs in a dose-dependent fashion, with ECs showing a higher resistance to these effects. Beta-irradiation-induced  $\text{G}_1$  arrest was not associated with cytotoxicity and apoptosis, thus demonstrating a potent cytostatic effect of beta-based therapy. This effect, coupled to that on VSMC migration inhibition and the appearance of a contractile phenotype, reinforced the potential of ionizing radiation to prevent neointima formation post-angioplasty.

## Introduction

It is well established that restenosis following angioplasty is characterized by significant neointimal formation and geometric remodeling of the artery<sup>1</sup>. Since the stent-based strategy is effective in preventing vessel shrinkage, excessive neointimal proliferation through the metallic prosthesis continues to reduce lumen size<sup>1</sup>. To prevent neointimal hyperplasia, various therapeutic strategies have been developed, based on pharmacological approaches, gene transfer<sup>2; 3</sup> and more recently on ionizing radiation (beta- and gamma-emitting sources)<sup>4; 5</sup>. Several animal studies using either beta-particle emitting stents<sup>6-8</sup> or wire-mediated endovascular beta-<sup>9; 10</sup> and gamma-emissions<sup>10-13</sup> have shown great promise in the field of restenosis prevention. Beta radioactive stents allow a long-term delivery of beta-particles within the arterial wall with a low dose-rate, whereas endovascular brachytherapy is characterized by high dose-rates over a short-term period<sup>4; 5</sup>. While there is a great interest in developing an effective clinical endovascular radiation strategy to prevent restenosis<sup>14-16</sup>, several questions pertinent to the use of such strategies remain unanswered. Indeed, the cellular consequences of ionizing radiation leading to the prevention of neointima formation following balloon angioplasty remain to be elucidated.

Accordingly, we developed a strategy combining radiotherapy and gene transfer approaches to effect an *in situ* delivery of pure beta-particles in vascular cells in an homogeneous manner. We propose in the present study, to investigate *in vitro* the



effect of beta-emission on (1) proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) and endothelial cells (ECs), (2) cell cycle progression, (3) cytotoxicity and apoptosis induction, (4) cell migration, (5) vascular cell phenotype and morphology features. We demonstrate *in vitro* the impact of local beta-irradiation on both proliferation and migration of vascular cells in a dose-dependent manner and describe for the first time the interference of beta-radiation with VSMC cell cycle progression, phenotype modulation and absence of cytotoxic effects.

## Methods

**Cell Culture.** All experimental protocols were approved by the Institutional Committee for Animal Protection of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. Porcine VSMCs were isolated from aortic explants of Yorkshire Swine (Charles Rivers, St Constant, Québec, Canada) as previously described<sup>17</sup>. Human VSMCs were harvested from unused specimens of saphenous veins obtained after bypass surgery, following informed consent of patients. Cell purity was estimated to be >95%, using VSMC  $\alpha$ -actin-immunostaining (Sigma). Human coronary artery endothelial cells (ECs, Clonetics Corporation, San Diego, CA) were grown in MCDB 131 medium (Sigma) and U937 human cells (Monocyte-like leukemic tumor, ATCC, Rockville, MD) in RPMI medium.

**Dosimetry for <sup>32</sup>P-Labeled-Oligonucleotides.** *In vitro* predicted dose was calculated considering both the specific activity of <sup>32</sup>P-labeled-oligonucleotides

and the exposure time according to the dose-point-kernel (DPK) prediction. The DPK estimation, derived from the Monte Carlo method, was based on the homogeneous distribution of radioactive particles in the medium<sup>18</sup>. Based on autoradiograms, beta-particle delivery was shown to be uniform in the 2 cm<sup>2</sup>-well and no radiation was detected in adjacent wells (data not shown).

**Local Beta-Particle Delivery.** We used <sup>32</sup>P-labeled-DNA oligonucleotides as a molecular delivery mode of beta-particles to vascular cells. In the present *in vitro* report, the sense sequence of c-myc was used to ensure that the observed effects were not sequence-specific but mainly due to beta-particle emission. Previous studies conducted to compare sense and antisense sequences, reported that the efficacy of both <sup>32</sup>P-labeled-sequences was statistically similar in inhibiting VSMC proliferation (unpublished data, 1996). Sense c-myc phosphorothioate oligonucleotides (5'-ATGCCCTCAACGTG-3') were synthesized on a DNA/RNA automated synthesizer (Applied Biosystems, Foster City, CA) and purified according to the supplier's protocol (Glen Research, Sterling, VA). Oligonucleotides were internally labeled with [<sup>32</sup>γATP] (3000 Ci/mmol, Du Pont Canada Inc., Mississauga, ON) by T4 polynucleotide kinase (Gibco-BRL). The stability of the labeled-oligomer was assessed by incubating VSMCs with the probe (0.4 nmol/L) for 1 to 7 days. Extracts were loaded on 20% urea-polyacrylamide gel and revealed by autoradiography. To determine the cellular localization of the radioactive source, VSMCs were transfected with oligomer 5'-labeled with fluoresceine-isothiocyanate molecule (FITC, 2 μmol/L).

**External Gamma- and Electron-Particle Deliveries.** To compare the low dose-rate strategy obtained with the use of labeled-oligonucleotides to a high dose-rate approach, we exposed VSMCs, ECs and U937 cells to either  $^{60}\text{Co}$  (Cobalt-60) or electron beam sources, leading to gamma- (1.6 Gy/min) or electron-particle (4 Gy/min) deliveries respectively (3, 10, 20 and 30 Gy).

**VSMC Viability.** Cell integrity was evaluated by the trypan blue exclusion test (Gibco-BRL)<sup>19</sup>. Increasing beta-doses were tested (1, 3, 5, 10, 20 and 30 Gy) by incubating VSMCs with labeled-oligonucleotides for 72 hours. Cell viability assay was performed in triplicate on 4 cell preparations and expressed as a percent of total cell counts.

**Cell Proliferation Assay.** VSMCs and ECs were synchronized with serum-deprived medium for 48 hours and then stimulated with FBS in the presence of increasing levels of  $^{32}\text{P}$ -labeled-oligonucleotides (0.4 to 10 Gy). Non-irradiated cells received equal concentrations of unlabeled-oligonucleotides (>20 nmol/L). After [methyl- $^3\text{H}$ ]-thymidine incorporation (6.7 Ci/mmol, NEN Life Science Products, Mississauga, Ontario, Canada), cells were treated as previously described<sup>20</sup>. To evaluate the cell regrowth following removal of the beta-source from the medium, VSMCs were first incubated with labeled-oligonucleotides (5.5 Gy) leading to severe inhibition of proliferation (80%), then the beta-source was removed from the cell layer for 3 and 5 days. The effects of local irradiation on proliferation was calculated as a percent of that obtained with non-irradiated cells, based on quadruplicates with 5 to 7 cell preparations. Since similar effects of

labeled-oligonucleotides on porcine and human VSMCs were seen (Figure 3), we then decided to perform all the following experiments on porcine VSMCs, as porcine explants are more readily available.

***Cell Cycle Progression.*** VSMCs were synchronized in serum-deprived medium for 48 hours. Labeled-oligonucleotides were simultaneously added with 10% FBS. Cells were incubated with beta-sources (2, 10 and 30 Gy) and harvested 6, 10, 16, 20, 24, 48, 72, 96 and 120 hours after serum-activation. Cells were fixed in 70% ethanol and treated with 0.1% sodium citrate, 0.3% NP-40, 0.02 mg/mL RNase and 0.05 mg/mL propidium iodide. Stained cells were analyzed by flow cytometry using a FACScan model (Becton Dickinson Immunocytometry systems, San Jose, CA).

***Internucleosomal DNA Fragmentation.*** VSMCs, ECs and U937 cells were incubated with labeled-oligonucleotides for 72 hours (1, 3, 5, 10, 20 and 30 Gy). The three cell-types were also exposed to external  $^{60}\text{Co}$  and electron beam sources (3, 10, 20, 30 Gy) and processed 24 and 72 hours post-irradiation. As a positive control of DNA fragmentation, we treated U937 cells with 1  $\mu\text{mol/L}$  camptothecin, a DNA Topoisomerase I inhibitor (Sigma) for 6 hours. Genomic DNA was extracted from treated cells as described<sup>21</sup>.

***Transmission Electron Microscopy.*** VSMCs, ECs and U937 cells were incubated with labeled-oligonucleotides for 72 hours (3 and 30 Gy). Cells were fixed in Millonig' sodium phosphate solution containing 2.5% glutaraldehyde and stored in

0.1 mol/L Millonig' solution until processing (50 to 70 nm thick). Transmission electron microscopy was performed with a Zeiss Em10 CA microscope (JFE Enterprises, Brookeville, MD).

***Cell Migration and Immunofluorescence.*** VSMC and EC migration assays were performed with modified Boyden chambers (Neuroprobe Inc., Cabin John, MD) in which cells were allowed to migrate through a polycarbonate membrane (8- $\mu$ m pore size, Costar Corp., Cambridge, MA)<sup>22</sup>. Immunostaining was performed to investigate effects of beta-irradiation on cell phenotype, by incubating cells with either anti- $\alpha$ -actin or anti-von Willbrand factor antibodies (Sigma) for VSMCs and ECs respectively<sup>23</sup>. After nuclei staining with 0.01% Hoechst solution (Sigma), slides were observed with an epifluorescence microscope. Low beta-irradiation doses (0.4 and 1 Gy) were used to evaluate the setting of migration and phenotype modulation.

***Statistical Analysis.*** All values are expressed as means  $\pm$  SEM. Differences between control and irradiated cells were assessed by ANOVA with subsequent Student-Newman-Keuls test for multiple comparisons. Statistical significance was established when  $p < 0.05$ .

## Results

**Local Beta-particle Delivery.** We used a phosphorothioate-modified-oligonucleotide as its high stability has been previously demonstrated<sup>24</sup>. The labeled-oligomer showed no evidence of radiolysis or degradation within the media even after 7 days (Figure 1), demonstrating the high stability of <sup>32</sup>P-labeled-oligonucleotides *in vitro*. As illustrated in Figure 2A, >95% of cells were positive for fluorescent label, showing that the transfection was highly effective and uniform *in vitro*. FITC-oligomers were localized mainly in the nucleus in accordance with previous studies<sup>24; 25</sup>. In agreement with the DPK prediction<sup>18</sup>, no radiation was reported in adjacent wells (Figure 2B); the level and the distribution of beta-particle emission were reinforced by autoradiography analysis (data not shown). Together these results demonstrated that stable labeled-oligonucleotides homogeneously emit beta-particles.

**Cell Viability.** After beta-irradiation, viable cell proportion was maintained to an average of 95±1% (1, 3, 10 Gy), compared to 96±0.6% in control VSMCs. Interestingly, molecular beta-irradiation, even at high doses (20 and 30 Gy), did not alter significantly VSMC viability (94±0.9% for 30 Gy, p=NS vs 1 to 10 Gy), suggesting that <sup>32</sup>P-labeled oligonucleotides were not lethal for VSMCs.

**Vascular Cell Proliferation.** The effect of unlabeled-oligonucleotides (<20 nmol/L) on the cell proliferation was evaluated to be a reduction of less than 10%

in accordance with previous studies<sup>20; 26</sup>. For the first time, we report a significant inhibition of VSMC proliferation with beta-irradiation in a dose-dependent manner (0.4 to 10 Gy, Figure 3A), with an ED<sub>50</sub> at 1.10±0.07 Gy and 1.08±0.12 Gy for porcine and human respectively, an ED<sub>50</sub> statistically similar in both species. Increasing beta-dose induced comparable patterns of growth inhibition in ECs, with an ED<sub>50</sub> at 2.15±0.10 Gy (Figure 3B). However, ED<sub>50</sub> comparison of VSMC and EC demonstrated that the ability of beta-irradiation to inhibit proliferation was significantly higher in VSMCs compared to that with ECs (p<0.01), except at the highest dose (10 Gy). Removal of <sup>32</sup>P-labeled oligonucleotides did not completely abolish the potential inhibitory effect of beta-irradiation on VSMC proliferation over 3 to 5 days (p<0.05 vs non-irradiated cells, Figure 4).

***Cell Cycle Progression in VSMCs.*** As shown in Figure 5, serum-deprived cells were mainly distributed in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of the cell cycle (57±2%, panel A) with reduced DNA synthesis activity (32±2%) and low level of cell division (8±1% in the G<sub>2</sub>/M phase). Between 3 to 20 hours following serum-activation, quiescent cells did not progress into S phase (data not shown). As previously described<sup>27</sup>, 24 hours after serum addition, we observed that most of VSMCs progressed into the S phase (85±3%, Figure 5B), and to a lesser extent, cells remained in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> state. Interestingly, VSMCs remained in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase after beta-exposure (2, 10 and 30 Gy), with a concomitant reduction in cell cycle progression into the S phase (Figures 5 and 6). Beta-irradiation did not modify significantly the G<sub>2</sub>/M phase of the cell cycle (Figure 6). As illustrated in Figure 5, no apoptotic peak,

corresponding to DNA degradation was noted at low or high beta-doses. Investigation of long-term effects of beta-exposure on cell cycle progression showed that cells remained mainly in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> state (57%±3%) for up to 120 hours.

***Comparative Effects of Local and External Irradiation on DNA Fragmentation.***

Labeled-oligonucleotides at low (3 Gy) and elevated dose-ranges (10, 20 and 30 Gy) did not induce DNA fragmentation in VSMCs, ECs and U937 cells (Figure 7A). Exposure to <sup>60</sup>Co or electron beam sources did not alter DNA integrity in VSMCs and ECs, whereas this type of delivery induced DNA laddering in U937 cells (Figures 7B and 7C). These data suggest that U937 cells may be more sensible than vascular cells following high dose-rate radiation. Camptothecin also led to severe DNA fragmentation in leukemic cells after 6 hours (Figure 7A, lane 4) as previously reported<sup>21</sup>.

***Morphological Changes and Apoptosis.*** Electron micrographs showed that following labeled-oligonucleotides irradiation (3 and 30 Gy), VSMCs, ECs and U937 cells conserved normal ultrastructural features (Figure 8). Presence of apoptotic cells was identified by the following features: chromatin compaction, cell surface blebbing, cytoplasmic shrinkage and condensation. Morphological studies reported that the frequency of apoptotic cells in control and beta-irradiated VSMCs, ECs and U937 cells was <3%, whereas following camptothecin treatment, 50 to 60% of leukemic cells met the apoptosis criteria<sup>21</sup>.



**Cell Migration and Phenotype.** Our results reported similar inhibitory effect in migration of VSMCs ( $43\pm 0.4\%$  and  $20\pm 3.5\%$  of control cell level) and ECs ( $47.3\pm 2.5$  and  $13\pm 2.3\%$  of control cell level) for doses of 0.4 and 1 Gy respectively ( $p < 0.001$  vs control cells). Proliferating VSMCs showed a weak immunostaining of  $\alpha$ -actin proteins, corresponding to the synthetic phenotype (Figure 9A). Local beta-irradiation induced an increase in  $\alpha$ -actin fibers, which appeared to be dose-dependent (Figures 9B and 9C) and occurred in nearly all cells ( $>95\%$ , panel D), suggesting the appearance of a contractile phenotype in irradiated VSMCs. With ECs, beta-irradiation (0.4 and 1 Gy) did not modify von Willbrand factor immunostaining (data not shown).

## Discussion

The development of endovascular radiotherapy initiated a series of seminal experiments demonstrating the effectiveness of a gamma-source to prevent restenosis over short-<sup>9; 10; 12</sup> and long-term observation periods<sup>9; 11; 28</sup>. Verin *et al.*<sup>29</sup> and Waksman *et al.*<sup>10; 30</sup> subsequently demonstrated the effectiveness of a beta-source in reducing intimal hyperplasia in rabbit and pig models respectively. Stent-based approaches were also proposed as platforms from which beta-emission could be delivered to the vessel wall<sup>6-8</sup>. In a landmark trial, Teirstein *et al.*<sup>14</sup> reported the successful reduction of restenosis rates in injured arteries with Iridium-192. Although the concept of radiotherapy to prevent restenosis recently

reached the clinical arena, several questions regarding its mechanism of action on vascular cells remain unanswered. Therefore, we proposed in this study to examine the consequences of beta-emission radiation on various fundamental functions of vascular cells, such as cell viability, proliferation and migration. We also dissected the effects of beta-radiation on cell cycle progression, apoptosis induction, phenotype modulation and morphological features in VSMCs and ECs.

To deliver beta-particles in a homogenous fashion, we developed a novel approach based on the local delivery of radiolabeled short DNA single-strands. We demonstrate that oligomers internally labeled with Phosphorus-32 ( $^{32}\text{P}$ ) provided a stable source of radiation and an uniform dose distribution to target cells. Comparison of the effects of sense and antisense sequences demonstrated that both labeled-sequences had similar inhibitory effect, supporting the concept that the oligonucleotides only served as a molecular vector to locally deliver beta-particles. The  $^{32}\text{P}$ -isotope (half-life :14.3 days) has already been adopted by two different platforms in coronary radiation clinical trials (wire- and stent-based).

To date, few data are available on the biological effects of radiation on vascular cells. Fischell *et al.*<sup>31</sup> observed that  $^{32}\text{P}$ -radioactive wires inhibited the growth and migrative functions of VSMCs using a non-uniform dose-distribution. A dose-response effect of a Cesium-137 source on VSMC proliferation was reported and showed “reproductive cell death”, without, however, any sign of apoptosis<sup>32</sup>. The current study reports for the first time that beta-irradiation efficiently inhibits human and porcine VSMCs and human ECs in a dose-dependant manner. At moderate range of beta-particle delivery (0.4 to 6 Gy), ECs appeared to be more

radioresistant than VSMCs. No difference, however, could be seen at doses that induced optimal proliferation inhibition. Protocols used in current clinical trials of brachytherapy<sup>14-16</sup> would thus not be expected to have a different effect on VSMCs and ECs. VSMC growth inhibition was maintained over at least 5 days following radioactive-source removal, suggesting either that the effects of beta-irradiation are sustained even after source removal or that remaining incorporated intracellular oligonucleotides continued to inhibit proliferation<sup>24</sup>.

To understand the mechanisms of the inhibitory effect of radiation, we investigated cell cycle progression in irradiated VSMCs. For the first time, we report that beta-irradiation caused cells to remain in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase and reduced cell numbers in the S phase, as leukemic cells after radiotherapy<sup>33</sup>. Moreover, this growth arrest was maintained over 5 days. The mechanisms of beta-irradiation-induced G<sub>1</sub> arrest in VSMCs remain, however, to be defined. Recent recombinant adenoviral strategies reported that adenovirus containing p21<sup>27</sup>, p53<sup>34</sup> or retinoblastoma<sup>35</sup> efficiently blocked the cell cycle progression and successfully reduced intimal hyperplasia in animals. It may be hypothesized that p53-induced p21 inhibits the cyclin-dependent kinases<sup>36; 37</sup>, leading to the G<sub>1</sub> arrest in irradiated VSMCs.

Previous studies on the effects of external radiation using high dose-rates reported damage leading to “reproductive cell kill”<sup>32; 33</sup> or apoptosis induction<sup>33</sup>. However, “reproductive cell kill” is not synonymous to the loss of physical integrity. The current low dose-rate beta-emission approach did not induce signs of loss of organelle integrity or DNA fragmentation as shown by ultrastructural and FACS

analyses. To compare this low dose-rate approach to that used in brachytherapy, we exposed cells to external sources of gamma- or electron-particles. High dose-rate irradiation did not induce any DNA laddering in VSMCs and ECs, whereas leukemic cells appeared to die by radiation-induced DNA fragmentation. This is in accordance with the low level of apoptosis found in rabbit beta-irradiated arteries<sup>29</sup> and the absence of apoptosis reported in porcine irradiated arteries<sup>10</sup>. The low dose-rate delivery effected by labeled-oligonucleotides (2-10 cGy/hour) is more closely related to that used with radioactive-stents<sup>6-8</sup> than that used in brachytherapy (1-5 Gy/min)<sup>9; 10; 12; 13; 28</sup>. Consequently, such low dose-rate strategies could be defined as cytostatic, preserving cell integrity and viability and acting as a growth suppressor<sup>37</sup>. Also, no apoptosis could be seen in vascular cells in our high dose-rate experiments. Whether “physical cell kill” is a desirable endpoint in the objective of preventing clinical restenosis remains unanswered.

In addition to inhibiting cell proliferation, beta-irradiation significantly reduced migration of VSMCs and ECs, at much lower beta-doses (1 Gy) than those affecting the proliferative properties, suggesting that the migrative function may be more radiosensible than cell growth. Beta-irradiation inhibited EC migration, but failed to alter von Willbrand factor immunostaining, suggesting that reduced migrative function of irradiated ECs may be responsible for potential endothelial-related dysfunction, by altering re-endothelialization of injury site after balloon angioplasty. VSMC functions are closely related to their phenotype modulation<sup>38</sup> and in proliferative disorders, such as restenosis, contractile VSMCs become dedifferentiated and develop the synthetic phenotype. This immature stage, similar

to the *in vitro* conditions, is correlated with a high migrative capacity of VSMCs<sup>38</sup>. We demonstrate that low beta-irradiation induced the transition from the synthetic to the contractile phenotype as shown by the higher  $\alpha$ -actin immunostaining in beta-irradiated cells.

In conclusion, we report that labeled-oligonucleotides inhibited proliferation of VSMCs and ECs in a cell- and dose-specific manners, by acting as a growth suppressor resulting in G<sub>1</sub>-arrest, with no morphological changes and apoptosis induction. Beta-radiation succeeded in inhibiting cell migration and enhanced the contractile phenotype of VSMCs. By acting on vascular cell function, the beta-radioactive strategy may contribute to prevent intimal hyperplasia following angioplasty.

### **Acknowledgements**

Dr Fareh is a recipient of a Research Fellowship from the Heart and Stroke Scientific Research Corporation of Canada-Merck Frosst Canada Inc. P. Kermani is a recipient of a Research Traineeship from the Heart and Stroke Foundation of Canada. The authors are grateful for the exceptional help of S. LeBail, J.F. Corbett and R. Carrier for the dosimetry.

## References

1. Bittl JA: Advances in coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1996;335:1290-1302
2. Gibbons GH, Dzau VJ: Molecular therapies for vascular diseases. *Science* 1996;272:689-693
3. Stephan D, Nabel EG: Gene and other biological therapies for vascular diseases. *Fundamental Clinical Pharmacology* 1997;11:97-110
4. Teirstein PS: Beta-radiation to reduce restenosis. Too little, Too soon? *Circulation* 1997;95:1095-1097
5. Serruys PW, Levendag PC: Intracoronary brachytherapy: the death knell of restenosis or just another episode of a never-ending story. *Circulation* 1997;96:709-712
6. Hehrlein C, Gollan C, Donges K, Metz J, Reissen R, Fehsenfeld P, von Hodenberg E, Kubler W: Low-dose radioactive endovascular stents prevent smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia in rabbits. *Circulation* 1995;92:1570-1575
7. Laird JR, Carter AJ, Kufs WM, Hoopes TG, Farb A, Nott SH, Fischell RE, Fischell DR, Virmani R, Fischell TA: Inhibition of neointimal proliferation with low-dose irradiation from a beta-particle-emitting stent. *Circulation* 1996;93:529-536

8. Rivard A, Bouchard M, Roorda S, Beaudoin G, Carrier R, Leclerc G: Low-dose beta-emitting radioactive stents inhibit neointimal hyperplasia in porcine coronary arteries : an IVUS assessment. *Circulation (Suppl.)* 1996;94:I-210
9. Waksman R, Robinson KA, Crocker IR, Gravanis MB, Cipolla GD, King SB: Endovascular low-dose irradiation inhibits neointima formation after coronary artery balloon injury in swine. *Circulation* 1995;91:1533-1539
10. Waksman R, Rodriguez JC, Robinson KA, Cipolla GD, Crocker IR, Scott NA, King SB, Wilcox JN: Effect of intravascular irradiation on cell proliferation, apoptosis, and vascular remodeling after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries. *Circulation* 1997;96:1944-1952
11. Waksman R, Robinson KA, Crocker IR, Gravanis MB, Palmer SJ, Wang C: Intracoronary radiation before stent implantation inhibits neointima formation in stented porcine coronary arteries. *Circulation* 1995;92:1383-1386
12. Weinberger J, Amols H, Ennis RD, Schwartz A, Wiedermann JG, Marboe C: Intracoronary irradiation : dose response for the prevention of restenosis in swine. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 1996;36:767-775
13. Mazur W, Ali MN, Khan MM, Dabaghi SF, Defelice CA, Paradis P, Butler EB, Wright AE, Fajardo LF, French BA, Raizner AE: High dose rate intracoronary radiation for inhibition of neointimal formation in the stented and balloon-injured porcine models of restenosis : angiographic,

- morphometric and histopathologic analyses. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 1996;36:777-788
14. Teirstein PS, Massullo V, Jani S, Popma JJ, Mintz G, Russo RJ, Schatz RA, Guarneri EM, Steuterman S, Morris N, Leon MB, Tripuraneni P: Catheter-based radiotherapy to inhibit restenosis after coronary stenting. *N Engl J Med* 1997;336:1697-1703
  15. Verin V, Urban P, Popowski Y, Schwager M, Nouet P, Dorsaz PA, Chatelain P, Kurtz JM, Rutishauser W: Feasibility of intracoronary beta-irradiation to reduce restenosis after balloon angioplasty. A clinical pilot study. *Circulation* 1997;95:1138-1144
  16. Candado JA, Waksman R, Gurdziel O, Espinosa R, Gonzalez J, Burger B, Villoria G, Acquatella H, Crocker IR, Seung KB, Liprie SF: Long-term angiographic and clinical outcome after percutaneous transluminal coronary angioplasty and intracoronary radiation therapy in humans. *Circulation* 1997;96:727-732
  17. Russel R: The smooth muscle cell. II Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *The Journal of Cell Biology* 1971;50:172-186
  18. Prestwich WV, Kenett TJ: The dose distribution produced by a  $^{32}\text{P}$ -coated stent. *Med Physics* 1995;22:313-320
  19. Niedereau C, Fronhoffs K, Klonowski H, Schulz HU: Active pancreatic digestive enzymes show striking differences in their potential to damage isolated rat pancreatic acinar cells. *J Lab Clin Med* 1995;125:265-275



20. Biro S, Fu YM, Yu ZX, Epstein SE: Inhibitory effects of antisense oligodeoxynucleotides targeting c-myc mRNA on smooth muscle cell proliferation and migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:654-658
21. Sanie AT, Bertrand R: Distinct steps in DNA fragmentation pathway during camptothecin-induced apoptosis involved caspase-, benzyloxycarbonyl- and N-tosyl-L-phenylalanylchloromethyl ketone-sensitive activities. *Cancer Res* 1998;58:3072
22. Skinner MP, Raines EW, Russel R: Dynamic expression of  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 2\beta 1$  integrin receptors by human vascular smooth muscle cells. *American Journal of Pathology* 1994;145:1070-1081
23. Fareh J, Touyz RM, Schiffrin EL, Thibault G: Endothelin-1 and angiotensin II receptors in cells from rat hypertrophied heart. Receptor regulation and intracellular calcium modulation. *Circ Res* 1996;78:302-311
24. Pickering JG, Isner JM, Ford CM, Weir L, Lazarovits A, Rocnik EF, Chow LH: Processing of chimeric antisense oligonucleotides by human vascular smooth muscle cells and human atherosclerotic plaque. Implications for antisense therapy of restenosis after angioplasty. *Circulation* 1996;93:772-780
25. Beltinger C, Saragovi HU, Smith RM, LeSauteur L, Shah N, DeDionisio L, Christensen L, Raible A, Jarett L, Gewirtz AM: Binding, uptake and intracellular trafficking of phosphothioate-modified oligodeoxynucleotides. *J Clin Invest* 1995; 95: 1814-1823.

26. Pitsch RJ, Goodman GRR, Minion DJ, Madura JA, Fox PL, Graham LM: Inhibition of smooth muscle cell proliferation and migration in vitro by antisense oligonucleotide to c-myb. *J Vasc Surg* 1996; 23:783-791.
27. Chang MW, Barr E, Lu MM, Barton K, Leiden JM: Adenovirus-mediated over-expression of the cyclin/cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat carotid artery model of balloon angioplasty. *J Clin Invest* 1995;96:2260-2268
28. Wiederman JG, Marboe C, Amols H, Schwartz A, Weinberger J: Intracoronary irradiation markedly reduces neointimal proliferation after balloon angioplasty in swine : persistent benefit at 6-month follow up. *J Am Coll Cardiol* 1995;25:1451-1456
29. Verin V, Popowski Y, Bochaton-Piallat L, Belenger J, Redard M, Costa M, Neuville P, Celetta G, Gabbiani G, Urban P: Intraarterial beta irradiation reduces medial smooth muscle cell density and induces apoptosis in a hypercholesterolemic rabbit restenosis model. *Circulation (Suppl.)* 1997;96: I-219
30. Waksman R, Robinson KA, Crocker IR, Wang C, Gravanis MB, Cipolla GD, Hillstead RA, King SB: Intracoronary low-dose beta-irradiation inhibits neointima formation after coronary artery balloon injury in the swine restenosis model. *Circulation* 1995;92:3025-3031
31. Fischell TA, Kharma BK, Fischell DR, Loges PG, Coffey CW, Duggan DM, Naftilan AJ: Low-dose, beta-particle emission from "stent" wire results in

complete, localized inhibition of smooth muscle cell proliferation.

*Circulation* 1994;90:2956-2963

32. Gajdusek CM, Tian H, London S, Zhou D, Rasey J, Mayberg MR: Gamma radiation effect on vascular smooth muscle cells in culture. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 1996;36:821-828
33. Hartwell LH, Kastan MB: Cell cycle control and cancer. *Science* 1994;266:1821-1828
34. Katayose D, Wersto R, Cowan K, Seth P: Consequence of p53 gene expression by adenovirus vector on cell cycle arrest and apoptosis in human aortic vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1995;215:446-451
35. Smith RC, Wills KN, Antelman D, Perlman H, Truong LN, Krasinski K, Walsh K: Adenoviral constructs encoding phosphorylation-competent full-length and truncated forms of the human retinoblastoma protein inhibit myocyte proliferation and neointima formation. *Circulation* 1997;96:1899-1905
36. Dynlacht BD: Regulation of transcription by proteins that control the cell cycle. *Nature* 1997;389:149-152
37. MacLellan WR, Majesky MW: Cell cycle regulators in vascular disease. *Circulation* 1997;96:1717-1719
38. Katoh Y, Periasamy M: Growth and differentiation of smooth muscle cells during vascular development. *Trends in Cardiovascular Medicine* 1996;6:100-106.

## Figure legends

*Figure 1:* Stability of  $^{32}\text{P}$ -oligonucleotides in the presence of VSMCs 1 to 7 days post-transfection. The 15-mers internally labeled conserved the  $^{32}\text{P}$  -isotope within the sequence. At a lower level, labeled-oligomers of 14 mers were also detected, corresponding to the ligation of two 7 mers with an internal  $^{32}\text{P}$  within the sequence.

*Figure 2:*(panel A), Uniform localization of FITC-oligonucleotides in transfected VSMCs. Negative control (omission of fluorescent-oligomers) was negligible (data not shown). X20. (panel B), Dosimetry of beta-particle delivery. This illustration represents the dosimetry for 1  $\mu\text{Ci}$  of  $^{32}\text{P}$ -oligonucleotides distributed in 2  $\text{cm}^2$ , when incubated for 1, 3 and 5 days in presence of cell monolayer.

*Figure 3:*Line graph of dose-response effects of beta-irradiation on cell proliferation of human and porcine VSMCs (panel A) and ECs (Human Coronary artery Endothelial Cells) (panel B). Data are expressed in mean  $\pm$  SEM and beta-doses in gray (Gy).

*Figure 4:*VSMC regrowth after  $^{32}\text{P}$ -labeled-oligonucleotide removal. Data were expressed as mean  $\pm$  SEM, \* : $p < 0.05$  when regrowing cells were compared to 5.5 Gy-irradiated cells.

*Figure 5:*Effects of beta-irradiation on cell cycle progression of VSMCs. Representative cell cycle progression (measured on 6,500 cells) of quiescent (panel A), proliferating (panel B), 2 Gy- (panel C) and 30-Gy- (panel D) irradiated cells are illustrated. Treatment of 10 Gy gave similar results.

*Figure 6:* Statistical effect of beta-irradiation on cell cycle distribution of VSMCs. Data are represented as mean  $\pm$  SEM, \*:p<0.01 when proliferating VSMCs compared to quiescent cells,  $\blacklozenge$ :p<0.01 when treated VSMCs compared to proliferating cells.

*Figure 7:* DNA fragmentation after local and external irradiation. VSMCs, ECs and U937 cells were exposed to labeled-oligonucleotides (panel A),  $^{60}\text{Co}$  (panel B) or electron beam (panel C) sources (0, 3, 10 and 30 Gy for lanes 0, 1, 2 and 3 respectively). Intermediate dose (20 Gy) led to similar results. U937 cells were also treated with camptothecin (lane 4, panel A). MW means molecular weight markers.

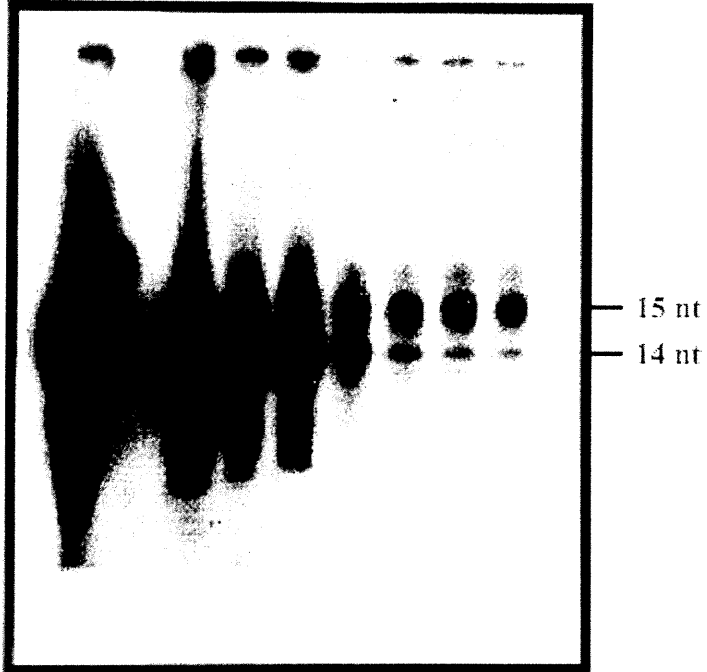
*Figure 8:* Micrographs of morphology features of beta-irradiated cells. VSMCs (panels A, B and C), ECs (panels D, E and F) and U937 cells (panels G, H and I) were exposed to labeled-oligonucleotide (0, 3 and 30 Gy) for 72 hours. For comparison, arrow represents a typical apoptotic cells in panels H and I (<3%), characterized by chromatine condensation within an intact nuclear membrane (arrowhead), whereas normal cells had homogeneous chromatine (n). (X6,000).

*Figure 9:* Immunostaining of  $\alpha$ -actin in beta-irradiated VSMCs (left panel) with 0 (panel A), 0.4 (panel B) and 1 Gy (panel C) during 72 hours. Nuclei were stained with Hoechst assay (corresponding right panels). Panel D represents the superposition of  $\alpha$ -actin and nuclei staining, demonstrating that >95% of irradiated cells were altered (1 Gy). (X40).

**Figure 1**

Incubation time with VSMCs (day)

0 1 2 3 4 5 6 7



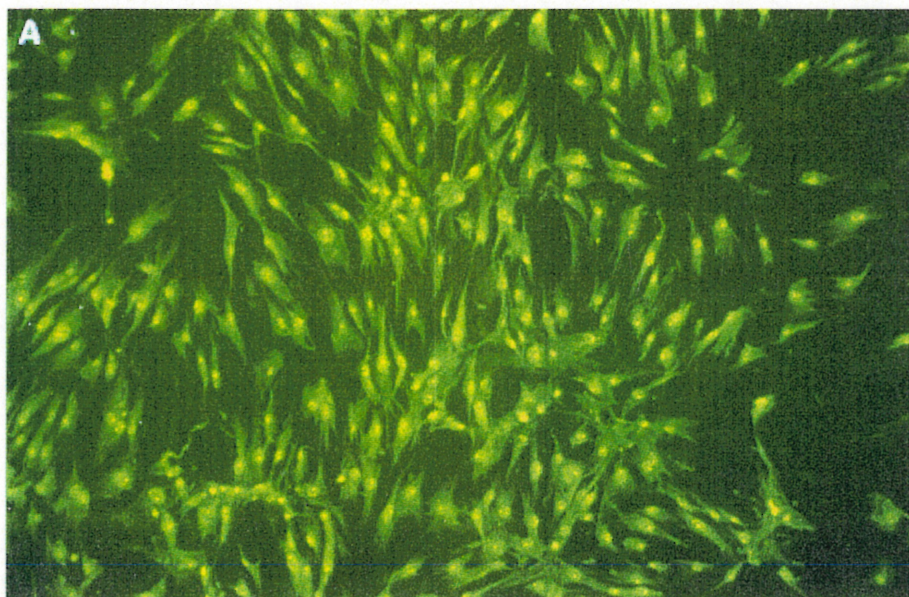
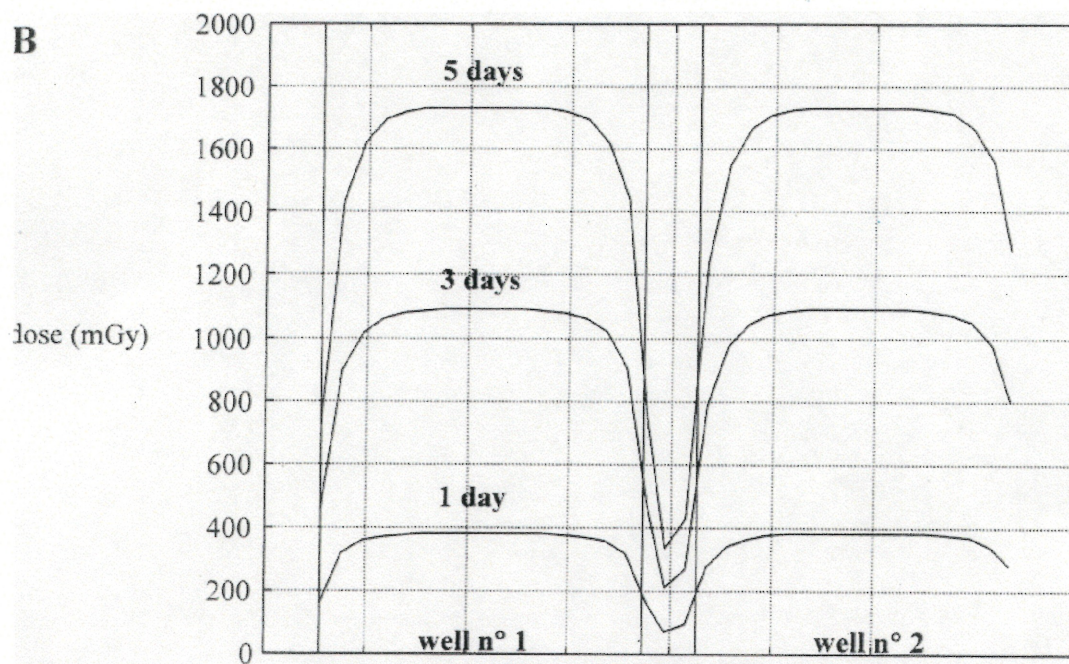
**Figure 2**

Figure 3

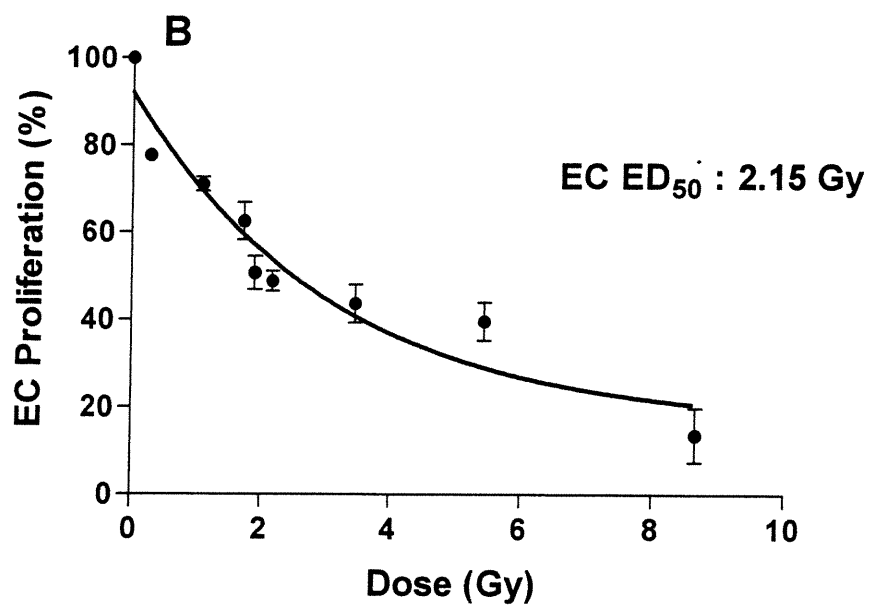
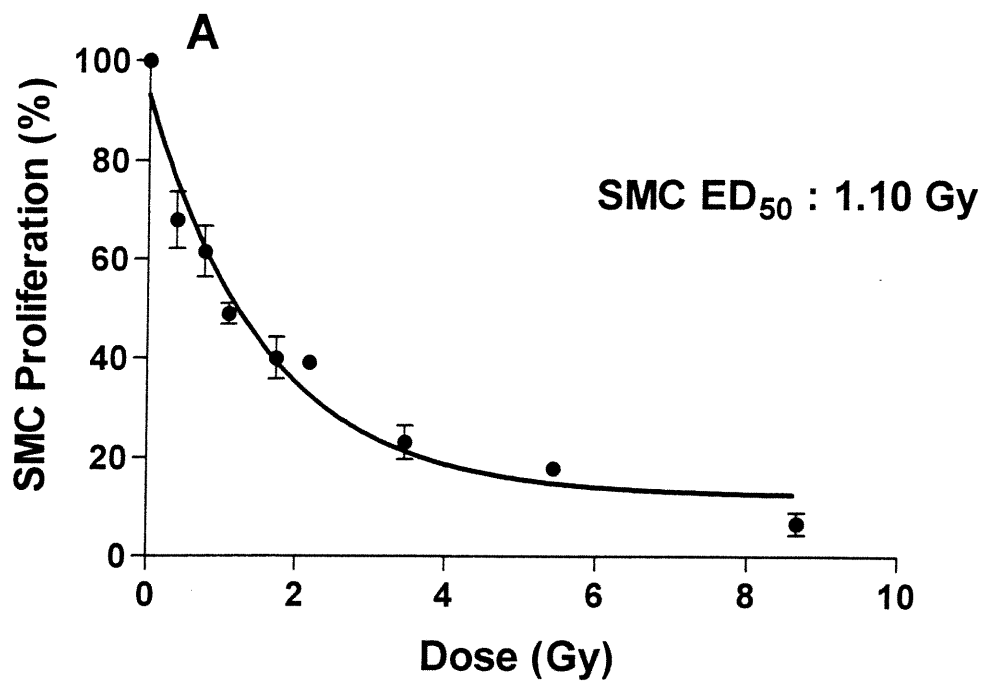




Figure 4

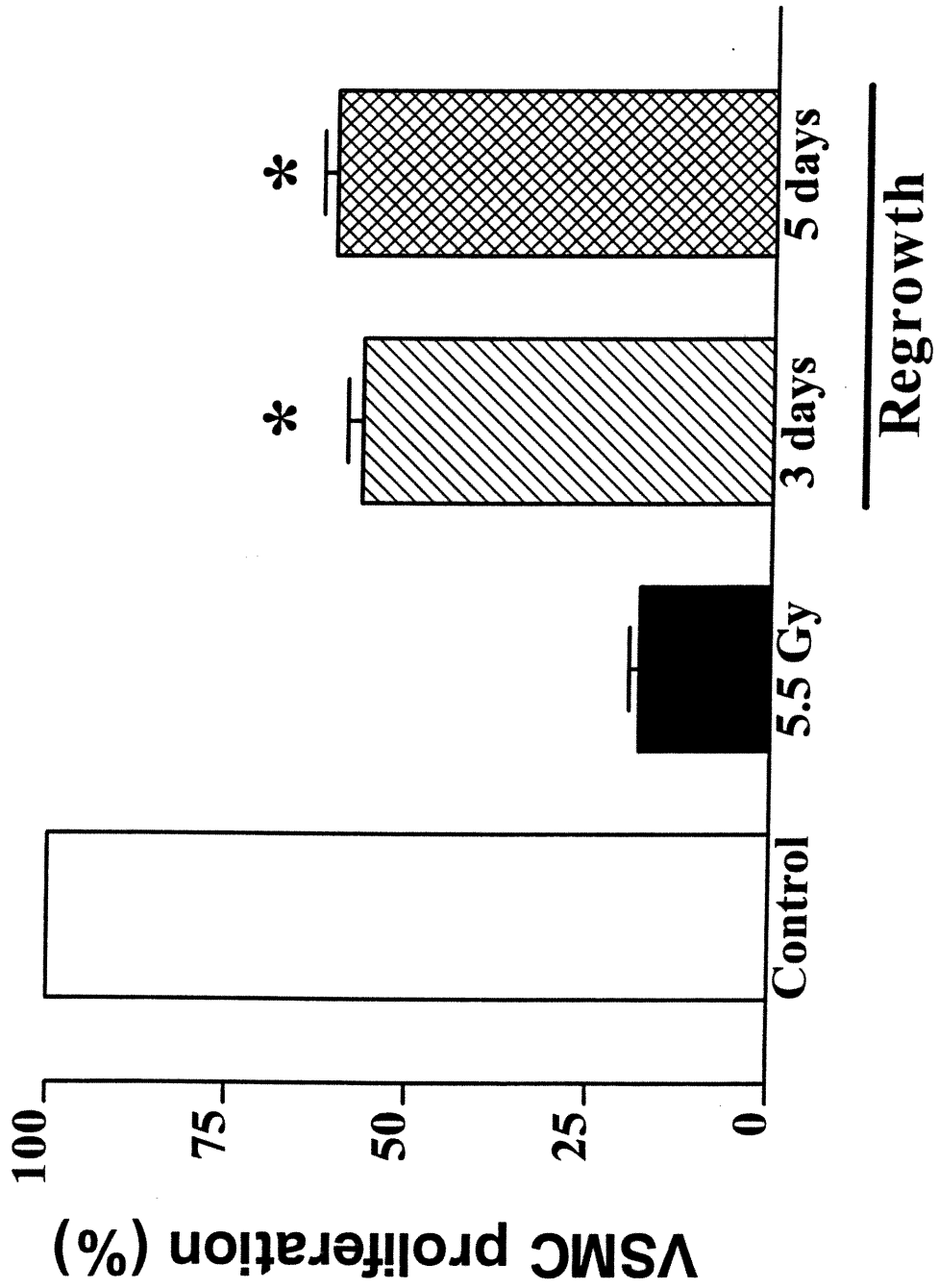


Figure 5

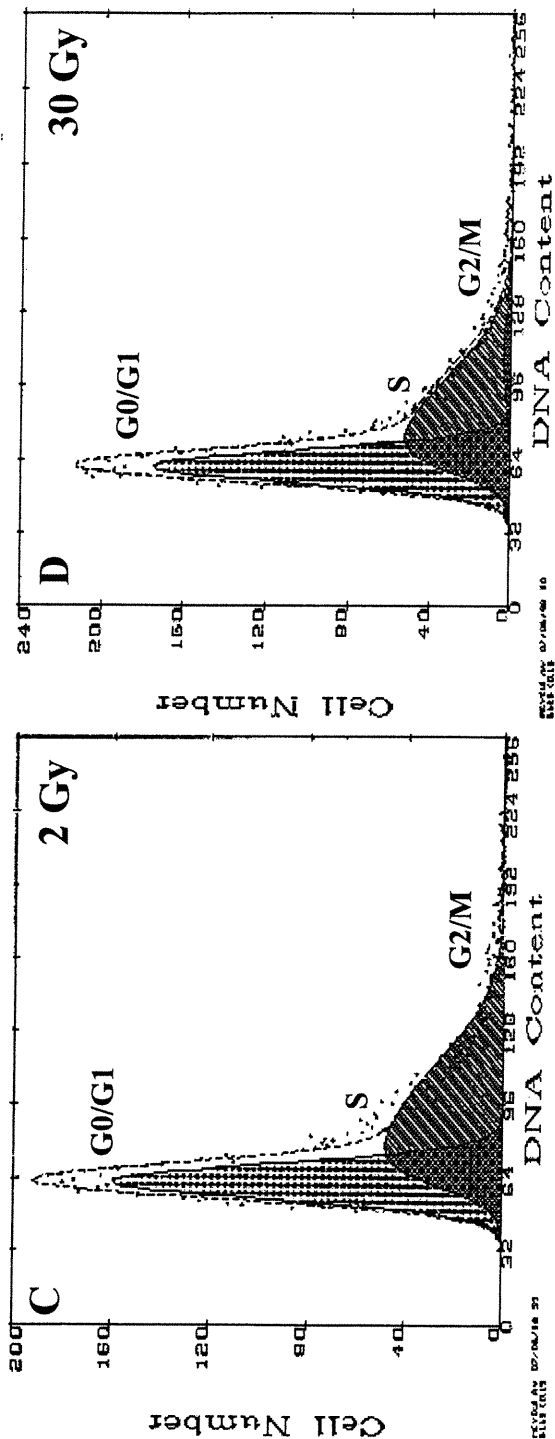
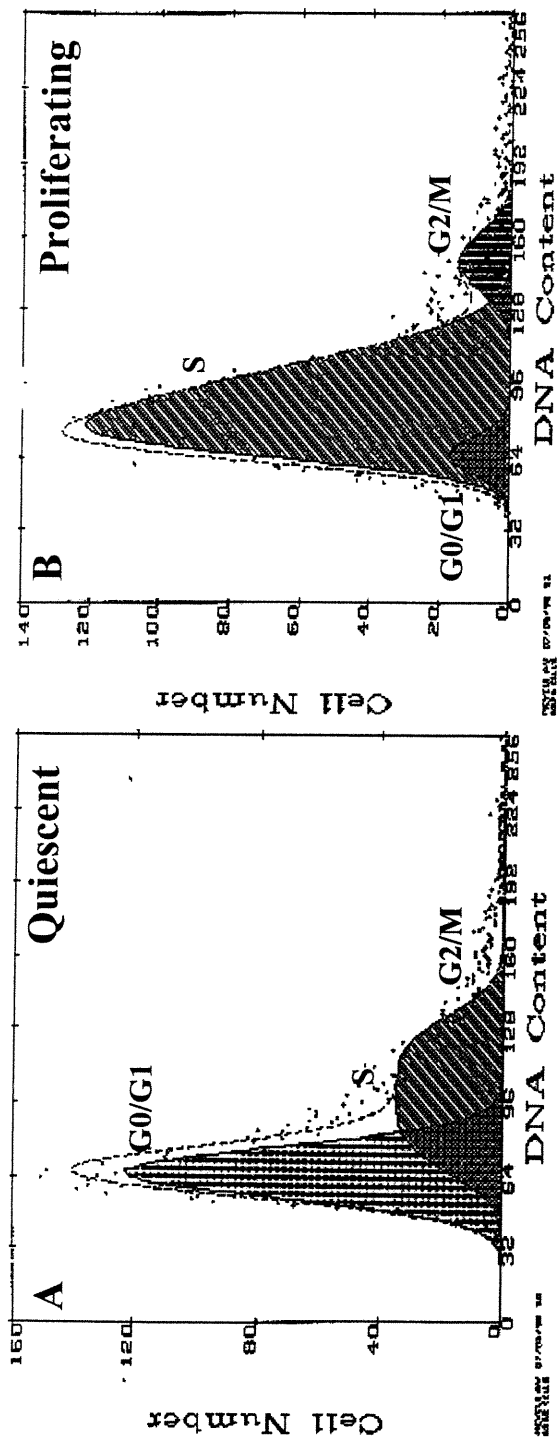


Figure 6

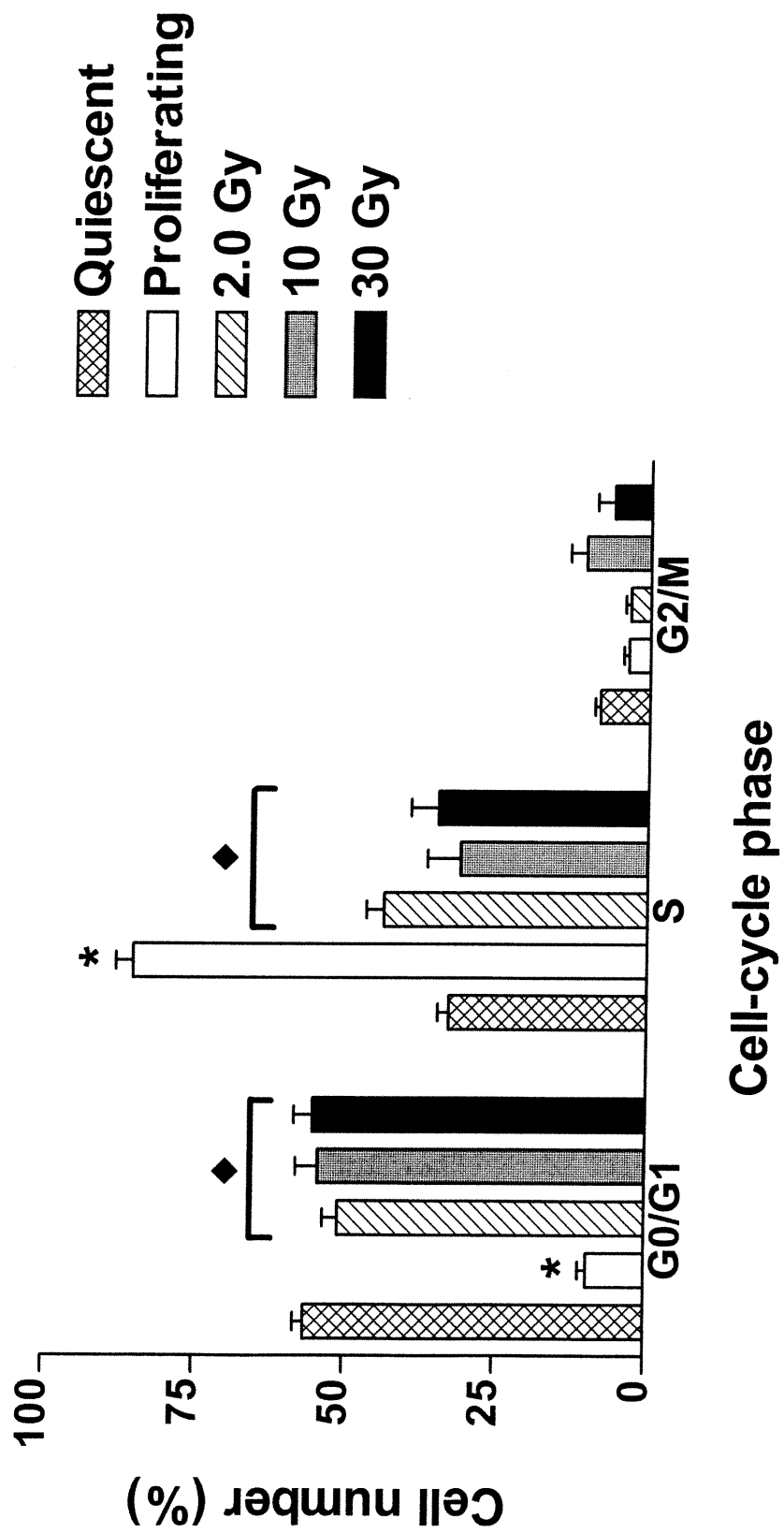
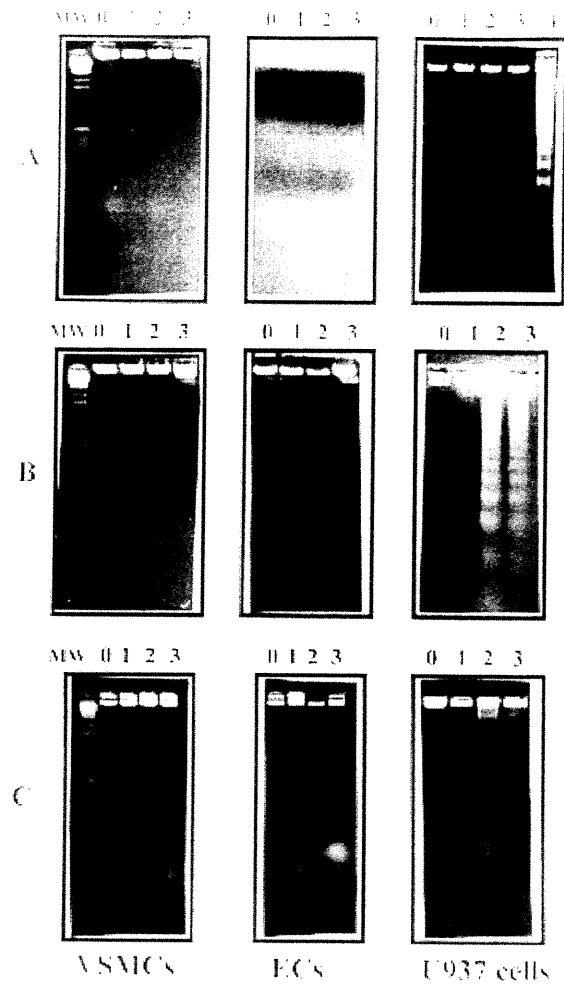


Figure 7



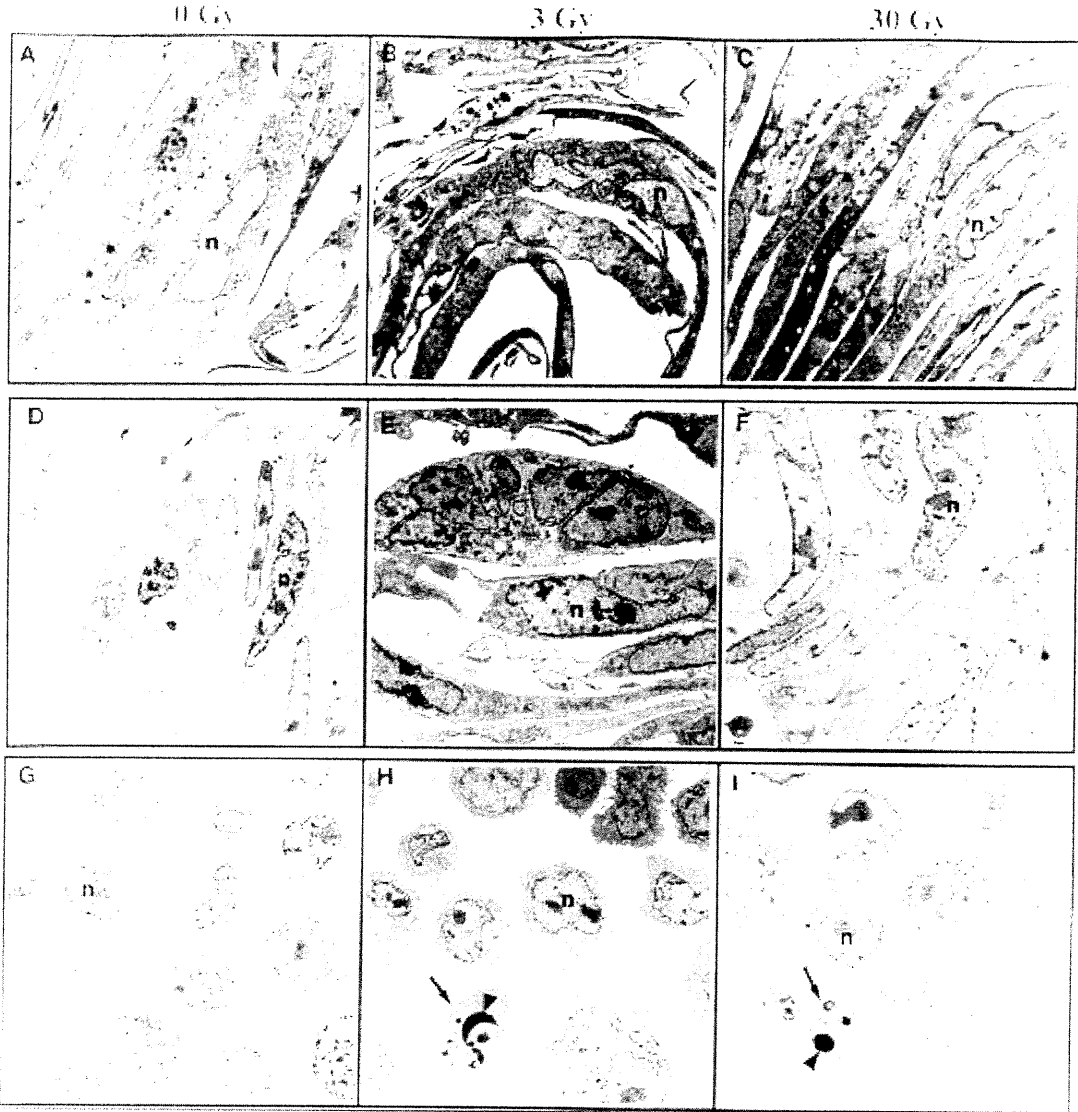
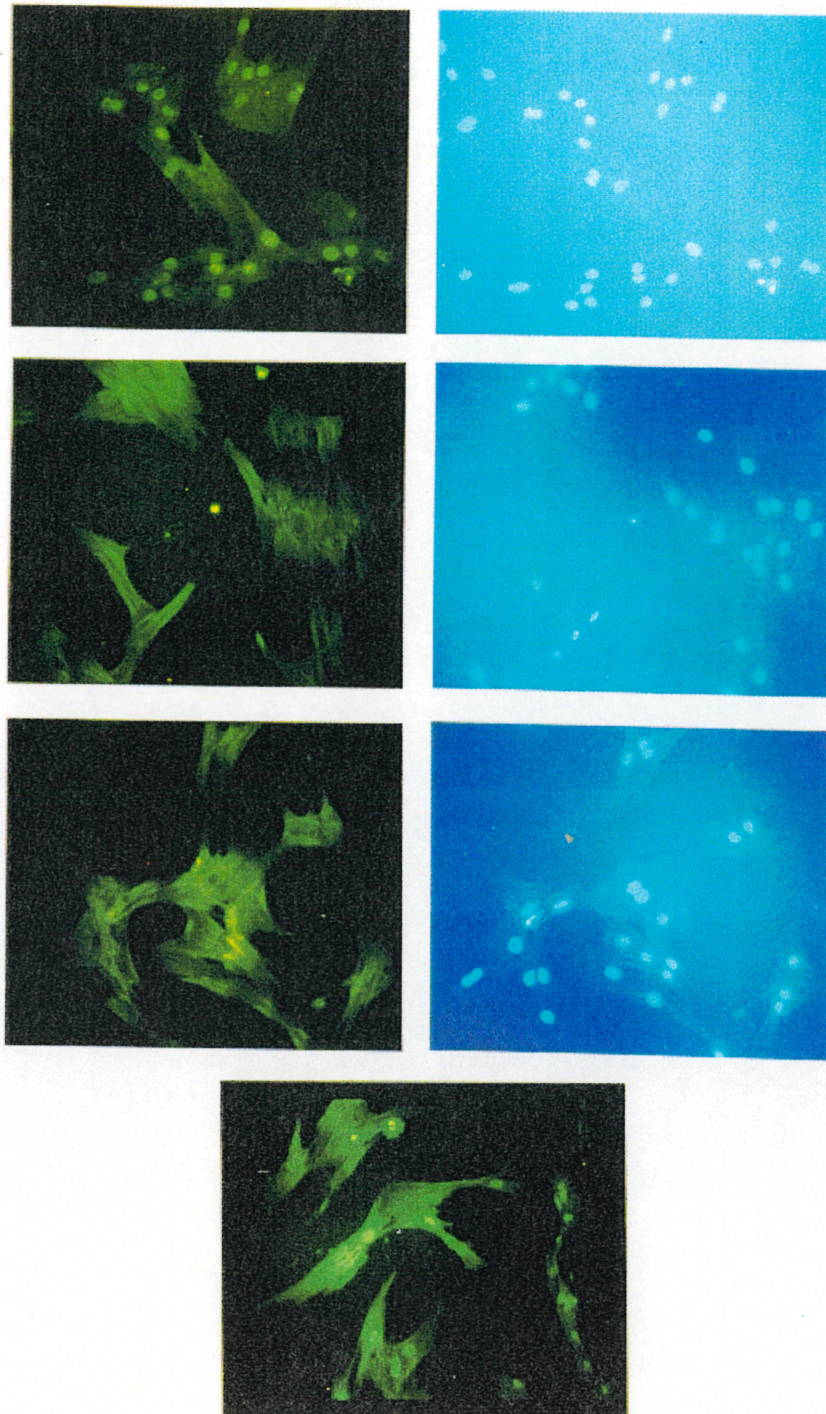


Figure 8

Figure 9



**Chapitre 4 : Effect of Ionizing Radiation on Thymidine uptake,  
Differentiation, and VEGFR2 Receptor Expression in Endothelial  
Cells: The Role of VEGF<sub>165</sub>**

Pouneh Kermani, PhD, Guy Leclerc, MD, Remi Martel, PhD and Jeannette Fareh,  
PhD

*Laboratory of Molecular Cardiology, Louis-Charles Simard Research Center,  
Centre Hospitalier de l'Université de Montréal,  
Montréal Québec, H2L 4M1, Canada.*

*Running title* : Radioprotective Effect of VEGF<sub>165</sub> on endothelial cells  
*Key words* : Cell proliferation – restenosis – gene therapy - beta-particles radiation

*(Manuscrit accepté dans Int J Radiat Oncol Biol Phys 2001. 50: 213-220)*

### **Acknowledgments**

This work was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada. P. Kermani is a recipient of a Research Traineeship from the Heart and Stroke Foundation of Canada. J. Fareh is a recipient of a Research Fellowship from the Heart and Stroke Scientific Research Corporation of Canada and by Merck Frosst Canada Inc. We acknowledge Dr. Bernard Massie (Biotechnology Research Institute/NRC, Montréal, Canada) for providing help for adenovirus production

## **Abstract**

**Purpose:** Late thrombosis of irradiated vascular segments may be the consequence of endothelial cell (EC) dysfunction following radiation therapy. We investigated the effects of beta ionizing radiation on human EC viability, Thymidine uptake and differentiation. **Methods and Materials:** Endothelial cells were exposed to  $^{32}\text{P}$ -labeled-DNA oligonucleotides in incremental doses of 2, 6 and 10 Gy. The modulation of the VEGFR2 receptor expression after irradiation and the overall potential radioprotective effect of VEGF<sub>165</sub> on these functions were assayed. **Results:** A dose dependent inhibitory effect of beta-irradiation on ECs thymidine uptake and differentiation was observed. EC viability, however, was not affected at levels of radiation up to 10 Gy. VEGF<sub>165</sub> proved to have a radioprotective effect as ECs thymidine uptake, following radiation doses of 2, 6 and 10 Gy, was increased by 1.5, 2 and 4 fold respectively, in presence of 10 ng/ml of VEGF<sub>165</sub> ( $p < 0.05$  versus LacZ). This concentration of VEGF<sub>165</sub> also proved beneficial in maintaining cell differentiation at 16 hours post-irradiation when compared to controls. These biological effects were in direct correlation with the upregulation of VEGFR2 receptor expression in irradiated ECs. **Conclusions:** Beta-irradiation disrupts EC functions by significantly reducing their ability to differentiate and proliferate, associated with upregulation of VEGFR2. These effects can be prevented in part by pre-treating cells with VEGF<sub>165</sub>, an effect potentially favored by the upregulation of VEGFR2 receptor protein expression following irradiation.



## Introduction

One of the most potent endothelial mitogenic factor is VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). It plays a role in the physiological and pathological regulation of endothelial cell and blood vessel functions (1-4). VEGF, a heparin-binding protein of 23 kDa subunits, is a key modulator of endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis (5-7). The homodimer is found in five alternatively spliced forms (5) including the 165-amino acid isoform which is the most abundant. *In vitro* as *in vivo*, the potent mitogenic effect of VEGF<sub>165</sub> was reported to be specific to endothelial cells (ECs) (8). This effect is mediated through high affinity receptors fms-like tyrosine kinase Flt-1 or VEGFR1 (9) and Flk-1/KDR or VEGFR2 (10, 11). Both transmembrane receptors autophosphorylate in response to VEGF treatment (10-13).

VEGF<sub>165</sub> expression is upregulated by several environmental signals, such as hypoxia (14-17). Recently, Brogi *et al.*, (18) and Waltenberger *et al.*, (19) demonstrated that hypoxia can also induce a posttranscriptional upregulation of VEGFR2 in ECs. Bauters *et al.*, (20) reported that exogenous administration of VEGF<sub>165</sub> induced angiogenesis specifically in the rabbit ischemic limb. Moreover, the mRNA expression of VEGF<sub>165</sub> and VEGFR2 were upregulated in the lung tissue of rats chronically exposed to hypoxic condition (21). These data suggest that under stressful conditions, such as hypoxia, VEGF<sub>165</sub>-induced angiogenesis seems to be correlated with an upregulation of VEGF receptor expression.

The presence of VEGF receptors in hematopoietic cells, such as monocytes and melanoma cell lines, was also reported (22). During ionizing radiation VEGF was able to suppress apoptotic cell death of normal hematopoietic stem cells and human leukemia cell lines caused by gamma-particle exposure, suggesting a positive effect for VEGF overexpression in hematopoietic cell survival (22).

Radiotherapy prevents restenosis post-angioplasty (23, 24), but little data is available on the effects of ionizing radiation on endothelial cell proliferation and differentiation, nor on the expression of VEGF<sub>165</sub> and its receptors, VEGFR2 and VEGFR1 in these stressful conditions.

The purpose of the present study was to investigate the effects of ionizing radiation (beta-particle exposure) on endothelial cell function, by assessing: 1) endothelial cell viability, thymidine uptake and differentiation and 2) VEGFR2 and VEGFR1 receptor regulation in human ECs exposed to beta-particle radiation. The potential effect of VEGF<sub>165</sub> on thymidine uptake and differentiation was then assessed in irradiated human ECs.

## **Methods and materials**

**Cell Culture.** All experimental protocols were approved by the Institutional Committee for Animal Protection of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. Human Coronary Artery Endothelial Cells (ECs, Clonetics Corporation, San Diego, CA) were grown in MCDB 131 medium (Sigma, St-Louis, MO) supplemented with 10% FBS, 10 ng/ml human recombinant Epidermal Growth

Factor, 1 g/ml hydrocortisone and 12 g/ml Bovine Brain Extract (Clonetics Corporation, San Diego, CA). Human Vascular Smooth Muscle Cells (VSMCs) were harvested from unused specimens of saphenous veins obtained after bypass surgery, following informed consent of patients. VSMCs were grown in DMEM medium supplemented with 20% FBS and cell purity was estimated to be 95%, using SMC-actin immunostaining (Sigma Immunochemicals, St-Louis, MO).

***Cloning of human VEGF<sub>165</sub> in adenovirus.*** A replication deficient recombinant adenovirus based on human adenovirus serotype 5 was used according to previous studies (25). The expression and secretion of VEGF<sub>165</sub> was confirmed by infecting rabbit VSMCs by adenovirus for 2 hours at MOI of 100 at 37°C. Conditioned media of VSMCs transduced with AdCMV.VEGF<sub>165</sub> or AdCMV.LacZ (used as negative control) for 48 hours, were concentrated and purified as previously described (26). Briefly, after 48 hours the supernatants were collected and VEGF<sub>165</sub> protein was purified from the conditioned medium by using the HiTrap Heparin column (Pharmacia, Upsala, Swenden). Total protein extract was subjected to SDS-PAGE (15% polyacrylamide gel) and blotted onto a PVDF membrane (Bio-Rad, Hercules, California). VEGF<sub>165</sub> protein was detected using monoclonal antibodies raised against human VEGF<sub>165</sub> (1 µg/ml) (R&D system, Inc, Minneapolis, MN), followed by a chemiluminescence-based detection method (ECL, Amersham Corp.).

***Cell thymidine uptake assay of ECs and VSMCs in presence of VEGF or LacZ extracts.*** Biological activity of VEGF<sub>165</sub> derived from recombinant-adenovirus was assayed by thymidine incorporation assay as previously described (27). Human

ECs or VSMCs ( $1.5 \times 10^4$  cells) were seeded in 24 well plates in presence of 10% FBS for 24 hours and then synchronized by serum-deprivation for 48 hours. Quiescent cells were stimulated with 1 or 10 ng/ml of VEGF or LacZ extracts, in serum free medium. After 24 hours, [ $^3\text{H}$ ]-thymidine was added to the medium and cells were treated as previously described (28). Thymidine uptake assay was performed in quadruplicates with 4 to 5 different cell preparations.

***Ionizing radiation exposure and thymidine uptake.*** For the irradiation conditions, we used  $^{32}\text{P}$ -labeled-DNA oligonucleotides corresponding to beta-particles exposure as previously described (27). To assess the direct dose-response effect of beta irradiation on ECs proliferation, cells were incubated with  $^{32}\text{P}$ -labeled-oligonucleotides for 48 hours resulting to an exposure of 2, 6 and 10 Gy. To assess the effect of VEGF<sub>165</sub> under radiation exposure, quiescent endothelial cells were incubated during 48 hours, in the presence of increasing activities of  $^{32}\text{P}$ -labeled-oligonucleotides corresponding to increased doses of 2, 6 and 10 Gy (27). To that incubation, 1 and 10 ng/ml of VEGF<sub>165</sub> or LacZ extracts were added. Control non-irradiated cells received equal concentrations of unlabeled-oligonucleotides (27). The level of endothelial cell thymidine uptake was determined as previously described (27). Thymidine incorporation was expressed as percentage for condition without VEGF treatment and as fold-increase of the effect of VEGF<sub>165</sub> compared to the effect of LacZ. Thymidine uptake assay was performed in quadruplicates in 4 series of experiments.

***Determination of cell viability following beta-irradiation.*** Cell viability was assessed by the trypan blue staining (Gibco-BRL)(29). ECs were exposed to 2, 6

or 10 Gy of  $^{32}\text{P}$ -labeled oligonucleotides in serum free media for 48 hours. Cells in presence of 10% FBS without irradiation were used as positive control. Cell viability assay was performed in quadruplicates on 4 separate cell preparations of ECs and expressed as a percent viable cell of total cell counts.

***In vitro endothelial cell differentiation.*** Endothelial cell differentiation was assessed on a Matrigel system as previously described (30). Matrigel, serves as an *in vitro* attachment matrix, which promotes cell differentiation in normal and transformed anchorage dependent cells. ECs were seeded at  $5 \times 10^5$  cells/ $6 \text{ cm}^2$  and grown for 24 hours in serum-free medium. For irradiation experiments, cells were stimulated with a maximal dose of 10 Gy for 16, 24 or 48 hours. Matrigel-coated plates (Becton Dickinson labware, Bedford, MA) were thawed overnight at  $4^\circ\text{C}$  and then incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 30 minutes. Irradiated cells were plated on the dishes in the presence of 10 ng/ml of either VEGF<sub>165</sub> or LacZ extracts. After 16, 24 or 48 hours cells were examined to evaluate the formation of capillary-like network by phase contrast microscopy.

***RT-PCR.*** PCR was performed with primers to VEGFR2 (31) and using GAPDH as a internal standard control. Total RNA was isolated after the indicated times (32). RNA, 1  $\mu\text{g}$ , was reverse-transcribed and cDNA produced using M-MuLV reverse transcriptase (GibcoBRL) and synthetic oligo (dT) primers for 1 hour at  $37^\circ\text{C}$ . PCR was performed with cDNAs in the presence of 500 ng/ml of each primer in a total volume of 100  $\mu\text{l}$ . Following a hot-start ( $94^\circ\text{C}$ , 5 minutes), the amplification program used was as follow: 1 min at  $94^\circ\text{C}$  ; 1 min at  $50^\circ\text{C}$  ; 2 min at

72°C , for a total of 25 cycles. The amplification products were separated on 1.5% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

***Analysis of receptor protein expression.*** Subconfluent ECs were cultured in serum free medium and exposed to doses of 2, 6 and 10 Gy of <sup>32</sup>P-labeled oligonucleotides for 16, 24 or 48 hours. Cells were washed 2 times in PBS containing 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and then treated with cell lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 25 mM NaF, 5 mM Sodium pyrophosphate, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% Triton-X-100, 1% NP-40, 0.25% Sodium deoxycholate containing freshly added protease inhibitors (1 mM PMSF, 0.15 Units/ml aprotinin and 10 mg/ml leupeptin)). Total cell lysates (500 µg) were immunoprecipitated with a polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA) raised against a peptide mapped to the carboxy terminus of mouse Flk-1 (C-1158, amino acids 1158-1345) or Flt-1 (C-17). The supernatants were precleared overnight at 4°C using 20 µl of protein A/G plus Agarose (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA) according to manufacturer instructions. Immunoprecipitates were reduced with 2-mercaptoethanol and run in a SDS-PAGE (7.5% polyacrylamide gel) and blotted onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA). Flk-1 protein was detected with the polyclonal antibody F-7 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA) and Flt-1 with polyclonal antibody C-17 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA). Immunoreactive bands were detected with a peroxidase-conjugated secondary antibody and the ECL chemiluminescence detection system (Amersham Corp.). Bands on films were quantitated by scanning with an LKB Ultrascan densitometer.

**Statistical analysis.** The results are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean. Comparison between control and irradiated conditions as well as VEGF exposure was evaluated by two-way analysis (ANOVA), with Tukey test. A  $p < 0.05$  was taken to indicate statistical significance.

## Results

### ***VEGF overexpression and its biological activity in adenovirus infected VSMCs.***

VSMCs infected with AdCMV.VEGF<sub>165</sub> overexpressed and secreted the VEGF<sub>165</sub> protein, as evaluated by western blot analysis (Fig 1). In contrast, no VEGF<sub>165</sub> was found in the conditioned medium of AdCMV.LacZ transduced cells. We used clone 1 for the western blot analysis and the same clone has been used for all the biological studies. To demonstrate the biological activity of VEGF<sub>165</sub> expressed following VSMC infection, we determined the mitogenic effect of VEGF<sub>165</sub> on ECs. The effect of VEGF<sub>165</sub> on cell thymidine uptake is presented as fold increase of the effect of LacZ or cytokine free conditions. The results showed that VEGF<sub>165</sub> purified from supernatants of VSMCs virally transduced induced 2.1 and 2.6 fold-increases in thymidine uptake in ECs at 1 and 10 ng/ml respectively, in normal conditions compared to basal activity induced by conditioned medium AdCMV.LacZ infected cells ( $p < 0.05$ ).

***Mitogenic effect of VEGF<sub>165</sub> in beta- irradiated ECs and VSMCs.*** In the absence of VEGF<sub>165</sub> EC proliferation was significantly reduced by  $50 \pm 2\%$ ,  $40 \pm 3.4\%$  and  $13 \pm 6\%$  when exposed to 2, 6 and 10 Gy, respectively. In presence of VEGF<sub>165</sub> (10

ng/mL) and ionizing radiation, endothelial cell thymidine uptake was enhanced by 1.5-, 2- and 4-fold for 2, 6 and 10 Gy respectively, when compared to conditions without growth factors (*i.e.* Lac Z,  $p < 0.05$ ) (Fig 2). To evaluate the specificity of VEGF<sub>165</sub> to human endothelial cells, we treated human VSMCs in the same manner than ECs. VEGF<sub>165</sub> did not modify ( $P = NS$ ) the thymidine uptake rate of irradiated VSMCs, underlying the specific mitogenic effect of VEGF<sub>165</sub> to ECs (data not shown), as previously reported in normal conditions without irradiation (8).

***Endothelial cell viability in beta-irradiation condition.*** The EC viability was maintained to an average of 94.1% after beta-irradiation (2, 6 and 10 Gy), which was statistically similar to control ECs (96.1%) ( $P = NS$ ). These results suggest that exposure to beta particles does not seem to be lethal for human ECs at doses up to 10 Gy.

***Endothelial cell differentiation during beta-irradiation.*** Based on photomicrograph observations, beta-irradiated ECs (10 Gy) were characterized as having reduced differentiation suggested by lower number of capillary-like networks on three dimensional matrigel; this reduction is observed after 16, 24 and 48 hours of ECs treatment when compared to non-irradiated cells. Addition of 10 ng/ml of VEGF<sub>165</sub> extracts reversed the inhibition of cell differentiation at 16 hours after irradiation. This positive effect of VEGF<sub>165</sub> extract was maintained at 24 hours but decreased by 48 hours, when compared with LacZ-extract treated cells. The level of differentiation of irradiated ECs in the presence of 10% FBS was similar to VEGF extract condition in serum free conditions (Fig 3). These results



suggest that VEGF<sub>165</sub> at 10 ng/ml reduces the inhibiting effect of beta radiation on human EC differentiation by 16 hours, but this effect progressively decreases with time thereafter. The photomicrographs are representative of 4 series of experiments.

***Effect of beta-irradiation on VEGF receptor expression.*** We observed a significant upregulation of VEGFR2 gene and protein expression in ECs following ionizing beta-irradiation ( $p < 0.05$ ). Subconfluent ECs were incubated for 16, 24 and 48 hours at 2, 6 and 10 Gy to assess VEGFR2 mRNA level by semiquantitative RT-PCR. RT-PCR revealed a time and dose dependant increase in VEGFR2 mRNA in ECs treated with 10 Gy with a maximal 2-fold increase at 16 to 24 hours (Fig 4A, B). As a positive control, we used 10 ng/ml of bFGF resulting in a 1.5-fold to 2-fold increase in VEGFR2 mRNA level as compared with untreated cells, as previously described (33). The effect of ionizing radiation on VEGFR2 expression was further investigated at the level of protein expression. Mature receptors migrate in SDS-PAGE corresponding to a molecular size of 205 kDa, whereas the precursors migrate slightly lower, at less than 200 kDa (19). The upregulation was dose and time-dependent. At 10 Gy, the upregulation of VEGFR2 receptor was detected at 16 hours of irradiation with a maximum expression at 16 to 24 hours and decreased at 48 hours when compared to controls (Fig 5A, B). In contrast, the VEGFR2 protein or RNA expression was unaffected in ECs in the presence of 2 and 6 Gy (data not shown). Evaluation of VEGFR1 protein expression revealed that beta radiation did not modify the level of that

receptor expression at 2, 6 and 10 Gy (data not shown). The mRNA data are in accordance with the protein level detected by western blot (Fig 5A).

## Discussion

Although prevention of restenosis *via* endovascular radiotherapy is well developed and has reached the clinical trial arena, limited data are available on the effect of ionizing radiation on endothelial cell function. In this study, we demonstrate, for the first time, the inhibitory effect of beta-irradiation on human endothelial cell thymidine uptake and differentiation, with a specific upregulation of VEGFR2 receptor expression. Moreover, VEGF<sub>165</sub> promoted EC thymidine uptake and differentiation under radiation exposure, suggesting a potential radioprotective role for VEGF.

Recently, our laboratory demonstrated that beta-irradiation inhibited endothelial cell thymidine uptake in a dose-dependent manner (0.4 to 10 Gy), characterized by a dose inducing 50% of inhibition (ED<sub>50</sub>) at 2 Gy and a maximal inhibitory effect at 10 Gy (27). In these conditions, beta-irradiation induced G1-arrest without any sign of cytotoxicity or apoptosis in vascular cells. We limited our maximum exposure to 10 Gy since a plateau was observed (27). It is important to mention that we previously demonstrated that EC were more radioresistant than VSMC (27). The present study focused mainly on the effects of irradiation on endothelial thymidine uptake, differentiation, viability and the regulation of VEGFR2 expression. In human endothelial cells, both cell thymidine uptake and

differentiation were inhibited under beta-irradiation exposure. Interestingly, in presence of VEGF<sub>165</sub>, both the irradiated EC thymidine uptake and differentiation were significantly improved in a dose-dependent manner. In our study we chose the range of concentration of 1 and 10 ng/ml of VEGF<sub>165</sub> based on other investigations (34). We reported that the positive impact of VEGF<sub>165</sub> appears to be dose related, up to 10 Gy.

The effect of irradiation on the release of growth factors from human endothelial cells was previously demonstrated (35-37). The protective role of basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) to reduce apoptotic DNA degradation in endothelial cells exposed to radiation *in vitro* has been demonstrated (36, 37). Our data demonstrates the positive impact of VEGF<sub>165</sub> on radiation-induced endothelial cell growth arrest.

To examine whether the positive impact effect of VEGF is mediated by its receptors expressed in endothelial cells, the expression regulation of VEGFR2 and VEGFR1 were investigated in beta-irradiated endothelial cells. We found that the level of VEGFR2 mRNA and protein expression was increased in a time- and dose-dependant manner with maximum expression at 16 hours, for a dose of 10 Gy. Waltenberger *et al.*, (19) and Brogi *et al.*, (18) recently reported that hypoxia upregulated VEGFR2 protein expression in a time dependant manner, whereas the level of mRNA remained unaffected. Unlike hypoxia, other investigators have reported that bFGF increased both the mRNA and protein expression level of VEGFR2 in bovine microvascular endothelial, aortic endothelial and transformed fetal aortic endothelial cells (33). However, whether the increase in VEGFR2

transcripts in irradiated ECs is due to a higher transcription rate or to an increase in VEGFR2 mRNA stability remains to be elucidated. Thus, the increase in endothelial cell thymidine uptake by VEGF<sub>165</sub> in ionizing conditions may be explained, at least in part, by the upregulation of VEGFR2 receptor in these conditions. Our observations suggest that VEGF<sub>165</sub>, via the upregulation of VEGFR2 receptor expression may play an important role in endothelial cell proliferation in stressful conditions such as ionizing radiation; those physical conditions seem to be comparable to hypoxia (18, 19).

In conclusion, we demonstrate the inhibitory effect of beta-irradiation on human endothelial cell thymidine uptake and differentiation, correlated with an upregulation of VEGFR2 receptor expression. We also reported, for the first time, the improvement of thymidine uptake and differentiation of irradiated endothelial cells by VEGF<sub>165</sub> in a dose and time dependent manners. The radiation-induced upregulation of VEGFR2 expression in endothelial cells seems to be important in the survival of radiation-damaged endothelium and regulation of reendothelization in blood vessels *in vivo*. These observations may lead to a better understanding of endothelial function in endovascular radiotherapy treatment.

## References

1. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, *et al.* Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983-985.
2. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, *et al.* Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 1989;84:1470-1478.
3. Kim KJ, Li B, Winer J, *et al.* Inhibition of vascular endothelial growth factor induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature* 1993;362:841-844.
4. Breier G, Albrecht U, Sterrer S, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 1992;114:521-532.
5. Ferrara N, and Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:851-858.
6. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, *et al.* Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306-1309.
7. Ploüet J, Schilling J, Gospodarowicz D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogene produced by AtT-20 cells. *Embo J* 1989;8: 3801-3806.

8. Olander JV, Connolly DT, DeLarco JE. Specific binding of vascular permeability factor to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;175:68-76.
9. DeVries C, Escobed, JA, Ueno H, *et al.* The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992;255:989-991.
10. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, *et al.* Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial growth factor. *Biochem. Biophys Res Commun* 1992;187:1579-1586.
11. Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, *et al.* High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993;72:835-846.
12. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, *et al.* Different signal transduction properties of KDR and Flt-1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994;269:26988-26995.
13. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, *et al.* Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995;376:62-66.
14. Hashimoto E, Ogita T, Nakaoka T, *et al.* Rapid induction of vascular endothelial growth factor by transient ischemia in rat heart (abstr.) *Am J Physiol* 1994;267:H1948-H1954.

15. Banai S, Shweiki D, Pinson A, *et al.* Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia : implications for coronary angiogenesis. *Cardiovasc Res* 1994;28:1176-1179.
16. Brogi E, Wu T, Namiki A, *et al.* Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* 1994;90:649-652.
17. Iizuki M, Yamauchi M, Ando K, *et al.* Quantitative RT-PCR assay detecting the transcriptional induction of vascular endothelial growth factor under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;205:1474-1480.
18. Brogi E, Schatteman G, Wu T, *et al.* Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression. *J Clin Invest* 1996; 97:469-476.
19. Waltenberger J, Mayr U, Pentz S, *et al.* Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia. *Circulation* 1996;94:1647-1654.
20. Bauters C, Asahara T, Zheng L, *et al.* Site specific therapeutic angiogenesis following systemic administration of vascular endothelial growth factor. *J Vasc Surg* 1995;21:314-325.
21. Tuder RM, Flook BE, Voelkel NF. Increased gene expression of VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk-1 and Flt-1 in lung exposed to acute or chronic hypoxia. *J Clin Invest* 1995;95:1798-1807.
22. Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, *et al.* Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene KDR, in hematopoietic

- cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res* 1995;55:5687-5692.
23. Verin V, Urban P, Popowski Y, *et al.* Feasibility of intracoronary  $\beta$ -irradiation to reduce restenosis after balloon angioplasty. *Circulation* 1997;95:1138-1144.
24. Serruys PW, Levendag PC. Intracoronary brachytherapy: the death knell of restenosis or just another episode of a never-ending story. *Circulation* 1997;96:709-712.
25. Maeda H, Danel C, Crystal RG. Adenovirus-mediated transfer of human lipase complementary DNA to the gallbladder. *Gastroenterology* 1994;106:1638-1644.
26. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, *et al.* Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 1992;267:26031-26037.
27. Fareh J, Martel R, Kermani P, *et al.* Cellular effects of  $\beta$ -particle delivery on vascular smooth muscle cells and endothelial cells: a dose-response study. *Circulation* 1999;99:1477-1484.
28. Biro S, Fu YM, Yu ZX, *et al.* Inhibitory effects of antisense oligodeoxynucleotides targeting *c-myc* mRNA on smooth muscle cell proliferation and migration. *Proc Natl Aca Sci USA* 1993;90:654-658.



29. Niedereau C, Fronhoffs K, Klonowski H, *et al.* Active pancreatic digestive enzymes show striking differences in their potential to damage isolated rat pancreatic acinar cells. *J Lab Clin Med* 1995;125:265-275.
30. Riccioni T, Cirielli C, Wang X, *et al.* Adenovirus-mediated wild-type p53 overexpression inhibits endothelial cell differentiation in vitro and angiogenesis *in vivo*. *Gene therapy* 1998;5:747-754.
31. Maier JAM, Voulalas P, Roeder D, *et al.* Extension of the life-span of human endothelial cells by an interleukin-1 alpha antisense oligomer. *Science* 1990;249:1570-1574.
32. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor (NY) 1982.
33. Pepper MS, Mandriota SJ. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1) expression in vascular endothelial cells. *Exp Cell Res* 1998;241:414-425.
34. Van Belle E, Witzenbichler B, Chen D, *et al.* Potentiated angiogenic effect of scatter factor/hepatocyte growth factor via induction of vascular endothelial growth factor, the case for paracrine amplification of angiogenesis. *Circulation* 1998;97:381-390.
35. Witte L, Fuks Z, Haimovitz-Friedman A, *et al.* Effects of irradiation on the release of growth factors from cultured bovine, porcine and human endothelial cells. *Cancer Res* 1989;49:5066-5072.

36. Haimovitz-Friedman A, Vlodavsky I, Chaudhuri A, *et al.* Autocrine effects of Fibroblast growth factor in repair of radiation damage in endothelial cells. *Cancer Res* 1991;51:2552-2558.
37. Fuks Z, Persaud RS, Alfieri A, *et al.* Basic Fibroblast Growth Factor protects endothelial cells against radiation induced programmed cell death in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1994;54:2582-2590.

## Figure Legends

**Figure 1: Expression of VEGF<sub>165</sub> protein.** A: Viral plaques were isolated and screened for expression of VEGF<sub>165</sub> by PCR reaction. The positive control corresponds to PCA14 containing VEGF<sub>165</sub> gene used for homologous recombination in 293 cells. Lanes 1 to 10 correspond to 10 clones of AdCMVVEGF<sub>165</sub>. B: The overexpression and secretion of VEGF<sub>165</sub> was confirmed by Western blot. An equal amount of total protein extract from infected cells was subjected to 15% polyacrylamide gel. Lane 1, total protein extract from supernatant of VSMCs infected with AdCMVLacZ and lane 2, total protein extract from supernatant of VSMCs infected with AdCMVVEGF<sub>165</sub>. MW: Molecular Weight

**Figure 2: Effect of VEGF<sub>165</sub> on endothelial cell thymidine uptake under beta irradiation condition.** The endothelial cell thymidine uptake was assessed in the presence of increasing amounts of <sup>32</sup>P-labeled oligonucleotides corresponding to increased doses of 2, 6 and 10 Gy and 1 and 10 ng/ml of VEGF<sub>165</sub> or LacZ extract, quantified by Bio-Rad assay. The endothelial cell thymidine uptake was expressed as fold increase of the effect of VEGF<sub>165</sub> compared to the effect of LacZ. Data are means ± SEM.

**Figure 3: Endothelial cell differentiation during beta-irradiation.** Endothelial cell differentiation was assessed on matrigel in the presence of 10 Gy and 10 ng/ml of VEGF<sub>165</sub> or LacZ extracts alone for 16, 24 or 48 hours and examined for formation of capillary-like network by phase contrast microscopy. 0% FBS medium was used as negative control and 10% FBS medium as positive control. The basal condition (non irradiated cells) was same for different period of time (16 to 48 hours).

**Figure 4: Effect of beta-irradiation on VEGFR2 gene expression.** A: Subconfluent endothelial cells were cultured in 0% FBS medium in presence of doses of 2, 6 and 10 Gy of <sup>32</sup>-P oligonucleotides for 16, 24 and 48 hours. Lanes 1 to 3 correspond to non-irradiated cells and 4 to 6 to irradiated cells. BFGF was used as positive control and GAPDH as an internal standard control. B: Histograms showing the optical densities of VEGFR2 cDNA fragment (320 bp) as a function of time by densitometry in presence of 10 Gy dose. Data shown reflect the means  $\pm$  SEM of four independent experiments.

**Figure 5: Beta-irradiation-induced up-regulation of VEGFR2 protein is time-dependent.** Confluent endothelial cells were exposed to a dose of 10 Gy for 16, 24 and 48 hours at 37°C. An equal amount of protein from each sample (500  $\mu$ g of immunoprecipitation of lysates) was separated on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. A: Western blot showing time-dependent increase in VEGFR2

proteins. Lanes 1 and 4, 16 hours; Lanes 2 and 5, 24 hours and lanes 3 and 6, 48 hours. B: Histograms showing the optical densities of VEGFR2 bands at 210, 180 and 150 kDa by densitometry in presence of 10 Gy dose. Data shown reflect the means  $\pm$  SEM of four independent experiments.

Figure 1

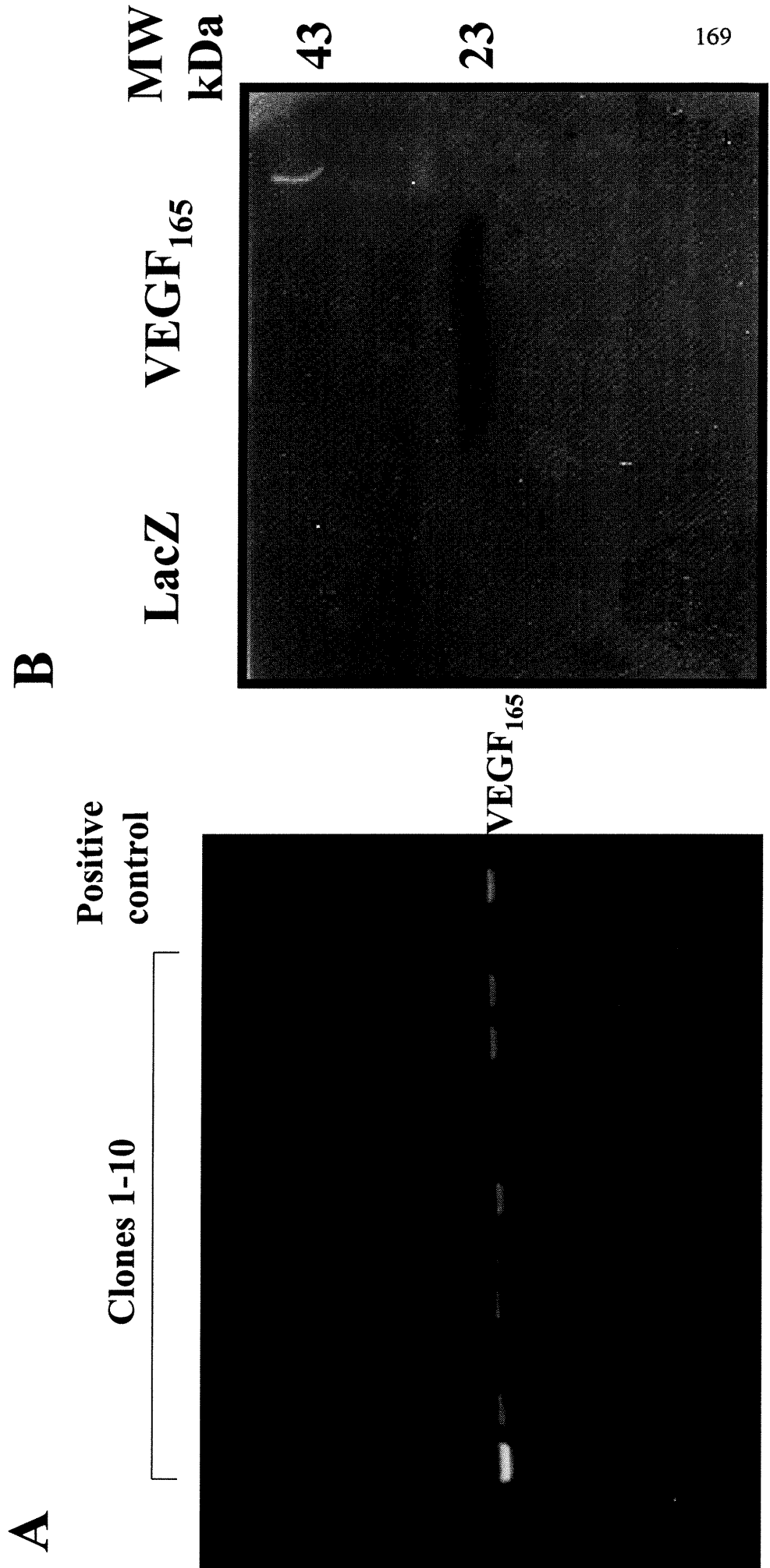


Figure 2

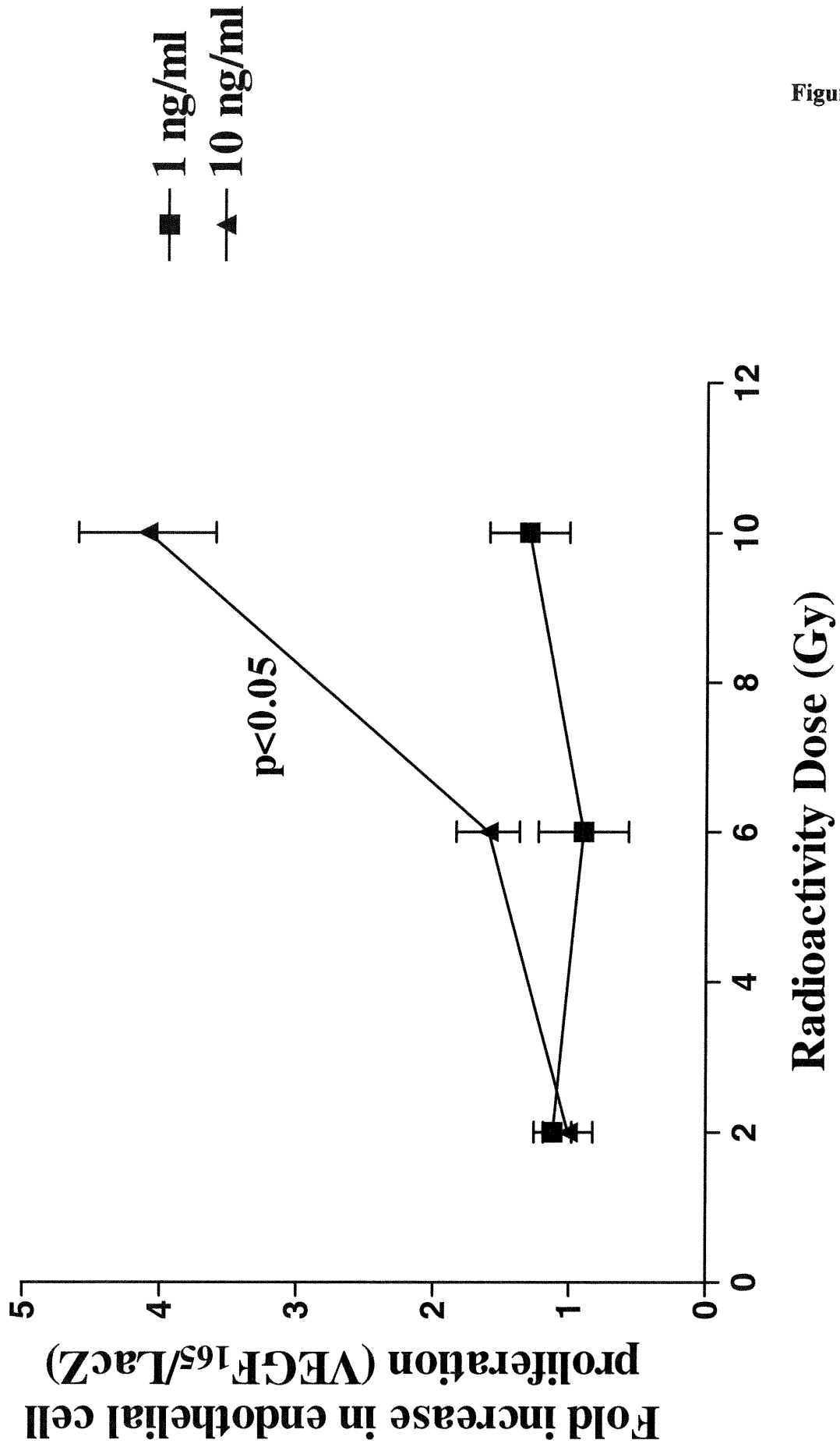


Figure 3

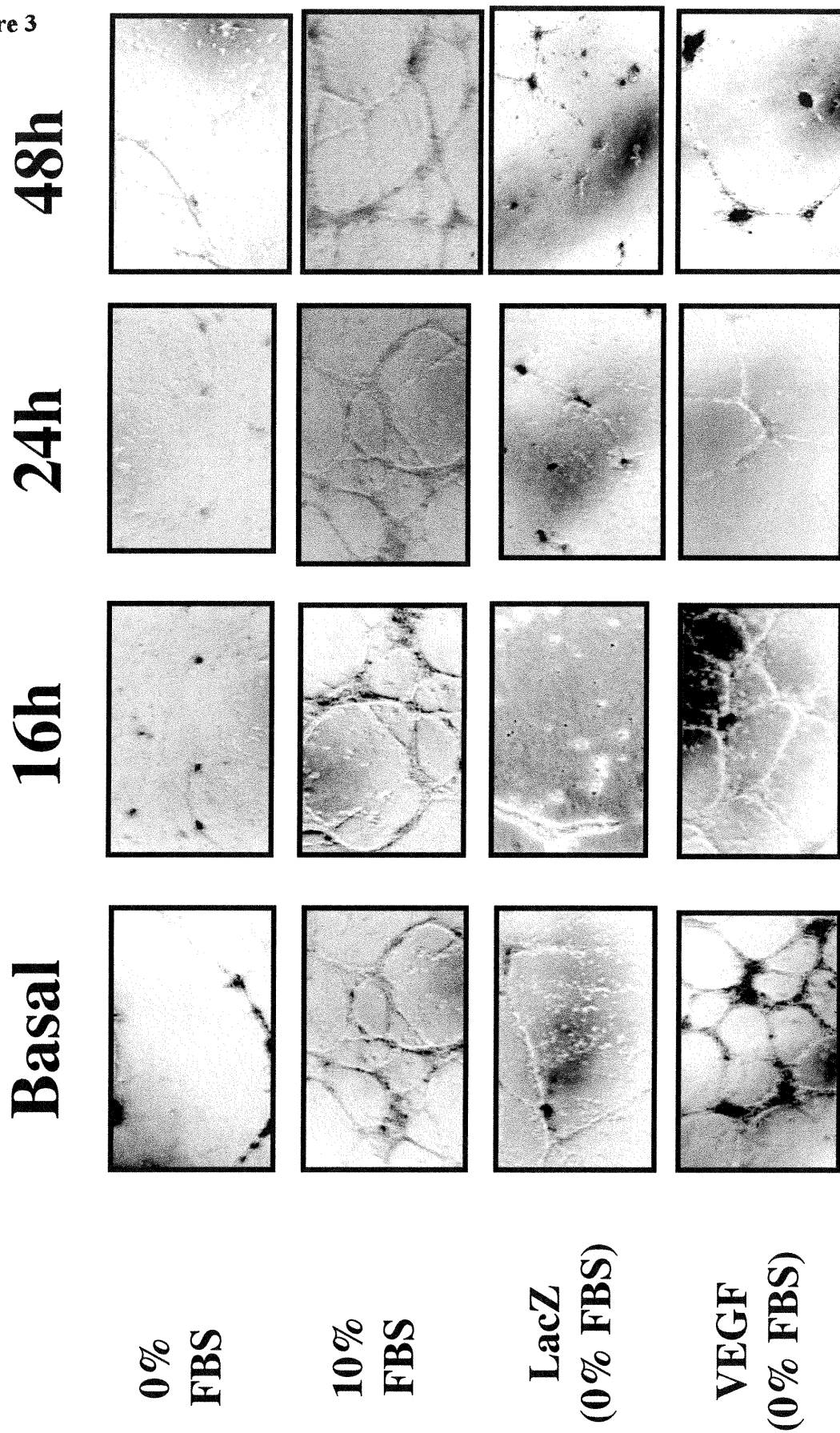




Figure 4

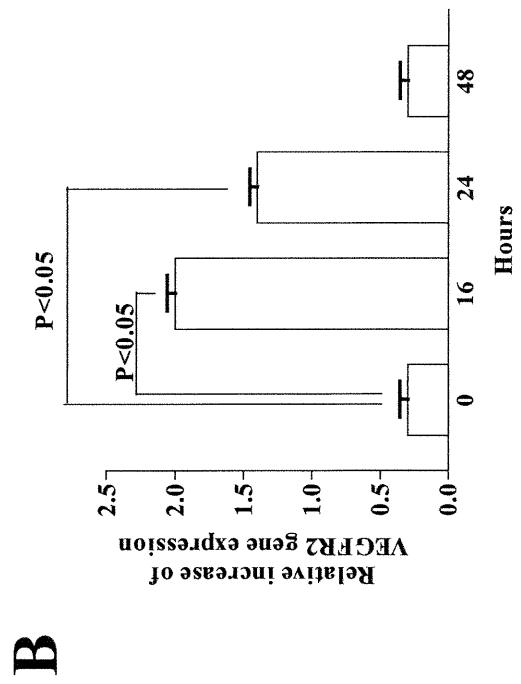
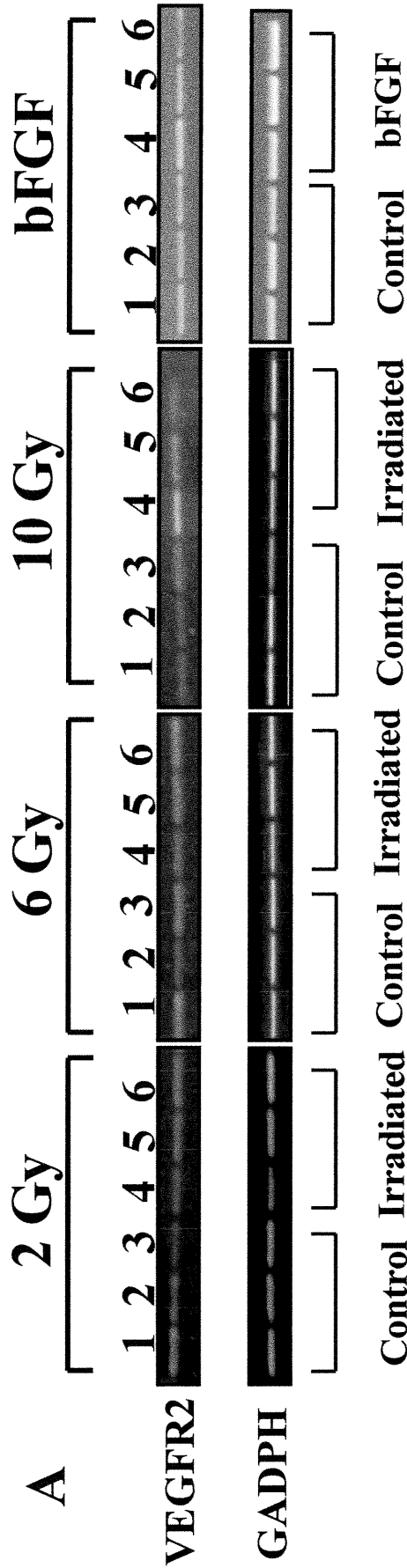
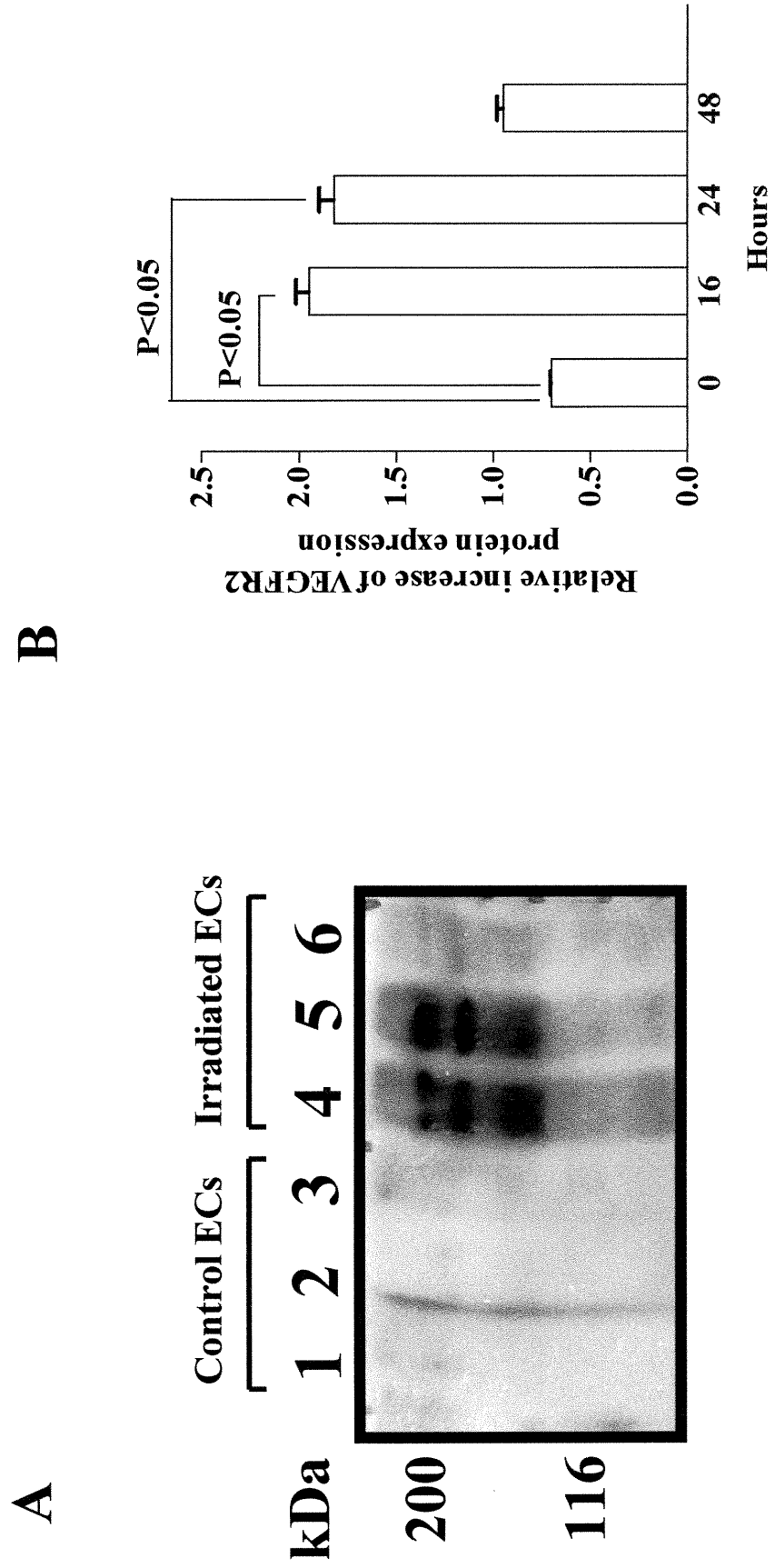


Figure 5



## Chapitre 5: Discussion

L'occlusion graduelle des artères coronaires engendre le développement de nouveaux vaisseaux sanguins appelés les vaisseaux collatéraux, qui correspondent à l'extension de l'arbre vasculaire par bourgeonnement des vaisseaux préexistants ou l'angiogénèse. L'angiogénèse est un phénomène multifactoriel, incluant la dégradation de la matrice extracellulaire, la migration et la prolifération des cellules endothéliales qui sont sous le contrôle des protéinases, d'un éventail de facteurs de croissance et de cytokines, des molécules d'adhésion et également des inhibiteurs. Parmi les facteurs angiogéniques connus, VEGF<sub>165</sub> et son récepteur VEGFR2, jouent un rôle important dans l'initiation de l'angiogénèse.

Le but de mon projet de doctorat consistait à vérifier l'effet mitogénique de VEGF<sub>165</sub> dans deux conditions expérimentales : 1- ischémie myocardique (chez le porc adult), 2- radiation ionisante (cellules endothéliales en culture).

Depuis une dizaine d'années, il y a eu une avancée significative dans la prévention des maladies cardiovasculaires par thérapie génique. L'utilisation de facteurs angiogéniques est la principale approche utilisée (Sinnaeve *et al.*, 1999 ; Kornowski *et al.*, 2000 b). En se basant sur les données de la littérature relatives à la spécificité de la protéine VEGF<sub>165</sub> aux cellules endothéliales et son effet mitogénique pro-angiogénique dans les tissus ischémiques, nous voulions démontrer que l'administration du vecteur adénoviral exprimant le gène VEGF<sub>165</sub> de façon intramyocardique dans un modèle d'ischémie myocardique porcin, permettrait le développement de nouveaux vaisseaux collatéraux. La spécificité de

VEGF<sub>165</sub> pour les cellules endothéliales offre plus d'avantages par rapport à d'autres molécules angiogéniques comme les facteurs de la famille FGF, qui sont non seulement mitogéniques pour des cellules endothéliales mais aussi pour d'autres types cellulaires tels que les fibroblastes et les cellules musculaires lisses (Deroanne *et al.*, 1997).

La livraison de l'agent thérapeutique est primordial pour le succès de la thérapie dans la prévention des maladies cardiovasculaires. La molécule thérapeutique peut être administrée sous forme, soit protéinique, soit génique. La thérapie génique pour traiter les maladies ischémiques présente plusieurs avantages sur une stratégie thérapeutique basée sur l'utilisation de protéine. En effet, le transfert de gène fournit une concentration élevée de la protéine thérapeutique à un taux de libération lent, pour une période relativement longue. Le vecteur de livraison peut être un vecteur non viral, tel qu'un plasmide, ou viral, tels qu'un adénovirus et un rétrovirus. Il a été démontré que les adénovirus exprimaient la protéine VEGF dans le myocarde, jusqu'à 7 jours (Magovern *et al.*, 1996 ; Kornowski *et al.*, 2000b). Par contre, l'administration locale de VEGF sous forme protéinique n'est pas efficace étant donné sa très courte demie-vie biologique dans la circulation (Takeshita *et al.*, 1994). C'est pour cette raison que la plupart des études précédentes, ont injecté la protéine VEGF de façon continue ou par des doses répétitives pour atteindre l'effet thérapeutique escompté. Parmi d'autres avantages de la thérapie angiogénique par le gène de VEGF, le transfert direct du gène permet d'obtenir des concentrations élevées de VEGF localisées dans les sites ischémiques. À l'inverse, l'administration systémique de la protéine

peut conduire à une angiogénèse non-désirée dans des sites périphériques, entraînant des effets secondaires néfastes, au niveau par exemple de la rétine, du liquide synovial ou des tumeurs oculaires (Folkman, 1990).

Parmi les différents systèmes d'expression de gène nous avons choisi de travailler avec les vecteurs adénoviraux pour leurs propriétés inhérentes, qui les définissent comme des vecteurs idéaux pour l'angiogénèse thérapeutique. Les adénovirus sont capables d'infecter aussi bien des cellules en division que des cellules quiescentes, comme les cardiomyocytes et les cellules endothéliales. L'expression du transgène par les adénovirus est extrachromosomique, ce qui diminue considérablement le risque d'insertion inappropriée du transgène dans le génome de la cellule infectée. Par ailleurs, la durée de l'expression de la protéine par les vecteurs adénoviraux est plus appropriée pour induire l'angiogénèse (i.e. une à deux semaines). Par conséquent, en tenant compte de tous les avantages des vecteurs adénoviraux, nous avons cloné le gène de l'isoforme VEGF<sub>165</sub> humain dans ces vecteurs sous le contrôle du promoteur constitutif CMV (Cytomégalo virus). Nous avons par la suite évalué la présence du gène de VEGF<sub>165</sub> dans les vecteurs adénoviraux d'une part par la méthode de PCR (Polymerase Chain Reaction) et d'autre part par la méthode d'immunoblot pour déterminer la sur-expression et la sécrétion de la protéine dans les cellules musculaires lisses en culture. La protéine de VEGF<sub>165</sub> surexprimée par les adénovirus a conservé son effet biologique, puisque la stimulation des cellules endothéliales par différentes concentrations (1, 10 ng/ml) de VEGF<sub>165</sub> a abouti à l'augmentation de la prolifération de ces cellules. Ces résultats confirment que

l'expression de la protéine VEGF<sub>165</sub> par les vecteurs adénoviraux n'affecte pas la nature biologique de la protéine.

Plusieurs études expérimentales et cliniques renforcent l'importance du rôle de VEGF<sub>165</sub> dans le processus de l'angiogénèse. Banai et ses collaborateurs (1994 a) ont démontré que l'administration intracoronarienne de la protéine recombinante de VEGF<sub>165</sub> dans un modèle de chien avec une ischémie myocardique, d'une part augmente de 89% la densité des vaisseaux, et d'autre part améliore de 40% le flux sanguin analysé par la méthode des microsphères radioactives. Un autre groupe, Pearlman et ses collaborateurs (1995), a démontré que l'administration continue de la protéine VEGF<sub>165</sub> dans le myocarde sur une période de 6 semaines réduisait la zone ischémique et améliorait la fraction d'éjection et l'épaississement de la paroi ventriculaire évaluées par l'imagerie par résonance magnétique. D'autre part, Mack et ses collaborateurs (1998) ont rapporté que l'injection intramyocardique d'adénovirus, exprimant le gène VEGF<sub>121</sub> dans un modèle de coeur ischémique porcin, conduisait à la formation des nouveaux vaisseaux collatéraux associée à l'amélioration de la fonction et la perfusion cardiaque évaluée par la méthode d'imagerie SPECT (avec utilisation de <sup>99m</sup>Tc- sestamibi). Dans cette dernière étude, les auteurs ont choisi l'isoforme 121 de VEGF puisque cet isoforme n'est pas capable de lier la molécule d'héparine, ce qui augmente sa diffusion à travers le myocarde par rapport aux autres isoformes (Thomas, 1996). Le groupe de Rosengart (1999) a récemment démontré que l'injection intramyocardique chez l'humain, du gène VEGF<sub>121</sub> transporté par le vecteur adénoviral, permettait, d'une part le développement des nouveaux

vaisseaux capillaires évalué par angiographie, et d'autre part une amélioration de la contractilité de la paroi ventriculaire et de la fonction myocardique à l'état de stress, évaluée par la méthode de détection de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi.

D'autre part, l'étude clinique réalisée par Losordo et ses collaborateurs (1998) a démontré que l'administration intramyocardique de VEGF<sub>165</sub> sous forme plasmidique peut conduire à la réduction des symptômes d'angine de poitrine et améliorer la perfusion myocardique chez les patients sélectionnés avec une ischémie myocardique chronique. Cette étude a cependant été effectuée sur seulement 5 patients. Baumgartner et ses collaborateurs (1998) ont démontré que l'administration intramusculaire de VEGF<sub>165</sub> sous forme plasmidique augmentait, aussi bien la densité de capillaire que la perfusion des membres inférieurs chez les 9 patients atteints d'une ischémie périphérique. Toutes les études mentionnées ci-dessus et renforcées par d'autres expériences basées sur l'utilisation du VEGF<sub>165</sub> dans les conditions d'ischémie, ont démontré que ce facteur est non seulement capable d'augmenter le nombre de vaisseaux capillaires, mais joue aussi un rôle important dans l'amélioration de la fonction cardiaque. Ces différentes expériences semblent montrer qu'il serait possible de développer la circulation collatérale dans un territoire souffrant d'une ischémie chronique suite à l'administration du VEGF<sub>165</sub>.

Les résultats obtenus lors de notre étude *in vivo*, c'est à dire l'augmentation de la densité de capillaires suite à l'injection d'adénovirus exprimant le gène VEGF<sub>165</sub>, sont comparables et en accord avec ceux rapportés dans la littérature. Néanmoins, l'augmentation de la densité de capillaire, dans notre cas, n'a pas

conduit à l'amélioration de la fonction myocardique ; cette différence pourrait être expliquée par plusieurs hypothèses.

Dans l'étude de Mack et ses collaborateurs (1998), le modèle ischémique utilisé diffèrait du nôtre dans la mesure où afin de créer la région ischémique, les auteurs ont implanté le constricteur améroïde sur l'artère circonflexe gauche. Cet anneau métallique, contenant du matériel hydroscopique qui absorbe le liquide environnant, écrase graduellement la paroi vasculaire entraînant un blocage de la circulation sanguine. Par contre, dans notre modèle, l'ischémie myocardique a été créée en implantant le constricteur améroïde sur l'artère descendante antérieure, qui est une artère importante pour la fonction cardiaque. Étant donné cette différence expérimentale majeure, nous suggérons que la région ischémique que nous avons créée en bloquant l'artère descendante antérieure, pourrait être moins facilement réversible qu'une zone ischémique induite par le blocage d'une artère circonflexe. Cette différence pourrait expliquer en partie l'absence d'amélioration de la fonction myocardique.

Par ailleurs, dans notre modèle expérimental, nous n'avons pas utilisé la méthode la plus appropriée pour déterminer la fonction myocardique. En effet, Mack et ses collaborateurs (1998) ont utilisé la méthode de thalium radioactif pour déterminer la fonction myocardique ; la méthode de thalium permet une meilleur quantification de la fonction myocardique que l'échocardiographie de contraste, que nous avons utilisé dans notre étude.

Une autre hypothèse pouvant expliquer les différences de la fonction myocardique serait que le développement de nouveaux vaisseaux n'avait pas



atteint les vaisseaux fonctionnels. En effet, Suri et ses collaborateurs (1996) ont démontré que le facteur de croissance VEGF n'est pas suffisant pour compléter le phénomène d'angiogénèse, car d'autres facteurs de croissance tels que les angiopoïétines 1 et 2 pourraient jouer un rôle crucial dans la maturation et la stabilisation des cellules endothéliales ainsi que dans le recrutement des cellules de support telles que les péricytes. Il y a de plus en plus de données démontrant l'effet important des différents facteurs angiogéniques dans le développement des vaisseaux sanguins matures (Donavan *et al.*, 2000). Toutes ces données suggèrent que le développement des vaisseaux collatéraux matures, fonctionnels et stables dans une zone ischémique, nécessiterait la présence de plusieurs facteurs, qui joueraient chacun un rôle précis dans l'initiation de l'angiogénèse ainsi que dans le maintien des vaisseaux nouvellement formés.

Des études récentes ont identifié plusieurs facteurs angiogéniques impliqués dans la modulation des interactions réciproques entre les cellules endothéliales et les cellules de supports, telles que les péricytes et les cellules musculaires lisses. Ces cellules, recrutées durant le processus de remodelage vasculaire, sont importantes dans le processus de stabilisation des vaisseaux. Les facteurs de croissance tels que PDGF-BB et HB-EGF (Heparin Binding-Epidermal Growth Factor), synthétisés par les cellules endothéliales sont en partie responsables du recrutement des cellules de supports. La déficience dans la production de ces facteurs pourrait conduire à un manque de recouvrement des cellules endothéliales par des cellules de supports (*i.e.* les péricytes et les cellules musculaires lisses) (Folkman et D'Amore, 1996 ; Edelberg *et al.*, 1998). D'autre

part, les cellules musculaires lisses synthétisent et sécrètent le facteur angiopoïétine-1 pour activer le récepteur Tie2 sur les cellules endothéliales adjacentes, résultant ainsi à une signalisation bidirectionnelle entre les cellules endothéliales et les cellules de supports (Suri *et al.*, 1996).

Par conséquent, une thérapie génique efficace serait basée sur l'administration de différents facteurs permettant de stimuler différentes étapes de l'angiogénèse, soient l'induction de la prolifération, la migration ainsi que la maturation des cellules endothéliales.

La revascularisation biologique des tissus ischémiques *via* l'administration d'un facteur angiogénique, a été définie comme étant efficace dans des études cliniques chez des patients non admissibles aux interventions conventionnelles, telles que CABG (Coronary Artery Bypass Graft) ou PTCA. La thérapie angiogénique est d'autant plus intéressante, puisque l'administration des facteurs angiogéniques conduit à la formation de vaisseaux de petits calibres alors que l'athérosclérose affecte principalement les vaisseaux de moyens ou et larges calibres. Par conséquent, les vaisseaux nouvellement développés ne devraient pas être de nouveaux occlus.

Dans de récentes études cliniques, il a été démontré que la revascularisation transmyocardique ou TMR est une nouvelle procédure chirurgicale efficace dans la réduction des symptômes d'angine de poitrine. Cependant, le mécanisme exact de cette intervention reste inconnu et encore controversé. L'hypothèse proposée par certains auteurs serait que le flux sanguin transite dans les canaux perméables, qui sont formés par le laser. Cependant, le

groupe de Burkhoff et ses collaborateurs (1996) a démontré que les canaux formés par le laser ne restaient pas perméables, dans la mesure où ces ouvertures se remplissent d'une matrice fibreuse après 24 heures. Deux semaines plus tard, ces canaux sont complètement bloqués par du tissu cicatriciel. Ces observations ont incité les chercheurs à proposer une hypothèse alternative basée sur le phénomène d'angiogénèse. Le groupe de Chu et ses collaborateurs (1999) ont récemment démontré de façon histologique qu'aucun canal créé par le laser ou encore par l'utilisation d'un simple aiguille, causant des perforations mécanique, ne restait perméable et que, l'utilisation des deux méthodes conduisait à l'expression de VEGF et à l'augmentation de la densité vasculaire lorsque comparées au groupe contrôle. Ces résultats suggèrent que la réponse inflammatoire et angiogénique causées par le dommage tissulaire pourraient en partie expliquer les résultats obtenus. Cependant, nos résultats n'ont démontré aucune augmentation significative de la densité capillaire ainsi que de l'amélioration de la fonction myocardique dans le groupe traité avec le TMR.

Une troisième hypothèse serait que le laser dénervait le tissu et le patient ne ressentirait plus son angine, même si sa condition n'est pas améliorée (Kwong *et al.*, 1997).

Bien qu'il a eu beaucoup d'études sur cette approche, il reste encore beaucoup d'investigation à effectuer.

Dans la deuxième partie de mon projet de doctorat, nous avons vérifié l'effet de VEGF<sub>165</sub> dans les conditions d'irradiation ionisante sur la prolifération

des cellules endothéliales. Nous avons amorcé notre étude en étudiant l'effet d'émission de particules bêta sur la prolifération, la migration et sur la différenciation des cellules endothéliales ainsi que sur l'expression du récepteur VEGFR2.

La radiothérapie endovasculaire, nouvelle modalité thérapeutique pour prévenir la resténose post-angioplastie, connaît un grand développement. Plusieurs études ont décrit l'effet inhibiteur de l'irradiation sur la prolifération des cellules musculaires lisse, réduisant ainsi l'épaississement de l'intima survenant post-angioplastie. Les dommages mécaniques sur l'endothélium suite à la procédure de l'angioplastie, peut conduire à une dysfonction sévère de l'endothélium et constitue alors une des premières étapes responsable de la thrombose et de l'épaississement de l'intima. Cependant, Asahara et ses collaborateurs (1995) ont démontré qu'une accélération de la réendothélisation pouvait prévenir l'hyperplasie néointimale : ainsi l'administration de facteurs de croissance, tels que VEGF<sub>165</sub> dans le modèle de carotide de rat prevenait la resténose. L'intégrité de l'endothélium joue un rôle important dans la physiopathologie de la resténose. Ces observations nous ont incité à étudier la fonction endothéliale en conditions de radiations ionisantes ainsi que le rôle de VEGF<sub>165</sub> dans cette fonction, étant donné l'important développement de la radiothérapie endovasculaire.

Récemment, nous avons (Fareh *et al.*, 1999) démontré que les radiations ionisantes inhibent la prolifération de cellules musculaires lisses ainsi que les cellules endothéliales. Cette inhibition proportionnelle à la dose, est caractérisée par une dose induisant 50% d'inhibition (ED<sub>50</sub>) de la prolifération de 1.10 et 2.15 Gy,

pour les cellules musculaires et endothéliales, respectivement. La radiation ionisante induit l'arrêt cellulaire à la phase G1 sans aucun signe de toxicité ou d'apoptose des cellules vasculaires. Durant mon projet de doctorat, nous avons étudié l'effet de la radiation bêta sur la prolifération, la différenciation et la viabilité cellulaire ainsi que la régulation de l'expression du récepteur VEGFR2 sur les cellules endothéliales humaines. Pour réaliser nos objectifs, nous avons utilisé un oligonucléotide marqué de façon interne avec un isotope de  $^{32}\text{P}$ , comme moyen d'irradiation locale et homogène des cellules en culture (Fareh *et al.*, 1999).

La prolifération et la différenciation des cellules endothéliales humaines ont été significativement inhibées en présence de radiations ionisantes. Cependant, en présence de VEGF<sub>165</sub>, la prolifération ainsi que la différenciation des cellules endothéliales ont été significativement améliorées en fonction de la dose de VEGF<sub>165</sub> et de radiation bêta. L'effet bénéfique de VEGF<sub>165</sub> semble être plus important à des doses plus élevées de radiation bêta, 10 Gy (la dose la plus élevée testée dans nos expériences). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus précédemment par Katoh et ses collaborateurs (1995) qui ont démontré que VEGF pouvait supprimer l'apoptose cellulaire chez les cellules hématopoïétiques dans des conditions de radiation ionisantes. Nos résultats soulignent l'impact positif de VEGF<sub>165</sub> sur la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales irradiées. L'effet radioprotecteur de VEGF<sub>165</sub> a été mis en évidence sur la prolifération et la différenciation de cellules endothéliales. VEGF<sub>165</sub> semble jouer un rôle important dans le maintien de l'intégrité endothéliale lors de l'irradiation.

Nous voulions par la suite savoir si l'effet prolifératif de VEGF<sub>165</sub> lors d'une irradiation était médié par un récepteur spécifique pour les cellules endothéliales. Pour cette raison nous avons étudié l'effet de l'irradiation sur l'expression du récepteur VEGFR2 et VEGFR1, les récepteurs spécifiques de VEGF, exprimés par les cellules endothéliales.

L'étude cinétique de la régulation de l'expression protéinique et génique de VEGFR2 a démontré une augmentation de niveau de protéine ainsi que le niveau de l'ARNm en fonction de la dose et du temps. Cependant, nos résultats ne nous permettent pas d'expliquer la cause de cette augmentation. L'augmentation de l'expression du messager de VEGFR2 peut provenir soit d'une augmentation du taux de la transcription soit d'une augmentation de la stabilité de l'ARNm de VEGFR2. Waltenberger et ses collaborateurs (1996) ainsi que le groupe de Brogi (1996), ont rapporté que l'expression protéinique de VEGFR2 est augmentée dans les conditions d'hypoxie en fonction du temps, alors que le niveau de l'ARNm reste non-affecté. Contrairement aux conditions d'hypoxie, d'autres groupes ont reporté que bFGF augmente le niveau de l'ARNm ainsi que la protéine de VEGFR2 dans les cellules endothéliales microvasculaires, aussi bien que dans les cellules fœtales transformées (Pepper et Mandriota, 1998).

Dans notre étude, nous n'avons pas observé de différence au niveau de l'expression du récepteur VEGFR1. Le récepteur VEGFR1 semble ne pas être impliqué dans l'effet prolifératif de VEGF sur des cellules irradiées.

Nos résultats suggèrent que l'augmentation de la prolifération des cellules endothéliales en présence de VEGF<sub>165</sub> lors de l'irradiation serait en partie due à

une sur-expression de gène du récepteur VEGFR2. Ces dernières observations suggèrent que VEGF<sub>165</sub> ainsi que son récepteur VEGFR2 peuvent jouer un rôle important dans la prolifération des cellules endothéliales dans certaines conditions stressantes comme l'exposition aux radiations ionisantes. Cependant, afin de mieux caractériser le mécanisme d'action de VEGF dans les conditions de radiation bêta, dans les expériences futures, il serait intéressant de bloquer l'effet prolifératif de VEGF en utilisant des anticorps contre le récepteur KDR sur les cellules endothéliales irradiées *in vitro*.

Par ailleurs, Montrucchio et ses collaborateurs (2000) ont récemment démontré que l'expression du facteur PAF (Platelet-Activating Factor), induit par VEGF, joue un rôle important dans la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Il est possible de spéculer que l'effet radioprotecteur de VEGF sur les cellules endothéliales dans les conditions de radiation, est en partie due à l'expression indirecte d'autres facteurs de croissance tel que PAF. Afin de déterminer le mécanisme d'action de VEGF il serait intéressant d'étudier dans le futur l'effet de VEGF sur l'expression du PAF et examiner son rôle sur la protection de l'intégrité de l'endothélium dans les conditions d'irradiation.

Il est important également de vérifier si l'endothélium régénéré conserve sa fonction biologique. L'endothélium module le tonus vasculaire et donc le débit sanguin tissulaire régional par la production de vasodilateurs (Prostacycline, Bradykinine et monoxyde de l'azote) et de vasoconstricteurs (Endothéline, Angiotensine II) (Revue dans Goligorsky, 2000). Ces mêmes substances sont capables à long terme d'agir sur la structure des cellules musculaires lisses

vasculaires sous-jacentes, les vasodilateurs en inhibant leur croissance et les vasoconstricteurs en les stimulants. L'intégrité de la fonction endothéliale est donc essentielle pour le contrôle du tonus vasculaire et la structure de la paroi artérielle. Plusieurs études soulignent le rôle du monoxyde d'azote qui joue dans la fonction de l'endothélium. La production endogène du NO par l'endothélium est le point de convergence de plusieurs voie de signalisation intracellulaire (Revue dans Goligorsky, 2000).

Le monoxyde d'azote exerce son effet vasodilateur sur les vaisseaux sanguins. L'importance du monoxyde d'azote en physiologie et pathologie vasculaire a été étudiée de façon précise en utilisant des inhibiteurs du monoxyde d'azote. Egalement, des études récentes ont suggéré que le monoxyde d'azote joue un rôle essentiel dans la migration, la prolifération des cellules endothéliales ainsi que l'angiogénèse induit par VEGF (Papapetropoulos *et al.*, 1997). Donc, il serait intéressant de caractériser plus le maintien de l'intégrité endothéliale par le VEGF dans les conditions de radiations bêta en exminant la production de monoxyde d'azote par les cellules endothéliales.

Le mécanisme d'action de VEGF dans les conditions de radiation ionisante n'est pas encore connu. Cependant, Gerber et ses collaborateurs (1998) ont démontré que VEGF joue le rôle d'un facteur de survie en utilisant la voie intracellulaire AKT/PI3-kinase. Ils ont également démontré que l'activation de cette voie de signalisation est suivant l'activation du récepteur VEGFR2 et pas le récepteur VEGFR1. Nous spéculons que VEGF pourrait induire la voie de



signalisation intracellulaire de AKT/PI3-kinase dans les conditions d'irradiation bêta.

De plus, le mécanisme d'inhibition de la prolifération des cellules vasculaires reste à comprendre. Nous avons étudié la progression du cycle cellulaire dans les conditions d'irradiation. La radiation bêta a induit l'arrêt du cycle cellulaire à la phase G0/G1 et a réduit le nombre des cellules dans la phase S. Il a été démontré que l'expression des protéines p53 et p21 par les vecteurs adénoviraux, bloquent la progression du cycle cellulaire et réduit l'hyperplasie néointimale chez le modèle carotidien de rat (Chang *et al.*, 1995 ; Katayose *et al.*, 1995). Nous spéculons que l'irradiation bêta inhibe la prolifération des cellules vasculaires *via* les molécules p53 et p21, conduisant à l'arrêt cellulaire à la phase G0/G1.

De nombreux champs d'investigation restent à être explorés quant au développement d'une thérapie génique efficace pour les maladies vasculaires. L'accent doit être mis sur la recherche de nouvelles molécules angiogéniques, nouveaux vecteurs de livraison ainsi que déterminer la voie de livraison efficace. Ainsi, à l'aide de ces nouveaux outils, il sera possible dans un avenir proche d'envisager une thérapie efficace contre les maladies vasculaires. Quant au rôle de VEGF<sub>165</sub> dans les conditions de radiation bêta, bien qu'il ne s'agisse que d'une expérience unique pour l'instant, elle ouvre la voie à une thérapie ciblée de la paroi artérielle afin d'éviter la réstenose.

## Chapitre 6 : Conclusions et perspectives

En résumé, notre étude visait à explorer le potentiel du VEGF<sub>165</sub> en utilisant un vecteur adénoviral, dans le traitement des maladies cardiovasculaires ischémiques. Dans un premier temps nous avons démontré que la protéine VEGF<sub>165</sub> surexprimée par les vecteurs adénoviraux conservait son activité biologique c'est à dire son effet prolifératif sur les cellules endothéliales. En utilisant un modèle d'ischémie myocardique chez le porc, nous avons étudié les effets angiogéniques du VEGF<sub>165</sub> comparativement ou en combinaison avec le laser transmyocardique. Nous avons démontré que l'administration intramyocardique des adénovirus exprimant le gène VEGF<sub>165</sub> dans un modèle d'ischémie myocardique chez le porc conduit au développement des nouveaux vaisseaux collatéraux, sans cependant améliorer la fonction myocardique. En revanche, l'application du laser transmyocardique a été sans effet sur ces paramètres.

Bien que notre modèle animal soit représentatif d'une condition ischémique se rapprochant le plus des conditions observées en clinique, il serait intéressant dans les expériences futures d'étudier l'effet de VEGF dans un modèle animal athérosclérotique.

Par ailleurs, avec l'identification de nouveaux facteurs angiogéniques impliqués dans le développement des vaisseaux sanguins, où ils interviennent de façon orchestrée du point de vue de temps, espace et dose, il est difficile à imaginer que l'administration d'un seul facteur comme VEGF<sub>165</sub> pourrait suffire à

former des vaisseaux fonctionnels. Il serait possible de potentialiser l'effet angiogénique de VEGF<sub>165</sub> en co-injectant des facteurs qui ciblent différents composants de la vasculature tel que l'angiopoétine, qui joue un rôle important dans la maturation des vaisseaux sanguins. La caractérisation continue des nouveaux facteurs angiogéniques qui contrôlent la formation des nouveaux vaisseaux sanguins, mèneraient à compléter et raffiner les approches thérapeutiques visant à former des nouveaux vaisseaux sanguins. Dans les études futures, Il serait important de vérifier le rôle de plusieurs facteurs angiogéniques dans un modèle animal d'ischémie myocardique afin de mieux comprendre le mécanisme d'angiogénèse et d'améliorer ce phénomène.

D'autre part, malgré toutes les études animales et cliniques sur le TMR, le mécanisme de cette technique n'est pas encore connu. L'application de TMR, chez les patients ayant des maladies cardiovasculaires, avec des multiples occlusions au niveau des artères coronaires s'avère une technique invasive possédant un degré élevé de mortalité et morbidité. Avec toutes ces considérations, à notre avis, l'induction de la néovascularisation par TMR ouvre de nouvelles possibilités de traitement pour les maladies ischémiques. Cependant, avant que certaines de ces possibilités soient réalisées, plus de développement pré-cliniques et cliniques sont nécessaires.

D'autre part nous avons mis en évidence une fonction importante de VEGF<sub>165</sub> dans des conditions de radiations ionisantes ; VEGF<sub>165</sub> et son récepteur VEGFR2 jouent un rôle dans la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales dans les conditions d'irradiation bêta *in vitro*. Dans ces conditions

l'expression du récepteur VEGFR2 est augmentée en fonction de la dose et du temps. Nos résultats suggèrent que VEGF<sub>165</sub> joue un rôle important non seulement dans le processus de l'angiogénèse en condition d'ischémie tissulaire, mais également dans le maintien de la fonction endothéliale dans certaines conditions stressantes, telles que la radiation ionisante. Ces dernières données sont importantes pour mieux comprendre la fonction endothéliale et donc l'intégrité endothéliale suite à la radiothérapie endovasculaire, thérapie récemment développée pour prévenir la resténose post-angioplastie. Dans les études futures il serait intéressant de vérifier l'effet de radiations ionisantes sur l'expression endogène de VEGF dans de telle condition dans le but de mieux comprendre l'effet radioprotecteur de VEGF. Il serait également important d'étudier l'effet de radiations ionisantes sur l'expression du récepteur VEGFR2 et également de définir l'implication de VEGF<sub>165</sub> dans une artère porcine irradiée.

Le potentiel thérapeutique de VEGF dans la thérapie des maladies cardiovasculaires est très excitant, mais exploiter cette thérapie présente plusieurs défis pour les scientifiques de même que pour les cliniciens. Il est clair que VEGF et son récepteur VEGFR2, jouent un rôle important sur l'intégrité de la fonction endothéliale en conditions d'hypoxie ou de radiation.

L'association d'un geste mécanique de dilatation à une thérapie génique pourrait permettre d'éviter la réstenose.

## Références

Achen MG., Jeltsch M., Kukk E., Makinen T., Vitali A., Wilks AF., Alitalo K., Stackner SA. (1998). Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk-1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci USA*. **95**: 548-553.

Acsadi G., Massie B., Jani A. (1995). Adenovirus-mediated gene transfer into striated muscles. *J Mol Med*. **73**: 165-180.

Akiri G., Nahari D., Finkelstein Y., Le S., Elroy-Stein O., and Levi B. (1998). Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription. *Oncogene*. **12**: 227-236.

Albiero R., and Colombo A. (2000). European high-activity (32)P radioactive stent experience. *J Inv Cardiol*. **12**: 416-421.

Amlos HI., Reinstein LE., Weinberger J. (1996). Dosimetry of a radioactive coronary balloon dilatation catheter for treatment of neointimal hyperplasia. *Med Phys*. **23**: 1783-1788.

Anthony P., Keys H., McClollister Evarts C., Rubin P., Lush C. (1987). Prevention of heterotopic bone formation with early post operative irradiation in high risk patients undergoing total hip arthroplasty: comparison of 10.00 Gy vs 20.00 Gy schedules. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. **13**: 365-369.

Antonelli-Orlidge A., Saunders KB., Smith SR., D'Amore PA. (1989). An activated form of TGF $\beta$  is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. **86**: 4544-4548.

Armstrong E., Kastury K., Aprelikova O., Bullrich F., Nezelof C., Gogusev J. (1993). Flt4 receptor tyrosine kinase gene mapping to chromosome band 5q35 in relation to the t(2;5), t(5;6) and t(3;5) translocations. *Genes Chromosom Cancer*. **7**: 144-151.

Asahara T., Bauters C., Pastore C., Kearney M., Rossow S., Bunting S., Ferrara N., Symes J., Isner JM. (1995). Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon injured rat carotid artery. *Circ*. **91**: 2793-2801.

Assali A., and Beigel Y. (1995). Restenosis after PTCA. *Israel J Med Sci*. **31**: 377-381.

Banai S., Jaklitsch MT., Shou M. (1994 a). Angiogenic-included enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circ.* **89**: 2183-9.

Banai S., Shweiki D., Pinson A., Chandra M., Lazarovici G., Keshet E. (1994 b). Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis. *Cardiovasc Res.* **28**: 1176-1179.

Basson CT., Kocher O., Basson MD., Asis A., Madri JA. (1992). Differential modulation of vascular cell integrin and extracellular matrix expression in vitro by TGF $\beta$ -1 correlates with reciprocal effects on cell migration. *J Cell Physiol.* **153**: 118-128

Baumgartner I., Pieczek A., Manor O., Blair R., Isner JM. (1998). Constitutive expression of phVEGF<sub>165</sub> after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation.* **97**: 1114-1123.

Beck L Jr., and D'Amore P. (1997). Vascular development: Cellular and molecular regulation. *FASEB J.* **11**: 365-367.

Bell L., and Madri JA. (1989). Effect of platelet factors on migration of cultured bovine aortic endothelial and smooth muscle cells. *Cir Res.* **65**: 1957-1065.

Bergelson JM., Cunningham JA., Droguett G., Kurt-Jones EA., Krithivas A., Hong JS., Horwitz MS., Crowell RL., Finber RW. (1997). Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**: 1320-1323.

Blann AD., Belgore FM., Constans J., Conri C., Lip GYH. (2001). Plasma Vascular Endothelial Growth Factor and its receptor Flt-1 in patients with hyperlipidemia and atherosclerosis and the effects of Fluvastatin or Fenofibrate. *Am J Cardiol.* **87**: 1160-1163.

Borg JP., De lapeyriere O., Noguchi T., Rottapel R., Dubreuil P., Birnbaum D. (1995). Biochemical characterization of two isoforms of flt4, a VEGF receptor-related tyrosine kinase. *Oncogene.* **10**: 973-984.

Breier G., Breviaro F., Caveda L., Berthier R., Schnurch H., Gotsch U. (1996). Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood.* **87**: 630-641.

Brenner DJ., Miller RC., Hall EJ. (1996). The radiobiology of intravascular irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **36**: 805-810.

Brogi E., Wu T., Namiki A., Isner JM. (1994). Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circ.* **90**: 649-52.

Brogi E., Schatteman G., Wu T., Kim EA., Varticovski L., Keyt B., Isner JM. (1996). Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression. *J Clin Invest.* **97**: 469-476.

Burkhoff D., Fisher PE., Apfelbaum M., Kohmoto T., DeRosa CM., Smith CR. (1996). Histologic appearance of transmural laser channels after 4½ weeks. *Ann Thorac Surg.* **61**: 1532-1535.

Cao Y., Chen H., Zhou L., Chiang MK., Anand-Apte B., Weatherbee JA., Wang Y., Fang F., Flanagan J., Lik-Shing Tsang M. (1996). Heterodimers of Placenta Growth Factor/Vascular Endothelial Growth Factor: Endothelial activity, tumor cell expression, and high affinity binding to Flk-1/KDR. *J Biol Chem.* **271**: 3154-3162.

Canman CE., Lim DS., Cimprich KA., Taya Y., Tamai K., Sakaguchi K. (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* **281**: 1677-1679.

Carmeliet P., Ferreira V., Breier G., Pollefeyt S., Kieckens L., Eberhardt C. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single vascular endothelial growth factor allele. *Nature.* **380**: 435-439.

Carmeliet P., Lampugnani MG., Moons L., Breviario F., Compernelle V., Bono F., et al. (1999). Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell.* **98**: 147-157.

Christofori G. (1996). The role of fibroblast growth factors in tumor progression and angiogenesis. In tumor angiogenesis. R, Bicknell, C.E, and N. Ferrara, eds. (Oxford: Oxford University Press).

Chu V., Kuang Jq., McGinn A., Giaid A., Korkola S., Chiu RC. (1999). Angiogenic response induced by mechanical transmural revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg.* **118** : 849-856.

Claffey KP., Shih SC., Mullen A., Dziennis S., Cusick JL., Abrams KR., Lee SW., Detmar M. (1998). Identification of a human VPF/VEGF 3' untranslated region mediating hypoxia-induced mRNA stability. *Mol Biol Cell.* **9**: 469-448.

Clapp C., Martial JA., Guzman RC., Rentier DF., Weiner RI. (1993). The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrin.* **133**: 1292-9.

Clark ER., and Clark EL. (1938). Microscopic observations on the growth of blood capillaries in the living animal. *Am J Anat.* **64**: 251-301.

Cooley DA., Frazier OH., Kadipasaoglu KA., Pehlivanoglu S., Shannon RL., Angelini P. (1994). Transmyocardial laser revascularization: anatomic evidence of long-term channel patency. *Tex Heart Inst J.* **21**: 220-224.

Condado JA., Waksman R., Gurdiel O., Epinosa R., Gonzales J., Burger B. (1997). Long-term angiographic and clinical outcome after percutaneous transluminal coronary angioplasty and intracoronary radiation therapy in humans. *Circ.* **96**: 727-732.

Cunningham S., Waxhaam N., Arrate P., Brock T. (1995). Interaction of the Flt-1 tyrosine kinase receptor with the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* **35**: 20254-20257.

Dameron KM., Volpert OV., Tainsky MA., Bouck N. (1994). Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science.* **265**: 1582-1584.

Damert A., Machein M., Breir G., Fujita MQ., Hanahan D., Risau W., Plate KH. (1997). Up-regulation of vascular endothelial growth factor expression in a rat glioma is conferred in two distinct hypoxia-driven mechanisms. *Cancer Res.* **57**: 3860-3864.

Danthinne X., and Imperiale MJ. (2000). Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Therapy.* **7**: 1707-1714.

D'Angelo G., Struman I., Martial J., Weiner RI. (1995). Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16- N-terminal fragment of prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**: 6374-6378.

Davis S., Aldrich TH., Jones PF., Acheson A., Compton DL., Jain V., Ryan TE., Bruno J., Radziejewski C., Maisonpierre PC., Yancopoulos GD. (1996). Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell.* **87**: 1161-1169.

Dejana E. (1996). Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *J Clin Invest.* **98**: 1949-1953.



Denekamp J. (1993). Review article: angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. *Br J Radiol.* **66**: 181-196.

Deroanne CF., Hajitou A., Calberg-Bacq CM., Nusgens BV., Lapiere CM. (1997). Angiogenesis by fibroblast growth factor 4 is mediated through an autocrine up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res.* **57**: 5590-5597.

DeVeries C., Escobedo JA., Ueno H., Houck K., Ferrara N., Williams LT. (1992 a). The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science.* **255**: 989-999.

Dickson MC., Martin JS., Cousins FM., Kulkarni AB., Karlsson S., Akhurst RJ. (1995). Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor  $\beta$ -1 knock out mice. *Development.* **121**: 1845-1854.

DiSalvo J., Bayne ML., Conn G., Kwok PW., Trivedi PG., Soderman PD., Palisi TM., Sullivan KA., Thomas KA. (1995). Purification and characterization of a naturally occurring vascular endothelial growth factor-placental growth factor heterodimer. *J Biol Chem.* **270**: 7717-7723.

Donovan MJ., Lin MI., Wiegand P., Rinstedt T., Kraemer R., Hahn R., Wang S., Ibanez CF., Rafii S., Hempstead BL. (2000). Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development.* **127** : 4531-4540.

Dorros G., and Jaff MR. (1997). Restenosis after peripheral artery angioplasty. Advanced in cardiovascular radiation therapy. In: abstracts book, ed. Proceedings of the 9th international brachytherapy conference; 20-21 February 1997; Plam Springs, CA. p 146-147.

Douglas BC., Pollak ES., Buck CA., Loscalzo J., Zimmerman GA., McEver Rp., Pober JS., Wick TM., Konkle BA., Schwartz BS., Barnathan ES., McCrae KR., Hug BA., Schmidt AM., Stern D. (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* **91**: 3527-3561.

Dumont DJ., Gradwohl G., Fong GH., Puri MC., Gertsenstein M., Auerbach A., Breitman ML. (1994). Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev.* **8**: 1897-909.

Dumont D., Fong GH., Puri MC., Gradwohl G., Alitalo K., Breitman ML. (1995). Vascularization of the mouse embryo: a study of flt-1, tek, tie and vascular

endothelial growth factor expression during development. *Dev Dynamics*. **203**: 80-92.

Edelberg JM., Aird WC., Wu W., Rayburn H., Mamuya WS., Mercola M., Rosenberg R. (1998). PDGF mediates cardiac microvascular communication. *J Clin Invest*. **102**: 837-843.

Eichmann A., Marcelle C., Breant C., Le Douarin NM. (1993). Two molecules related to the VEGF receptor are expressed in early endothelial cells during avian embryonic development. *Mech Dev*. **42**: 33-48.

Elyazidi I. (1998). Facteurs de croissance FGF et cancer. *Regard sur la biochimie*. **1**: 28-34.

Enholm B., Paavonen K., Risimaeki A., Kumar V., Gunji Y., Klefstrom J., Kivinen L., Laiho M., Olofsson B., Joukov V., Eriksson U., Alitalo K. (1997). Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene*. **14**: 2475-2483.

Fareh J., Martel R., Kermani P., Leclerc G. (1999). Cellular effects of  $\beta$ -particle delivery on vascular smooth muscle cells and endothelial cells: A dose response study. *Circ*. **99**: 1477-1484.

Ferrara N., and Henzel WJ. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **161**: 851-858.

Ferrara N., Leung DW., Cachianes G., Winer J., Henzel WJ. (1991a). Purification and cloning of vascular endothelial growth factor secreted by pituitary folliculostellate cells. *Methods Enzymol*. **198**: 391-405.

Ferrara N., Winer J., Cachianes G., Li B., Leung DW. (1991b). The Vascular endothelial growth factor family—identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol*. **5**: 1806-1814

Ferrara N., Houck K., Jakeman I., Leung DW. (1992). Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth family of proteins. *Endocrinol Rev*. **13**: 18-32.

Feuerstein GZ. (1996). Coronary restenosis: From genetics to therapeutics. Marcel Dekker Inc., New York. p: 99-128.

Fischell TA., Kharma BK., Fischell DR et al. (1994). Low-dose  $\beta$  particle emission from stent wire results in complet, localized inhibition of smooth muscle cell proliferation. *Circ.* **90**: 2956-2963.

Fischell TA. (1998). Radioactive stens. *Sem Interv Cardiol.* **3**: 51-56.

Fishman MC., and Stainier DYR. (1994). Cardiovascular development: prospect for a genetic approach. *Circ Res.* **74**: 757-763.

Flamme I., Breier G., Risau W. (1995). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and differentiation in the quail embryo. *Dev Biol.* **169**: 699-712.

Flamme I., Frolich T., Risau W. (1997). Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol.* **173**: 206-210.

Fleisher KJ., Goldschmidt-Clermont PJ., Fonger JD., Hutchins GM., Hruban RH., Baumgartner WA. (1996). One-month histologic reponse of transmural laser channels with molecular intervention. *Ann Thorac Surg.* **62**: 1051-1058.

Fleser A., and Leclerc G. (1996). Drug treatment of restenosis. *Drugs of Today.* **32**: 195-208.

Folkman J. (1972). Antiangiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg.* **175**: 409-416.

Folkman J. (1990). What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst.* **82**: 4-7.

Folkman J., and Shing Y. (1992). Angiogenesis. *J Biol Chem.* **267**: 10931-4.

Folkman J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med.* **1**: 27-31.

Folkman J., and D'Amore PA. (1996). Blood vessel formation : what is the molecular basis? *Cell.* **87**:1151-1155.

Fong GH., Rossant J., Gertsenstein M., Breitman ML. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature.* **376**: 66-70.

Fournier E., Birnbaum D., Borg JP. (1997). Receptors for factors of the VEGF family. *Bull. Cancer.* **84**: 397-403.

Fournier E., Rosnet O., Marchetto S., Turk CW., Rottapel R., Pelicci PG. (1996). Interaction with the phosphotyrosine binding domain/phosphotyrosine interacting domain of SHC is required for the transforming activity of the flt4/VEGFR3 receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem.* **271**: 12956-12963.

Frank S., Hubner G., Breier G., Longaker MT., Greenhalgh DG., Werner S. (1995). Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes-implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem.* **270**: 12607-12613.

Frazier OH, Cooley DA, Kadipasaoglu KA, Pehlivanoglu S, Lindenmeir M, Barasch E, Conger JL, Wilansky S, Moore WH. Myocardial revascularization with laser: preliminary findings. *Circ* 1995;**92**: suppl II:58-65.

Frubeis B., Zwaldo G., Brocker EB., Schule Osthoff K., Hagemeyer HH., Topoll H., Sorg C. (1988). Immunolocalization of an angiogenic factor (HAF) in normal, inflammatory and tumor tissues. *Int J Cancer.* **42**: 207-212.

Fuh G., Li B., Crowley C., Cunningham B., Wells JA. (1998). Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* **273**: 11197-11204.

Fukumara D., Gohongi T., Kadambi A., Izumi Y., Ang J., Yun CD., Buerk DG., Huangt PL., Jain RK. (2001). Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98** : 2604-2609.

Galland F., Karamysheva A., Pebusque MJ., Brog JP., Rottapel R., Dubreuil P., Rosnet O., Birnbaum D. (1993). The FLT4 gene encodes a transmembrane tyrosine kinase related to the vascular growth factor receptor. *Oncogene.* **8**: 1233-1240.

Garland CJ., Plane F., Kemp BK., Cocks TM. (1995). Endothelium-depenent hyperpolarization: A role in the control of vascular tone. *Trend Biol Sci.* **16**: 23-27.

Giordano FJ., Ping P., McKirnan D., Nozaki S., DeMaria AN., Dillmann WH., Mathieu-Costello M., Hammond K. (1996). Intracoronary gene transfer of fibroblast growth factor-5 increases blood flow and contractile function in an ischemic region of the heart. *Nat Med.* **2**: 534-539.

Glagov s., Weisenberg E., Zarins CK., Stankunavicius R., Klottis GJ. (1987). Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *New Engl J Med.* **316**: 1371-1375.

Goldberg MA., and Schneider TJ. (1994). Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J Biol Chem.* **269**: 4355-4359.

Goligorsky MS. (2000). Endothelial cell dysfunction and nitric oxide synthase. *Kidney Intern.* **58**: 1360-1376.

Good DJ., Polverini PJ., Rastinejad F., LeBeau MM., Lemons RS., Frazier WA., Bouck NP. (1990). A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci USA.* **87**: 6624-6628.

Gosh-Choudhury G., Haj-Ahmad Y., Graham FL. (1987). Protein IX a minor component of human adenovirus capsid is essential for the packing of full length genomes. *EMBO J.* **6**: 1733-1739.

Gospodarowicz D. (1976). Humoral control of cell proliferation: the role of fibroblast growth factor in regeneration, angiogenesis, wound healing and neoplastic growth. *Prog Clin Biol Res.* **9**: 1-19.

Gospodarowicz D., Cheng J., Lui GM., Baird A., Bohlen P. (1984). Isolation of brain fibroblast growth factor by heparin-Sepharose affinity chromatography: identity with pituitary fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* **81**: 6963-6967.

Gravanis MB., and Roubin GS. (1989). Histopathologic phenomena at the site of percutaneous transluminal coronary angioplasty: the problem of restenosis. *Hum Pathol.* **20**: 477-485.

Greber UF., Willetts M., Webster P., Helenius A. (1993). Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell.* **75**: 477-486.

Gruberg L., Waksman R., Satler LF., Pichard AD., Kent KM. (2000). Novel approaches for the prevention of restenosis. *Expert Opinion Investigation Drugs.* **9**: 2555-2578.

Guenot O., and Terraube P. (1991) Angioplastie transluminale des coronaires. *Encycl. Med. Chir. (Elsevier, Paris).* *Cardiologie.* **11**-030-T-10.

Gumbiner BM. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell.* **84**: 345-357.

Guo D., Jia Q., Song HY., Warren RS., Donner DB. (1995). Vascular endothelial growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. *J Biol Chem.* **270**: 6729-6733.

Gupta SK., Hassel T., Singh JP. (1995). A potent inhibitor of endothelial cell proliferation is generated by proteolytic cleavage of the chemokine platelet factor 4. *Proc Natl Acad Sci USA*. **92**: 7799-7803.

Hammerschmidt DE. (1999). Development of a gutless vector. *J Lab Clin Med*. **134** : C3.

Hanahan D., and Folkman J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. **86**: 353-364.

Hardy RI., Bove KE., James FW., Kaplan S., Goldman L. (1987). A histologic study of laser-induced transmural channels. *Las Med Surg*. **6**: 563-573.

Hashimoto E., Ogita T., Nakaoka T., Matsuoka R., Takaon A., Kira Y. (1994). Rapid induction of vascular endothelial growth factor expression by transient ischemia in rat heart. *Am J Physiol*. **267**: H1948-54.

He Z., and Tessier-Lavigne M. (1997). Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent semaphorin III. *Cell*. **90**: 739-775.

Heldin CH. (1995). Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*. **80**: 213-223.

Hockel M., Sasse J., Wissler J.H. (1987). Purified monocyte-derived angiogenic substance (angiotropin) stimulates migration, phenotypic changes, and "tube formation" but not proliferation of capillary endothelial cells in vitro. *J Cell Physiol*. **133**: 1-13.

Hockel M., Jung W., Vaupel P., Rabes H., Khaledpour C., Wissler J.H. (1988). Purified monocyte-derived angiogenic substance (angiotropin) induces controlled angiogenesis associated with regulated tissue proliferation in rabbit skin. *J Clin Invest*. **82**: 1075-1090.

Hondermarck H., Courty I., Ledoux D., Blanckaert V., Barritault D., Boilly B. (1990). Evidence of high and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factor in mouse placenta. *Biochem Biophys Res Commun*. **169**: 272-281.

Houck KA., Ferrara N., Winer J., Cachianes G., Li B., Leung DW. (1991). The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol*. **5**: 1806-1814.

Horvath KA, Mansting F, Cummings N, Sherman SK, Cohn LH. Transmyocardial Laser Revascularization: operative techniques and clinical results at two years. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;**111**:1047-53.

Horvath KA, Cohn LH, Cooley DA, Crew JR, Frazier OH, Griffith BP, Kadipasaoglu KA, Lansing A, Mannting F, March R, Mirhoseini MR, Smith C. Transmyocardial laser revascularization: results of a multicenter trial with transmyocardial laser revascularization used as sole therapy for end-stage coronary artery disease. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997;**113**:645-54.

Horvath KA.(2000). Update on clinical trials of transmyocardial laser revascularization. *Cardiac and Vascular Regeneration*. **1**: 63-69.

Hynes RO. (1996). Targeted mutations in cell adhesion genes: What have we learned from them? *Dev Biol*. **180**: 402.

Imbert A., Rosnet O., Marchetto S., Ollendorff V., Birnbaum D. (1994). Characterization of a yeast artificial chromosome from human chromosome band 13q12 containing the FLT1 and FLT3 receptor-type tyrosine kinase genes. *Cytogenet Cell Genet*. **67**: 175-177.

Jeltsch M., Kaipainen A., Joukov V., Meng XJ., Lakso M., Rauvala H., Swartz M., Fukumura D., Jain RK., Alitalo K. (1997). Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science*. **276**: 1423-1425.

Joukov V., Pajusola K., Kaipainen A., Chilov D., Lahtinen I., Kukk E., Saksela O., Kalkkinen N., Alitola K. (1996). A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *Embo J*. **15**: 290-298.

Kaipainen A., Korhonen J., Pajusola K., Aprelikova O., Perisco MG., Terman BI., Alitola K. (1993). Related FLT4, FLT1 and KDR receptor tyrosine kinases show distinct expression patterns in human fetal endothelial cells. *J Exp Med*. **178**: 2077-2088.

Kaipainen A., Korhonen J., Mustonen T., Van Hinsberg V., Fang GH., Dumont D., Breitman M., Alitola K. (1995). Expression of the FLT4 receptor tyrosine kinase becomes restricted to endothelium of lymphatic vessels and some high endothelial venules during development. *Proc Natl Acad Sci USA*. **92** : 3566-3570.

Kaiser D., Freyberg MA., Friedl P. (1997). Lack of hemodynamic forces triggers apoptosis in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **231**: 586-590.

- Kakuta T., Currier JW., Haudenschild CC., Ryan TJ., Faxon DP. (1994). Differences in compensatory vessel enlargement, not intimal formation, account for restenosis after angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit model. *Circ.* **89**: 2809-2815.
- Katoh O., Tauchi H., Kawaishi K., Kimura A., Satow Y. (1995). Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res.* **55**: 5687-5692.
- Keck, PJ., Hauser SD., Krivi G., Sanzo K., Warren T., Feder J., Connolly DT. (1989). Vascular permeability factor, and endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science.* **246**: 1309-1312.
- Kelly TJ. (1984). Adenovirus DNA replication. In: Ginsberg HS (ed) *The adenoviruses*. Plenum, New York, pp271-308.
- Kirshenbaum LA., MacLellan WR., Mazur W., French BA., Schneider MD. (1993). Highly efficient gene transfer to adult rat ventricular myocytes by recombinant adenovirus. *J Clin Invest.* **92**: 381-387.
- Kitsukawa T., Shimizu M., Sanbo M., Hirata T., Taniguchi M., Bekku Y., Yagi T., Fujisawa H. (1997). Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron.* **19**: 995-1005.
- Klagsbrun M., and Folkman J. (1990). Angiogenesis. In: Sporn MB, Roberts AB (eds) *Peptide growth factors and their receptors II*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 549-574.
- Kolodkin AL., Levensgood DV., Rowe EG., Tai YT., Giger RJ., Ginty DD. (1997). Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell.* **90**: 753-762.
- Kornowski R., Fuchs S., Leon MB., Epstein SE. (2000 a). Delivery strategies to achieve therapeutic myocardial angiogenesis. *Circ.* **101**: 454-458.
- Kornowski R., Leon MB., Fuchs S. (2000 b). Electromagnetic guidance for catheter-based transendocardial injection: a platform for intramyocardial angiogenesis ntherapy. *J Am Coll Cardiol.* **35**: 1031-1039.
- Kroll J., and Waltenberger J. (1997). The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells. *J Biol Chem.* **272**: 32521-32527.
- Kwong KF., Kaneilopoulos GK., Nickols JC., Pogwizd SM., Saffitz JE., Schuessler RB., Sundt TM. (1997). Transmyocardial laser treatment denervates canine myocardium. *J Thorac Surg.* **114**: 883-890.



Ladoux A., and Frelin C. (1993). Hypoxia is a strong inducer of vascular endothelial growth factor mRNA expression in the heart. *Biochem Biophys Res Commun.* **195**: 1005-1010.

Lampugnani MG., Resnati M., Raiteri M., Pigott R., Pisacane A., Houen G., Ruco LP., Dejana E. (1992). A novel endothelial specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol.* **118**: 1511-1522.

Lazarous DF., Shou M., Scheinowitz M., Hodge E., Thirumurti V., Kitsiou A., Epstein SE., Unger EF. (1996). Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and the arterial response to injury. *Circ.* **94**: 1074-1082.

Lee J., Gray A., Yuan J., Luoh SM., Avraham H., Wood WI. (1996). Vascular endothelial growth factor -related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**: 1988-1992.

Leung DW., Cachianes G., Kuang WJ., Goeddel DW. Ferrara N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science.* **246**: 1306-1309.

Levy AP., Levy NS., Wegner S., Goldberg MA. (1995 a). Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem.* **270**: 13333-13340.

Levy AP., Levy NS., Loscalzo J., Calderone A., Takahashi N., mYeo KT., Koren G., Colucci WS., Goldberg MA. (1995 b). Regulation of vascular endothelial growth factor in cardiac myocytes. *Circ Res.* **76**: 758-66.

Levy NS., Chung S., Furneaux H., Levy AP. (1998). Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA-binding protein HuR. *J Biol Chem.* **273**: 6417-6425.

Lin H., McManus BM., Kanda T. (1995). Prominence of versican in the early neointimal response to injury by balloon dilataion of coronary arteries: analysis of primary and restenotic lesions obtained by directional atherectomy. *Circ.* **92**: I-424.

Linder V., Majack RA., Reidy MA. (1990). Basic fibroblast growth factor stimulates endothelial regrowth and proliferation in denuded arteries. *J Clin Invest.* **85**: 2004-2008.

Lindner V., Reidy MA., Fingerle J. (1989). Regrowth of arterial endothelium. Denudation with minimal trauma leads to complete endothelial cell regrowth. *Lab Invest.* **61**: 556-563.

- Liu YX., Cox SR., Morita T., Kourembanas S. (1995). Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells identification of a 5' enhancer. *Circ Res.* **77**: 638-643.
- Losordo DW., Vale PR., Symes JF., Dunnington CH., Esakof DD., Maysky M., Ashare AB., Lathi K., Isner M. (1998). Gene therapy for myocardial angiogenesis : initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circ.* **98** : 2800-2804.
- Mack CH., Patel SR., Schwarz EA., Zanzonico P., Hahn RT., Ilercil A., Devereux RB., Goldsmith SJ., Christian TF., Sanborn TA., Kovesdi I., Hackett N., Isom OW., Crystal R. (1998). Biological bypass with the use of adenovirus-mediated gene transfer of the complementary deoxyribonucleic acid for vascular endothelial growth factor 121 improves myocardial perfusion and function in the ischemic porcine heart. *J Thorac Cardiovasc Surg.* **115**: 168-177.
- Madtes DK., Raines EW., Sakariaassen KS., Assoian RK., Sporn MB., Bell GI., Ross R. (1988). Induction of transforming growth factor- $\beta$  in activated human alveolar macrophages. *Cell.* **53**:285-293.
- Maglione D., Guerriero V., Viglietto G., Delli-Bovi P., Persico MG. (1991). Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* **88**: 9267-9271.
- Magovern CJ., Mack CA., Zhang J., Rosengart TK. (1996). Direct in vivo gene transfer to canine myocardium using a replication-deficient adenovirus vector. *Ann Thorac Surg.* **62**:425-34.
- Maisonpierre PC., Suri C., Jones PF., Bartunkova S., Wiegand SJ., Radziejewski C., Compton D., Mc Clain J., Aldrich TH., Papadopoulos N., Daly TJ., Davis S., Sato TN., Yancopoulos GD. (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science.* **277** : 55-60.
- Mandriota SJ., Menoud PA., Pepper MS. (1996). Transforming growth factor- $\beta$  1 downregulates vascular endothelial growth factor receptor-2/flk-1 expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* **271**:11500-11505.
- Matthews W., Jordan GT., Gavin M., Jenkins N., Copeland NG., Lemischka IR. (1991). A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Proc Natl Acad Sci USA.* **88**: 9026-9030.
- Melder RJ., Koenig GC., Witwer BP., Safabakhsh N., Munn LL., Jain RK. (1996). During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth

factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium. *Nat Med.* **2**: 992-997.

Meurice T., Bauters C., Auffray JL., Vallet B., Hamon M., Valero F., Van Belle E., Lablanche Jm., Bertrand ME. (1996). Basic fibroblast growth factor restores endothelium-dependent responses after balloon injury of rabbit arteries. *Circ.* **93**: 18-22.

Meyn MS. (1995). Ataxia-telangiectasia and cellular responses to DNA damage. *Cancer Res.* **55**: 5991-6001.

Migdal M., Huppertz B., Tessler S., Comforti A., Shibuya M., Reich R., Baumann H., Neufeld G. (1998). Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *J Biol Chem.* **273**: 22272-22278.

Millauer B., Witzigmann -Voos S., Schnurch H., Martinez R., Moller NPH., Risau W., Ullrich A. (1993). High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Klf-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell.* **72**: 835-846

Mirhoseini M., Fisher JC., Cayton MM. (1983). Myocardial revascularization by laser. *Lasers Surg Med.* **3**: 241-245.

Mirhoseini M., Shelgikar S., Cayton MM. (1988). New concepts in revascularization of the myocardium. *Ann Thorac Surg.* **45**: 415-420.

Mirhoseini M., Shelgikar S., Cayton MM. (1990). Clinical and histological evaluation of laser myocardial revascularization. *J Clin Laser Med Surg.* **8**: 73-78.

Morishita K., Johnson DE., Williams LT. (1995). A novel promoter for vascular endothelial growth factor receptor (flt-1) that confers endothelial specific gene expression. *J Biol Chem.* **270**: 27948-27953.

Mukhopadhyay D., Tsiokas L., Sukhatme VP. (1995). Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer Res.* **55**: 6161-6165.

Nagle D., Martin-Deleon P., Hough R., Bucan M. (1994). Structural analysis of chromosomal rearrangement associate with the developmental mutations ph, W<sup>19H</sup> and Rw on chromosome 5. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91**: 7237-7241.

Nikkari ST., Jarvelainen HT., Wight TN., Ferguson M., Clowes AW. (1994). Smooth muscle cell expression of extracellular matrix genes after arterial injury. *Am J Pathol.* **144**: 1348-1356.

- Nikol S., and Huehns TY. (2001). Preclinical and clinical experience in vascular gene therapy: advantages over conservative/standard therapy. *J Invas Cardiol.* **13**: 333-338.
- Oelrichs R., Reid HH., Bernard O., Ziemiecki A., Wilks A. (1992). NYK/FLK-1: a putative receptor tyrosine kinase isolated from E10 embryonic neuroepithelium is expressed in endothelial cells of the developing embryo. *Oncogene.* **8**: 11-18.
- Ogawa H., Yasue H., Misumi T., Masuda T., Okumura K., Bannai S., Takanashi N., Tsukada Y. (1992). Plasma Platelet-derived growth factor levels in coronary circulation in unstable angina pectoris. *Am J Cardiol.* **69**: 453-456.
- Ogawa H., Yasue H., Okumura K., Fujii H., Masuda T., Miyao Y., Bannai S., Takanashi N. (1993). Platelet-derived growth factor is released into the coronary circulation after coronary spasm. *Coron Artery Dis.* **4**: 437-442.
- Ogawa S., Oku A., Sawano A., Yamaguchi S., Yazaki Y., Shibuya M. (1998). A novel type of Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF-E (NZ VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J Biol Chem.* **273**: 31273-31282.
- Ohno T., Gordon D., San H. (1994). Gene therapy for vascular smooth muscle cell proliferation after arterial injury. *Science.* **265**: 781-784.
- Okada M., Ikuta H., Shimizu K., Horii H., Nakamura K. (1986). Alternative method of myocardial revascularization by laser: experimental and clinical study. *Kobe J Med Sci.* **32**: 151-161.
- Olivo O., Bhardwaj R., Schulze-Osthoff K., Sorg C., Jacob H.J., Flamme I. (1992). A comparative study on the effect of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), human angiogenic factor (h-AF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) on the choriollantoic membrane of the chick embryo. *Anatom Rec.* **234**:105-115.
- Olofsson B., Pajusola K., Kainpainen A., von Euler G., Joukov V., Saksela O., Orpana A., Pettersson RF., Alitalo K., Eriksson U. (1996). Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**: 2576-2581.
- Ombrellaro MP., Stevens SL., Kerstetter K., Freeman MB., Goldman MH. (1996). Healing characteristics of intraarterial stented grafts: effect of intraluminal position on prosthetic healing. *Surgery.* **120**: 60-70.

- Orlandini M., Marcincicni L., Ferruzzi R., Oliviero S. (1996). Identification of a c-foc-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family. *Proc Natl Acad Sci USA*. **93**: 11675-11680.
- Orlidge A., and D'Amore PA. (1987). Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J Cell Biol*. **105**: 1455-1462.
- Oshima M., Oshima H., Taketo MM. (1996). TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol*. **179**: 297-302.
- Owen ER., Canfield R., Bryant K., Hopwood PR. (1984). Observations on the effects of CO2 laser on rat myocardium. *Microsurgery*. **5**: 149-143.
- Pajusola K., Aprelokova O., Armstrong E., Morris S., Alitalo K. (1993). Two human Flt4 receptor tyrosine kinase isoforms with distinct carboxy terminal tails are produced by alternative processing of primary transcripts. *Oncogene*. **8**: 2931-2937.
- Pajusola K., Aprelikova O., Pelicci G., Weich H., Claesson-Welsh L., Alitalo K. (1994). Signaling properties of Flt4, a proteolytically processed receptor tyrosine kinase related to two VEGF receptors. *Oncogene*. **9**: 3545-3555.
- Papapetropoulos A., Garcia-Cardena G., Mardi JA. (1997). Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of Vascular Endothelial Growth Factor in human endothelial cells. *J Clin Invest*. **100**: 3131-3139.
- Park JE., Chen HH., Winer J., Houvk KA., Ferrara N. (1994). Placenta growth factor. *J Biol Chem*. **269**: 25646-25654.
- Partanen J., Armstrong E., Makela T., Korhonen J., Sandberg M., Renkonen R., Knuutila S., Huebner K., Alitalo K. (1992). A novel endothelial cell surface receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth factor homology domains. *Mol Cell Biol*. **12**: 1698-1707.
- Patel SR., Lee LY., Mack CA. (1999). Safety of direct myocardial administration of an adenovirus vecor encoding vascular endothelial growth factor 121. *Human Gene Therapy*. **10**: 1331-1348.
- Pearlman JD., Hibberd MG., Chuang ML. (1995). Magnetic resonance mapping demonstrates benefits of VEGF-induced myocardial angiogenesis. *Nat Med*. **1**:1085-9.
- Pèbusque MJ., Lafage-Pochitaloff M., galland F., Simonetti J., Armstrong E., Rimokh R., Birnbaum D. (1993). Localization of two tyrosine kinase receptor genes with respect to the 5q35 chromosomal breakpoint of ki-1 lymphoma cell lines. *Genes Chromosom Cancer*. **8**: 119-126.

Pepper MS., Ferrara N., Orci L., Montesano R. (1991). Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **181**: 902-906.

Pepper MS. (1997). Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis and vessel wall integrity. *Cyt Grow Fact Rev.* **8**:21-43.

Pepper MS., and Mandriota SJ. (1998). Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1) expression in vascular endothelial cells. *Exp Cell Res.* **241**: 414-425.

Peters KG., DeVeries C., Williams LT. (1993). Vascular growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci USA.* **90**: 8915-8918.

Plate KH., Breier G., Weich HA., Risau W. (1992). Vascular endothelial growth factor is a potent tumor angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature.* **359**: 845-848.

Plouet J., Schilling J., Gospodarowicz D. (1989). Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT20. *Embo J.* **8**: 3801-3807.

Pollman MJ., Hall JL., Mann MJ., Zhang L., Gibbons GH. Inhibition of neointimal cell bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease. *Nat Med.* **4**: 222-227.

Popowski Y., Verin V., Urban P. (1996). Endocascular B-irradiation after percutaneous transluminal coronary balloon angioplasty. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **36**: 841-845.

Presta M., Moscatelli D., Joseph-Silverstein J., Rifkin DB. (1986). Purification from a human hepatoma cell line of a basic fibroblast growth factor-like molecule that stimulates capillary endothelial cell plasminogen activator production, DNA synthesis, and migration. *Mol Cell Biol.* **6**:4060-4066.

Puri MC., Rossant J., Alitalo K., Bernstein A., Partanen J. (1995). The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. *EMBO J.* **14**: 5884-91.

Quarto N. (1994). Heparan sulfate proteoglycans as transducers of FGF-2 signaling. *J Cell Sci.* **107**: 3201-3212.

- Raines EW., and Ross R. (1993). Platelet-derived growth factor in vivo. In *Cytokines*, Vol. 5, *Biology of platelet-derived growth factor* (B. Westermarck and C. Sorg eds) Karger, Basel, 74-114.
- Raizner AE. (1997). Endovascular radiation using HDR with beta and gamma sources in the porcine model. *Advanced in cardiovascular radiation therapy*. In: abstracts book, ed. *Proceedings of the 9th International Brachytherapy Conference*; 20-21 February 1997; Palm Springs, CA, 1997. P 99-101.
- Rappolee DA., Mark D., Banda MJ., Werb Z. (1988). Wound macrophages express TGF- $\alpha$  and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science*. **241**:708-712.
- Riesson R., Isner JM., Blessing E., Loushin C., Nikol S., Wight TN. (1994). Regional differences in the distribution of the proteoglycans biglycan and decorin in the extracellular matrix of atherosclerotic and restenotic human coronary arteries. *Am J Pathol*. **144**: 962-974.
- Rifkin DB., and Moscatelli D. (1989). Recent development in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol*. **109**: 1-6.
- Risau W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. **386**: 671-674.
- Risau W., and Flamme I. (1995). Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **11**:73.
- Rivard A., Fabre JE., Silver M., Chen D., Murohara T., Kearney M., Magner M., Asahara T., Isner JM. (1999). Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circ*. **99**: 111-120.
- Rohovsky SA., Hirschi KK., D'Amore PA. (1996). Growth factor effects on a model of vessel formation. *Surg Forum*. **47**: 390-391.
- Rosengart TK., Kupferschmid JP., Ferrans VJ., Casscells W., Maciag T., Clark RE. (1998). Heparin-binding growth factor-I (endothelial cell growth factor) binds to endothelium in vivo. *J Vasc Surg*. **7**:311-317.
- Rosengart TK., Lee LY., Patel SR., Sanborn TA., Parikh M., Bergman GW., et al. (1999). Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF<sub>121</sub> cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circ*. **100**: 468-474.
- Ross R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis a perspective for the 1990s. *Nature*. **362**: 801-809.
- Ross R., and Glomset JA. (1976). The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *N Engl J Med*. **295**: 420.

- Sato Y., and Rifkin DB. (1989). Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: Activation of a latent transforming growth factor beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J Cell Biol.* **109**: 309-315.
- Sato TN., Beitz JG., Kato J., Yamamoto M., Clark JW., Calabresi P., Raymond A., Frackelton AR. (1993 a). Platelet-derived growth factor indirectly stimulates angiogenesis in vitro. *Am J Pathol.* **142**: 1119-1130.
- Sato Y., Okmura K., Morimoto A., Hamanaka R., Hamaguchi K., Shimada T., Ono M., Kohno K., Sakata T., Kuwano M. (1993 b). Indispensable role of tissue-type plasminogen activator in growth factor-dependent tube formation of human microvascular endothelial cells in vitro. *Exp Cell Res.* **204**:223-229.
- Sato TN., Tozawa Y., Deutsch U., Wolburg-buchholz K., Fujiwara Y., Gendron-Maguire M., Gridley T., Wolburg H., Risau W., Qin Y. (1995). Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature.* **376**: 70-74.
- Scaria A., Curiel DT., Kay MA. (1995). Complementation of a human adenovirus early region 4 deletion mutant in 93 cells using adenovirus-polylysine-DNA complexes. *Gene Ther.* **2** : 295-298.
- Schreiber AB., Winkler ME., Derynck R. (1986). Transforming growth factors - $\alpha$ : a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science.* **232**: 1250-1253.
- Schulze-Osthoff K., Fruhbeis B., Overwein B., Hilbig B., Sorg C. (1987). Purification and characterization of a novel human angiogenic factor (h-AF). *Biochem Biophys Res Commun.* **146**: 945-952.
- Schwartz ER., Speakman MT., Patterson M. (2000). Evaluation of the effects of intramyocardial injection of DNA expressing vascular endothelial growth factor (VEGF) in a myocardial infarction model in the rat-angiogenesis and angioma formation. *J Am coll Cardiol.* **35**: 1323-1330.
- Seetharam L., Gotoh N., Maru Y., Neufeld G., Yanaguchi S., Shibuya M. (1995). A unique signal transduction from FLT tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor (VEGF). *Oncogene.* **10**: 135-147.
- Semenza GL., Neufeldt MK., Chi SM., Antonarakis SE. (1991). Hypoxia inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3 inches to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* **86**: 2301-2305.



Senger DR., Galli SJ., Dvorak AM., Perruzzi CA., Harvey VS., Dvorak HF. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. **219**: 983-985.

Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi TP., Gertsenstein M., Wu XK., Breitman ML., Schuh AC. (1995). Failure of blood island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. *Nature*. **376**: 62-66.

Shalaby F., Ho J., Stanford WL., Fischer KD., Schuh AC., Schwartz L., Bernstein A., Rossant J. (1997). A requirement for Flk-1 in primitive and definite hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell*. **89**: 981-990.

Shibuya M., Yamaguchi S., Yamane A., Ikeda T., Toja A., Hitoshi M., Sato M. (1990). Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*. **5**: 519-524.

Shih SC., and Claffey K. (1999). Regulation of human vascular endothelial growth factor mRNA stability in hypoxia by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L. *J Biol Chem*. **274** : 1359-1365.

Sholley MM., Ferguson GP., Seibel HR., Montour JL., Wilson JD. (1984). Mechanisms of neovascularization. Vascular sprouting can occur without proliferation of endothelial cells. *Lab Invest*. **51**: 624-634.

Sinnaeve P., Varenne O., Collen D., Janssens S. (1999). Gene therapy in the cardiovascular system: an update. *Cardiovasc Res*. **44**: 498-506.

Smits A., Hermansson M., Nister M., Karnushina I., Heldin CH., Westermark B., Funai K. (1989). Rat brain capillary endothelial cells express functional PDGF B-type receptors. *Growth Factors*. **2**: 1-8.

Soker S., Fidler H., Neufeld G., Klagsbrun M. (1996). Characterization of novel VEGF binding proteins associated with tumor cells that bind VEGF<sub>165</sub> but not VEGF<sub>121</sub>. *J Biol Chem*. **271**: 5761-5767.

Soker S., Gollamudi-Payne S., Fidler H., Charnahelli H., Klagsbrun M. (1997). Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) induced endothelial cell proliferation by a peptide corresponding to the exon-7 encoded domain of VEGF<sub>165</sub>. *J Biol Chem*. **272**: 31582-31588.

Soker S., Takashima S., Miao HQ., Neufeld G., Klagsbrun M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*. **92**: 735-745.

- Spritz R., Strunk K., Lee S., Lu Kuo JM., Ward DC., Le Paslier D. (1994). YAC spanning a cluster of human type III receptor protein tyrosine kinase genes (PDGFRA-KIT-KDR) in chromosome segment 4q12. *Genomics*. **22**:431-436.
- Steg PG. (1996). Physiopathologie de la restenose. In: Monssier J.P., Guerin Y. *Cardiologie interventionnelle chez l'adulte*:Paris, 221-222.
- Steg PG., Tauhlil O., Aubailly N., Caillaud JM., Dedieu JF., Leroux A., Feldman L., Perricaudet M., Branellec D., Deneffe P. (1997). Reduction of the restenosis after angioplasty in an atheromatous rabbit model by suicide gene therapy. *Circ*. **96**: 408-411.
- Stein I., Itin A., Einat P., Skaliter R., Grossman Z., Keshet E. (1998). Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia. *Mol Biol Cell*. **18**: 3112-3119.
- Stein I., Neeman M., Shweiki D., Itin A., Keshet E. (1995). Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coagulation with other ischemia-induced genes. *Mol Cell Biol*. **15**: 5363-5358.
- Stenzinger W., Bruggen J., Macher E., Sorg C. (1983). Tumor angiogenic activity (TAA) production in vitro and growth in the nude mouse by human malignant melanoma. *Eur. J Cancer Clin Oncol*. **19**: 649-656.
- Stetler-Stevenson WG., Hewitt R., Corcoran M. (1996). Matrix metalloproteinases and tumor invasion: from correlation and causality to clinic. *Sem Cancer Biol*. **7**:147-154.
- Stratford-Perricaudet LD., Makeh I., Perricaudet M., Briand P. (1992). Widespread long-term gene transfer to mouse skeletal muscles and heart. *J Clin Invest*. **90**: 626-630.
- Sunderkötter C., Steinbrink K., Goebeler M., Bhardaj R., Sorh C. (1994). Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol*. **55**: 410-422.
- Suri C., Jones PF., Patan S., Bartunkova S., Maisonpierre PC., Davis S., Sato TN., Yancopoulos GD. (1996). Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*. **87**: 1171-80.
- Takahashi T., and Shibuya M. (1997). The 230 mature form of KDR/Flk-1 (VEGF receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene*. **14**: 2079-2089.
- Takeshita S., Zheng LP., Brogi E., Kearney M., Pu LQ., Bunting S., Ferrara N., Symes JF., Isner JM. (1994). Therapeutic angiogenesis: a single intraarterial bolus of

vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest.* **93**: 662-670.

Teirstein PS., Massullo V., Shirish J., Popina JJ., Mintz GS., Russo RJ. (1997). Catheter-based radiotherapy to inhibit restenosis after coronary stenting. *N Engl J Med.* **336**: 1697-1703.

Terman BC., Dougher-Vermazen M., Carrion ME., Dimitrov D., Armellino DC., Bohlen P. (1992). Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial growth factor. *Biochem Biophys Res Commun.* **187**: 1579-1586.

Thomas KA. (1996). Vascular Endothelial Growth Factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem.* **271**: 603-606.

Tio RA., Tkebuchava T., Acheuermann TH. (1999). Intramyocardial gene therapy with naked DNA encoding vascular endothelial growth factor improves collateral flow to ischemic myocardium. *Human Gene Therapy.* **10**: 2953-2960.

Tuder RM., Flook BE., Voelkel NF. (1995). Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia-modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest.* **95**: 1798-1807.

Ueda K., Tamai H., Hsu YS. (1995). Efficacy of translant on restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty in small sized coronary arteries. *Circ.* **92**: I-347.

Ueda M., Becker AE., Tsukada T., Numano F., Fujimoto T. (1991). Fibrocellular tissue response after percutaneous transluminal coronary angioplasty. An histochemical analysis of the cellular composition. *Circ.* **83**: 1327-1332.

Unger EF., Banai S., Shou M., Lazarous DF., Jaklitsch MT., Scheinowitz M., Correa R., Klingbeil C., Epstein SE. (1994). Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in canine model. *Am J Physiol.* **266**: H1588-H1595.

Vale PR., Losordo DW., Milleiken MA. (2000). Left ventricular electromechanical mapping to assess efficacy of phVEGF<sub>165</sub> via a minithoracotomy. *Circ.* **102**: 965-974.

Van Belle E., Witzgenbichler B., Chen D., Silver M., Chang L., Schwall R., Isner JM. (1998). Potentiated angiogenic effect of Scatter factor/hepatocyte growth factor via induction of vascular endothelial growth factor: the case for paracrine amplification of angiogenesis. *Circ.* **97**: 381-390.

Vanderbunder B., Fafeur V., Wernert N. Stehelin D. (1994). Analyse moleculaire de l'angiogenese tumorale. *Med Sci.* **10**: 516-527.

Verin V., Popowski Y., Urban P., Belenger J., Redard M., Costa M., Widmer MC., Rouzaud M., Nouet P., Grob E. (1995). Intraarterial beta irradiation prevents neointimal hyperplasia in a hypercholesteromic rabbit restenosis model. *Circ.* **92**: 2284-2290.

Vikkula M., Boon LM., Carraway KL., Clavert JT., Diamonti AJ., Goumnerov B. (1996). Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase Tie2. *Cell.* **87**: 1181-1190.

Vincent JG., Bardos P., Kruse J., Maass D. (1997). End stage coronary artery disease treated with the transmyocardial CO<sub>2</sub> laser revascularisation: A chance for the inoperable patient. *Eur J Cardiothorac Surg.* **121**: 888-894.

Waksmann R. (1995). Endovascular low-dose irradiation inhibits neointima formation after coronary artery balloon injury in swine and possible role for radiation therapy in restenosis prevention. *Circ* **91**: 1533-1539.

Waltenberger J., Claessonwelch L., Siegbahn A., Shibuya M., Heldin CH. (1994). Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* **269**: 26988-26995.

Waltenberger J., Mayr U., Pentz S., Hombach V. (1996). Functional up-regulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia. *Circ.* **94**: 1647-1654.

Walther W., and Stein U. (2000). Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs*: **60**: 249-271.

Westermarck B., Siegbahn A., Heldin CH., Claesson-Welsh L. (1990). B-type receptor for platelet-derived growth factor mediates a chemotactic response by means of ligand-induced activation of the receptor protein-tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* **87**: 128-132.

Wiederman JG., Marboe C., Amol H., Schwartz A., Weinberger J. (1995). Intracoronary irradiation fails to reduce neointimal proliferation after oversized stenting in a porcine model (abstract). *Circ.* **90** (Suppl I): I-146.

Witzenbichler B., Asahara T., Murohara T., Silver M., Spyridopoulos I., Magner M., Principe M., Kearney M., Hu JS., Isner JM. (1998) Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. *Am J Pathol.* **153**: 381-394.

Yamaguchi TP., Dumont DJ., Conlon RA., Breitman ML., Rosssant J. (1993). Flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development.* **118**: 489-498.

Yanagisawa-Miwa A., Uchida Y., Nakamura F., Tomaru T., Kido H., Kamijo T., Sugimoto T., Kaji K., Utsuyama M., Kurashima C. (1992). Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor. *Science*. **257**: 1401-1403.

Yancopoulos GD. (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*. **227**: 55-60.

Yayon A., Klagsbrun M., Esko JD., Leder P., Ornitz DM. (1991). Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell*. **64**: 841-848.

Ziche M., Morbidelli L., Choudhuri R. (1997). Nitric Oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest*. **99**: 2625-2634.

Zhou H., O'Neal W., Morral N., Beudet AL. (1996). Development of a complementing cell line and a system for construction of adenovirus vectors with E1 and E2a deleted. *J Virol*. **70** : 7030-7038.

## Remerciements

Avant tout, j'aimerais remercier mon directeur de recherche Dr. Guy Leclerc, qui m'a intégrée au sein de son équipe. Je lui suis reconnaissante pour la direction dans mes travaux de recherche ainsi que ses encouragements sur mon cheminement académique. Il m'a donnée les meilleurs outils pour atteindre mes objectifs tout au long de ma présence dans son laboratoire.

J'aimerais aussi remercier mon co-directeur, Dr. Bernard Massie, qui m'a permis de travailler au sein de son équipe et apprendre sur les vecteurs adénoviraux.

Une des mes plus grandes reconnaissances revient à Dr. Jeannette Fareh qui m'a guidée tout au long de ces années de recherche ainsi que lors de la rédaction de cette thèse de doctorat. J'ai reçu d'elle, entre autre, un encouragement constant et de judicieux conseils. J'aimerais la remercier pour sa patience inouïe, sa très grande disponibilité, son enthousiasme scientifique et son amour pour la vérité et son dévouement pour la recherche.

J'aimerais également remercier les autres membres du laboratoire, Dr. Remi Martel, Dr. Louis-Georges Guy, Dr. Luc Lévesque pour leur participation à la lecture de cette thèse et Dr. Pierre Voisine, M. Martin Bouchard, Martin Laflamme, François Boivert et Pascal St-Jacques pour leur grand aide technique lors de l'étude animal et leur enthousiasme. J'aimerais également remercier Mme. Suzanne Fournier et M. François Bergeron pour leur support.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à mes parents, mon frère et ma soeur pour leur support moral et affectif dans la réalisation de cette thèse, ainsi que pour leur exemple de courage.

J'aimerais également remercier tous mes amis pour leur support moral mais plus particulièrement Dr. Anne-Cécile Défaits pour ses conseils lors de la rédaction de cette thèse et Dr. Maryam Sartipour pour ses encouragements constants tout au long de ma thèse.

Ces remerciements ne seraient pas complets si je ne remercie pas mon epoux, Sina, pour sa patience, ses encouragements constants, ses conseils judicieux et ses nombreuses attentions inestimable qui ont été une inspiration et une source de motivation pour terminer ma thèse.

Cette thèse a été effectuée grâce au support financier de la Fondation des Maladies du Coeur du Canada.