

Université de Montréal

**SUREXPRESSON DE TGF- $\beta$ <sub>1</sub> ET CELLULES MUSCULAIRES LISSES  
VASCULAIRES : THÉRAPIE GÉNIQUE *EX VIVO* POUR AMÉLIORER  
LE TRAITEMENT ENDOVASCULAIRE DES ANÉVRISMES  
INTRACRÂNIENS**

Par

Edith Ribourtout

Département de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Maître es sciences en biologie moléculaire

Décembre 2001.

© Edith Ribourtout, 2001



QH

506

U54

2002

V.016

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**SUREXPRESSON DE TGF- $\beta_1$  ET CELLULES MUSCULAIRES LISSES  
VASCULAIRES : THÉRAPIE GÉNIQUE *EX VIVO* POUR AMÉLIORER  
LE TRAITEMENT ENDOVASCULAIRE DES ANÉVRISMES  
INTRACRÂNIENS.**

Présenté par :

Edith Ribourtout

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : D<sup>r</sup> Yves Langelier

Directeur de recherche : D<sup>r</sup> Jean Raymond

Codirectrice : D<sup>r</sup> Anne-Cécile Desfaits

Membre du jury : D<sup>r</sup> Eugenio Rasio

Mémoire accepté le

À ma mère et mon père,  
modèles exemplaires de détermination et de motivation.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout particulièrement le D<sup>r</sup> Jean Raymond pour l'accueil chaleureux au sein de son laboratoire, les conseils et les encouragements dont il a fait preuve.

Je remercie aussi très chaleureusement ma codirectrice, Anne-Cécile Desfaits, pour les idées, les conseils et le soutien qu'elle m'a apporté tout au long de mon cheminement.

Je voudrais aussi remercier Igor Salazkin, Guylaine Gévry et Anick Lambert pour leur précieux soutien technique.

Je remercie également :

Le D<sup>r</sup> Bernard Massie, de l'Institut de Recherche en Biotechnologie du Canada, pour nous avoir si généreusement fourni les vecteurs adénoviraux et la lignée cellulaire.

Tout le personnel de l'animalerie du Centre de Recherche de l'Hôpital Notre-Dame pour leur excellent travail et leur disponibilité.

Denis Rodrigue, du département de pathologie de l'Université de Montréal, pour son aide technique en pathologie.

Et tous ceux et celles qui, de près ou de loin, ont permis de rendre ce projet réalisable.

L'institut de recherche en santé du Canada pour le soutien financier.

## SOMMAIRE

Le traitement endovasculaire est efficace pour le traitement des anévrismes intracrâniens rompus, mais les récurrences sont fréquentes. Nous avons démontré que : 1) la greffe de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) autologues améliorerait les résultats angiographiques de l'embolisation 2) le TGF- $\beta_1$  (transforming growth factor- $\beta_1$ ) délivré *in vivo* augmentait l'épaisseur néointimale au collet. Notre but était d'améliorer les résultats à long terme de l'embolisation des anévrismes par une greffe *in situ* de CMLVs surexprimant le TGF- $\beta_1$ .

Les CMLVs provenant de cultures primaires d'artères fémorales étaient infectées avec un vecteur adénoviral. L'expression du vecteur et l'activité biologique du transgène ont été mesurées par ELISA, par test d'inhibition de croissance et par synthèse de collagène. La viabilité et la synthèse d'ADN des CMLVs normales ou surexprimant le transgène ont été comparées. Les CMLVs surexprimant soit le TGF- $\beta_1$ /GFP (green fluorescent protein) ou la GFP ont été réimplantées dans les anévrismes et les résultats de l'embolisation ont été comparés.

Les CMLVs étaient infectées efficacement. L'activité biologique du TGF- $\beta_1$  a été démontrée par tests d'inhibition de croissance et synthèse

de collagène. Les anévrismes traités démontraient à 3 semaines une surexpression du transgène, une amélioration des résultats angiographiques et une néointima plus épaisse par rapport aux résultats historiques. Il n'y avait cependant pas de différence significative entre les CMLVs/TGF- $\beta_1$  et les CMLVs/GFP.

Les greffes cellulaires peuvent améliorer la guérison des anévrismes traités par embolisation. Les CMLVs peuvent être transfectées et sécréter du TGF- $\beta_1$  actif *in vivo*. Le bénéfice potentiel de cette stratégie n'a pu être démontré dans notre modèle.

Mots clés : Anévrisme, thérapie génique, vecteur adénoviral, facteur de croissance, TGF- $\beta_1$ .

## SUMMARY

Recurrences are frequent after endovascular treatment of cerebral aneurysms. We have previously shown that : 1) autologous vascular smooth muscle cell (VSMC) grafts improve angiographic results after embolisation and 2) local *in vivo* delivery of transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) can increase neointimal thickness. Our goal was to improve long-term results of aneurysm embolisation using *in situ* grafts of VSMCs overexpressing TGF- $\beta_1$ .

VSMCs from femoral arteries were transduced *in vitro*, with an adenoviral vector. Long-term vector expression and transgene biological expression were assessed by ELISA, growth inhibition assay and collagen synthesis. We also compared transduced and untransduced VSMCs regarding their viability and DNA synthesis. Autologous VSMCs overexpressing either TGF- $\beta_1$ /GFP (green fluorescent protein) or GFP were reimplanted in lateral wall venous pouch carotid aneurysms and results were compared.

VSMCs were efficiently transduced. TGF- $\beta_1$  was biologically active as assessed by growth inhibition assay, collagen synthesis and DNA synthesis. Aneurysms treated with cellular grafts showed transgene expression, improved angiographic results and thicker neointimas as

compared to historical controls, but there was no significant difference between VSMCs/TGF- $\beta_1$  and VSMCs/GFP.

Cellular grafts can promote healing of aneurysms treated by embolisation. VSMCs can be transduced to secrete active TGF- $\beta_1$ . Gene expression persists for at least 3 weeks *in vivo*. The potential benefit of this strategy could not be demonstrated in this model.

Key words : Aneurysm, gene therapy, adenovirus vector, growth factor,  
TGF- $\beta_1$ .

## LISTE DES TABLEAUX

I.	Résumé des objectifs spécifiques.....	40
II.	Sommaire des scores angiographiques.....	88

## LISTE DES FIGURES

1.	Angiographie d'une récurrence clinique d'un anévrisme intracrânien...	7
2.	Récurrences d'anévrismes expérimentaux.....	9
3.	Schématisme du dimère de TGF- $\beta_1$ .....	18
4.	Schématisme de l'ancrage du complexe latent TGF- $\beta_1$ /LAP/LTBP à la matrice extracellulaire.....	20
5.	Voie de signalisation classique du TGF- $\beta_1$ .....	23
6.	Schématisme de la guérison ou de la recanalisation d'un anévrisme après l'embolisation.....	36
7.	Représentation schématique du vecteur de transfert adénoviral AdTR5-TGFbetaDCGFP.....	43
8.	Construction chirurgicale d'un anévrisme.....	52
9.	Synthèse d'ADN par les CMLVs en réponse à du TGF- $\beta_1$ et à du PDGF-BB.....	58
10.	Prolifération cellulaire des CMLVs en réponse à du TGF- $\beta_1$ et à du PDGF-BB.....	59

11.	Photos <i>in vitro</i> , des CMLVs surexprimant le TGF- $\beta_1$ /GFP ou la GFP seule, à une MOI de 300.....	62
12.	Sécrétion de TGF- $\beta_1$ recombinant par les CMLVs infectées.....	63
13.	Synthèse d'ADN par les CMLVs en réponse à leur sécrétion de TGF- $\beta_1$ recombinant.....	66
14.	Synthèse d'ADN par les CMLVs en réponse à leur l'expression de GFP recombinante.....	67
15.	Prolifération cellulaire des CMLVs en réponse à leur sécrétion de TGF- $\beta_1$ recombinant.....	68
16.	Prolifération cellulaire des CMLVs en réponse à leur l'expression de GFP recombinante .....	69
17.	Sécrétion de collagène par les CMLVs en réponse à leur sécrétion de TGF- $\beta_1$ recombinant .....	76
18.	Synthèse d'ADN par les MLEC-32 et les M1vLu en réponse à du TGF- $\beta_1$ .....	77
19.	Prolifération cellulaire des MLEC-32 et des M1vLu en réponse à du TGF- $\beta_1$ .....	78
20.	Synthèse d'ADN par les MLEC-32 en réponse à du TGF- $\beta_1$ recombinant produit par les CMLVs.....	79
21.	Prolifération cellulaire des MLEC-32 en réponse à du TGF- $\beta_1$ recombinant produit par les CMLVs .....	80

22.	Expression <i>in vivo</i> de la GFP.....	85
23.	Immunobuvardage du TGF- $\beta_1$ recombinant surexprimé par les CMLVs.....	86
24.	Résultats angiographiques.....	87
25.	CMLVs greffées <i>in vivo</i> .....	89

## ABRÉVIATIONS

<b>ADN</b>	acide désoxyribonucléique
<b>ARN</b>	acide ribonucléique
<b>CMLs</b>	cellules musculaires lisses.
<b>CMLVs</b>	cellules musculaires lisses vasculaires.
<b>ELISA</b>	« enzyme-linked immunosorbent assay » : essai par immunosorbant lié à une enzyme
<b>GFP</b>	« green fluorescent protein » : protéine verte fluorescente.
<b>LAP</b>	« latency associated peptide » : peptide associé à la latence.
<b>LTBP</b>	« latent TGF- $\beta$ binding proteins » protéines de liaison du TGF- $\beta$ latent.
<b>MOI</b>	« multiplicity of infection » : multiplicité d'infection.
<b>PDGF-BB</b>	« platelet-derived growth factor-BB » : facteur de croissance plaquettaire.
<b>TGF-<math>\beta</math> 1 à 3</b>	« transforming growth factor-beta » : facteur de croissance transformant-beta type 1 à 3.
<b>TGF-<math>\beta</math>R 1à 3</b>	« transforming growth factor-beta receptor » : récepteur de type 1 à 3 du TGF- $\beta$ .
<b>SMAD</b>	nom donné à la famille élargie des protéines homologues de Sma chez <i>C. elegans</i> et de Mad chez <i>Drosophila</i> .

## TABLE DES MATIÈRES

Dédicace

Remerciements

Sommaires

Liste des tableaux

Listes des figures

Abréviations

### 1. INTRODUCTION

<b>1.1</b>	<b>ANÉVRISMES INTRACRÂNIENS.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Démographie	
1.1.2	Pathologie	
1.1.3	Étiopathogenèse	
1.1.4	Manifestations cliniques	
1.1.5	Complications d'une rupture anévrismale	
1.1.6	Traitement chirurgical et approche endovasculaire	
1.1.7	Formation néointimale, guérison vasculaire après embolisation et récidence	
<b>1.2</b>	<b>ANÉVRISMES INTRACRÂNIENS ET VSMCs.....</b>	<b>10</b>
1.2.1	Généralités	
1.2.2	Modulation phénotypique des CMLVs et guérison vasculaire	
1.2.3	Matrice extracellulaire, collagène et guérison des anévrismes	
1.2.4	Collagène de type I	
<b>1.3</b>	<b>ANÉVRISMES INTRACRÂNIENS ET TGF-<math>\beta</math><sub>1</sub>.....</b>	<b>16</b>
1.3.1	Généralités	
1.3.2	Caractérisation moléculaire du TGF- $\beta$ <sub>1</sub>	
1.3.3	Origine cellulaire du TGF- $\beta$	

- 1.3.4 Synthèse de TGF- $\beta_1$
- 1.3.5 Activation du TGF- $\beta_1$
- 1.3.6 Récepteur du TGF- $\beta_1$
- 1.3.7 Signalisation du TGF- $\beta_1$
- 1.3.8 Activités biologiques du TGF- $\beta_1$

**1.4 THÉRAPIE GÉNIQUE.....26**

- 1.4.1 Généralités
- 1.4.2 Voie d'administration
- 1.4.3 Le vecteur de transfert
- 1.4.4 Adénovirus et vecteur adénoviral

**2. PRÉSENTATION DU PROJET DE RECHERCHE**

**2.1 HYPOTHÈSES.....35**

**2.2 BUT DU PROJET DE RECHERCHE.....37**

**2.3 OBJECTIFS SPÉCIFIQUES.....38**

**3 MATÉRIELS ET MÉTHODES**

**3.1 CULTURES CELLULAIRES.....42**

- 3.1.1 Culture primaire des CMLVs
- 3.1.2 Culture des lignées cellulaires
- 3.1.3 Infection virale
- 3.1.4 Ensemencement des CMLVs sur éponges de collagène

**3.2 MÉTHODOLOGIE *IN VITRO*.....45**

- 3.2.1 Synthèse d'ADN
- 3.2.2 Test de prolifération cellulaire
- 3.2.3 Détermination immunologique du TGF- $\beta_1$
- 3.2.4 Synthèse de collagène
- 3.2.5 Immunobuvardage
- 3.2.6 Tests statistiques

**3.3 MÉTHODOLOGIE *IN VIVO*.....51**

3.3.1 Modèle animal

3.3.2 Macrophotographie et histopathologie

**4. RÉSULTATS**

**4.1 CMLVs ET FACTEURS DE CROISSANCE *IN VITRO*.....56**

4.1.1 Synthèse d'ADN

4.1.2 Prolifération cellulaire

**4.2 EFFICACITÉ DE L'INFECTION *IN VITRO*.....60**

4.2.1 Visualisation en microscopie à fluorescence

4.2.2 Dosage de la concentration de TGF- $\beta_1$  recombinant

**4.3 CMLVs ET TGF- $\beta_1$  RECOMBINANT *IN VITRO*.....64**

4.3.1 Synthèse d'ADN

4.3.2 Prolifération cellulaire

**4.4 EFFICACITÉ BIOLOGIQUE DU TGF- $\beta_1$  RECOMBINANT  
*IN VITRO*.....70**

4.4.1 Synthèse de collagène

4.4.2 Tests d'inhibition de croissance

4.4.2.1 Caractérisation des deux lignées cellulaires

4.4.2.1.1 Synthèse d'ADN

4.4.2.1.2 Prolifération cellulaire

4.4.2.2 Caractérisation du TGF- $\beta_1$  recombinant

4.4.2.2.1 Synthèse d'ADN

4.4.2.2.2 Prolifération cellulaire

**4.5 GREFFES DE CMLVs SUREXPRIMANT  
LE TGF- $\beta_1$ /GFP OU LA GFP.....81**

4.5.1 Rétention de l'expression du transgène

4.5.1.1 Microscopie à fluorescence

- 4.5.1.2 Immunobuvardage
- 4.5.2 Effets biologiques sur la guérison ou la récurrence anévrysmale
  - 4.5.2.1 Résultats angiographiques
  - 4.5.2.2 Macrographie et histopathologie

## 5. DISCUSSION

<b>5.1</b>	<b>LES CMLVs RÉPONDENT AUX FACTEURS DE CROISSANCE.....</b>	<b>93</b>
<b>5.2</b>	<b>LES CMLVs EXPRIMENT EFFICACEMENT LES VECTEURS ADÉNOVIRAUX.....</b>	<b>97</b>
<b>5.3</b>	<b>LE TGF-<math>\beta_1</math> RECOMBINANT SÉCRÉTÉ PAR LES CMLVs EST BIOLOGIQUEMENT ACTIF.....</b>	<b>99</b>
<b>5.4</b>	<b>LES CMLVs GREFFÉES <i>IN VIVO</i> SURVIVENT ET EXPRIMENT LE TRANSGÈNE PENDANT AU MOINS 3 SEMAINES.....</b>	<b>102</b>
<b>5.5</b>	<b>LA GREFFE DE CMLVs AMÉLIORE LES RÉSULTATS ANGIOGRAPHIQUES DE L'EMBOLISATION DES ANÉVRISMES.....</b>	<b>105</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>108</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>109</b>

## **1. INTRODUCTION**

---

## **1.1 ANÉVRISMES INTRACRÂNIENS**

### **1.1.1 Démographie**

Les anévrismes se retrouvent fréquemment au niveau de la circulation intracrânienne. En Amérique du Nord, approximativement 1 à 8% de la population porte un anévrisme intracrânien asymptomatique. La rupture de l'anévrisme cause une hémorragie cérébrale, un événement qui survient chez 28 000 patients par an<sup>1, 2</sup>. Cette incidence est probablement sous-estimée : un tiers des patients décède avant l'arrivée à l'hôpital. L'âge moyen de la rupture anévrismale se situe autour de 45-50 ans, avec une légère prépondérance féminine<sup>3, 4</sup>. La rupture anévrismale est très rare voire exceptionnelle chez l'enfant<sup>5</sup>.

### **1.1.2 Pathologie**

Les anévrismes intracrâniens sont classifiés, selon leur apparence morphologique, en trois catégories : les anévrismes sacculaires, les anévrismes fusiformes et les anévrismes disséquants. Les anévrismes intracrâniens les plus communs sont les anévrismes sacculaires qui correspondent à une distension kystique localisée de la paroi d'un vaisseau. Ils prennent généralement origine à une bifurcation artérielle ou de façon plus occasionnelle sur la paroi latérale d'une artère non ramifiée<sup>6</sup>. La majorité des anévrismes sont des anévrismes vrais, c'est-à-

dire qu'ils contiennent au moins quelques couches habituellement retrouvées dans la paroi des artères normales. Typiquement, la média et le feuillet élastique de l'artère normale prennent fin au collet de l'anévrisme; en conséquence la paroi de l'anévrisme proprement dit ne contient que l'intima et l'adventice<sup>7, 8, 9</sup>. Un caillot plus ou moins organisé est parfois présent dans la lumière de l'anévrisme. Des modifications dans les fibres élastiques sont souvent perceptibles à l'autopsie, au niveau de la paroi des artères non anévrismales chez le même sujet<sup>10</sup>.

### **1.1.3 Étiopathogénèse**

La pathogénèse de la majorité des anévrismes intracrâniens n'est pas connue. Il est généralement accepté que des facteurs acquis, tels un stress hémodynamique, joueraient un rôle important dans le développement des anévrismes<sup>11, 12</sup>. De plus, des facteurs génétiques semblent aussi prédisposer à la formation d'anévrismes intracrâniens. De nombreuses maladies héréditaires du tissu conjonctif y sont associées telles que le syndrome d'Ehlers-Danlos de type IV, le syndrome de Marfan, la neurofibromatose de type I et la polykystose rénale autosomale dominante<sup>13</sup>. De plus, une surincidence familiale est reliée à la formation d'anévrismes intracrâniens sans toutefois être associée à une quelconque maladie du tissu conjonctif<sup>14</sup>. L'augmentation de la fréquence des anévrismes peut aussi être reliée à d'autres conditions, telles que les

maladies cardiaques congénitales, la dysplasie fibromusculaire, l'anémie à hématies falciformes ou des facteurs à risques environnementaux comme le tabagisme<sup>15, 16, 17, 18</sup>. Ils peuvent aussi être d'origine mycotique ou traumatique, mais ces causes sont exceptionnelles<sup>19</sup>.

Certaines anomalies moléculaires sont caractéristiques de la paroi anévriasmale. Par exemple, on retrouve une déficience en collagène de type III comparativement aux vaisseaux intracrâniens normaux, ce qui pourrait être attribuable à une augmentation de l'activité des métalloprotéinases de la matrice (MMPs). En plus d'une désorganisation des protéines de la membrane basale, il peut y avoir chez certains patients atteints une expression anormale des facteurs de croissance liés à l'angiogenèse<sup>20</sup>.

Bien que de nombreuses maladies soient associées à la formation d'anévrismes, il semble que la majorité soit due à un stress hémodynamique, une lésion initiale ou un stress mécanique provoqué par une hypertension vasculaire, une plaque d'athérome ou autres, induisant des changements dégénératifs à l'intérieur même de la paroi. Ils prennent généralement origine au niveau d'une zone de moindre résistance de la paroi artérielle, où le stress hémodynamique est à son maximum, et progresse lentement vers la formation de l'anévrisme proprement dit<sup>11, 21</sup>.

Le flux sanguin intra-anévrismal est un phénomène important qui contribue à la croissance et éventuellement à la rupture de l'anévrisme. Les régions de forte pression dépendent du flux sanguin entrant dans l'anévrisme qui sont déterminées par la géométrie de la lésion et par le débit sanguin dans l'embranchement. Typiquement, la trajectoire du flux sanguin comprend trois zones distinctes et caractéristiques au niveau d'un anévrisme dit « latéral » : a) la zone d'entrée qui se situe à la paroi distale du collet, b) la zone de sortie qui est proximale au collet et c) la zone centrale de circulation circulaire lente<sup>22, 23, 24</sup>. La trajectoire est beaucoup plus complexe et difficile à prédire dans les anévrismes de bifurcation. Comme la formation des anévrismes est un phénomène progressif, ils ont tendance à prendre de l'expansion avec le temps<sup>25</sup>.

#### **1.1.4 Manifestations cliniques**

La majorité des anévrismes intracrâniens demeurent asymptomatiques jusqu'au jour de leur rupture. Cette rupture cause une hémorragie sous-arachnoïdienne qui est la première manifestation de la présence d'un anévrisme chez 85-95% des patients et dont l'expression clinique est variée, allant de la céphalée au coma profond<sup>26</sup>. De nombreux symptômes peuvent parfois mener à la découverte d'un anévrisme intracrânien avant sa rupture : une paralysie survenant au niveau du

visage, une dilatation des pupilles, une perte du réflexe photomoteur, des douleurs au niveau des orbites, une cervicalgie postérieure<sup>27</sup>.

### **1.1.5 Complications d'une rupture anévrismale**

De 30 à 50% des ruptures anévrismales conduisent au décès du malade avant toute intervention médicale ou chirurgicale. Si le patient survit à l'hémorragie, il est exposé à un certain nombre de complications. Bien que la rupture anévrismale soit extrêmement brève et que l'hémostase de la brèche survienne de façon instantanée, elle demeure très fragile<sup>28, 29</sup>. La récurrence hémorragique est maximale dans les premiers jours qui suivent la rupture initiale, ce qui explique la nécessité d'un traitement chirurgical ou endovasculaire précoce. Le vasospasme artériel est une complication majeure de l'hémorragie sous-arachnoïdienne, qui peut survenir à partir du quatrième jour. Il s'agit d'une réduction du calibre artériel qui peut demeurer localisée au niveau de l'artère porteuse de l'anévrisme ou être plus diffuse. La baisse d'irrigation dans le territoire concerné par le vasospasme peut-être responsable d'une ischémie cérébrale<sup>30, 31</sup>. D'autres déficits neurologiques peuvent survenir suite à une complication de l'hémorragie telle que l'hydrocéphalie aiguë ou l'hypertension intracrânienne<sup>32</sup>.

### **1.1.6 Traitement chirurgical et approche endovasculaire**

Historiquement, la chirurgie des anévrismes a débuté au cours des années 30. Il s'agissait alors, soit d'enrober le sac anévrisimal avec des lambeaux musculaires, soit de ligaturer la carotide. Ce n'est qu'après la seconde guerre mondiale que l'on a commencé à exclure l'anévrisme lui-même par une ligature, puis par la mise en place d'un clip. Depuis, les techniques de dissection se sont nettement améliorées grâce aux progrès de la neuroanesthésie d'une part et à l'apparition du microscope opératoire de l'autre. Aujourd'hui, la chirurgie est le traitement classique des anévrismes intracrâniens. L'objectif de la chirurgie est de poser un ou plusieurs clips sur le collet anévrisimal après une dissection précise du vaisseau porteur et du collet, afin d'exclure totalement l'anévrisme de la circulation<sup>33</sup>. La chirurgie comporte des risques de complications (rupture peropératoire, ischémie cérébrale, etc.), entre autres, chez les patients trop malades ou âgés, ou encore chez les patients porteurs d'anévrismes plus difficilement opérables tels que les anévrismes carotido-ophtalmiques ou basilaires situés à des endroits moins faciles d'accès<sup>34, 35, 36</sup>.

La nécessité d'une alternative thérapeutique moins invasive a conduit au développement de l'approche endovasculaire. Son principe repose aujourd'hui sur l'occlusion de l'anévrisme par des microspires métalliques (coils) ou des microspires en platine détachables (GDCs, « Guglielmi

Detachable Coils ») qui sont mises en place dans la lumière anévrismale par un microcathéter introduit par voie fémorale<sup>37, 38</sup>. Les principaux avantages de cette méthode résident en l'absence de craniotomie, de rétraction du parenchyme cérébral et de manipulation des vaisseaux cérébraux. Ce traitement réussi à prévenir le resaignement en phase aiguë. Malheureusement, il est incomplet dans 50% des cas, et mène à des récives précoces chez au moins 20% des patients, ce qui nécessite un retraitement souvent inefficace et risqué<sup>35</sup>. À l'heure actuelle, environ 10% des patients sont traités par voie endovasculaire. Un nombre beaucoup plus élevé (60-80%) pourrait en bénéficier, si le problème des récives était diminué, en favorisant la guérison au collet des anévrismes (figure 1).



**Figure 1 : Angiographie d'une récive clinique d'un anévrisme intracrânien.**

Récive 2 ans après traitement endovasculaire d'un anévrisme intracrânien traité à l'aide de filaments de platine. (→) zone de récive.

### **1.1.7 Formation néointimale, guérison vasculaire après embolisation et récursive**

Les phénomènes de guérison vasculaire, responsables du rétablissement de l'intégrité de la paroi, impliquent la formation d'un thrombus au sein de l'anévrisme, la migration et la prolifération de CMLVs ou myofibroblastes ainsi que la synthèse et la sécrétion de matrice extracellulaire. La collagénisation et l'endothélisation du thrombus se font simultanément. Les cellules endothéliales, qui normalement maintiennent la paroi vasculaire non thrombogène, migrent rapidement à la surface du caillot suivant un mécanisme analogue à celui retrouvé lors de l'angiogenèse ce qui conduit à la formation de fentes de recanalisation croissantes responsables de récurrences<sup>39</sup>. Ainsi, l'amélioration de la guérison des anévrismes intracrâniens vise généralement à : 1) diminuer la recanalisation du thrombus et 2) stimuler la formation de la néointima au collet des anévrismes traités par embolisation.

Des études *in vivo* ont déjà montré l'efficacité des facteurs de croissance ou de greffes cellulaires à stimuler la formation néointimale au collet des anévrismes. Des cellules prélevées deux semaines après embolisation, au collet des anévrismes porcins, conduisent à des cultures de cellules exprimant l' $\alpha$ -actine. Ces cellules ressemblent et se comportent comme des cellules néointimales prélevées de carotides soumises à une

angioplastie et elles répondent favorablement *in vitro* aux facteurs de croissance classiques associés à la formation néointimale, soient le PDGF-BB et le TGF- $\beta_1$ <sup>40, 41</sup>. Ces facteurs de croissance, délivrés localement par des éponges intra-anévrismales, ont permis d'épaissir la néointima de façon significative au collet des lésions traitées. Par contre, le modèle canin a une forte tendance à récidiver, même suite à l'ajout de facteurs de croissance délivrés localement. La greffe de cellules prélevées de la média des artères fémorales, au niveau de l'anévrisme a permis d'augmenter l'épaisseur néointimale au collet des anévrismes traités et réduisent l'incidence de récurrences<sup>42</sup> (figure 2).



**Figure 2 : Récidives d'anévrismes expérimentaux.**

Macrophotographies du collet (A) et tranche d'une section axiale (B) d'un anévrisme traité avec une éponge de collagène montrant le collet perméable et la recanalisation au pourtour de l'éponge. Un mécanisme identique pourrait expliquer la récurrence au collet d'un anévrisme traité avec les coils (C) utilisés en pratique courante.

## 1.2 ANÉVRISMES INTRACRÂNIENS ET CELLULES MUSCULAIRES LISSES VASCULAIRES

### 1.2.1 Généralités

Dès le début du XX<sup>ème</sup> siècle les CMLs ont été cultivées *in vitro*. Champy fut le premier à publier des notes préliminaires décrivant ces cellules allongées avec fibrilles, perdant cette caractéristique morphologique suite à la répétition mitotique<sup>43</sup>. Par la suite, Laqueur a noté des contractions spontanées dans les explants viscéraux de CMLs, puis Lewis et Lewis ont décrit une coloration mitochondriale pour les CMLs<sup>44, 45</sup>. Ce n'est que plus tard que l'attention a été portée sur les cultures de CMLVs et la caractérisation des mécanismes cellulaires sous-jacents.

La fonction première des CMLVs matures est de maintenir le tonus vasculaire en réponse à une variété de stimuli hormonaux et hémodynamiques : structurellement cette fonction se traduit par la présence de filaments contractiles dans 75% du volume cytoplasmique et d'une petite quantité d'organelles situées dans la région périnucléaire<sup>46</sup>. Les CMLVs différenciées, retrouvées dans la média des vaisseaux sanguins normaux, présentent un niveau prolifératif et une production de protéines de la matrice peu élevés. Ces processus de prolifération et de sécrétion s'accélèrent pendant le développement du système vasculaire

et le remodelage vasculaire. Une transformation phénotypique des cellules est nécessaire afin qu'elles puissent accomplir leurs nouvelles fonctions<sup>47</sup>.

### **1.2.2 Modulation phénotypique des CMLVs et guérison vasculaire**

Lors des phénomènes de guérison enclenchés par des traumatismes variés, les CMLVs subissent des changements phénotypiques leur permettant d'accomplir des fonctions non-contractiles, incluant la réplication, la migration ainsi que l'élaboration et la dégradation de protéines de la matrice extracellulaire<sup>48</sup>. Les premières hypothèses, évoquant le concept de modulation phénotypique des CMLVs, reviennent à Wissler en 1967, qui présumait que les CMLVs étaient le seul type cellulaire de la média artérielle. Cette modulation phénotypique, suivant cette hypothèse, était une composante pathologique importante de l'athérosclérose<sup>49</sup>. Le concept a été supporté par les découvertes subséquentes voulant que les cellules de la média artérielle dispersées enzymatiquement et mises en culture adoptent les propriétés des cellules moins différenciées ainsi que les caractéristiques des CMLVs retrouvées dans les lésions vasculaires<sup>50, 51, 52</sup>. Dès lors, le paradigme prévalant voulait que les CMLVs dans des conditions de stress perdent leur fonction contractile et acquièrent une fonction synthétique, tout en gardant la

possibilité de revenir à leur état contractile plus spécialisé. Par exemple, les CMLVs seraient en grande partie responsables de la formation néointimale retrouvées dans la resténose<sup>53</sup>. Cependant, la relation entre la différenciation et la prolifération des CMLVs n'est pas définitive et ne peut être définie comme étant une relation mutuellement inclusive ou exclusive<sup>40</sup>. Bien que des changements d'expression des marqueurs de différenciation, tels que la chaîne lourde et la chaîne légère de la myosine ainsi que la protéine  $\alpha$ -actine du muscle lisse, aient parfois été identifiés et reliés au phénotype mitotique, il n'y a pas d'évidence absolue qu'elles retournent à un état pluripotentiel : il s'agit plutôt d'une modulation phénotypique passant d'un état contractile prédominant à un état mitotique ou synthétique prédominant<sup>54, 55, 56, 57</sup>.

L'expression du phénotype synthétique des CMLVs impliquant la prolifération, la migration et la synthèse de composantes matricielles constitue une caractéristique essentielle des CMLVs impliquées dans le phénomène de guérison des anévrismes traités par embolisation. Si la présence de ces cellules mésenchymateuses  $\alpha$ -actine positive est bien démontrée en pathologie et en culture *in vitro* du tissu néointimal retrouvé au collet des anévrismes, la provenance de ces cellules au cours du remodelage vasculaire demeure hypothétique. Il pourrait s'agir de CMLVs migrant de la paroi artérielle ou de l'anévrisme, de myofibroblastes en

provenance de l'adventice, ou encore de cellules souches circulantes à destinée mésenchymateuse capables de se différencier en réponse à un stimulus environnemental ou à des facteurs de croissance (comme le PDGF-BB) et d'envahir le thrombus. Quelle que soit leur origine, ou leur nature, le rôle premier de ces cellules est de produire du collagène afin de remplacer le thrombus par un tissu cicatriciel plus définitif<sup>58, 59, 60, 61, 62</sup>.

### **1.2.3 Matrice extracellulaire, collagène et guérison des anévrismes**

Une grande diversité de macromolécules sont répertoriées au niveau de la matrice extracellulaire. Ces molécules participent aux échanges permanents existant entre les cellules et entre la matrice et les cellules. L'assemblage de ce réseau de macromolécules confère au tissu conjonctif des propriétés biomécaniques et fonctionnelles variées bien ajustées à leurs fonctions. La matrice extracellulaire est un assemblage complexe de collagène, d'élastine, de glycoprotéines et de protéoglycans. Dans les artères adultes normales, l'interaction entre la matrice extracellulaire et les CMLVs semble être importante pour le maintien de la différenciation des CMLVs. La matrice ne régit pas seulement l'intégrité mécanique de la paroi des vaisseaux sanguins, mais comporte tout un répertoire de ligands solubles et insolubles capables d'induire au niveau des cellules environnantes des signaux pour contrôler la prolifération, la

migration, la différenciation et la survie cellulaire. En condition de reconstruction artérielle, la matrice extracellulaire peut être rapidement remodelée par une combinaison de synthèse, de dégradation protéolytique et de régulation de l'assemblage de ces molécules matricielles. Toutes ces actions réunies contribuent aux changements dynamiques du comportement des CMLVs<sup>63, 64, 65</sup>.

Suite à l'embolisation d'un anévrisme intracrânien, la guérison dépend de la formation d'une néointima au collet de l'anévrisme afin de sceller de façon permanente l'entrée de l'anévrisme. Comme il s'agit de fermer un orifice, où la circulation sanguine se fait à haut débit, la formation du thrombus et la migration des CMLVs sécrétant du collagène sont cruciales à la formation de cette néointima. Le thrombus sert de matrice provisoire pour l'invasion des CMLVs à la surface et à l'intérieur de l'agent embolisant. En absence de cette matrice provisoire, les cellules ne peuvent pas coloniser l'agent embolisant soumis à une forte circulation. La formation néointimale est un processus nécessitant autant la présence de la matrice provisoire que des CMLVs. Les CMLVs sont responsables de l'élaboration d'un tissu cicatriciel riche en collagène au collet des anévrismes traités par embolisation<sup>66</sup>.

#### 1.2.4 Le collagène de type I

Dans un contexte physiologique et pathologique, le collagène de type I est secrété dans le milieu extracellulaire sous forme soluble, le procollagène, qui présente des extrémités polypeptidiques non-hélicoïdales. Ces polypeptides sont ensuite clivés en présence de protéinases, aboutissant à la molécule de collagène qui précipite spontanément en formant des fibrilles.<sup>67</sup> La taille et l'organisation des fibrilles à l'intérieur même de la matrice extracellulaire est contextuelle et dépend de l'influence mécanique, du stade de développement du tissu et de l'interaction avec les autres molécules de la matrice. Néanmoins, ces fibrilles sont une composante déterminante de la cicatrisation. Elles régissent également le comportement des CMLVs<sup>68</sup>.

En condition normale, l'assemblage du réseau du collagène de la média semble servir de barrière mécanique à la migration des CMLVs. Par contre, une protéolyse locale du collagène augmente la mobilité des CMLVs par les intégrines, en particulier  $\alpha_2\beta_1$ <sup>69, 70, 71</sup>. Des études *in vitro* démontrent aussi que le collagène de type I peut être un substrat efficace pour la migration des CMLVs par une synthèse *de novo*, qui permet d'établir un nouvel environnement extracellulaire pour la migration<sup>69</sup>. De plus, de nombreuses études *in vivo* démontrent qu'à la suite d'une lésion artérielle, les CMLVs synthétisent à nouveau du collagène et que cette

expression coïncide avec la migration de CMLVs vers l'intima<sup>72, 73, 74</sup>. D'autre part, la synthèse et la sécrétion de collagène de type I par les CMLVs peuvent être stimulées par des facteurs de croissance, tels que le TGF- $\beta_1$ , le PDGF-BB et l'IGF-1 « insulin-like growth factor-1 » et l'interleukine-1<sup>75, 76</sup>.

La guérison des anévrismes expérimentaux, d'après les premières études *in vivo*, implique trois étapes consécutives soient : a) la coagulation et la réponse inflammatoire; b) la migration et la prolifération des CMLVs qui suivent l'établissement de la matrice provisoire formée par le thrombus et c) la collagénisation de la matrice ainsi que le remodelage. Ces mécanismes responsables de la réparation vasculaire peuvent être modulés afin de retrouver l'intégrité vasculaire<sup>77, 78</sup>.

### **1.3 ANÉVRISMES INTRACRÂNIENS ET TGF- $\beta_1$**

#### **1.3.1 Généralités**

La coordination de la croissance et de la prolifération cellulaire, ainsi que de la production et de la dégradation de la matrice extracellulaire, permettent de maintenir l'homéostasie tissulaire. Les facteurs de croissance et les cytokines agissent localement au niveau tissulaire, c'est d'ailleurs ce qui les différencient des hormones qui, elles, agissent sur les

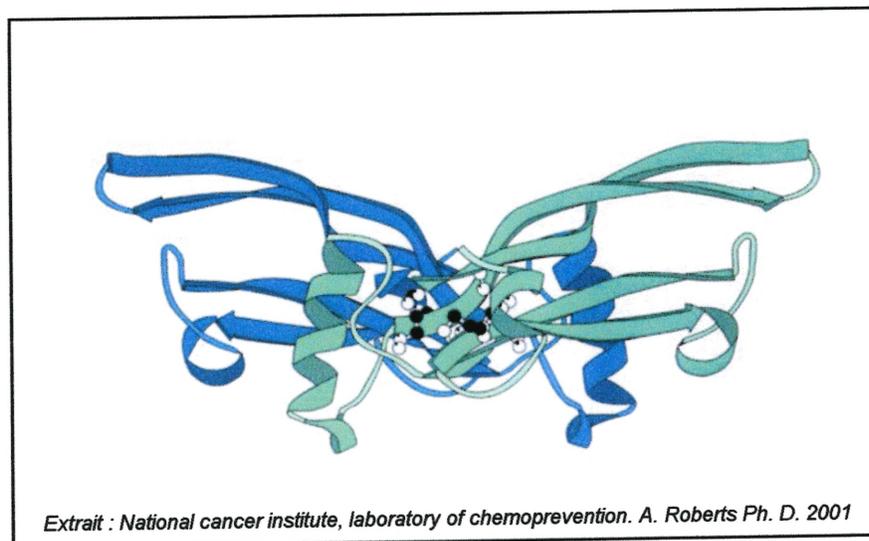
cellules d'un organe à distance de leur site de production. L'effet du facteur de croissance vers une réponse positive ou négative est influencé par d'autres facteurs de croissance, l'état physiologique de la cellule cible et la matrice extracellulaire environnante. Cette variabilité d'action permet aux cellules et aux tissus d'avoir tout un répertoire de réponses pour un même stimulus<sup>79, 80</sup>. Les facteurs de croissance modulent tous les aspects du remodelage tissulaire, que celui-ci soit planifié, comme lors de l'embryogenèse ou du développement, ou non planifié, mais ordonné, comme lors d'une réparation tissulaire suite à une lésion, ou de façon désordonnée, comme dans la carcinogenèse<sup>81, 82</sup>.

Le TGF- $\beta$  doit son nom à sa capacité de permettre à des fibroblastes non transformés de proliférer en suspension dans un milieu agar, propriété caractéristique des cellules transformées<sup>83</sup>. Le TGF- $\beta_1$  joue un rôle central dans la régulation d'une multitude de processus biologiques tels que l'embryogenèse, l'organogenèse, la morphogenèse des os et des cartilages, la vasculogenèse, la cicatrisation et l'angiogenèse, l'hématopoïèse et la régulation du système immunitaire<sup>84, 85</sup>.

### **1.3.2 Caractérisation moléculaire du TGF- $\beta_1$**

Le TGF- $\beta_1$  est un polypeptide homodimérique de 25 kD, appartenant à la superfamille des TGF- $\beta$  qui inclue les activines et les protéines

morphogénétiques osseuses (BMP) (figure 3). Cinq isoformes ont été identifiées, mais seulement trois d'entre elles sont présentes chez les mammifères : TGF- $\beta_1$ , TGF-  $\beta_2$  et TGF- $\beta_3$ , qui possèdent de 70% à 76% d'homologie.



**Figure 3 : Schématisation du dimère de TGF- $\beta_1$ .**

Chaque isoforme est extrêmement conservée entre les espèces (95% à 99%). Les peptides humains et murins ne diffèrent que par un seul acide aminé<sup>86</sup>. Le gène de chaque isoforme se localise sur un chromosome différent, mais possède la même organisation génomique soit sept exons aux positions homologues.

### 1.3.3 Origine cellulaire du TGF- $\beta_1$

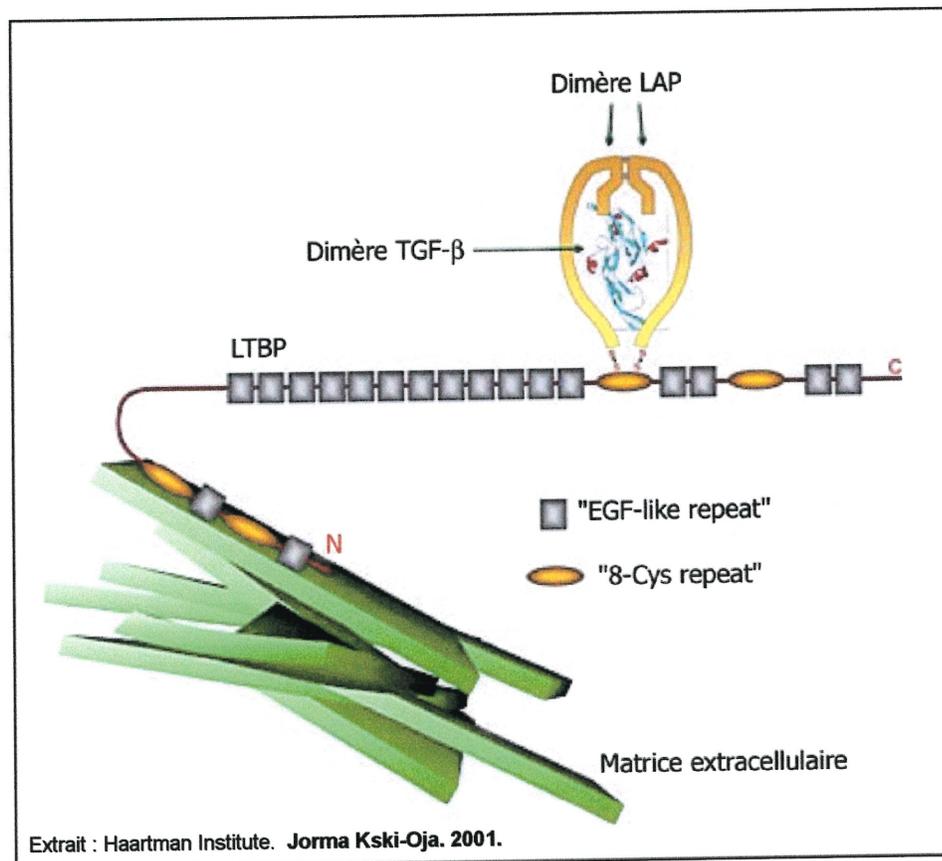
Les plaquettes sanguines sont la principale source de TGF- $\beta_1$  humain. Il est contenu sous forme latente dans les granules  $\alpha$  et libéré pendant la dégranulation. En condition normale, le TGF- $\beta_1$  est aussi produit et sécrété en petite quantité par les cellules endothéliales, les CMLVs, les fibroblastes, les leucocytes et les kératinocytes<sup>87, 88, 89</sup>. Dans le plasma humain, la forme latente du TGF- $\beta_1$  a été identifiée comme étant un complexe  $\alpha_2$ -macroglobuline/TGF $\beta_1$ <sup>90</sup>

### 1.3.4 Synthèse du TGF- $\beta_1$

Un précurseur de 392 acides aminés est synthétisé et forme un dimère stabilisé par trois ponts disulfures. Il est sécrété par la majorité des types cellulaires sous forme d'un complexe latent de poids moléculaire élevé formé par : le TGF- $\beta$  mature de 25 kD, le peptide LAP de 75 kD et une glycoprotéine de 160-240 kD appelée LTBP . Sous cette configuration, il ne possède aucune activité biologique<sup>91</sup>.

Le TGF- $\beta$  est généré à partir d'un précurseur homodimérique (pro-TGF- $\beta$ ) qui est clivé en son fragment C-terminal. Le complexe latent correspond au TGF- $\beta$  associé par des interactions non-covalentes au fragment N-terminal du pro-TGF- $\beta$  qui lui est défini comme étant le peptide LAP. Cette liaison forme un complexe au sein duquel le facteur est inactif. Par

la suite, une protéine LTBP s'associe à LAP par la formation de un ou deux ponts disulfures. L'association du TGF- $\beta$  avec les protéines LAPs est suffisante pour le rendre inactif, mais l'interaction avec LAP et LTBP est essentielle pour moduler l'activité de chacune des isoformes. C'est d'ailleurs LTBP qui assure l'ancrage du complexe latent dans la matrice extracellulaire par sa liaison aux résidus mannose-6-phosphate du récepteur du facteur de croissance à l'insuline de type II ou par d'autres protéines de liaison glycosylées<sup>92, 93</sup> (figure 4).



**Figure 4 : Schématisation de l'ancrage du complexe latent TGF- $\beta_1$ /LAP/LTBP à la matrice extracellulaire.**

« EGF-like repeat » et « 8-Cys repeat » sont des motifs de liaison.

### 1.3.5 Activation du TGF- $\beta_1$

Le complexe latent TGF- $\beta_1$ /LAP/LTBP ne peut se lier aux récepteurs du TGF- $\beta$ . Le TGF- $\beta_1$  doit être activé dans le milieu extracellulaire, mais le mécanisme exact de cette activation, qui constitue un élément déterminant du contrôle de ses effets biologiques, demeure inconnu. Des études *in vitro* suggèrent que le lien entre le TGF- $\beta_1$  mature et LAP peut être rompu par divers traitements physicochimiques, enzymatiques ou par clivages protéolytiques. Ainsi, la chaleur, un pH acide ou basique ainsi que des détergents peuvent libérer le TGF- $\beta_1$  de son complexe inactif<sup>94, 95</sup>. Par voie enzymatique, plusieurs types de glycosidases et de sialidases catalysent la libération du TGF- $\beta_1$ , *in vitro*<sup>96</sup>. De plus, des protéases à sérine, plasmine ou catépsine D, dégradent le peptide LAP dans sa partie N-terminale par clivage protéolytique<sup>97, 98</sup>. Un système de co-culture de cellules endothéliales et de CMLVs ou de péricytes, a permis d'identifier des composants d'une voie d'activation dépendante de la plasmine<sup>99, 100, 101</sup>.

### 1.3.6 Récepteurs du TGF- $\beta_1$

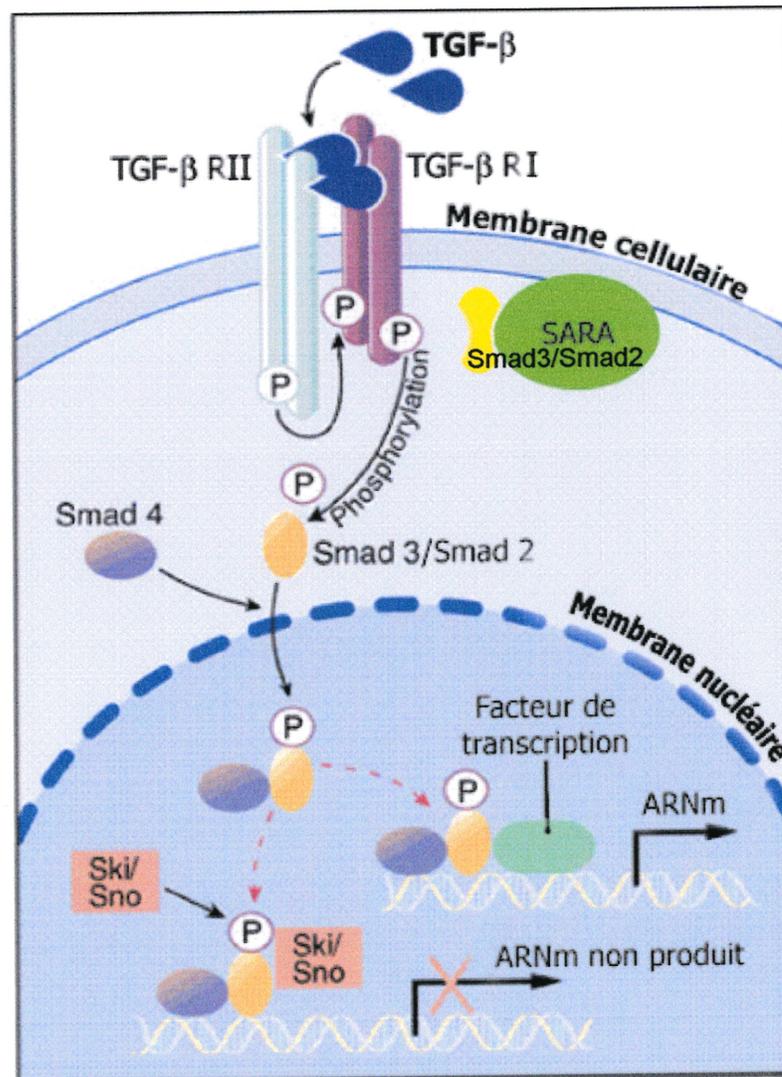
Le TGF- $\beta_1$  initie ses actions cellulaires en se liant à ses récepteurs. Trois types de récepteurs ont été identifiés: TGF- $\beta$ R I, TGF- $\beta$ R II et TGF- $\beta$ R III. Les récepteurs de type I et de type II, respectivement de 65 KDa et 100 KDa, sont des récepteurs de signalisation qui comportent une courte

région extracellulaire riche en cystéines, une hélice transmembranaire hydrophobique et un domaine cytoplasmique avec une activité sérine-thréonine kinase<sup>102, 103</sup>. Dans la majorité des cas, les récepteurs de type I et II sont présents à la surface cellulaire. Le récepteur de type III est quant à lui, aussi connu sous le nom de betaglycan. Il s'agit d'un protéoglycan avec un important domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire simple et une courte queue cytoplasmique ne possédant pas de motif de signalisation. Ce dernier peut interagir avec la matrice extracellulaire par ses chaînes de glycosaminoglycans extracellulaires et avec les trois isoformes du TGF- $\beta$ . Il constitue un récepteur de stockage et présente le TGF- $\beta$  aux récepteurs de signalisation avec une affinité accrue<sup>102</sup>. D'autres protéines de liaison pour le TGF- $\beta$  telles que l'endogline, la décorine, l' $\alpha_2$ -macroglobuline et la thrombospondine modulent l'accessibilité du ligand aux récepteurs de signalisation<sup>104</sup>.

### 1.3.7 Signalisation du TGF- $\beta_1$

La voie classique de signalisation du TGF- $\beta$  s'effectue par l'activation des TGF- $\beta$ R et des protéines Smads (figure 5). Brièvement, le TGF- $\beta$  se lie directement au TGF- $\beta$ R II présent à la surface cellulaire en tant qu'homooligomère. Cette liaison induit un changement conformationnel qui facilite le recrutement du TGF- $\beta$ R I et aussi la formation d'un complexe

hétéromérique stable<sup>105</sup>. Le complexe cytoplasmique du TGF- $\beta$ R II possède une activité sérine-thréonine kinase intrinsèque ce qui lui permet d'être constitutivement actif. Par transphosphorylation, le TGF- $\beta$ R II influence sur le TGF- $\beta$ R I, ce qui constitue le point initial de la signalisation du TGF- $\beta$  et permet la transduction des signaux intracellulaires en amont.



Adaptée de Sun Y. et al. *Molecular Cell* 4: 499-508 (1999).

**Figure 5 : Voie de signalisation classique du TGF- $\beta$ <sub>1</sub>.**

L'activité kinase du TGF- $\beta$ R I et II est interdépendante et nécessaire pour la transduction du signal par les protéines Smads. Ces substrats intracellulaires sont fonctionnellement divisés en trois groupes distincts : a) les R-Smads, régulés par les récepteurs, comprenant Smad 2 et Smad 3; b) le Co-Smad ou Smad 4, médiateur des R-Smads et c) les I-Smads, définis par Smad 6 et Smad 7, antagonistes de Smads. Les R-Smads sont ancrés à la membrane cellulaire par leur interaction avec les protéines SARA « Smad Anchor for Receptor Activation ». Suite à la stimulation par le ligand, R-Smad est phosphorylé par le TGF- $\beta$ R I et forme un complexe hétéromérique fonctionnel avec Co-Smad. Le complexe fonctionnel est ainsi acheminé au noyau où, en association avec certaines protéines de liaison à l'ADN, il en résulte une régulation positive ou négative des gènes cibles. Les I-Smads, quant à eux, inhibent la voie de signalisation du TGF- $\beta$  par deux mécanismes. Smad 7 peut interagir directement avec les R-Smads afin d'empêcher leur phosphorylation par le TGF- $\beta$ R I activé. Smad 6 peut interagir avec Co-Smad en tant que compétiteur de R-Smad phosphorylé ou directement avec le TGF- $\beta$ R I activé afin d'empêcher la phosphorylation des R-Smads<sup>104</sup>.

### 1.3.8 Activités biologiques du TGF- $\beta_1$

Le TGF- $\beta_1$  est un facteur de croissance qui possède un large éventail d'activités biologiques propices à la guérison des lésions vasculaires. Il est à la fois chimiotactique, régulateur de la prolifération et de la différenciation cellulaire, de l'apoptose ou de la mort cellulaire et de la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire<sup>81</sup>.

Le TGF- $\beta_1$  possède un effet bifonctionnel sur la prolifération cellulaire. Il peut être inhibiteur ou stimulateur selon le type cellulaire ou les conditions environnantes. En effet, il inhibe la prolifération cellulaire de façon réversible, dans la phase G1 du cycle cellulaire, des CMLVs, des cellules endothéliales, des kératinocytes et des leucocytes<sup>87</sup>. D'autre part, il agit en tant que mitogène indirect sur les fibroblastes en induisant la synthèse et la sécrétion de PDGF-BB par voie autocrine<sup>106</sup>.

Le TGF- $\beta_1$  favorise un dépôt significatif de protéines matricielles, en augmentant leur synthèse et en diminuant leur protéolyse. Le TGF- $\beta_1$  est un puissant stimulateur de la synthèse du procollagène de type 1, mais aussi de la fibronectine, des protéoglycans, de la tenascine, de l'ostéonectine, de l'ostéopondine, de la laminine et de la thrombospondine. Il augmente aussi la synthèse de PAI-1 « plasminogen activator inhibitor type 1 », de TIMP « tissue inhibitor of

metalloproteinases » et des intégrines<sup>82, 107</sup>. Il induit aussi une diminution de synthèse de l'activateur du plasminogène, des MMPs et de la transine<sup>108, 109</sup>.

Le TGF- $\beta_1$  favorise la migration des CMLVs, stimule l'activité synthétique des protéines matricielles, inhibe la protéolyse et la migration des cellules endothéliales. Il influence de nombreux aspects du remodelage vasculaire et contribue à l'initiation ainsi qu'à la progression du processus de guérison des lésions vasculaires.

## **1.4 LA THÉRAPIE GÉNIQUE**

### **1.4.1 Généralités**

La thérapie génique consiste en un transfert d'acides nucléiques dans les cellules afin d'induire la production de protéines thérapeutiques spécifiques. En général, les acides nucléiques transférés sont de l'ADN ou de l'ARN, codant pour le produit d'un gène ou une protéine. Un gène absent ou de structure défectueuse qui modifie la conformation ou la composition des protéines produites par la cellule, peut causer certaines maladies héréditaires telle que la mucoviscidose<sup>110</sup>. Dans ces maladies, la thérapie génique peut viser le remplacement du gène défectueux nécessitant une expression stable du transgène. Cette thérapie peut

également s'adresser à un gène spécifique déjà présent dans l'organisme, par l'effet d'une surexpression ou d'une suppression de ce gène spécifique, ce qui peut modifier le déroulement de la maladie ou l'évolution d'un processus physiologique. Généralement, ce type de thérapie génique ne requiert qu'une expression transitoire du transgène.

#### **1.4.2 Voie d'administration et vecteur**

L'efficacité d'une approche par thérapie génique exige un niveau significatif de transfert et une expression du gène recombinant en quantité thérapeutique mais non toxique. L'accomplissement optimal du transfert génique dépend de trois facteurs : l'accessibilité de la cellule cible, l'intégration du vecteur dans la cellule cible et l'habileté de la cellule cible à exprimer le gène d'intérêt<sup>111</sup>.

L'accessibilité à la cellule cible est un des facteurs déterminants du succès d'une thérapie génique. Elle dépend souvent d'un choix judicieux de la voie d'administration du vecteur. Le modèle à l'étude dicte souvent l'approche la plus appropriée. Par exemple, une administration systémique ou intraveineuse du vecteur ne permet pas une spécificité tissulaire<sup>112, 113</sup> alors qu'une administration bronchoscopique ou intramyocardique permet un traitement ciblé<sup>114</sup>. Une administration

---

péritumorale ou intrapéritonéale a souvent été utilisée dans des études précliniques<sup>115, 116</sup>.

Une alternative à toutes ces techniques directes *in vivo* et *in situ*, est l'approche *ex vivo*. Cette technique consiste à prélever les cellules cibles du patient, à effectuer un transfert génique *in vitro* et à réintroduire les cellules dans l'organisme<sup>117</sup>. Cette approche comporte de nombreux avantages comparativement au transfert direct. Tout d'abord, le transfert est effectué dans un environnement contrôlé *in vitro*, où l'efficacité du vecteur peut être optimisée. Une population purifiée de cellules exprimant le gène recombinant peut être sélectionnée avant d'être réintroduite dans l'organisme. Le niveau d'expression du gène ainsi que l'identité des cellules cibles peuvent être mesurés et vérifiés. Il est aussi possible de déterminer l'effet du transfert viral sur le phénotype des cellules cibles avant la transplantation<sup>111</sup>. Cette méthode a d'ailleurs été mise à l'épreuve dans le cadre d'une étude visant à démontrer le rôle des CMLVs dans le processus de guérison des anévrismes. Le vecteur employé pour les fins de cette étude était un adénovirus exprimant la protéine fluorescente verte (GFP) servant de marqueur cellulaire<sup>42</sup>.

### 1.4.3 Le vecteur de transfert

Les caractéristiques intrinsèques du vecteur et de la cellule cible doivent être bien définies pour optimiser le transfert. Le vecteur idéal devrait posséder les attributs suivants : être simple, avoir une haute efficacité de transfection, peu ou pas de toxicité, une insertion stable, une immunogénicité négligeable et une expression prolongée<sup>118</sup>. Pour le moment, aucun système ne possède toutes ces caractéristiques, donc les critères de sélection du vecteur sont dictés par le modèle étudié.

Il est important de considérer la spécificité d'intégration du vecteur, car certains d'entre eux possèdent un tropisme cellulaire spécifique qui nécessite parfois des modifications des protéines de la surface virale. Afin de cibler artificiellement un type cellulaire, un ligand peut être attaché à la capsid virale, par des anticorps ou par des méthodes chimiques<sup>119, 120</sup>. De plus, une modification du gène de l'enveloppe virale peut permettre d'exprimer une protéine chimérique et d'altérer le tropisme tissulaire<sup>121</sup>. Une autre approche consiste à modifier le motif de liaison des protéines du manteau viral afin d'augmenter la spécificité de liaison à la cellule cible<sup>122</sup>.

Un autre facteur déterminant du succès de la thérapie génique est la capacité de la cellule cible à exprimer le gène recombinant suite à un

transfert efficace. L'emploi d'un promoteur ubiquitaire hétérologue tissu ou cellule spécifique permet d'optimiser le niveau d'expression du gène et d'augmenter la spécificité d'expression<sup>123, 124, 125, 126, 127, 128</sup>. Le promoteur et l'amplificateur du cytomégalo virus humain est le plus souvent employé, car il est initié en trans, par des facteurs de transcription présents dans le noyau, permettant d'obtenir une expression constitutive et efficace du gène recombinant. Il est un des plus forts promoteurs connus et ne nécessite l'insertion que de quelques paires de bases (380pb) au sein du vecteur<sup>129, 130</sup>.

Le vecteur sélectionné doit permettre d'obtenir un effet thérapeutique plus ou moins persistant. Une expression de longue durée nécessite un vecteur capable de s'intégrer dans le génome, tel que le rétrovirus<sup>131</sup>. Cependant, il est associé à des risques de cytotoxicité et de mutagenèse insertionnelle. Par contre, un vecteur comme l'adénovirus permet une expression à plus court terme car il demeure épisomal et donc susceptible à la dégradation<sup>132, 133</sup>.

Le modèle étudié détermine *de facto* le choix du vecteur ainsi que le temps d'expression voulu. Généralement, les phénomènes de guérison des anévrismes intracrâniens ou leurs déficiences s'observent dans les trois semaines suivant l'embolisation<sup>42</sup>. Une expression protéinique

exogène efficace au sein de l'agent embolisant serait donc cruciale dès le début du traitement afin de stimuler rapidement le processus de formation néointimale. Une expression transitoire serait suffisante et même requise pour ne pas entraîner d'hyperplasie intinale à long terme.

#### **1.4.4 Adénovirus et vecteur adénoviral**

Les membres de la famille des adénovirus (*Adenoviridae*) sont des virus non-enveloppés, à ADN bicaténaire linéaire, d'approximativement 36 kb. La configuration génomique de l'adénovirus se divise en deux régions, les gènes précoces (E1 à E4) et les gènes tardifs (L1-L5), déterminés selon le moment de l'initiation de la réplication de l'ADN. L'expression des gènes viraux est dépendante des facteurs de transcription cellulaire et de l'expression de la région virale E1. La région E3 code pour des protéines virales qui régulent l'immunosurveillance *in vivo*. Le cycle lytique de l'adénovirus est caractéristique : il se lie aux récepteurs adénoviraux présents sur un grand nombre de cellules de mammifères telles que les CMLVs et il s'insère dans la cellule par endocytose assistée. Les protéines de la capsidie lui permettent d'échapper à la dégradation lysosomiale et d'exporter l'ADN viral vers le noyau. Dans le noyau, il persiste sous forme non-intégrée. Qu'il s'agisse d'une cellule mitotique ou post mitotique, lors de son cycle lytique, le génome viral se réplique en plusieurs milliers de copies par cellule. Il existe plus de 40 sérotypes

d'adénovirus et chez l'humain, la majorité d'entre eux cause une infection bénigne des voies respiratoires<sup>134</sup>.

Les sérotypes 2 et 5 (Ad-2 et Ad-5) ont été utilisés pour développer les vecteurs adénoviraux . La délétion des gènes E1A et E1B du génome viral le rend incapable de se répliquer. Ils sont alors produits par recombinaison homologue dans les cellules 293 ou toute autre lignée cellulaire qui contient une copie intégrée du gène E1 de l'adénovirus<sup>135</sup>. Cette première génération d'adénovirus recombinant permet d'introduire environ 6,5 kb d'ADN complémentaire, sous le contrôle d'un promoteur hétérologue. De cette façon, le vecteur viral est relativement stable et peut-être purifié à très haut titre, soit  $10^{10}$  à  $10^{12}$  particules virales par millilitre. De plus, le vecteur adénoviral demeure épisomal même lors de sa réplication. Ainsi l'introduction de mutations ou de dérèglages cellulaires par intégration aléatoire dans le génome est peu fréquente. Malgré tous ces avantages, certaines propriétés intrinsèques des vecteurs sont restrictives<sup>136</sup>. Dans la majorité des modèles, l'expression génique est transitoire, généralement moins de trois semaines, et une réaction inflammatoire est observée dans l'organe exprimant le transgène. Cependant, lors de thérapies vasculaires une expression à court terme est suffisante pour obtenir l'effet thérapeutique désiré. La réponse immunitaire due aux protéines virales et l'expression transitoire du

transgène, demeurent les restrictions majeures de l'utilisation de ces vecteurs de première génération<sup>137</sup>.

## **2. PRÉSENTATION DU PROJET DE RECHERCHE**

## 2.1 HYPOTHÈSES

Les anévrismes intracrâniens peuvent être traités par voie endovasculaire, une approche thérapeutique moins invasive que la chirurgie. L'inefficacité à moyen terme, la persistance de collets résiduels et les risques associés à la récurrence représentent les contraintes actuelles qui limitent le potentiel thérapeutique de ce traitement par voie endovasculaire. Les modèles animaux qui reproduisent la récurrence sont associés à une formation néointimale déficiente et à une recanalisation persistante au collet des anévrismes. La formation d'une néointima succède à la migration et à la prolifération des CMLVs au sein du thrombus. Cette formation néointimale doit se compléter avant la migration des cellules endothéliales associées à recanalisation afin de permettre la guérison complète des anévrismes (figure 6).

**2.1.1 Les CMLVs, seules cellules présentes dans la média artérielle, semblent participer à la formation néointimale.** Malgré les controverses existantes concernant l'origine et la nature précises des cellules néointimales, la greffe de CMLVs autologues sera utilisée pour favoriser la formation d'une néointima épaisse au collet des anévrismes traités, sans encourir des risques de rejet.

## Guérison ou recanalisation après embolisation

 CMLVs surexprimant TGF- $\beta$ 1/GFP ou GFP seule  
 Cellules endothéliales

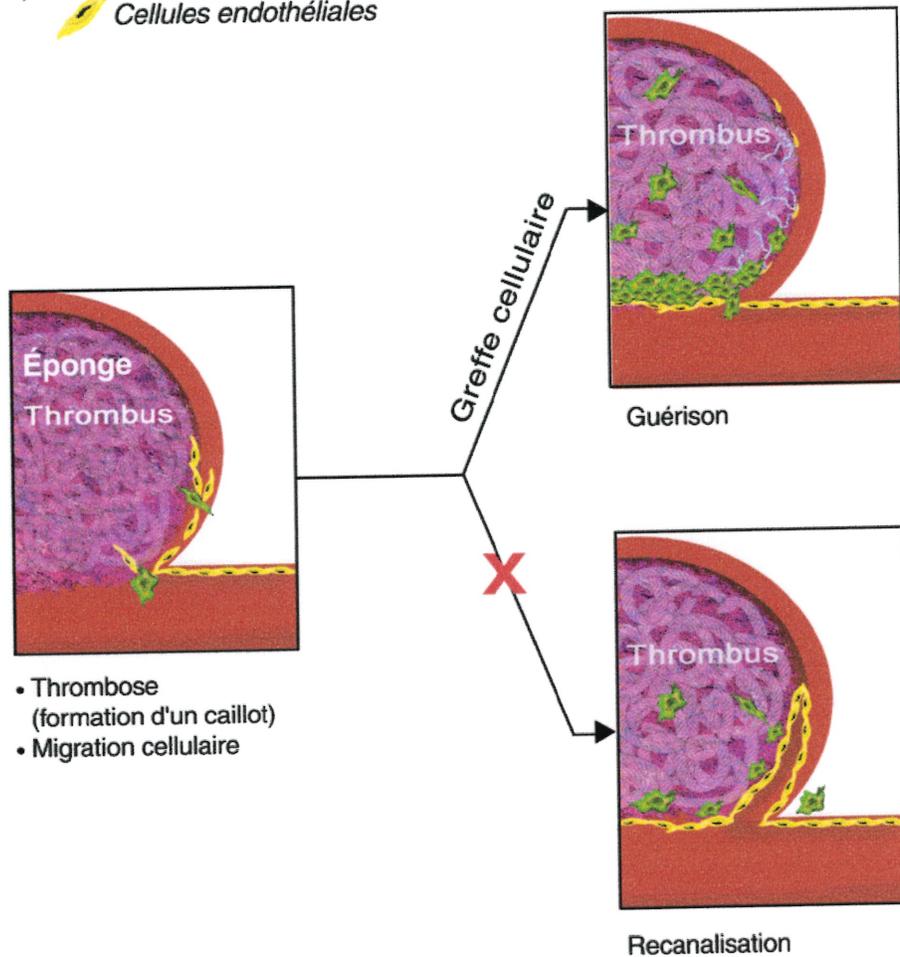


Figure 6 : Schématisation de la guérison ou de la recanalisation d'un anévrisme après l'embolisation.

**2.1.2 Le TGF- $\beta_1$  est susceptible d'améliorer la guérison des anévrismes et de diminuer la recanalisation reliée au problème de la récurrence.** Le TGF- $\beta_1$  est un facteur de croissance pléiotropique qui influence de nombreux aspects du remodelage vasculaire. Il contribue aussi à l'initiation et à la progression du processus de guérison des lésions vasculaires. Il est l'instigateur le plus puissant de l'activité biosynthétique matricielle des CMLVs et l'inhibiteur de la prolifération des cellules endothéliales.

**2.1.3 L'élaboration d'un agent embolisant comportant des CMLVs surexprimant le TGF- $\beta_1$  est susceptible de favoriser la guérison complète des anévrismes et d'améliorer les résultats angiographiques à long terme.** Une thérapie génique *ex vivo* est l'approche thérapeutique choisie pour rallier tous les éléments clés de notre projet.

## **2.2 BUT DU PROJET DE RECHERCHE**

Le but de ce projet est d'améliorer la guérison des anévrismes expérimentaux par une greffe autologue de CMLVs modifiées génétiquement *in vitro*, à l'aide d'un vecteur adénoviral surexprimant le TGF- $\beta_1$ . L'amélioration de la guérison anévrismale permettrait de

favoriser les résultats à long terme du traitement endovasculaire des anévrismes.

### **2.3 OBJECTIFS SPÉCIFIQUES**

La réalisation de ce projet de recherche implique les étapes suivantes (résumé, tableau I, page 39) :

#### ***In vitro* : caractérisation des CMLVs.**

2.3.1 Caractérisation de la synthèse d'ADN et de la prolifération cellulaire des CMLVs, en réponse à des facteurs de croissance généralement associés à la formation néointimale, soient le TGF- $\beta_1$  et le PDGF-BB ;

2.3.2 Caractérisation et comparaison des CMLVs transfectées avec les vecteurs adénoviraux AdTR5-TGFbetaDCGFP ou AdTR5-GFPq (vecteur contrôle) à diverses MOIs ;

2.3.2.1 Efficacité de transfection, qualifiée en microscopie à fluorescence et quantifiée par dosage protéique de la sécrétion de TGF- $\beta_1$ .

2.3.2.2 Seuil de toxicité cellulaire observé en microscopie à fluorescence, et déterminé par synthèse d'ADN et prolifération cellulaire.

2.3.2.3 Efficacité biologique du TGF- $\beta_1$  sécrété par les CMLVs transfectées, déterminée par synthèse de

collagène et test d'inhibition de croissance avec la lignée cellulaire MLEC-32.

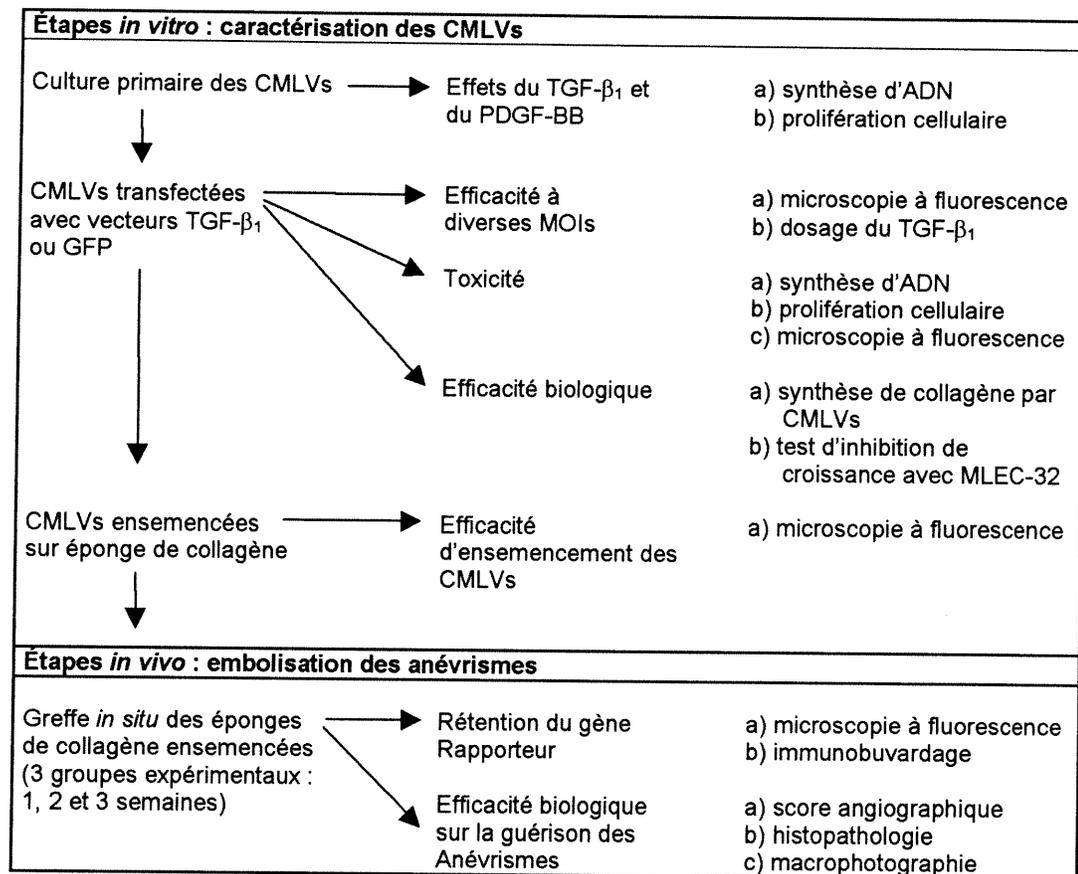
2.3.3 Visualisation en microscopie à fluorescence des CMLVs ensemencées sur éponges de collagène.

***In vivo* : embolisation des anévrismes.**

2.3.4 Greffes *in situ* d'éponges de collagène ensemencées de CMLVs autologues transfectées avec le vecteur AdTR5-TGFbetaDCGFP du côté traité et avec le vecteur AdTR5-GFPq du côté contrôle. L'étude comporte 3 groupes expérimentaux (1, 2 et 3 semaines);

2.3.4.1 Efficacité biologique du TGF- $\beta_1$  sur la guérison de l'anévrisme documentée par angiographie, macrophotographie et histopathologie;

2.3.4.2 Rétention du gène rapporteur qualifiée en microscopie à fluorescence et quantifiée par dosage de l'expression du transgène.



**Tableau I : Résumé des objectifs spécifiques**

### **3. MATÉRIELS ET MÉTHODES**

### **3.1 CULTURES CELLULAIRES**

#### **3.1.1 Culture primaire des CMLVs**

La culture primaire des CMLVs est effectuée à partir d'artères fémorales gauches canines, utilisées dans le laboratoire, selon la méthode de Ross<sup>138</sup>. Brièvement, l'artère est prélevée en conditions stériles et maintenue dans du DMEM riche en glucose (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium, Wisent) additionné de 10% de sérum foetal bovin (FBS, Wisent), 100 U/ml de pénicilline (Wisent) et 100 U/ml de streptomycine (Wisent). L'artère est ensuite nettoyée et mécaniquement désendothélialisée puis coupée en explants de 1 x 1 mm. Chaque explant est déposé dans 1 puits d'une plaque de 24 contenant 20 µl de DMEM. Suite à une période d'adhésion de 2 heures à 37°C, 500 µl de milieu frais est ajouté. Les explants sont enlevés 1 semaine plus tard et le milieu est changé. L'expansion cellulaire continue pendant 1 semaine en plaque et ensuite en flasques de 175 cm<sup>3</sup>. Des cellules entre les passages 1 à 7 sont utilisées pour toutes les expériences.

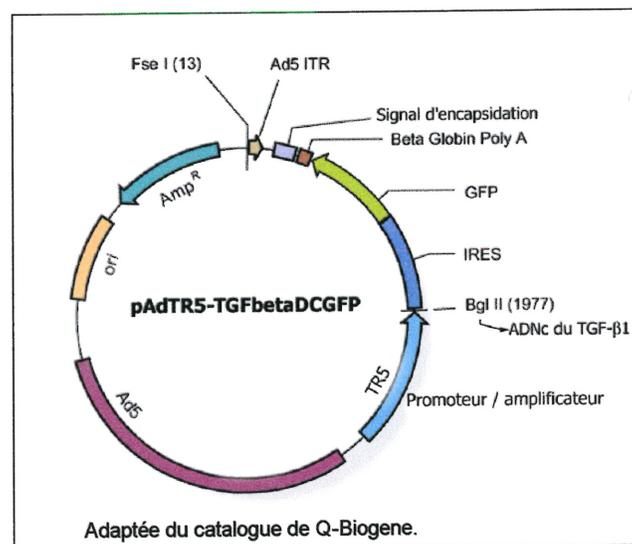
#### **3.1.2 Culture des lignées cellulaires**

Les cellules épithéliales de poumon de vison, soient les MLEC-32 (offertes généreusement par D<sup>r</sup> Bernard Massie, Institut de recherche en biotechnologie du Canada), soient les Mv1Lu (CCL-4; American Type Culture Collection, Manassas, Va.) sont cultivées dans du DMEM

additionné de 10% FBS, 100 U/ml de pénicilline et 100 U/ml de streptomycine, en flasques de 175 cm<sup>3</sup>.

### 3.1.3 Infection virale

Deux vecteurs adénoviraux sont utilisés pour les expériences *in vitro* et *in vivo* : le vecteur AdTR5-GFPq qui surexprime la GFP et le vecteur AdTR5-TGFbetaDCGFP qui surexprime le TGF- $\beta_1$  et la GFP dans une configuration discistronique. Le gène d'intérêt du vecteur discistronique est cloné dans la position du premier cistron. Les deux cistrons sont séparés par un site d'entrée interne pour les ribosomes (IRES) du virus de l'encéphalomyocardite. L'expression génique des deux vecteurs est sous le contrôle du promoteur régulé par la tétracycline (TR5) (figure 7).



**Figure 7 : Représentation schématique du vecteur de transfert adénoviral AdTR5-TGFbetaDCGFP.**

Pour que le système soit actif et fonctionnel, une expression constitutive du transactivateur à la tétracycline, produite par le vecteur AdCMV5-tTA est nécessaire. Une infection avec une MOI égale, entre le vecteur constitutif et le vecteur inductible, permet une efficacité maximale de l'expression du gène inductible. Les vecteurs adénovirus purifiés nous ont été généreusement donnés par D<sup>R</sup> Bernard Massie. Les CMLVs ensemencées dans une flasques de 175 cm<sup>3</sup> sont infectées, à la MOI désirée, suite à une incubation de 2 heures à 37°C, avec le vecteur AdTR5-GFPq ( $6,5 \times 10^{10}$  pfu/ml) ou le vecteur AdTR5-TGFbetaDCGFP ( $1,7 \times 10^{11}$  pfu/ml) ainsi que le vecteur AdCMV5-tTA ( $1,2 \times 10^{12}$  pfu/ml). Pendant la période d'absorption, une quantité minimale de milieu est employée (5ml) et une agitation mécanique est requise toutes les 15 minutes. L'efficacité de l'infection est vérifiée 48 heures post-infection en microscopie à fluorescence par un rapport du décompte cellulaire (nombre de VSMCs en lumière fluorescente/nombre de VSMCs en lumière normale) à une magnification de 40X et de 100X. L'intensité de l'infection est mesurée de façon arbitraire par comparaison visuelle entre les diverses MOIs.

#### **3.1.4 Ensemencement des CMLVs sur éponges de collagène**

Après la transfection, les CMLVs sont ensemencées sur un modèle tridimensionnel 5 jours avant d'être transplantées dans l'anévrisme

expérimental. Il s'agit de couper un morceau d'éponge de collagène en cubes de 10 x 10 x 10 mm et d'autoclaver les fractions d'éponge dans du PBS pendant 10 minutes. Ensuite, les éponges sont asséchées puis réhydratées dans du DMEM additionné de 10% FBS, 100 U/ml de pénicilline, 100 U/ml de streptomycine et 2 mg/ml de fibrinogène (Sigma). Les éponges réhydratées sont alors transférées dans une plaque de 24 puits et une suspension de cellules infectées à la MOI de 300 ( $4 \times 10^6$  CMLVs dans 100  $\mu$ l de DMEM non-additionné de fibrinogène) est rapidement ajoutée. Après 2 heures d'incubation à 37°C, le fibrinogène est polymérisé et les éponges sont alors transférées dans une plaque de 6 puits contenant 6 ml de milieu frais.

## **3.2 MÉTHODOLOGIE *IN VITRO***

### **3.2.1 Synthèse d'ADN**

La synthèse d'ADN est mesurée par incorporation de thymidine tritiée telle que décrit par Hadrava et al<sup>139</sup>. Les CMLVs sontensemencées dans une plaque de 24 puits avec une densité initiale de 50 000 cellules/500  $\mu$ l de DMEM additionné de 10% FBS, 100 U/ml de pénicilline et 100 U/ml de streptomycine puis incubées à 37°C pendant 24 heures. Les cellules sont alors mises à jeun pendant 24 heures, avec 500  $\mu$ l de DMEM additionné de 0,5% FBS, 100 U/ml de pénicilline et 100 U/ml de streptomycine. Les CMLVs sont ensuite traitées avec les facteurs de croissance aux

concentrations voulues pour 48 heures. La thymidine tritiée (Amersham-Pharmacia) est ajoutée à raison de  $5\mu\text{Ci/ml}$ , pour les 24 dernières heures. Le jour du dosage, les CMLVs sont lavées avec 1 ml de PBS 1X (Wisent) froid, puis fixées 10 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$  avec 1 ml d'une solution glacée d'éthanol (Sigma) et d'acide acétique (Sigma) (1:3). Par la suite, les CMLVs sont lavées avec 1 ml d'eau millipure froide, puis incubées 15 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$  avec 1 ml d'acide perchlorique (Fisher) 0,5 M froid. Un dernier lavage est effectué avec 1 ml d'acide perchlorique 0,5 M froid et les cellules sont incubées pour 30 minutes à  $80^{\circ}\text{C}$  avec  $750\ \mu\text{l}$  d'acide perchlorique 0,5 M. Les échantillons sont alors transférés dans des fioles contenant 10 ml de liquide à scintillation. La quantité de radioactivité mesurée correspond à la quantité de thymidine tritiée incorporée dans l'ADN nouvellement synthétisé; elle est mesurée au compteur à scintillation.

### **3.2.2 Test de prolifération cellulaire**

La prolifération cellulaire est mesurée par le dosage d'un sel de tétrazolium (WST-1, Roche Diagnostics) selon les instructions du manufacturier. Brièvement, les CMLVs sontensemencées dans une plaque de 96 puits avec une densité initiale de 5000 cellules/ $100\ \mu\text{l}$  de DMEM supplémenté de 10% FBS, 100 U/ml de pénicilline et 100 U/ml de streptomycine, puis incubées à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures. Les CMLVs

sont par la suite traitées avec les facteurs de croissance aux concentrations voulues. Après 48 heures d'incubation à 37°C, 10 µl de WST-1 sont ajoutés à chaque puits pour une période de 2 heures. La densité optique des échantillons est alors mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA. La mesure de l'absorbance quantifie le clivage du WST-1 (orangé) en formazan (rouge foncé) par les enzymes des cellules viables.

### **3.2.3 Détermination immunologique du TGF-β<sub>1</sub>**

Les surnageants cellulaires des CMLVs infectées, à diverses MOIs, sont recueillis à intervalles réguliers à toutes les 24 heures pendant 26 jours. La concentration de TGF-β<sub>1</sub> est déterminée par ELISA (Quantikyne assay, R&D systems) selon les instructions du fabricant. Brièvement, les échantillons sont activés par acidification, le TGF-β<sub>1</sub> total (forme active et latente) immunoréactif est obtenu en incubant pendant 10 minutes, 500 µl d'échantillon avec 100 µl de HCL 0,1N, à température de la pièce. La réaction d'acidification est arrêtée avec 100 µl de NaOH 1,2N/HEPES 0,5 M. Le standard ou les échantillons (200 µl) sont ajoutés à chaque puits et incubés pendant 3 heures à température de la pièce. Par la suite, 200 µl de conjugué (anticorps polyclonal anti TGFβ<sub>1</sub>-humain conjugué à la peroxidase de raifort) sont rajoutés après avoir effectué 3 lavages consécutifs avec 400 µl de tampon de lavage. La plaque est alors

incubée pendant 90 minutes à température de la pièce. Par la suite, 200  $\mu$ l de substrat sont ajoutés à chaque puits, après avoir effectué 3 lavages. La plaque est incubée à nouveau 20 minutes à température de la pièce, dans le noir. Finalement, 50  $\mu$ l de « solution d'arrêt » sont ajoutés pour mettre fin à la réaction du chromogène. La densité optique est mesurée, à la longueur d'onde de 450 nm, à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA, dans les 30 minutes qui suivent. La concentration basale de TGF- $\beta_1$  déterminée dans le milieu de culture (DMEM + 10% FBS) est soustraite de la valeur obtenue pour chacun des échantillons. La variation inter-essai et intra-essai, lors de la quantification du TGF- $\beta_1$ , est de 6,3% et 7,5% respectivement. La sensibilité minimale de détection du TGF- $\beta_1$  est de 7pg/ml.

#### **3.2.4 Synthèse de collagène**

La synthèse de collagène est mesurée par incorporation de proline tritiée, puisque plus de 80% de la masse sèche de la matrice extracellulaire est composée de collagène et que 40-80% de la proline est retrouvé dans le collagène. Le dosage de collagène est effectué tel que décrit par Koyano et al<sup>140</sup>, Les CMLVs sont ensemencées dans une plaque de 24 puits avec une densité initiale de 50 000 cellules/500  $\mu$ l de DMEM additionné de 10% FBS, 100 U/ml de pénicilline et 100 U/ml de streptomycine et incubées à 37°C, pendant 24 heures. Les cellules sont mises à jeun

pendant 24 heures avec 500  $\mu$ l de DMEM additionné de 0,5% FBS, 100 U/ml de pénicilline et 100 U/ml de streptomycine. Les CMLVs sont traitées avec les facteurs de croissance aux concentrations voulues, pour une période de 48 heures. La proline tritiée (Amersham) additionnée de 50  $\mu$ l/ml d'acide ascorbique (Sigma) est ajoutée à raison de 10 $\mu$ Ci/ml lors des 24 dernières heures d'incubation. Après avoir enlevé le milieu de marquage, la monocouche de cellules est lavée avec 500  $\mu$ l de PBS. Après sonification (Branson Ultrasonics), les membranes cellulaires sont brisées et les protéines marquées sont ainsi extraites dans 500  $\mu$ l d'acide acétique 0,5 M, pendant 24 heures à 4°C, avec légère agitation. Pour le dosage, les filtres d'une plaque de 96 puits avec un système de filtration (pore de 0,65  $\mu$ m, Millipore) sont mouillés avec 50  $\mu$ l d'acide trichloracétique (TCA, Fischer) 25%. Ensuite, 50  $\mu$ l d'extrait cellulaire et 50  $\mu$ l de TCA 50% sont ajoutés à chaque puits. La plaque est alors incubée pour 60 minutes à 4°C. Le précipité formé est recueilli sur le filtre par aspiration sous vide et les filtres sont lavés 3 fois avec 100  $\mu$ l de TCA 10%. Une fois séchés, les filtres sont transférés dans des fioles contenant 10 ml de liquide à scintillation. La quantité de radioactivité précipitée correspond à la proline tritiée incorporée dans le collagène nouvellement synthétisé et elle est mesurée au compteur à scintillation.

### 3.2.5 Immunobuvardage

Les fragments de spécimens prélevés au collet des anévrismes sont homogénéisés et incubés pendant 30 minutes avec 500  $\mu$ l de tampon de lyse (50 mM d'HEPES, 150 mM de NaCl<sub>2</sub>, 1 mM d'EDTA, 10% de glycérol, 25  $\mu$ M de  $\beta$ -glycérophosphate, 1 mM de DDT, 1 mM de NA<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM de NaF, 1% de Tween 20, 1 mM de PMSF, 1  $\mu$ g/ml de leupeptine et 1  $\mu$ g/ml d'aprotinine). Le lysat cellulaire est séparé par centrifugation et la concentration de protéines est déterminée par la méthode de Bradford (BIO-RAD protein assay, BIO-RAD). Les échantillons sont dénaturés à la chaleur pendant 5 minutes dans le tampon Laemmli 4X et 25  $\mu$ g de protéines sont migrées sur gel de SDS-polyacrylamide 12% puis transférées sur membrane de PVDF. Les membranes sont bloquées 1 heure dans du PBS contenant 5% de lait écrémé en poudre puis incubées, toute la nuit à 4°C, avec l'anticorps polyclonal de lapin anti-TGF $\beta$ <sub>1</sub> pAB (Promega, dilution de 1 :1000). Suite aux lavages avec du TBS-Tween 0,1%, les membranes sont incubées 1 heure avec l'anticorps secondaire anti-lapin conjugué à la peroxydase de raifort (Amersham, dilution de 1 : 20 000). Après les lavages, les conjugués sont révélés par la méthode de chémiluminescence ECL (Amersham) selon les instructions du manufacturier.

### 3.2.6 Tests statistiques

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type. Les effets *in vitro* des facteurs de croissance commerciaux (TGF- $\beta_1$  ou PDGF-BB) ou du TGF- $\beta_1$  recombinant produit sur les cellules sont évalués par tests de Student. Une valeur de  $P < 0,05$  est considérée significative.

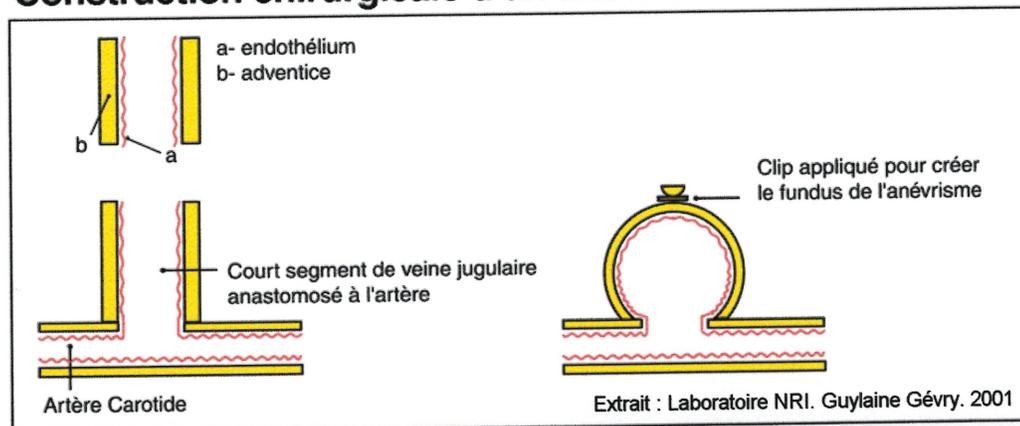
## 3.3 MÉTHODOLOGIE *IN VIVO*

### 3.3.1 Modèle animal

Nous avons développé, dans notre laboratoire un modèle chirurgical d'anévrisme carotidien. Ce modèle permet une embolisation peropératoire par le fundus à l'aide d'éponge de collagène<sup>40</sup>. Nous avons utilisé des chiens adultes de 20-25 kg. Toutes les procédures expérimentales sont réalisées sous anesthésie générale. Les chiens sont d'abord mis sous sédation avec de l'acépromazine (0,2 mg/kg) suivie d'une injection intraveineuse de thiopentale (5 mg/kg), de succinylcholine (0,5 mg/kg) et d'atropine (0,2 mg/kg). Suite à l'intubation endotrachéale, les chiens sont maintenus sous anesthésie avec de l'halothane (1,5-2%). De la buprénorphine (0,01 mg/kg) est ensuite administrée comme analgésique post-opératoire. Deux anévrismes latéraux sont construits sur les carotides communes de tous les animaux selon la méthode de German et Black telle que modifiée par Graves<sup>141, 142</sup>. Deux segments de la même veine jugulaire externe sont recueillis et utilisés pour construire

les poches veineuses. Une artériotomie ovale d'un diamètre de 5 mm est créée sur les carotides communes suite à leur occlusion temporaire. La poche veineuse est construite en anastomosant un segment de jugulaire à la carotide à l'aide de prolène 8,0. L'anévrisme est oblitéré avec une éponge de collagène ensemencée de CMLVs autologues transfectées et le fundus anévrisimal est suturé ou clippé (figure 8)

### Construction chirurgicale d'un anévrisme



**Figure 8 : Construction chirurgicale d'un anévrisme.**

Schématisation de la construction d'un anévrisme carotidien (A). Photo peropératoire d'un anévrisme latéral carotidien (B).

Ce modèle bilatéral d'anévrisme permet d'avoir un côté traité et un côté contrôle, choisi de façon aléatoire dans chaque animal. Le côté traité est embolisé avec une éponge de collagèneensemencée de CMLVs transfectées avec le vecteur l'AdTR5-TGFbetaDCGFP. Le côté contrôle est traité par une éponge de collagèneensemencée de CMLVs transfectées avec le vecteurAdTR5-GFPq. Une angiographie de contrôle post-opératoire est effectuée pendant que l'animal est toujours sous anesthésie générale afin de vérifier la symétrie et la similitude de la construction et de l'embolisation des anévrismes. Comme il s'agit d'une étude comparative dans le temps, les animaux sont répartis en trois groupes expérimentaux soient : 1, 2 et 3 semaines. Pour documenter le degré d'oblitération anévrismale et la guérison ou la récurrence au collet des anévrismes, une angiographie de contrôle est réalisée après 1 à 3 semaines selon le groupe expérimental. Les résultats angiographiques sont gradés selon la classification décrite par Raymond et Roy<sup>35, 36</sup>. Un score de 0 est attribué à une oblitération complète de l'anévrisme, un score de 1 est attribué à une fissure proximale ou distale du collet de l'anévrisme, un score de 2 est attribué à l'opacification d'un collet résiduel ou récidivant et un score de 3 pour une récurrence sacculaire de l'anévrisme. Les animaux sont euthanasiés par une administration intraveineuse massive de barbiturique, et les anévrismes sont prélevés et maintenus dans du DMEM additionné de 10% FBS. Avant de fixer les tissus dans la

formaldéhyde pour les études histopathologiques, des photos en macroscopie sont réalisées à l'état frais sur les spécimens et un segment au collet de l'anévrisme est coupé, congelé dans l'azote liquide et gardé à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour l'immunobuvardage.

### **3.3.2 Histopathologie**

Une coloration au trichrome de Masson HPS (Hématoxiline- Phloxine - Safran) et au pantachrome de Movat est effectuée sur les tissus fixés<sup>40</sup>.<sup>143</sup>. L'épaisseur de la néointima au collet des l'anévrismes est comparée entre le côté traité et le côté contrôle<sup>41</sup>.

## **4. RÉSULTATS**

## **4.1 CMLVs ET FACTEURS DE CROISSANCE *IN VITRO***

Nous avons caractérisé la synthèse d'ADN et la prolifération cellulaire des CMLVs en réponse aux facteurs de croissance associés à la formation néointimale, soient le TGF- $\beta_1$  et le PDGF-BB.

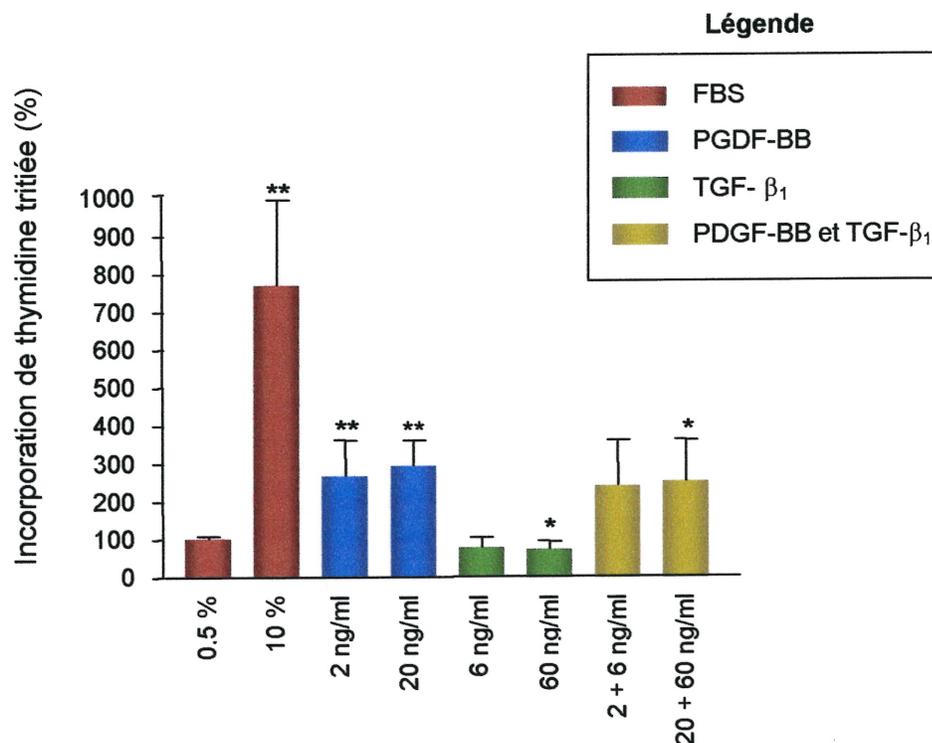
### **4.1.1 Synthèse d'ADN**

La synthèse d'ADN des CMLVs a été augmentée significativement (plus de 150%) avec l'ajout de 2 ou 20 ng/ml de PDGF-BB (figure 9). Le TGF- $\beta_1$  a diminué significativement (50%) l'incorporation de thymidine tritiée lorsque les CMLVs ont été traitées avec 60 ng/ml. Suite à la combinaison des deux facteurs de croissance, le TGF- $\beta_1$  n'a pas diminué l'effet stimulateur du PDGF-BB (2 ng et 6 ng respectivement).

### **4.1.2 Prolifération cellulaire**

La prolifération cellulaire des CMLVs quantifiée par le WST-1 a été significativement augmentée (75%) par l'ajout de 2 ou 20 ng/ml de PDGF-BB (figure 10). Le TGF- $\beta_1$ , aux concentrations de 6 et 60 ng/ml n'a pas entraîné d'inhibition significative de prolifération comparativement au niveau basal (DMEM + 0,5% FBS). Suite à la combinaison des deux facteurs de croissance, le TGF- $\beta_1$  n'a pas diminué l'effet stimulateur du PDGF-BB (2 ng et 6 ng respectivement).

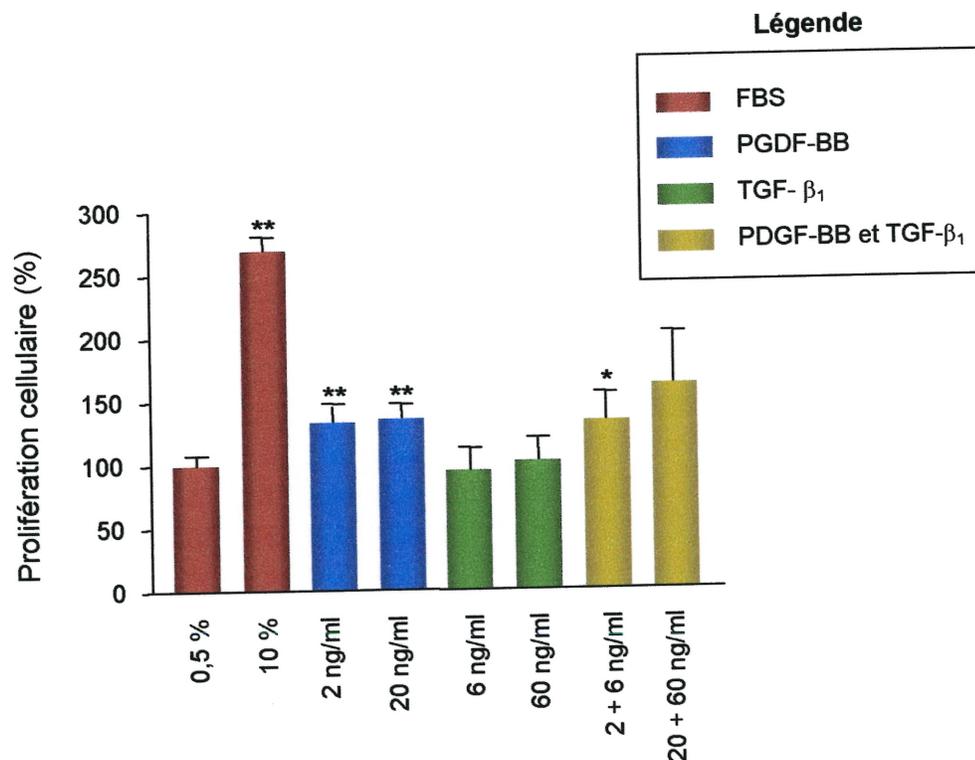
- Le PDGF-BB possède un effet mitotique sur les CMLVs à faibles et fortes concentrations.
- Le TGF- $\beta_1$  démontre une activité inhibitrice à fortes concentrations sur les CMLVs.
- Le TGF- $\beta_1$  n'a pas diminué l'effet stimulateur du PDGF-BB.



**Figure 9: Synthèse d'ADN par les CMLVs en réponse à du TGF- $\beta_1$  et à du PDGF-BB.**

Les CMLVs ont été traitées pendant 48 heures avec du FBS (0,5% ou 10%), du PDGF-BB (2 ou 20 ng/ml), ou du TGF- $\beta_1$  (6 ou 60 ng/ml). L'ADN nouvellement synthétisé a été mesuré par incorporation de thymidine tritiée et a été exprimé en pourcentage par rapport au contrôle (0,5% FBS).

\*P < 0,05 vs contrôle et \*\*P < 0,01 vs contrôle.



**Figure 10 : Prolifération cellulaire des CMLVs en réponse à du TGF- $\beta_1$  et à du PDGF-BB .**

Les CMLVs ont été traitées pendant 48 heures avec du FBS (0,5% ou 10%), du PDGF-BB (2 ou 20 ng/ml), ou du TGF- $\beta_1$  (6 ou 60 ng/ml). La prolifération cellulaire a été mesurée par le dosage du WST-1 et a été exprimée en pourcentage par rapport au contrôle (0,5% FBS).

\*P < 0,05 vs contrôle et \*\*P < 0,01 vs contrôle.

## 4.2 EFFICACITÉ DE L'INFECTION *IN VITRO*

Nous avons voulu déterminer l'efficacité d'infection des vecteurs AdTR5-TGFbetaDCGFP et AdTR5-GFPq par les CMLVs, en faisant varier la MOI de 100 à 900 pfu/cellule.

### 4.2.1 Visualisation en microscopie à fluorescence

Un niveau d'efficacité de 75 à 85% a été observé lorsque les CMLVs ont été infectées, par l'un ou l'autre des vecteurs à 300 pfu/cellules (figure 11). Dans les 2 cas, l'intensité du signal a été nettement accentuée avec un accroissement de la MOI. Par contre, l'intensité du signal retrouvée était la plus forte lorsque les CMLVs ont été infectées par le vecteur AdTR5-GFPq.

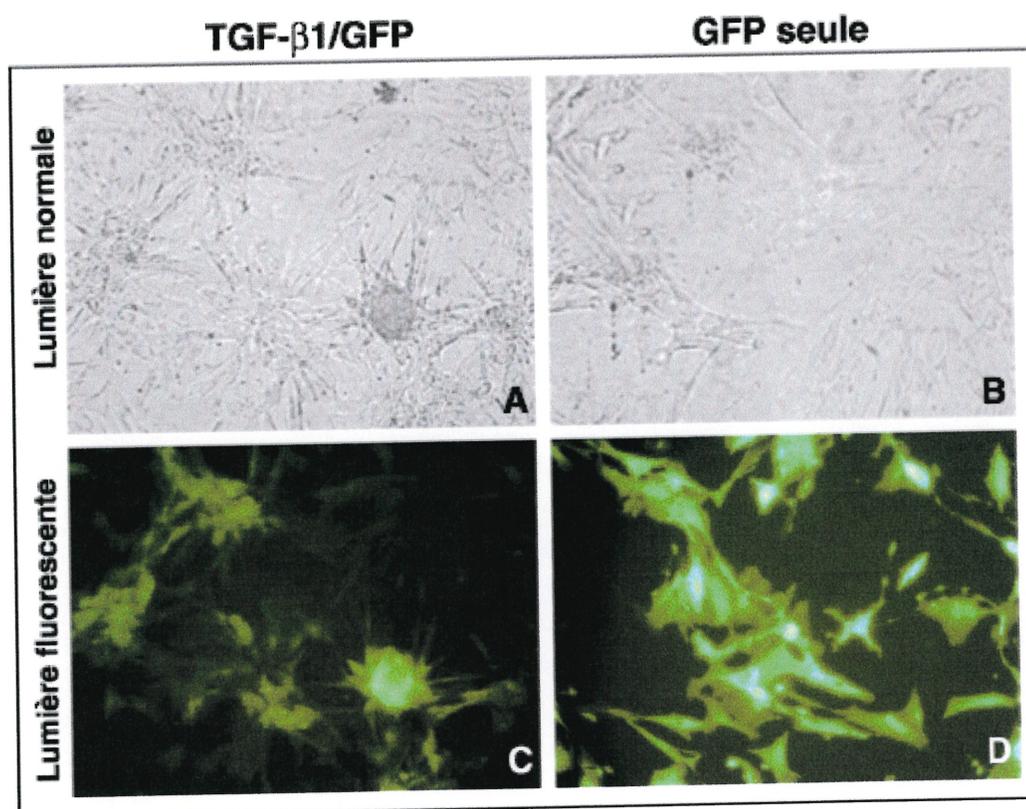
### 4.2.2 Dosage de la concentration de TGF- $\beta_1$ recombinant

La quantification de la synthèse du TGF- $\beta_1$  recombinant, sécrété par les CMLVs, nous a également permis de déterminer l'efficacité de transfection des CMLVs. La quantité de TGF- $\beta_1$  détectée à la MOI de 0 correspondait à la concentration basale de TGF- $\beta_1$  retrouvée dans le DMEM + 10% FBS (figure 12). Aux MOIs inférieures ou égales à 300, la sécrétion de TGF- $\beta_1$  a été quasi constante jusqu'au jour 26 : à la MOI maximale, une concentration de 180 ng/ml a été retrouvée. À des MOIs

de 100 à 300, un niveau maximal de sécrétion a été observé au jour 12, pour revenir au niveau de sécrétion initiale au jour 20. À de fortes MOIs (600 et 900), la sécrétion de TGF- $\beta_1$  diminuait entre le jour 6 et 12, pour atteindre dès le jour 12 des valeurs de sécrétion inférieures aux faibles MOIs.

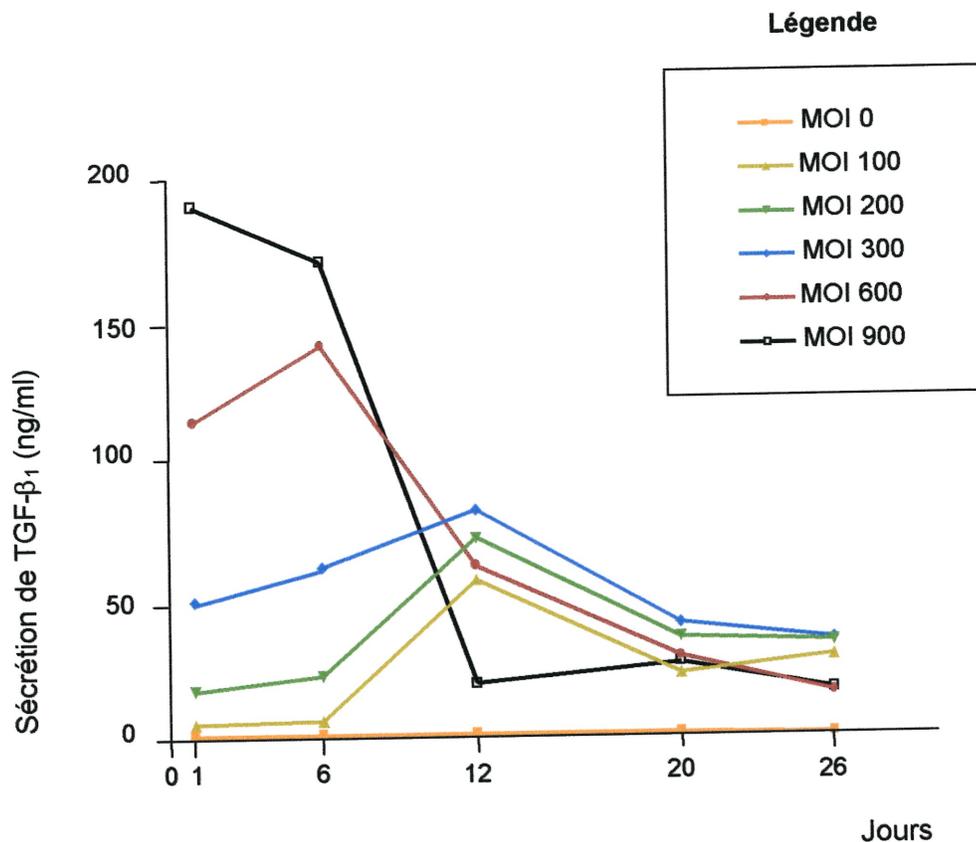
Un dosage de la sécrétion de TGF- $\beta_1$  a aussi été effectué, aux jours 1, 6, 12, 20 et 26, avec les surnageants cellulaires des CMLVs infectées par le vecteur AdTR5-GFPq à des MOIs de 0, 100, 200, 300, 600 et 900. Toutes les valeurs obtenues correspondaient à la concentration basale de TGF- $\beta_1$  retrouvée dans le DMEM +10% FBS.

- Le vecteur AdTR5-DCTFGbetaGFP et AdTR5GFPq possèdent un bon tropisme pour les CMLVs.
- Une concentration croissante de TGF- $\beta_1$  recombinant immunoréactif est sécrétée par les CMLVs en faisant varier la MOI de 100 à 900 pfu/cellule.



**Figure 11 : Photos *in vitro*, des CMLVs surexprimant le TGF- $\beta$ <sub>1</sub>/GFP ou la GFP seule, à une MOI de 300.**

Les CMLVs ont été infectées avec le vecteur AdTR5-TGFbetaDGGFP, à une MOI de 300 et visualisées en lumière normale (A) et en lumière fluorescente (C). Les CMLVs ont également été infectées avec le AdTR5-GFPq, à une MOI de 300, et visualisées en lumière normale (B) et en lumière fluorescente (D).



**Figure 12: Sécrétion de TGF- $\beta_1$  recombinant par les CMLVs infectées.**

Les CMLVs ont été infectées à des MOIs de 0, 100, 200, 300, 600 et 900 pendant 2 heures avec le vecteur AdTR5-TGFbetaDCGFP. Après une période de 48 heures, le surnageant a été recueilli toutes les 24 heures pendant 26 jours. La sécrétion de TGF- $\beta_1$  a été mesurée par ELISA aux jours 1, 6, 12, 20 et 26.

### 4.3 CMLVs ET TGF- $\beta_1$ RECOMBINANT *IN VITRO*

Nous avons déterminé l'effet de la sécrétion du TGF- $\beta_1$  recombinant sur la synthèse d'ADN et la prolifération cellulaire des CMLVs. Les CMLVs ont été infectées avec le vecteur AdTR5-TGFbetaDCGFP à des MOIs de 0, 100, 200, 300, 600 et 900.

Nous avons tenté de discerner l'effet de l'infection virale et de la sécrétion de TGF- $\beta_1$  recombinant, sur le phénotype des CMLVs, par la synthèse d'ADN et la prolifération cellulaire. Les résultats obtenus par l'infection des CMLVs avec le vecteur AdTR5GFPq, aux diverses MOIs, seront comparés à ceux démontrés avec le vecteur AdTR5-TGFbetaDCGFP.

#### 4.3.1 Synthèse d'ADN

La synthèse d'ADN fut significativement diminuée lorsque les CMLVs ont été infectées avec le vecteur AdTR5-TGFbetaDCGFP et cultivées dans un milieu pauvre ou riche en FBS (figure 13). Dans le milieu pauvre, le pourcentage d'incorporation de thymidine tritiée a diminué de 75% à 60% lorsque la MOI augmentait de 100 à 900 par rapport au contrôle négatif (MOI 0, figure 13A). Dans un milieu riche en FBS, la diminution de la

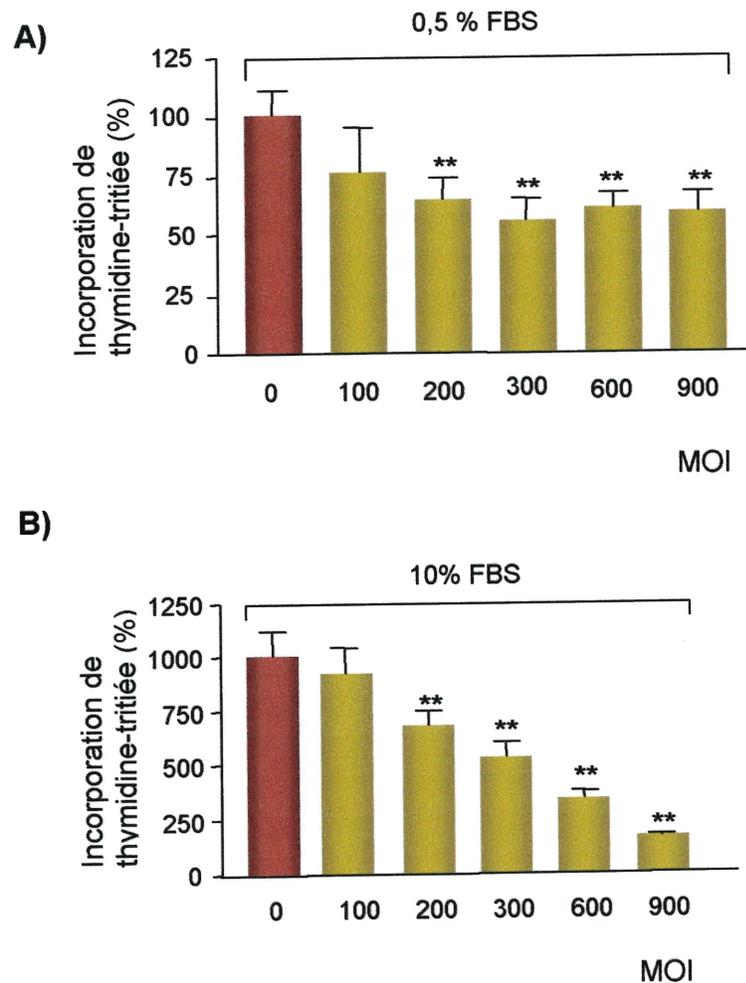
synthèse d'ADN était directement proportionnelle à l'augmentation de la MOI (figure 13B).

La synthèse d'ADN a été significativement diminuée lorsque les CMLVs ont été infectées avec le vecteur AdTR5-GFPq et cultivées dans un milieu pauvre ou riche en FBS (figure 14). La diminution d'incorporation de thymidine tritiée était directement proportionnelle à l'augmentation de la MOI. La synthèse d'ADN semble avoir été inhibée davantage suite à l'infection par le vecteur AdTR5-GFPq comparativement au vecteur AdTR5-TGFbetaDCGFP. Dans un milieu pauvre en FBS, une diminution supplémentaire du pourcentage d'incorporation de thymidine tritiée de 20% a été observée. Dans un milieu riche en FBS, la diminution observée a été de 10% de plus.

#### **4.3.2 Prolifération cellulaire**

La prolifération des CMLVs telle qu'illustrée à la figure 15 et 16 a révélé une très grande variabilité entre les MOIs. Le dosage du WST-1 n'a pu démontrer un effet significatif sur la prolifération des CMLVs surexprimant le TGF- $\beta_1$  ou la GFP.

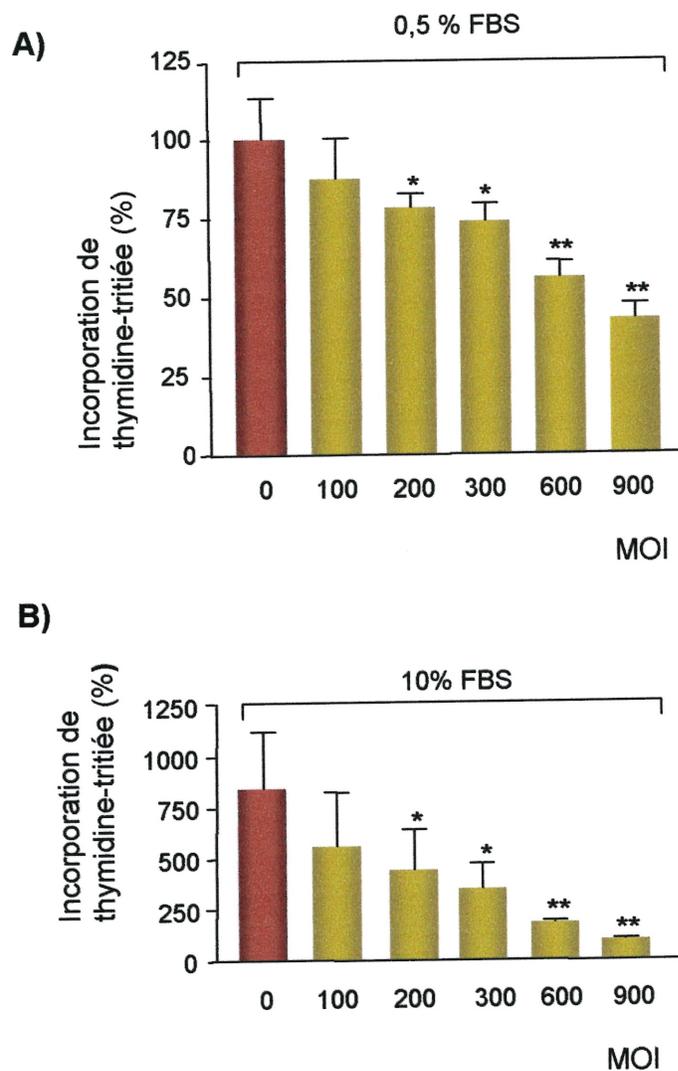
- L'infection virale par l'un ou l'autre des vecteurs diminue la synthèse d'ADN des CMLVs suivant l'augmentation de la MOI.



**Figure 13: Synthèse d'ADN par les CMLVs en réponse à leur sécrétion de TGF- $\beta_1$  recombinant.**

Les CMLVs ont été infectées à des MOIs de 0, 100, 200, 300, 600 et 900 pendant 2 heures avec le vecteur AdTR5-TGFbetaDCGFP. Après une période de 48 heures, les CMLVs ont été cultivées dans un milieu pauvre (A) ou un milieu riche (B) en FBS. L'ADN nouvellement synthétisé a été mesuré par incorporation de thymidine tritiée et a été exprimé en pourcentage par rapport au contrôle (MOI 0/0,5% FBS).

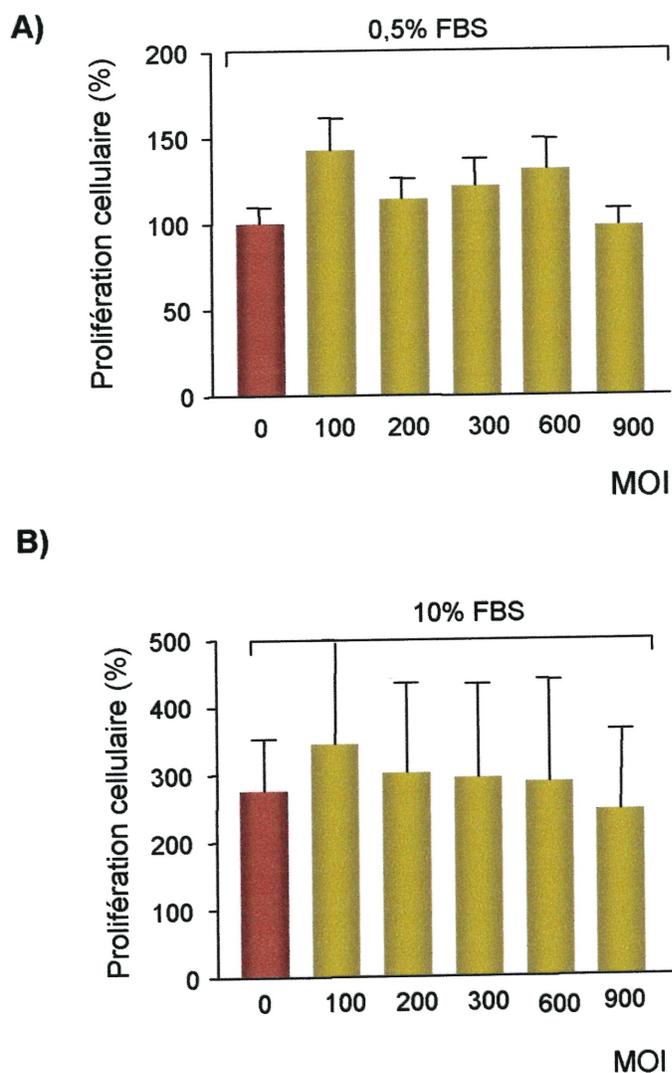
\*P < 0,05 vs contrôle et \*\*P < 0,01 vs contrôle.



**Figure 14: Synthèse d'ADN par les CMLVs en réponse à leur expression de GFP recombinante.**

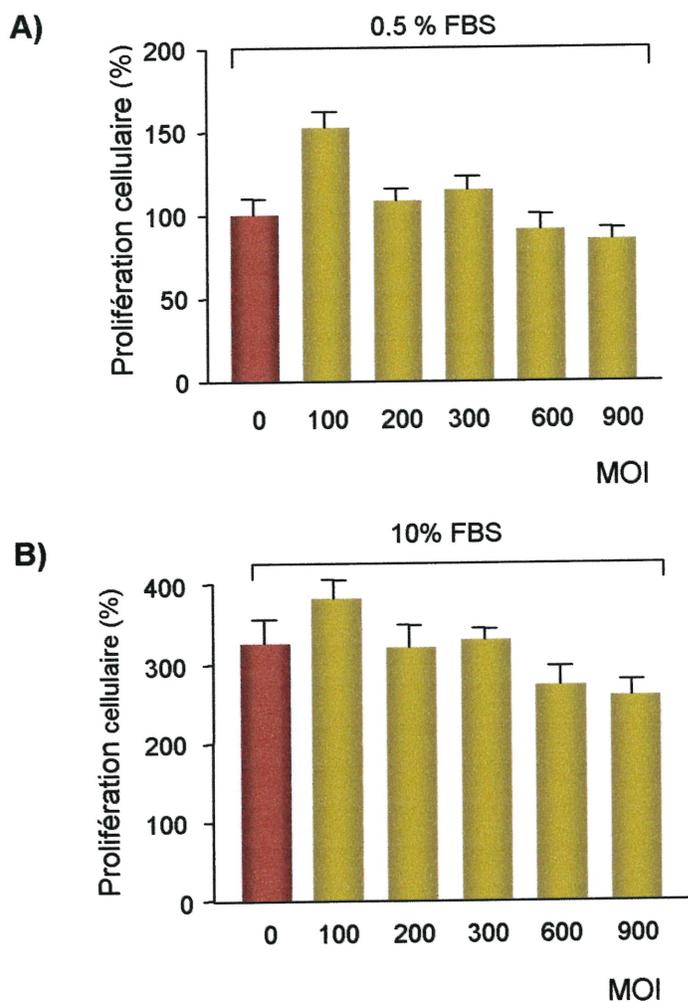
Les CMLVs ont été infectées à des MOIs de 0, 100, 200, 300, 600 et 900 pendant 2 heures avec le vecteur AdTR5-GFPq. Après une période de 48 heures, les CMLVs ont été cultivées dans un milieu pauvre (A) ou un milieu riche (B) en FBS. L'ADN nouvellement synthétisé a été mesuré par incorporation de thymidine tritiée et a été exprimé en pourcentage par rapport au contrôle (MOI 0/0,5% FBS).

\* $P < 0,05$  vs contrôle et \*\* $P < 0,01$  vs contrôle.



**Figure 15: Prolifération cellulaire des CMLVs en réponse à leur sécrétion de TGF- $\beta_1$  recombinant.**

Les CMLVs ont été infectées à des MOIs de 0, 100, 200, 300, 600 et 900 pendant 2 heures avec le vecteur AdTR5-TGFbetaDCGFP. Après une période de 48 heures, les CMLVs ont été cultivées dans un milieu pauvre (A) ou un milieu riche (B) en FBS. La prolifération cellulaire a été mesurée par le dosage du WST-1 et a été exprimée en pourcentage par rapport au contrôle (MOI 0/0,5% FBS).



**Figure 16 : Prolifération cellulaire des CMLVs en réponse à leur expression de GFP recombinante.**

Les CMLVs ont été infectées à des MOIs de 0, 100, 200, 300, 600 et 900 pendant 2 heures avec le vecteur AdTR5-GFPq. Après une période de 48 heures, les CMLVs ont été cultivées dans un milieu pauvre (A) et un milieu riche (B) en FBS. La prolifération cellulaire a été mesurée par le dosage du WST-1 et a été exprimée en pourcentage par rapport au contrôle (MOI 0/0,5% FBS).

## 4.4 EFFICACITÉ BIOLOGIQUE DU TGF- $\beta_1$ RECOMBINANT

### *IN VITRO*

Nous avons déterminé l'efficacité biologique de la protéine recombinante sécrétée par les CMLVs. Tout d'abord, une mesure de la synthèse de collagène a été effectuée avec les CMLVs transfectées avec le vecteur AdTR5-TGFbetaDCGFP à des MOIs de 0, 100, 200, 300, 600 et 900. Ensuite, l'activité biologique de ces surnageants a été mesurée par des tests d'inhibition de croissance à l'aide des MLEC-32 : lignée cellulaire excessivement sensible au TGF- $\beta_1$  mature et classiquement utilisée pour confirmer l'activité biologique du TGF- $\beta_1$ .

#### 4.4.1 Synthèse de collagène

La synthèse de collagène a significativement augmenté lorsque les CMLVs ont été infectées avec le vecteur AdTR5-TGFbetaDCGFP comparativement au contrôle négatif, sauf à la MOI de 900 (MOI 0/0,5% FBS, figure 17). À la MOI de 100, le pourcentage de synthèse de collagène obtenu était maximal : 200% d'augmentation de la synthèse de collagène comparativement au contrôle négatif. La sécrétion de collagène diminuait progressivement avec une augmentation de la MOI. À la plus forte MOI significative (600), la synthèse de collagène était 40% plus élevée que le contrôle négatif.

#### **4.4.2 Tests d'inhibition de croissance**

Deux lignées cellulaires ont été caractérisées : les MLEC-32 et les Mv1Lu à l'aide du TGF- $\beta_1$  commercial en étudiant la synthèse d'ADN et la prolifération cellulaire afin de déterminer l'activité biologique du TGF- $\beta_1$  sécrété par les CMLVs infectées.

##### **4.4.2.1 Caractérisation des deux lignées cellulaires**

###### **4.4.2.1.1 Synthèse d'ADN**

La synthèse d'ADN par les MLEC-32 a été significativement inhibée en présence d'une concentration croissante de TGF- $\beta_1$  (0,1 à 10 ng/ml) dans du DMEM sans sérum (figure 18A). Une inhibition de 90% de l'incorporation de thymidine tritiée a été observée, pour toutes les concentrations de TGF- $\beta_1$ , en comparaison avec le contrôle négatif (0ng/ml de TGF- $\beta_1$ ). La synthèse d'ADN a été inhibée de 70-75% lorsque les cellules ont été traitées dans du DMEM additionné de 0,5 % FBS. Cependant, l'inhibition de croissance n'était pas aussi marquée lorsque les MLEC-32 ont été traitées dans du DMEM additionné de 10% FBS . Une inhibition significative de l'incorporation de thymidine tritiée de 75% a été observée seulement lorsque les cellules ont été traitées avec des concentrations de TGF- $\beta_1$  commercial variant de 0,1 à 0,5 ng/ml.

La synthèse d'ADN par les Mv1Lu a été inhibée en présence d'une concentration croissante de TGF- $\beta_1$  (0,1 à 10 ng/ml) dans du DMEM sans sérum (figure 18B). Une inhibition significative de 70% de l'incorporation de thymidine tritiée a été observée, pour toutes les concentrations de TGF- $\beta_1$ , comparativement au contrôle négatif (0ng/ml TGF- $\beta_1$ /0% FBS). La synthèse d'ADN a été inhibée de 50-80% lorsque les cellules ont été traitées dans du DMEM additionné de 0,5% FBS. L'inhibition de croissance a été de 60 à 75% lorsque les cellules ont été traitées dans du DMEM additionné de 10% FBS. La mesure de l'activité biologique du TGF- $\beta_1$  commercial a été plus précise avec la lignée cellulaire MLEC-32 qu'avec la lignée cellulaire Mv1Lu. L'activité du TGF- $\beta_1$  recombinant a donc été déterminée à l'aide de la lignée cellulaire MLEC-32.

#### **4.4.2.1.2 Prolifération cellulaire**

L'activité biologique du TGF- $\beta_1$  commercial, mesurée par le dosage du WST-1 qui a démontré une inhibition de 30% à 50% de la prolifération des MLEC-32 et une inhibition 25% à 50% de la prolifération des Mv1Lu (figure 19).

#### **4.4.2.2 Caractérisation du TGF- $\beta_1$ recombinant**

La quantité de TGF- $\beta_1$  recombinant mesurée par ELISA a permis de calculer le volume nécessaire afin d'obtenir les concentrations de 0,1 et

1 ng/ml pour les essais de synthèse d'ADN ou de dosage du WST-1 par les MLEC-32.

#### **4.4.2.2.1 Synthèse d'ADN**

À la MOI de 200, la synthèse d'ADN des MLEC-32 a été significativement inhibée de 80% avec 0,1 ng/ml de TGF- $\beta_1$  recombinant aux jours 1 et 6 ainsi qu'au jour 6, à la concentration de 1 ng/ml (figure 20A). L'incorporation de thymidine tritiée a été aussi significativement diminuée de 50% avec 1 ng/ml de TGF- $\beta_1$  recombinant, aux jours 6 et 12. À partir du jour 20, l'inhibition de la synthèse d'ADN, avec 0,1 ou 1 ng/ml de TGF- $\beta_1$  recombinant n' a pu être démontrée.

À la MOI de 300, la synthèse d'ADN des MLEC-32 a été significativement inhibée avec 0,1 ng/ml de TGF- $\beta_1$  recombinant (figure 20B). La diminution d'incorporation de thymidine tritiée était de plus de 90% aux jours 1 et 6, de 80% au jour 12 et de 40% aux jours 20 et 26. De plus, lorsque les cellules ont été traitées avec 1 ng/ml de TGF- $\beta_1$  recombinant, la synthèse d'ADN des MLEC-32 a été significativement inhibée de 40% au jour 1, de 85% aux jours 6 et 12, de 60% au jour 20 et de 20% au jour 26.

À la MOI de 600, la synthèse d'ADN des MLEC-32 a été significativement inhibée de 50%, aux jours 1 et 6, avec 0,1 ng/ml et 1 ng/ml de TGF- $\beta_1$  recombinant (figure 20C). À partir du jour 12, l'inhibition de la synthèse d'ADN à 0,1 ou 1 ng/ml de TGF- $\beta_1$  recombinant n' a pu être démontrée.

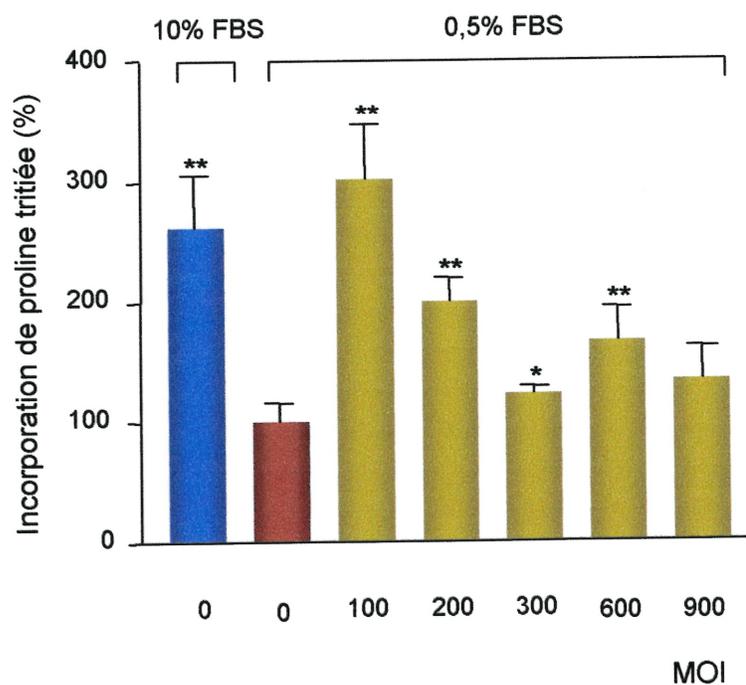
#### **4.4.2.2 Prolifération cellulaire**

À la MOI de 200, la prolifération cellulaire des MLEC-32 a été inhibée d'approximativement 20%, du jour 1 au jour 26, que les cellules aient été traitées avec 0,1 ou 1 ng/ml de TGF- $\beta_1$  recombinant (figure 21A).

À la MOI de 300, la prolifération cellulaire des MLEC-32 a été significativement inhibée avec 0,1 ng/ml de TGF- $\beta_1$  recombinant (figure 21B). La prolifération cellulaire a été significativement inhibée de 60% aux jours 1 et 6 et de 40% aux jours 12 et 20. De plus, 1 ng/ml de TGF- $\beta_1$  recombinant a inhibé significativement la prolifération cellulaire des MLEC-32 de 40% aux jours 1 à 20.

À la MOI de 600, la prolifération cellulaire des MLEC-32 a été inhibée significativement de 30% avec 1 ng/ml de TGF- $\beta_1$  recombinant seulement aux jours 6 et 12 (figure 21C).

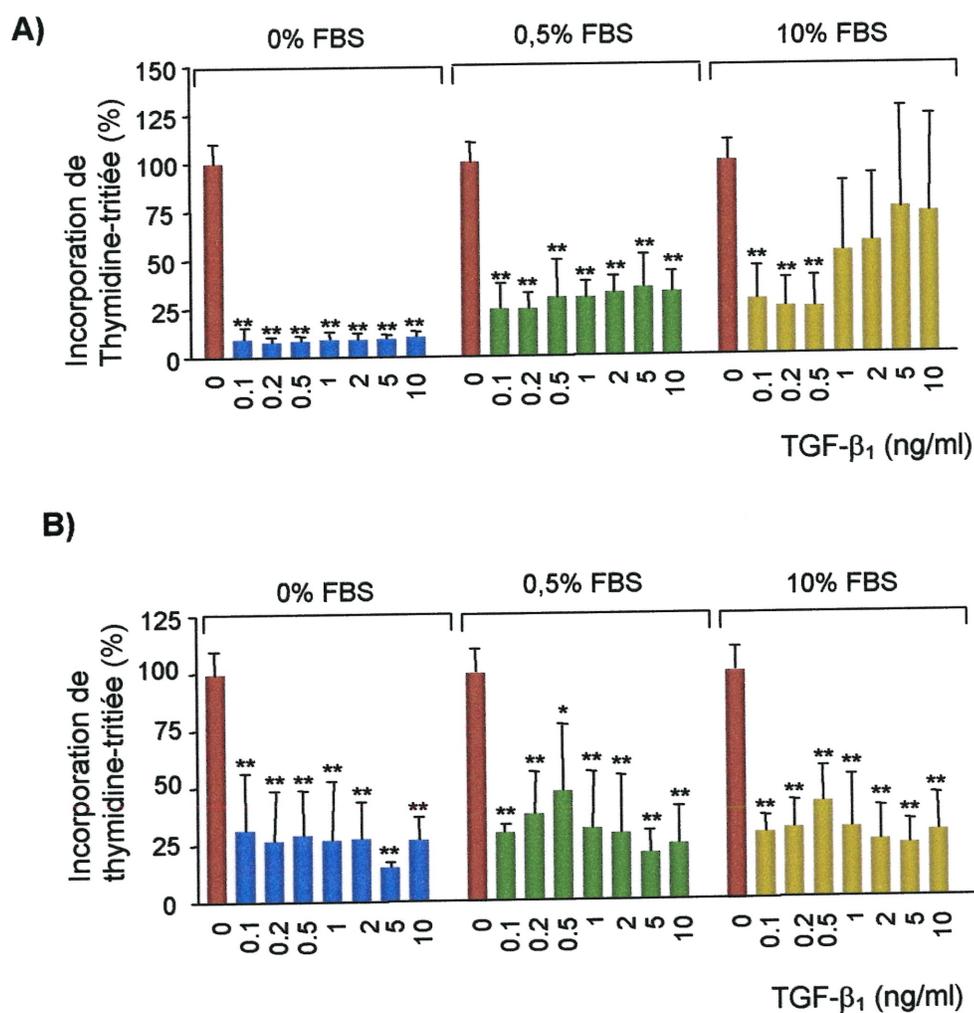
- Le TGF- $\beta_1$  recombinant sécrété par les CMLVs est biologiquement actif puisqu'il induit une augmentation de leur synthèse de collagène.
- Reconnues pour être sensibles au TGF- $\beta_1$ , les cellules épithéliales de poumon de vison ont confirmé l'activité biologique paracrine du TGF- $\beta_1$  recombinant recueilli dans le milieu de culture des CMLVs infectées à diverses MOIs.



**Figure 17 : Synthèse de collagène par les CMLVs en réponse à leur sécrétion de TGF- $\beta_1$  recombinant.**

Les CMLVs ont été infectées à des MOIs de 0, 100, 200, 300, 600 et 900 pendant 2 heures avec le vecteur AdTR5-TGFbetaDCGFP. Après une période de 48 heures, la synthèse de collagène a été mesurée par incorporation de proline-tritiée et a été exprimée en pourcentage par rapport au contrôle (MOI 0/0,5% FBS).

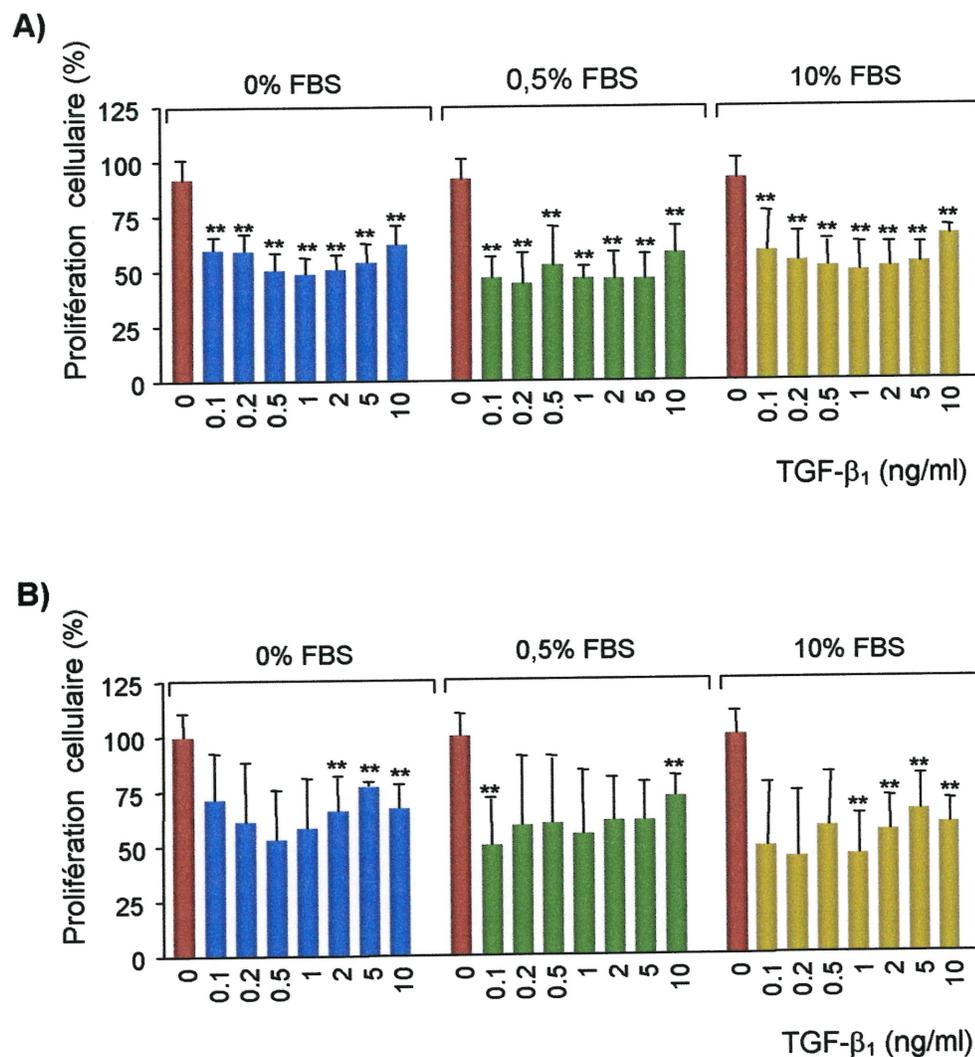
\*P < 0,05 vs contrôle et \*\*P < 0,01 vs contrôle.



**Figure 18: Synthèse d'ADN par les MLEC-32 et les Mv1Lu en réponse à du TGF- $\beta_1$ .**

Les MLEC-32 (A) et les Mv1Lu (B) ont été traitées pendant 48 heures, dans trois milieux de culture différents (0%, 0,5% et 10% FBS), avec des concentrations croissantes de TGF- $\beta_1$  (0 à 10 ng). L'ADN nouvellement synthétisé a été mesuré par incorporation de thymidine tritiée et a été exprimé en pourcentage par rapport à son contrôle respectif (0 ng TGF- $\beta_1$ /0% FBS, 0 ng TGF- $\beta_1$ /0,5% FBS et 0 ng TGF- $\beta_1$ /10% FBS).

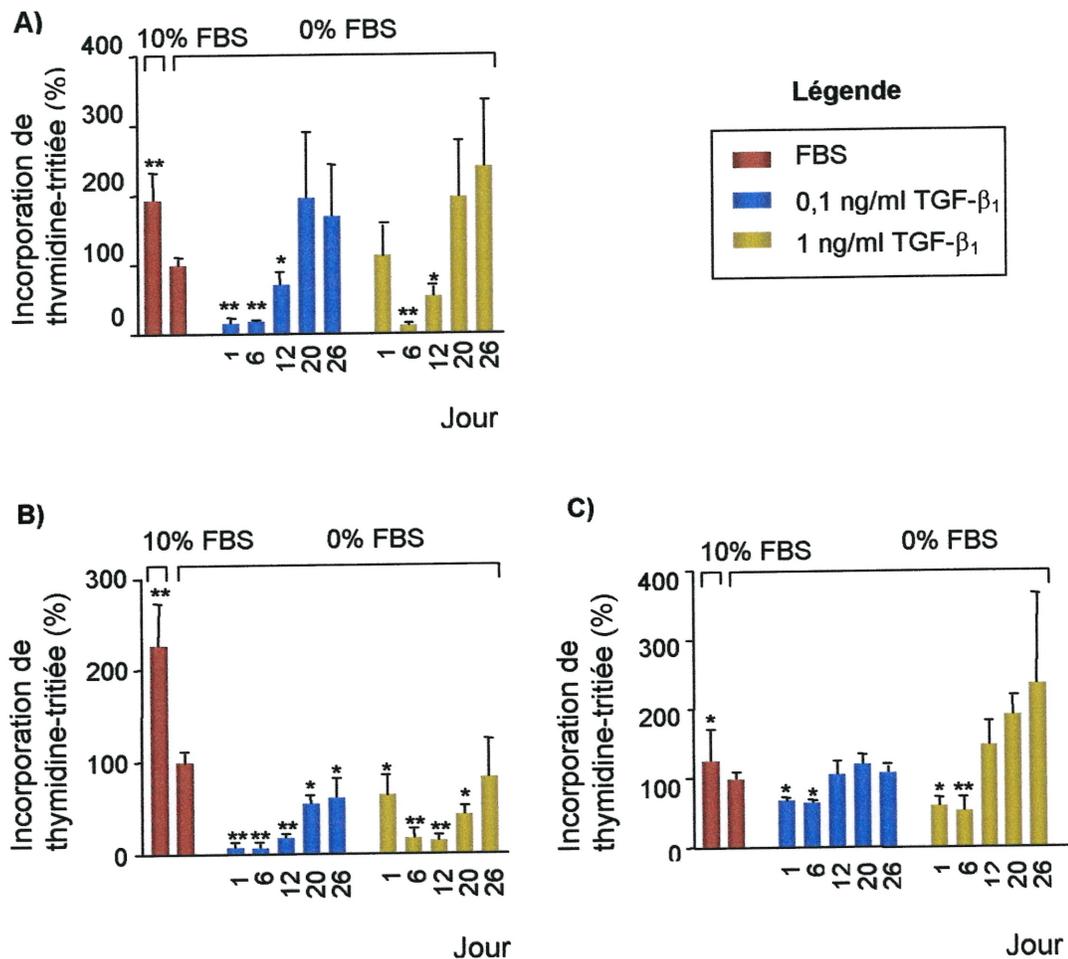
\*P < 0,05 vs contrôle et \*\*P < 0,01 vs contrôle.



**Figure 19 : Prolifération cellulaire des MLEC-32 et des Mv1Lu en réponse à du TGF-β<sub>1</sub>.**

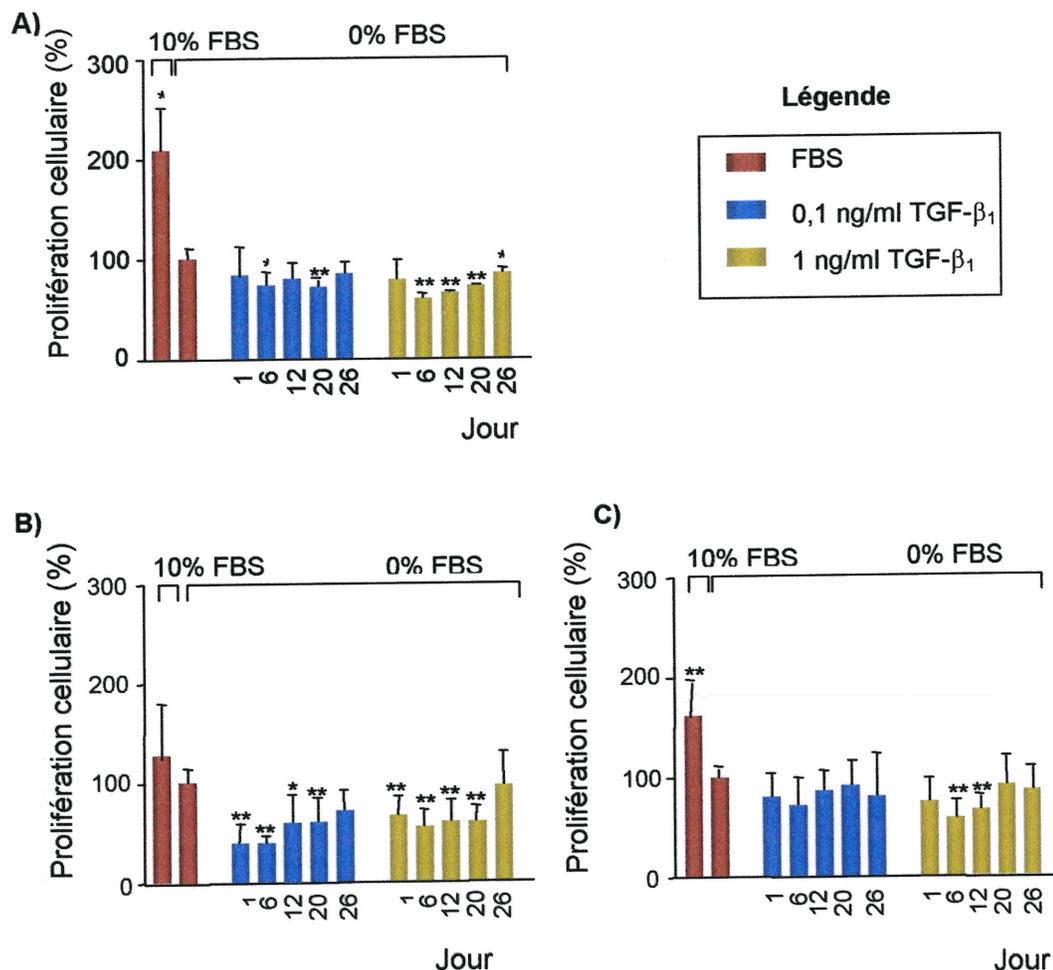
Les MLEC-32 (A) et les Mv1Lu (B) ont été traitées pendant 48 heures, dans trois milieux de culture différents (0%, 0,5% et 10% FBS), avec des concentrations croissantes de TGF-β<sub>1</sub> (0 à 10 ng). La prolifération cellulaire a été mesurée par le dosage du WST-1 et a été exprimée en pourcentage par rapport à son contrôle respectif (0 ng TGF-β<sub>1</sub>/0% FBS, 0 ng TGF-β<sub>1</sub>/0,5% FBS et 0 ng TGF-β<sub>1</sub>/10% FBS).

\*\*P<0,01 vs contrôle.



**Figure 20: Synthèse d'ADN par les MLEC-32 en réponse à du TGF- $\beta_1$  recombinant produit par les CMLVs.**

Les MLEC-32 ont été traitées pendant 48 heures, avec du TGF- $\beta_1$  recombinant (0,1 ng/ml et 1 ng/ml), provenant de surnageants prélevés aux jours 1, 6, 12, 20 et 26, de culture de CMLVs infectées avec le vecteur AdTR5-TGFbetaDCGFP, à des MOIs de 200 (A), 300 (B) et 600 (C). L'ADN nouvellement synthétisé a été mesuré par incorporation de thymidine tritiée et a été exprimé en pourcentage par rapport au contrôle (0% FBS). \*P < 0,05 vs contrôle et \*\*P < 0,01 vs contrôle.



**Figure 21: Prolifération cellulaire des MLEC-32 en réponse à du TGF-β<sub>1</sub> recombinant produit par les CMLVs.**

Les MLEC-32 ont été traitées pendant 48 heures, avec du TGF-β<sub>1</sub> recombinant (0,1 ng/ml et 1 ng/ml), provenant de surnageants prélevés aux jours 1, 6, 12, 20 et 26, de culture de CMLVs infectées avec le vecteur AdTR5-TGFbetaDCGFP, à des MOIs de 200 (A), 300 (B) et 600 (C). La prolifération cellulaire a été mesurée par le dosage du WST-1 et a été exprimée en pourcentage par rapport au contrôle (0% FBS).

\*P < 0,05 vs contrôle et \*\*P < 0,01 vs contrôle.

## **4.5 GREFFES DE CMLVs SUREXPRIMANT LE TGF- $\beta_1$ /GFP OU LA GFP**

Les anévrismes expérimentaux ont été embolisés avec des éponges de collagèneensemencées de CMLVs surexprimant le TGF- $\beta_1$ /GFP ou la GFP. La rétention de l'expression du transgène a été évaluée en microscopie à fluorescence et par immunobuvardage. Le degré d'oblitération anévrismale et la guérison ou la récurrence au collet des anévrismes ont été documentés par l'angiographie de contrôle, la macrophotographie et l'histopathologie après le sacrifice.

### **4.5.1 Rétention de l'expression du transgène**

#### **4.5.1.1 Microscopie à fluorescence**

La microscopie à fluorescence réalisée sur les spécimens fraîchement prélevés au collet des anévrismes à 1 et 3 semaines après l'embolisation a révélé de nombreuses cellules GFP positives tant du côté traité avec les épongesensemencées avec les CMLVs infectées avec le vecteur AdTR5-GFPq que du côté traité avec les CMLVs infectées avec le vecteur AdTR5-DCTGFbetaGFP (figure 22). L'index de fluorescence était plus intense lorsque les CMLVs étaient infectées avec le vecteur AdTR5-GFPq que lorsqu'elles étaient infectées avec le vecteur AdTR5-DCTGFbetaGFP. L'intensité de la fluorescence était également moindre *in vivo* qu'*in vitro*, et

moindre à 3 semaines qu'à 1 semaine après l'implantation au sein des anévrismes.

#### 4.5.1.2 Immunobuvardage

Le TGF- $\beta_1$  recombinant a été détecté par immunobuvardage dans la fraction cellulaire prélevée au collet des anévrismes à 1 et 3 semaines après l'intervention, du côté traité avec les CMLVs surexprimant le TGF- $\beta_1$  (figure 23, puits 3A et 4B). Des épongesensemencées de la même façon, mais conservées en culture pendant le même période de temps aux jours de la chirurgie (temps 0) et du sacrifice (1 ou 3 semaines) ont été également dosées afin d'obtenir une mesure comparative de l'expression du TGF- $\beta_1$  recombinant *in vitro* et *in vivo*. Une très forte surexpression de TGF- $\beta_1$  recombinant, au temps 0 a été détectée *in vitro* à 1 et 3 semaines (puits 2A et 2B), en comparaison avec les épongesensemencées de CMLVs normales (puits 8A et 8B) ou surexprimant la GFP seule (puits 5A à 7A et puits 5B à 7B), où aucun signal n'a été détecté. Une diminution de l'expression de TGF- $\beta_1$  recombinant été mesurée entre le temps 0 et 3 semaines autant *in vitro* (puits 2A et 3B) que *in vivo* ( puits 3A et 4B).

## **4.5.2 Effets biologiques sur la guérison ou la récurrence anévrismale**

### **4.5.2.1 Résultats angiographiques**

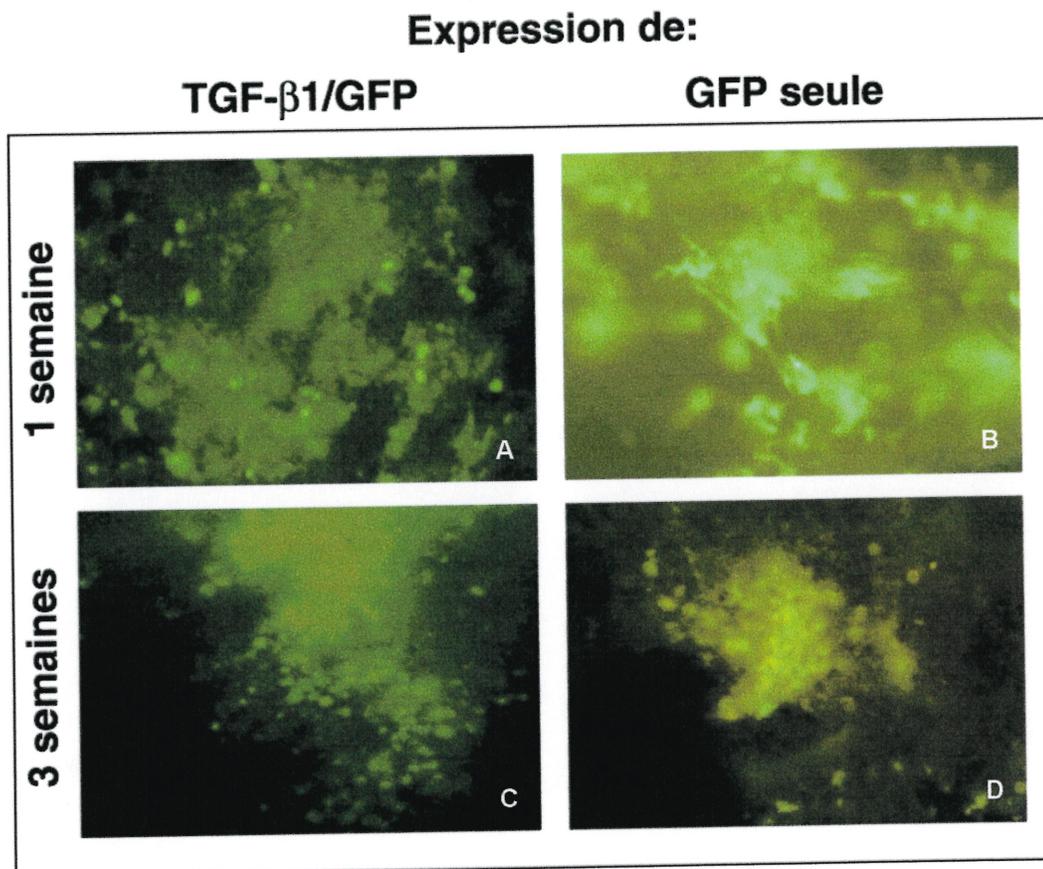
L'angiographie réalisée 1 semaine après l'embolisation des anévrismes avec les éponges de collagèneensemencées de CMLVs avec l'un ou l'autre des vecteurs a révélé après 1 semaine la persistance des collets résiduels démontrés comparativement à l'angiographie initiale (figure 24, A à D). Les angiographies à 3 semaines ont démontré une oblitération complète ou quasi complète de l'anévrisme des 2 côtés (figure 24, G et H). En effet, le score angiographique des anévrismes traités avec les greffes cellulaires surexprimant le TGF- $\beta_1$  ou la GFP a diminué entre 0 et 3 semaines (résumé des scores angiographiques, tableau II). Cependant, il n'y avait pas de différence significative dans le degré d'oblitération anévrismale obtenu par greffe d'éponges de collagène surexprimant le TGF- $\beta_1$ /GFP ou la GFP.

### **4.5.2.2 Macrophotographie et histopathologie**

La macrophotographie a démontré une fermeture complète ou quasi complète des collets des anévrismes à 3 semaines, scellés par une nouvelle paroi le plus souvent étanche, autant du côté embolisé avec une éponge de collagène surexprimant le TGF- $\beta_1$ /GFp que surexprimant la GFP (figure 25, A et B). L'histopathologie réalisée sur les spécimens

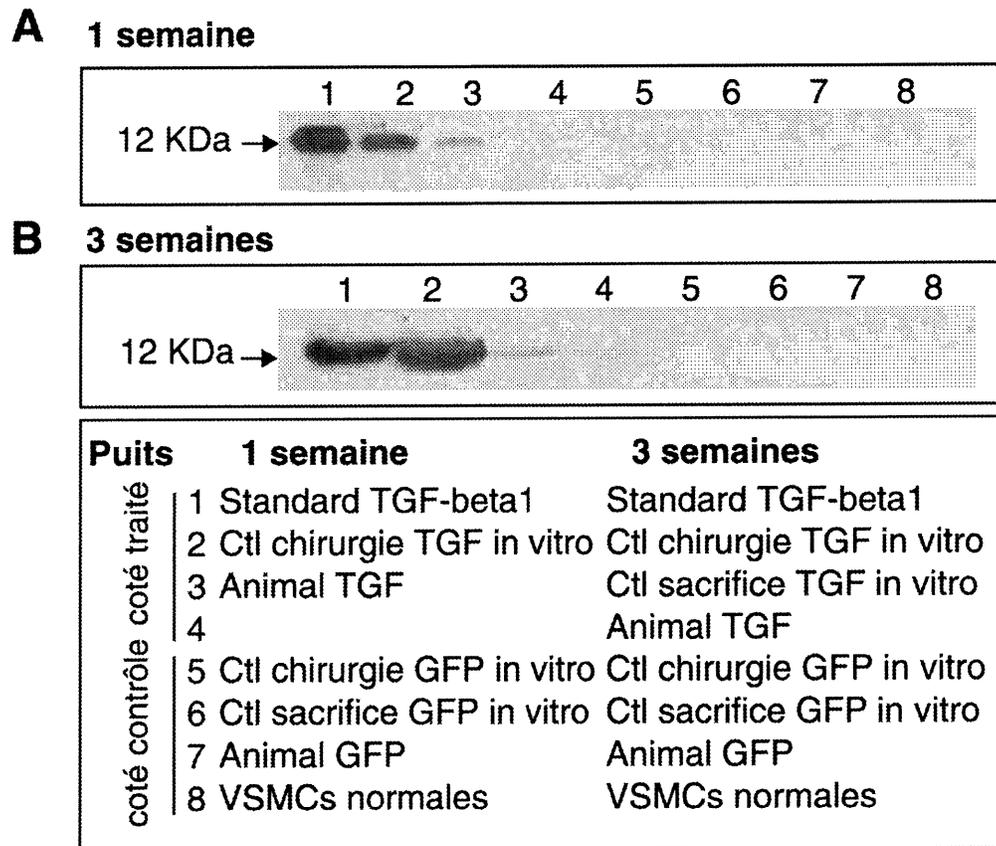
prélevés à une semaine a permis de retrouver le tissu greffé et révéler la présence d'une « néointima précoce », au sein d'un thrombus en voie d'organisation, tant du côté traité à l'aide d'épongesensemencées de cellules surexprimant le TGF- $\beta_1$  que de celui traité avec les cellules surexprimant la GFP (figure 25, C et D). La néointima formée à 3 semaines à la surface des éponges de collagène au collet des anévrismes était plus cellulaire, plus épaisse et contenait plus de fibres matricielles qu'à 1 semaine (figure 25, E à F). Cependant, il n'y avait pas de différence perceptible au niveau de la néointima formée à la surface de l'agent embolisant à 3 semaines, entre le côtéensemencé de CMLVs surexprimant le TGF- $\beta_1$  ou la GFP.

- La microscopie à fluorescence et l'analyse par immunobuvardage confirme la rétention de l'expression du transgène *in vitro* et *in vivo* dans les CMLVs pour une période d'au moins trois semaines.
- La greffe de CMLVs exprimant le vecteur adénoviral TGF- $\beta_1$ /GFP ou GFP permet une fermeture complète ou quasi complète des collets des anévrismes à 3 semaines.
- L'histopathologie permet de confirmer la présence du tissu greffé ainsi que la présence d'une néointima étanche, cellulaire et contenant plus de fibres matricielles.



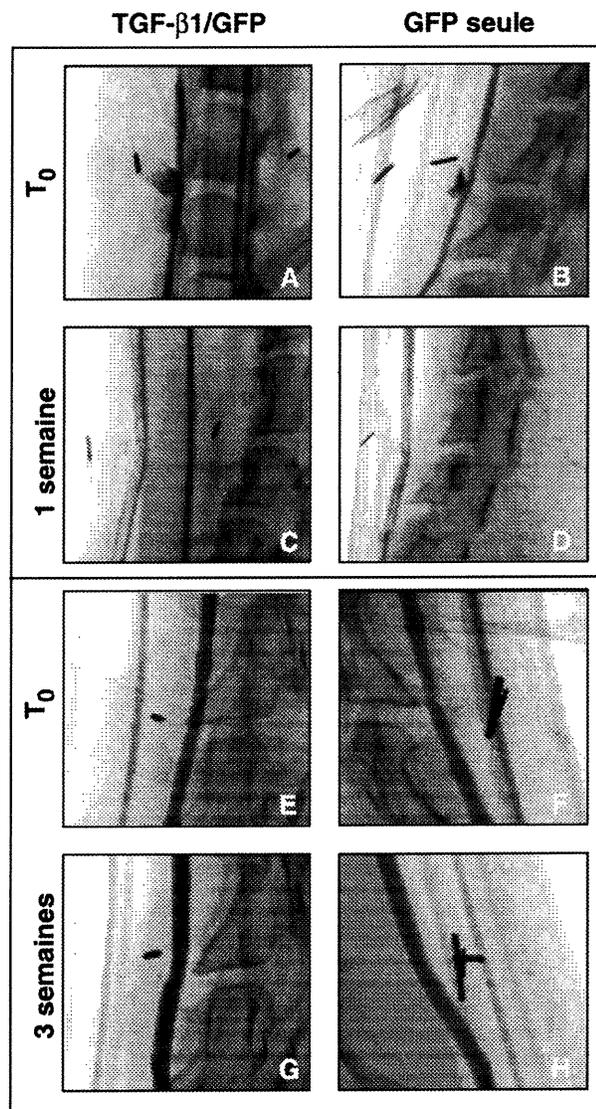
**Figure 22 : Expression *in vivo* de la GFP.**

Microscopie à fluorescence des éponges de collagèneensemencées de CMLVs surexprimant le vecteur AdTR5-TGFbetaDCGFP ou AdTR5-GFPq à la MOI de 300, fraîchement prélevées à 1 et 3 semaines après la greffe. Magnification 40X (A, C et D) et 100X (B).



**Figure 23 : Immunobuvardage du TGF- $\beta_1$  recombinant surexprimé par les CMLVs.**

Comparaison *in vivo* et *in vitro* de l'expression du TGF- $\beta_1$  recombinant par les CMLVs à 1 et 3 semaines (A et B). Les fractions cellulaires proviennent d'éponges de collagèneensemencées de CMLVs surexprimant le TGF- $\beta_1$  ou la GFP qui sont soit greffées dans l'anévrismes (*in vivo*, puits 3 et 7) soit conservées *in vitro*. *In vitro*, les éponges contrôles correspondent au jour de la chirurgie (*in vitro*, puits 2 et 5) et au jour du sacrifice (*in vitro*, puits 5 et 7). Le puits 1 contient 50 ng de standard.



**Figure 24 : Résultats angiographiques.**

Angiographies des anévrismes embolisés par greffe de CMLVs, surexprimant le TGF- $\beta_1$  ou la GFP. CMLVs/TGF- $\beta_1$  au temps 0 (A et E), 1 semaine (C) et 3 semaines (G); CMLVs/GFP au temps 0 (B et F), 1 semaine (D) et 3 semaines (H).

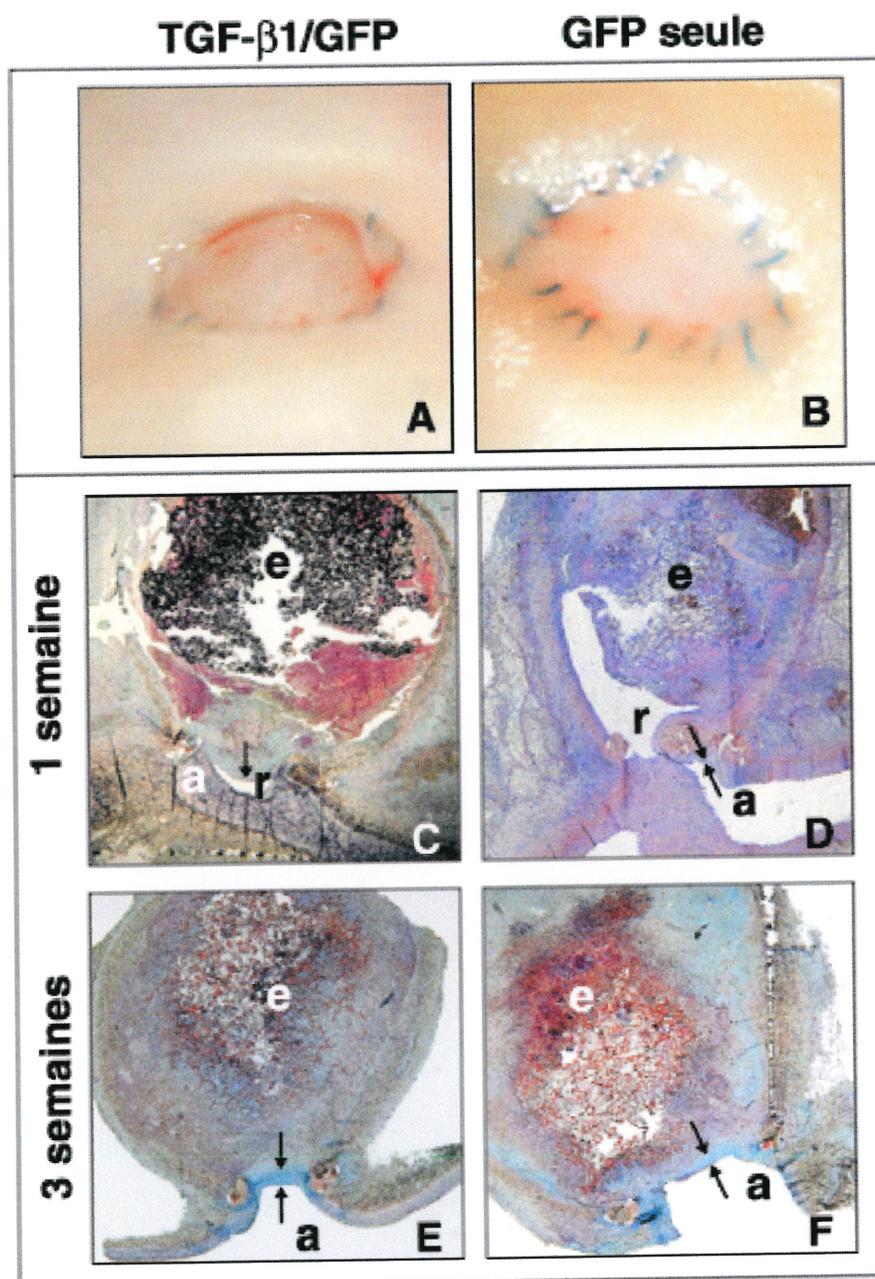
GROUPES EXPÉRIMENTAUX	SCORES ANGIOGRAPHIQUES				
	Animaux	TGF- $\beta_1$ /GFP		GFP	
		Chirurgie	Sacrifice	Chirurgie	Sacrifice
1 semaine	1	3	2	3	2
	2	3	2	3	2
2 semaines	3	3	1	3	2
	4	2	1	2	2
3 semaines	5	2	0	2	0
	6	2	0	0	0
	7	2	0	0	1

**Tableau II : Sommaire des scores angiographiques.**

Les anévrismes expérimentaux ont été embolisés par des éponges de collagène ensemencées de CMLVs surexprimant le TGF- $\beta_1$ /GFP ou la GFP. Une angiographie de contrôle a été réalisée à 1, 2 et 3 semaines afin de documenter l'évolution de l'occlusion anévrismale.

**Légende des scores angiographiques**

0	Oblitération complète de l'anévrisme
1	Fissure proximale ou distale
2	Collet résiduel
3	Récidive de l'anévrisme



**Figure 25 : CMLVs greffées *in vivo*.**

Macrophotographies du collet des anévrismes embolisés avec CMLVs surexprimant le TGF-β<sub>1</sub> (A) et la GFP (B) à 3 semaines, magnification 20X. Études histopathologiques des sections axiales des anévrismes

traités avec éponges de collagène ensemencées de CMLVs surexprimant le TGF- $\beta$  à 1 semaine (C) et 3 semaines (E) ou surexprimant la GFP à 1 semaine (D) et 3 semaines (F). a : artère carotidienne, e : éponge,  $\rightarrow$  : néointima, r : recanalisation. Coloration au pentachrome de Movat (C, D et F) et à l'hématoxyline, phloxine, safran HPS (D), magnification 20X.

## **5. DISCUSSION**

L'objectif général de ce projet était de développer un agent embolisant, stimulant la formation néointimale, qui permettrait d'améliorer les résultats, à long terme, du traitement endovasculaire des anévrismes. Les mécanismes de guérison ou de récurrences des anévrismes intracrâniens traités par embolisation demeurent méconnus. Des travaux antérieurs ont démontré que les modèles expérimentaux qui évoluent vers la guérison sont associés à une formation néointimale épaisse au collet des anévrismes, alors que ceux qui récidivent sont associés à une formation néointimale déficiente. La libération locale de facteurs de croissance (PDGF-BB ou TGF- $\beta_1$ ) pouvait stimuler la formation néointimale au collet des anévrismes traités par embolisation. Cette approche, efficace dans le modèle porcin, s'est avérée sans effet sur un modèle canin où la récurrence est constante<sup>41</sup>. Par ailleurs, une greffe *in situ* de CMLVs autologues a permis d'épaissir la néointima et d'améliorer les résultats angiographiques dans le modèle expérimental canin<sup>42</sup>. La suite logique de ces travaux était d'utiliser les CMLVs en tant que vecteur cellulaire d'une thérapie génique et le TGF- $\beta_1$  comme agent thérapeutique, puisqu'ils s'étaient avérés efficaces pour stimuler la guérison anévrismale. Des travaux plus récents ont par ailleurs révélé le rôle déterminant des mécanismes de recanalisation du caillot dans la récurrence anévrismale, mécanismes synchrones à ceux impliqués dans la

formation néointimale<sup>39</sup>. Nous souhaitons donc favoriser la formation néointimale tout en inhibant la recanalisation en réalisant une greffe autologue de CMLVs surexprimant le TGF- $\beta_1$ .

### 5.1 Les CMLVs répondent aux facteurs de croissance

Les cellules néointimales retrouvées au collet des anévrismes porcins traités par embolisation répondent favorablement à l'administration de facteurs de croissance *in vitro*. Cette réponse est identique à celle des cellules (CMLVs)  $\alpha$ -actine positive de la média artérielle. Nous avons d'abord voulu vérifier si les CMLVs canines répondaient favorablement *in vitro* aux facteurs de croissance, les travaux antérieurs ayant été réalisés sur des CMLVs porcines<sup>41</sup>. L'étude des effets mitotiques du PDGF-BB et du TGF- $\beta_1$  a permis de confirmer que le PDGF-BB stimule la prolifération des CMLVs contrairement au TGF- $\beta_1$  qui lui l'inhibe. Le PDGF-BB est un puissant agoniste de la prolifération et de la migration des CMLVs *in vitro*<sup>144, 145</sup>. Nous savons également que son expression augmente au site d'une lésion vasculaire et qu'il stimule la formation néointimale *in vivo*<sup>146, 147</sup>. Nous avons démontré que le TGF- $\beta_1$  inhibe la prolifération des CMLVs, mais nous n'avons pas réussi à démontrer significativement l'effet inhibiteur du TGF- $\beta_1$  sur l'effet mitotique du PDGF-BB (figure 9). Les effets mitogènes du TGF- $\beta_1$ , *in vitro*, diffèrent selon le type cellulaire, la densité et les conditions de culture. En effet, il est tantôt inhibiteur, tantôt

stimulateur de la prolifération cellulaire<sup>87, 148</sup>. Par contre, il est reconnu que le TGF- $\beta_1$  est impliqué dans le processus de guérison des lésions vasculaires. Il régule la prolifération et la migration des CMLVs et des cellules endothéliales, il induit la différenciation des CMLVs et stimule la production de protéines de la matrice extracellulaire<sup>149, 150</sup>. Les cellules souches embryonnaires en culture peuvent migrer vers un gradient de PDGF-BB et se différencier en CMLVs. Ces mêmes cellules, lorsqu'en contact avec l'endothélium peuvent se différencier en CMLVs. Cette étape de différenciation est inhibée par la présence d'anticorps neutralisant le TGF- $\beta_1$ . Ainsi, le TGF- $\beta_1$  semble favoriser la différenciation des CMLVs et le rétablissement de l'intégrité vasculaire<sup>151</sup>.

La réponse mitotique au PDGF emprunte de nombreuses voies de signalisation notamment la voie MAP kinase ou « mitogen-activated protein kinase » et la voie phosphoinositide (PI3-kinase/Akt). Suite à l'activation du récepteur du PDGF, la voie MAP kinase, par la protéine ras puis le facteur erk, aboutit à l'augmentation de l'expression de l'ARNm de la cycline D. La voie de signalisation PI3-kinase/Akt phosphoryle la cycline D et bloque sa dégradation par ubiquitination tandis qu'elle inhibe également les voies de l'apoptose. Le cycle cellulaire est alors activé et la cellule progresse vers la phase S, la mitose et la prolifération<sup>152, 153</sup>.

À l'inverse du PDGF-BB, le TGF- $\beta_1$  est un inhibiteur de la prolifération des CMLVs (figure 9). Cet effet peut s'expliquer par une augmentation de l'expression des protéines qui inhibent les protéines kinases cdk de la phase G1, comme la protéine p21. Cette protéine est synthétisée sous la dépendance du facteur p53; elle se lie aux protéines kinases cdk2, cdk4, cdk6 et bloque le passage de G1 vers S. En outre, elle se lie au PCNA ou « proliferating cell nuclear antigen », un co-facteur de l'ADN polymérase nécessaire pour la réplication de l'ADN. Lors du contrôle normal de la prolifération cellulaire, l'effet anti-mitotique du TGF $\beta_1$  est dominant sur l'effet d'un facteur mitotique, tel que le PDGF-BB, ayant une signalisation par la protéine ras<sup>103, 154, 155</sup>.

Contre toute attente, les résultats obtenus par le dosage du WST-1 suggèrent un effet de synergie entre le PDGF-BB et le TGF- $\beta_1$  (figure 10), ce qui est contraire à l'effet inhibiteur normalement attendu dans le même modèle lors de l'incorporation de thymidine tritiée (figure 9). Pour expliquer cette contradiction, il faut savoir que les changements dans l'environnement de culture, tels qu'un apport de glucose ou une modification de pH, peuvent influencer la réduction des sels de tétrazolium et introduire des artéfacts dans les essais colorimétriques<sup>156</sup>. L'introduction de telles variations au sein des expériences peuvent mener à des résultats aberrants ou paradoxaux. Puisque ce test peut entraîner

des erreurs d'interprétation, seuls les résultats obtenus par l'incorporation de thymidine tritiée ont été retenus.

Les CMLVs peuvent subir une modulation phénotypique passant d'un état contractile prédominant à un état mitotique ou synthétique prédominant. Suivant cette hypothèse, la prolifération et la migration des CMLVs « synthétiques » se retrouvent de façon non-spécifique dans les mécanismes de guérison des lésions vasculaires, dans la resténose et dans l'athérosclérose<sup>157, 158</sup>. Les études *in vivo* démontrent que la dénudation endothéliale provoquée par une angioplastie induit la sécrétion de PDGF-BB et de TGF- $\beta_1$ , ce qui stimule la prolifération et la migration des CMLVs vers l'intima, favorise l'hyperplasie intimale ainsi que la production et l'accumulation de matrice extracellulaire incluant le collagène<sup>159, 160, 161, 162, 163</sup>. Dans cette optique, le TGF- $\beta_1$  possède aussi une activité chimiotactique et mitotique car il induit la synthèse et la sécrétion de PDGF-BB<sup>106</sup>. Dans notre modèle expérimental, la prolifération et la migration des CMLVs sont aussi des étapes essentielles à la formation néointimale au collet des anévrismes traités par embolisation. Nous avons montré que les cellules néointimales prélevées au collet des anévrismes traités par embolisation présentaient les mêmes caractéristiques et les mêmes réponses aux facteurs de croissance (PDGF-BB et TGF- $\beta_1$ ) que les cellules prélevées de la média artérielle<sup>41</sup>.

Les résultats obtenus dans cette étude (figure 9 et 10) ont permis de retrouver les effets classiques des facteurs de croissance impliqués dans la formation néointimale chez les CMLVs canines, qui serviront de vecteur à la thérapie génique.

## **5.2 Les CMLVs expriment efficacement les vecteurs adénoviraux.**

Nous avons utilisé un vecteur adénoviral contenant l'ADN complémentaire du TGF- $\beta_1$  humain et de la GFP ainsi qu'un vecteur contrôle n'ayant que celui de la GFP. L'emploi d'un vecteur avec une co-expression de GFP permet une évaluation rapide et directe de l'efficacité de transfection. Nous avons constaté une augmentation proportionnelle de l'index de fluorescence *in vitro*, avec l'augmentation de la MOI, autant avec le vecteur AdTR5-GFPq qu'avec le vecteur AdTR5-TGFbetaDCGFP. Ce marqueur d'expression génique possède la propriété de pouvoir être détecté autant au niveau de la cellule que dans l'organisme entier.<sup>164</sup> Cependant, lorsque la GFP est exprimée en tant que second cistron, l'intensité de son expression est diminuée de 2 à 4 fois (figure 11). Elle demeure néanmoins facilement détectable autant *in vitro* que *in vivo*.

Un système d'expression par un vecteur adénoviral permet de produire une grande quantité de protéines recombinantes. Nous avons démontré

que notre système d'expression est efficace puisque des concentrations considérables de TGF- $\beta_1$  ont été mesurées dans les surnageants de culture des cellules transfectées, jusqu'à un maximum de 180 ng/ml à la MOI de 900 (figure 12). Les concentrations mesurées augmentent de façon linéaire avec l'accroissement de la MOI et elles suivent également l'index de fluorescence de la GFP. Ce patron d'expression demeure constant pendant les premiers six jours. Par la suite, on assiste à une baisse abrupte de la sécrétion aux MOIs de 600 et 900, révélant ainsi une faiblesse dans le système d'expression de la protéine recombinante. La cytotoxicité est une première hypothèse permettant d'expliquer cette baisse de production. Effectivement, nous avons remarqué en microscopie que la viabilité cellulaire est affectée à de fortes MOIs. Généralement, ce type de système d'expression permet de produire la protéine recombinante jusqu'à des niveaux atteignant plus de 20% du total des protéines cellulaires, mais seulement si les protéines produites n'affectent pas la cellule transfectée. De manière générale, le TGF- $\beta_1$  n'est pas considéré comme toxique<sup>173</sup>. Il est normalement produit en quantité infinitésimale par les cellules. En concentration supra-physiologique, des fonctions cellulaires pourraient être altérées.

Afin de discriminer les effets de l'infection virale de ceux liés à la production de TGF- $\beta_1$  recombinant, des études comparatives de la

synthèse d'ADN et de la prolifération cellulaire ont été réalisées avec le vecteur surexprimant le TGF- $\beta_1$  et celui ne surexprimant que la GFP. La comparaison des résultats démontre clairement que le modèle de réponse est le même, soit une diminution graduelle et proportionnelle de l'incorporation de thymidine tritiée avec l'augmentation de la MOI (figures 13 à 15). La diminution de la synthèse d'ADN n'est donc pas associée à la production et la sécrétion du TGF- $\beta_1$  recombinant, mais plutôt à l'effet de l'infection virale.

### **5.3 Le TGF- $\beta_1$ recombinant sécrété par les CMLVs est biologiquement actif.**

Bien que le taux de transfection du vecteur dans la cellule cible atteigne 80% d'efficacité *in vitro* et qu'il soit possible d'obtenir une grande quantité de TGF- $\beta_1$  immunoréactif, qu'en est-il de l'activité biologique du transgène? Tout d'abord, l'activité biologique du TGF- $\beta_1$  recombinant a été testée par une mesure de la synthèse de collagène par les cellules transfectées. Nous avons démontré que le TGF- $\beta_1$  sécrété par les CMLVs augmente la synthèse de collagène pour toutes les MOIs (figure 17). Puisque le TGF- $\beta_1$  est un puissant stimulateur de la synthèse du procollagène de type 1, il est inattendu de constater que la synthèse de collagène diminue avec une augmentation de la MOI. En effet, par

rapport au contrôle négatif, la synthèse de collagène passe de 200% à des faibles MOIs (100 et 200) à 40% à une MOI de 900.

Le TGF- $\beta_1$  est sécrété sous la forme d'un complexe inactif. De manière classique, la régulation de l'activité du TGF- $\beta_1$  est évaluée en examinant le niveau de sa synthèse, que ce soit la transcription ou la traduction. Pourtant, l'augmentation de la production du TGF- $\beta_1$  par les cellules n'est pas toujours corrélée avec une activité biologique plus intense. Bien que des cellules en culture puissent synthétiser une très grande quantité de TGF- $\beta_1$  latent, une infime partie (généralement moins de 5%) est activée<sup>165</sup>. L'activation du complexe latent représente une étape restrictive qui est au moins aussi importante que celle de la synthèse pour moduler son activité. Ainsi, la recherche d'une activité accrue du TGF- $\beta_1$  par une surexpression nécessiterait l'utilisation d'un ADN complémentaire muté qui coderait pour du TGF- $\beta_1$  actif et non pas latent puisque la surexpression n'aboutit pas toujours à un phénotype détectable. Puisque le TGF- $\beta_1$  recombinant est sécrété par les CMLVs sous forme latente, qu'il peut être activé indépendamment de sa transcription et que nous n'avons employé aucun moyen pour l'activer lors de cette expérience, nous pouvons suggérer que la variation des résultats est le reflet d'un manque de contrôle de l'activation du TGF- $\beta_1$ . D'ailleurs, la comparaison des résultats de la synthèse de collagène obtenus à des MOIs de 200, 300 et

600 le démontre bien. Ainsi, nous avons mesuré une augmentation de la synthèse de collagène de 100% à la MOI de 200, de 23% à la MOI de 300 et de 70% à la MOI de 600 comparativement au contrôle négatif (figure 17). L'effet de l'infection virale pourrait peut-être aussi expliquer le patron de diminution de la synthèse de collagène avec des MOIs croissantes. Il serait d'ailleurs intéressant de pouvoir comparer les résultats obtenus avec un système d'expression adénoviral permettant une expression constitutive de TGF- $\beta_1$  actif.

Pour démontrer l'activité biologique du TGF- $\beta_1$  recombinant, nous avons également employé une lignée de cellules épithéliales de poumon de vison, reconnue comme étant excessivement sensible au TGF- $\beta_1$ . L'activité biologique du TGF- $\beta_1$  recombinant contenu dans les surnageants cellulaires a été mesurée par la synthèse d'ADN et la prolifération cellulaire des MLEC-32. En comparant la caractérisation des MLEC-32 faite avec le TGF- $\beta_1$  commercial, nous avons pu authentifier que le TGF- $\beta_1$  recombinant sécrété à court terme par les CMLVs infectées peut inhiber la synthèse d'ADN (figure 20). Par contre, le TGF- $\beta_1$  à plus long terme ne démontre pas d'effet anti-mitotique sur les MLEC-32. Une proportion importante de TGF- $\beta_1$  sécrétée demeure vraisemblablement sous forme latente.

Dans les vaisseaux sanguins, les cellules endothéliales se retrouvent en contact avec les cellules musculaires ou les péricytes. Ces types cellulaires, lorsqu'ils sont cultivés *in vitro* séparément, produisent du TGF- $\beta_1$  latent, mais très peu de TGF- $\beta_1$  actif. En revanche, lorsque les cellules endothéliales sont mises en présence de cellules musculaires lisses ou de péricytes, on observe une augmentation du taux de TGF- $\beta_1$  actif, ce qui se traduit, par exemple, par l'inhibition de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales<sup>99, 166</sup>. La mise en contact, ou la proximité des deux types cellulaires déclenchent l'activation du TGF- $\beta_1$  latent. Cette observation est importante puisque nous n'avons testé l'efficacité du système d'expression *in vitro* qu'en présence d'un seul type cellulaire.

#### **5.4 Les CMLVs greffées *in vivo* survivent et expriment le transgène pendant au moins 3 semaines.**

Pour réaliser une thérapie génique, on doit d'abord s'assurer de la survie des cellules greffées et de la persistance *in vivo* de l'expression du transgène. En effet, les cellules pourraient ne pas « prendre » au collet de l'anévrisme, être affectées par le flot sanguin, être compromises par la réponse immunitaire causée par les antigènes viraux. Par ailleurs, l'ADN demeure épisomal, il pourrait ne pas s'exprimer suffisamment longtemps pour réaliser son effet thérapeutique et la MOI choisie pourrait ne pas être

convenable pour produire les effets escomptés. Le modèle expérimental que nous avons choisi a fréquemment servi à étudier les mécanismes de guérison ou de récurrence des anévrismes<sup>41,42</sup>; l'embolisation peropératoire à l'aide d'éponge de collagène est un modèle pratique, bien documenté, peu coûteux qui nous a permis de reproduire le problème de la récurrence. Des travaux similaires réalisés avec des coils de platine auraient engendré des coûts prohibitifs. De plus, l'embolisation post-opératoire réalisée avec les coils est moins contrôlée. Les coupes histologiques sont également dégradées par les artéfacts causés par les fils métalliques. Nous avons donc testé l'expression du transgène dans notre modèle d'anévrismes carotidiens expérimentaux, qui permet d'étudier un côté traité et un côté contrôle chez le même animal. Le côté traité est embolisé avec une éponge de collagèneensemencée de CMLVs surexprimant le TGF- $\beta_1$  et le côté contrôle contient une éponge de collagèneensemencée de CMLVs surexprimant la GFP. Nous avons utilisé des éponges de collagène comme agent embolisant, car elles peuvent aussi bien supporter la croissance de CMLVs *in vitro*, que la transplantation dans les anévrismes *in vivo*. Grâce au marqueur fluorescent, nous pouvons affirmer que les CMLVs encemencées sur les éponges de collagène survivent et expriment toujours le transgène et ce jusqu'à 3 semaines après l'embolisation. Le fragment prélevé au collet de chacun des anévrismes embolisés démontre clairement l'expression de la GFP en

microscopie à fluorescence à 3 semaines (figure 22). Nous pouvons également confirmer que l'index de fluorescence autant *in vitro* que *in vivo* est plus fort avec le vecteur qui exprime seulement la GFP comparativement au vecteur TGF- $\beta_1$ /GFP. De plus, les résultats de l'immunobuvardage démontre que le TGF- $\beta$  est surexprimé dans l'anévrisme à 1 et 3 semaines, comparativement au côté contrôle où aucun TGF- $\beta_1$  n'est détecté (figure 23, puits 3A, 4B et 7A, 7B). Des éponges contrôles aux jours de la chirurgie et du sacrifice permettent de comparer la mesure *in vivo* à la sécrétion de TGF- $\beta_1$  recombinant *in vitro*. L'intensité du signal *in vitro* diminue entre le jour 1 et le jour 21 (puits 2A et 2B). Elle est encore plus faible *in vivo*, à 21 jours (puits 4B). Il est plus difficile, voir impossible, de déterminer avec précision la quantité de TGF- $\beta_1$  exprimée et sécrétée *in vivo*, car nous n'avons prélevé qu'un fragment de la néointima retrouvée au collet de l'anévrisme pour l'immunobuvardage, ce qui ne correspond pas à la totalité des cellules infectées puis greffées. Par ailleurs, le TGF- $\beta_1$  possède une courte demi-vie qui pourrait vraisemblablement modifier les résultats de l'immunobuvardage *in vivo*. En effet, les CMLVs surexprimant le TGF- $\beta_1$  sont greffées dans la poche veineuse délimitée par les cellules endothéliales. Lors de la formation du caillot et de la migration des cellules de l'hôte, elles seront en contact avec de nombreux types cellulaires, y compris les cellules endothéliales associées à la

recanalisation. Puisque la proximité des deux types cellulaires semble déclencher l'activation du TGF- $\beta_1$  latent. Il serait d'ailleurs intéressant d'étudier l'activité mitotique des cellules endothéliales canines en réponse au TGF- $\beta_1$  recombinant contenu dans les surnageants de cultures de CMLVs ayant été infectées. L'inhibition attendue de la prolifération des cellules endothéliales supporterait l'hypothèse voulant que notre stratégie puisse inhiber les mécanismes de recanalisation du caillot associés à la récurrence anévrismale dans notre modèle animal.

### **5.5 La greffe de CMLVs améliore les résultats angiographiques de l'embolisation des anévrismes.**

Le modèle canin d'anévrismes carotidiens embolisés à l'aide d'éponges de collagène a été étudié de façon extensive dans notre laboratoire<sup>41, 42</sup>. La documentation du degré d'oblitération anévrismale et de la guérison ou de la récurrence au collet des anévrismes nécessite une angiographie de contrôle, la macrophotographie et l'histopathologie après le sacrifice. Les anévrismes embolisés avec une éponge de collagène seule récidivent : le score angiographique augmente à trois semaines, le collet demeure largement ouvert à la macrophotographie et la néointima est déficiente à l'immunohistochimie. Nous avons observé une nette amélioration du score angiographique (figure 24, tableau II) entre 0 et 3 semaines avec les greffes cellulaires tant du côté traité avec le TGF- $\beta_1$  que du côté

contrôle traité avec la GFP. Cette observation confirme des travaux réalisés lors d'études antérieures dans notre laboratoire avec le même modèle animal<sup>42</sup>. Les résultats obtenus avec la greffe de CMLVs sont tels qu'il n'y a plus de récurrence et que les collets sont bien scellés par une néointima épaisse. La surexpression de TGF- $\beta_1$  au sein de l'anévrisme traité n'a pas causé de changement significatif du score angiographique et n'augmente pas significativement la formation néointimale. Nous pouvons seulement affirmer que la surexpression du TGF- $\beta_1$  n'a pas nuit à l'effet thérapeutique de la greffe de CMLVs sur l'évolution du modèle. Il faudra avoir recours à d'autres modèles pour évaluer l'effet de la surexpression de TGF- $\beta_1$  ou encore initialement ensemercer moins de cellules sur l'éponge de collagène pour vraiment percevoir les effets bénéfiques du TGF- $\beta_1$  recombinant au collets des anévrismes. Il faut souligner que l'embolisation peropératoire d'éponges ensemençées de cellules, qui permet une greffe cellulaire efficace, n'est pas une solution réaliste au problème de la récurrence après traitement endovasculaire, car elle ne peut être adaptée en clinique. La petite taille des microcathéters qui permettent normalement l'accès à l'anévrisme, nous contraint à l'utilisation d'agents embolisant beaucoup plus petits comme les filaments de platine. Une greffe cellulaire via les filaments de platine a déjà été étudiée<sup>167, 168</sup>. La greffe cellulaire est alors beaucoup moins efficace et la surexpression d'un gène, tel que le TGF- $\beta_1$ , pourrait dans ce contexte se révéler d'une

grande valeur. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en comparant le taux de recanalisation d'artères embolisées avec un filament de platine avec celui d'artères embolisées avec filamentensemencé de CMLVs surexprimant ou non le TGF- $\beta_1$ . Une autre solution technique envisageable est l'utilisation d'un polymère tel que l'alginate, qui peut être injecté par microcathéter et pourrait permettre d'ensemencer l'anévrisme avec des CMLVs<sup>169</sup>.

## 6 Conclusion

Les résultats obtenus par ce modèle de thérapie génique *ex vivo* avec le TGF- $\beta_1$ , ne démontrent pas d'amélioration significative de la guérison des anévrismes expérimentaux. Nous avons cependant démontré la faisabilité de cette stratégie : il est possible de prélever des CMLVs, de les infecter par un adénovirus pour qu'elles surexpriment le TGF- $\beta_1$ . Nous avons identifié les conditions optimales d'infection. Nous avons démontré que ces cellules survivent à la greffe et expriment le transgène *in vivo*, pour au moins 3 semaines. Nos travaux futurs viseront à identifier une méthode endovasculaire afin de réaliser cette greffe par des microcathéters utilisés en pratique courante. Nous espérons ainsi améliorer les résultats à long terme du traitement endovasculaire des anévrismes intracrâniens.

---

**BIBLIOGRAPHIE**

- <sup>1</sup> **Wiebers DO.** Unruptured intracranial aneurysms—risk of rupture and risk of surgical intervention. International Study of Unruptured Intracranial Aneurysms Investigators [published erratum appears in *N Engl J Med.* 1999 Mar 4;340(9):744]. *N Engl J Med.* 1998. 339 (24):1725-33.
- <sup>2</sup> **Andreoli A, Sturiale C, Pozzati E, Mascari C, Testa C.** [Unruptured cerebral aneurysms. What is the risk of rupture? What is the risk connected with a surgical intervention? A contribution to the international ISUIA study: International Study on Unruptured Intracranial Aneurysms] *Recenti Prog Med.* 1999 May;90(5):249-53.
- <sup>3</sup> **Kassell NF, Torner JC, Haley EC Jr, Jane JA, Adams HP, Kongable GL.** The International Cooperative Study on the Timing of Aneurysm Surgery. Part 1: Overall management results. *J Neurosurg.* 1990 Jul;73(1):18-36.
- <sup>4</sup> **Mayberg MR, Batjer HH, Dacey R, Diringer M, Haley EC, Heros RC, Sternau LL, Torner J, Adams HP Jr, Feinberg W, et al.** Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. A statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association. *Circulation.* 1994 Nov;90(5):2592-605.
- <sup>5</sup> **Roche JL, Choux M, Czorny A, Dhellemmes P, Fast M, Frerebeau P, Lapras C, Sautreaux JL.** Intracranial arterial aneurysm in children. A cooperative study. Apropos of 43 cases. *Neurochirurgie.* 1988;34(4):243-51.
- <sup>6</sup> **Osborn AG.** Intracranial aneurysms . In : Brant-Zawadski M, Drayers BP, eds. Core curriculum course in neuroradiology. Part I : Vascular lesions and degenerative diseases. American Society of Neuroradiology, Chicago, IL, April 21-22, 1995.
- <sup>7</sup> **Stehbens WE.** Etiology of intracranial berry aneurysms. *J Neurosurg.* 1989 Jun;70(6):823-31.
- <sup>8</sup> **Cawley CM, Dawson RC, Shengelaia G, Bonner G, Barrow DL, Colohan AR.** Arterial saccular aneurysm model in the rabbit. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1996 Oct;17(9):1761-6.

- <sup>9</sup> **Abruzzo T, Shengelaia GG, Dawson RC 3rd, Owens DS, Cawley CM, Gravanis MB.** Histologic and morphologic comparison of experimental aneurysms with human intracranial aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1998 Aug;19(7):1309-14.
- <sup>10</sup> **Connolly ES Jr, Fiore AJ, Winfree CJ, Prestigiacoma CJ, Goldman JE, Solomon RA.** Elastin degradation in the superficial temporal arteries of patients with intracranial aneurysms reflects changes in plasma elastase. *Neurosurgery.* 1997 May;40(5):903-8.
- <sup>11</sup> **Strother CM, Graves VB, Rappe A.** Aneurysm hemodynamics: an experimental study. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1992 Jul-Aug;13(4):1089-95.
- <sup>12</sup> **Kerber CW, Hecht ST, Knox K, Buxton RB, Meltzer HS.** Flow dynamics in a fatal aneurysm of the basilar artery. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1996 Sep;17(8):1417-21.
- <sup>13</sup> **Schievink WI.** Genetics of intracranial aneurysms. *Neurosurgery.* 1997 Apr;40(4):651-62; discussion 662-3.
- <sup>14</sup> **Schievink WI, Parisi JE, Piepgras DG.** Familial intracranial aneurysms: an autopsy study. *Neurosurgery.* 1997 Dec;41(6):1247-51; discussion 1251-2.
- <sup>15</sup> **Cloft HJ, Kallmes DF, Kallmes MH, Goldstein JH, Jensen ME, Dion JE.** Prevalence of cerebral aneurysms in patients with fibromuscular dysplasia: a reassessment. *J Neurosurg.* 1998 Mar;88(3):436-40.
- <sup>16</sup> **Juvela S, Hillbom M, Numminen H, Koskinen P.** Cigarette smoking and alcohol consumption as risk factors for aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 1993 May;24(5):639-46.
- <sup>17</sup> **Tasker AD, Byrne JV.** Basilar artery fenestration in association with aneurysms of the posterior cerebral circulation. *Neuroradiology.* 1997 Mar;39(3):185-9.
- <sup>18</sup> **Preul MC, Cendes F, Just N, Mohr G.** Intracranial aneurysms and sickle cell anemia: multiplicity and propensity for the vertebrobasilar territory. *Neurosurgery.* 1998 May;42(5):971-7; discussion 977-8.
- <sup>19</sup> **terBrugge KG.** Aneurysm in the pediatric population. *Riv Neuroradiol.* 1998 ;11(suppl 1):54-55.

- <sup>20</sup> **Skirgaudas M, Awad IA, Kim J, Rothbart D, Criscuolo G.** Expression of angiogenesis factors and selected vascular wall matrix proteins in intracranial saccular aneurysms. *Neurosurgery*. 1996 Sep;39(3):537-45; discussion 545-7.
- <sup>21</sup> **Kerber CW, Hecht ST, Knox K, Buxton RB, Meltzer HS.** Flow dynamics in a fatal aneurysm of the basilar artery. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1996 Sep;17(8):1417-21.
- <sup>22</sup> **Chong BW, Kerber CW, Buxton RB, Frank LR, Hesselink JR.** Blood flow dynamics in the vertebrobasilar system: correlation of a transparent elastic model and MR angiography. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1994 Apr;15(4):733-45.
- <sup>23</sup> **Gobin YP, Counord JL, Flaud P, Duffaux J.** In vitro study of haemodynamics in a giant saccular aneurysm model: influence of flow dynamics in the parent vessel and effects of coil embolisation. *Neuroradiology*. 1994 Oct;36(7):530-6.
- <sup>24</sup> **Graves VB, Strother CM, Partington CR, Rappe A.** Flow dynamics of lateral carotid artery aneurysms and their effects on coils and balloons: an experimental study in dogs. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1992 Jan-Feb;13(1):189-96.
- <sup>25</sup> **Geremia G, Haklin M, Brennecke L.** Embolization of experimentally created aneurysms with intravascular stent devices. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1994 Aug;15(7):1223-31.
- <sup>26</sup> **Kopitnik TA, Samson DS.** Management of subarachnoid haemorrhage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1993 Sep;56(9):947-59.
- <sup>27</sup> **Bassi P, Bandera R, Loiero M, Tognoni G, Mangoni A.** Warning signs in subarachnoid hemorrhage: a cooperative study. *Acta Neurol Scand*. 1991 Oct;84(4):277-81.
- <sup>28</sup> **Ausman JI, Diaz FG, Malik GM, Andrews BT, McCormick PW, Balakrishnan G.** Management of cerebral aneurysms: further facts and additional myths. *Surg Neurol*. 1989 Jul;32(1):21-35.
- <sup>29</sup> **Mayberg MR, Batjer HH, Dacey R, Diringer M, Haley EC, Heros RC, Sternau LL, Torner J, Adams HP Jr, Feinberg W, et al.** Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. A statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke

Council, American Heart Association. *Circulation*. 1994 Nov;90(5):2592-605.

<sup>30</sup> **Charpentier C, Audibert G, Guillemin F, Civit T, Ducrocq X, Bracard S, Hepner H, Picard L, Laxenaire MC.** Multivariate analysis of predictors of cerebral vasospasm occurrence after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 1999 Jul;30(7):1402-8

<sup>31</sup> **Solenski NJ, Haley EC Jr, Kassell NF, Kongable G, Germanson T, Truskowski L, Torner JC.** Medical complications of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a report of the multicenter, cooperative aneurysm study. Participants of the Multicenter Cooperative Aneurysm Study. *Crit Care Med*. 1995 Jun;23(6):1007-17.

<sup>32</sup> **Rinne J, Hernesniemi J, Niskanen M, Vapalahti M.** Analysis of 561 patients with 690 middle cerebral artery aneurysms: anatomic and clinical features as correlated to management outcome. *Neurosurgery*. 1996 Jan;38(1):2-11.

<sup>33</sup> **Laine E.** [Historical recall of surgery of intracranial aneurysms] *Neurochirurgie*. 1986;32(6):459-70.

<sup>34</sup> **Guglielmi G, Vinuela F, Duckwiler G, Dion J, Lylyk P, Berenstein A, Strother C, Graves V, Halbach V, Nichols D, et al.** Endovascular treatment of posterior circulation aneurysms by electrothrombosis using electrically detachable coils. *J Neurosurg*. 1992 Oct;77(4):515-24.

<sup>35</sup> **Raymond J, Roy D, Bojanowski M, Moumdjian R, L'Esperance G.** Endovascular treatment of acutely ruptured and unruptured aneurysms of the basilar bifurcation. *J Neurosurg*. 1997 Feb;86(2):211-9.

<sup>36</sup> **Roy D, Raymond J, Bouthillier A, Bojanowski MW, Moumdjian R, L'Esperance G.** Endovascular treatment of ophthalmic segment aneurysms with Guglielmi detachable coils. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1997 Aug;18(7):1207-15.

<sup>37</sup> **Guglielmi G, Vinuela F, Sepetka I, Macellari V.** Electrothrombosis of saccular aneurysms via endovascular approach. Part 1: Electrochemical basis, technique, and experimental results. *J Neurosurg*. 1991 Jul;75(1):1-7.

<sup>38</sup> **Guglielmi G, Vinuela F, Dion J, Duckwiler G.** Electrothrombosis of saccular aneurysms via endovascular approach. Part 2: Preliminary clinical experience. *J Neurosurg*. 1991 Jul;75(1):8-14.

- <sup>39</sup> **Raymond J, Sauvageau E, Salazkin I, Ribourtout E, Gévry G and Desfaits AC.** Role of the endothelial lining in persistence of residual lesions and growth of recurrences after endovascular treatment of experimental aneurysms. *Stroke*. 2002 Mar;33(3):850-5.
- <sup>40</sup> **Raymond J, Venne D, Allas S, Roy D, Oliva VL, Denbow N, Salazkin I, Leclerc G.** Healing mechanisms in experimental aneurysms. I. Vascular smooth muscle cells and neointima formation. *J Neuroradiol*. 1999 Mar;26(1):7-20.
- <sup>41</sup> **Desfaits AC, Raymond R.** Growth factors stimulate neointimal cells in vitro and increase the thickness of the neointima formed at the neck of porcine aneurysms treated by embolization. *Stroke*. 2000 Feb;31(2):498-507.
- <sup>42</sup> **Raymond J, Desfaits AC, Roy D.** Fibrinogen and vascular smooth muscle cell grafts promote healing of experimental aneurysms treated by embolization. *Stroke*. 1999 Aug;30(8):1657-64.
- <sup>43</sup> **Champy C.** Quelques résultats de la méthode de culture des tissus. I. Généralités. II. Le muscle lisse (note préliminaire) *Arch Zool Exp Gen* 1913/14; 53: 42-51.
- <sup>44</sup> **Laqueur E.** Zur Fberlebensdauer von Sugetierorganem mit Automatic. *Zentralbl Physiol* 1914; 28: 728-39.
- <sup>45</sup> **Lewis MR, Lewis WH.** Mitochondria in tissu culture. *Science* (Washington D.C.) 1914; 39: 330-3.
- <sup>46</sup> **Mosse PR, Campbell GR, Wang ZL, Campbell JH.** Smooth muscle phenotypic expression in human carotid arteries. I. Comparison of cells from diffuse intimal thickenings adjacent to atheromatous plaques with those of the media. *Lab Invest*. 1985 Nov;53(5):556-62.
- <sup>47</sup> **Campbell JH, Campbell GR.** Culture techniques and their applications to studies of vascular smooth muscle. *Clin Sci (Lond)*. 1993 Nov;85(5):501-13.
- <sup>48</sup> **Li S, Sims S, Jiao Y, Chow LH, Pickering JG.** Evidence from a novel human cell clone that adult vascular smooth muscle cells can convert reversibly between noncontractile and contractile phenotypes. *Circ Res*. 1999 Aug 20;85(4):338-48.

- <sup>49</sup> **Wissler RW.** The arterial medial cell, smooth muscle, or multifunctional mesenchyme? *Circulation*. 1967 Jul;36(1):1-4.
- <sup>50</sup> **Chamley JH, Campbell GR, McConnell JD, Groschel-Stewart U.** Comparison of vascular smooth muscle cells from adult human, monkey and rabbit in primary culture and in subculture. *Cell Tissue Res*. 1977 Feb 14;177(4):503-22.
- <sup>51</sup> **Schwartz SM, Campbell GR, Campbell JH.** Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ Res*. 1986 Apr;58(4):427-44.
- <sup>52</sup> **Campbell GR, Campbell JH, Manderson JA, Horrigan S, Rennick RE.** Arterial smooth muscle. A multifunctional mesenchymal cell. *Arch Pathol Lab Med*. 1988 Oct;112(10):977-86.
- <sup>53</sup> **Sanz-Gonzalez SM, Poch E, Perez-Roger I, Diez-Juan A, Ivorra C, Andres V.** Control of vascular smooth muscle cell growth by cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and its implication in cardiovascular disease. *Front Biosci*. 2000 Jul 1;5:D619-28.
- <sup>54</sup> **Duband JL, Gimona M, Scatena M, Sartore S, Small JV.** Calponin and SM 22 as differentiation markers of smooth muscle: spatiotemporal distribution during avian embryonic development. *Differentiation*. 1993 Dec;55(1):1-11.
- <sup>55</sup> **Holycross BJ, Blank RS, Thompson MM, Peach MJ, Owens GK.** Platelet-derived growth factor-BB-induced suppression of smooth muscle cell differentiation. *Circ Res*. 1992 Dec;71(6):1525-32.
- <sup>56</sup> **Owens GK, Vernon SM, Madsen CS.** Molecular regulation of smooth muscle cell differentiation. *J Hypertens Suppl*. 1996 Dec;14(5):S55-64.
- <sup>57</sup> **Chamley-Campbell J, Campbell GR, Ross R.** The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev*. 1979 Jan;59(1):1-61.
- <sup>58</sup> **Dilley RJ, McGeachie JK, Prendergast FJ.** A review of the proliferative behaviour, morphology and phenotypes of vascular smooth muscle. *Atherosclerosis*. 1987 Feb;63(2-3):99-107.
- <sup>59</sup> **Clowes AW.** Regulation of smooth muscle cell proliferation and migration. *Transplant Proc*. 1999 Feb-Mar;31(1-2):810-1.

- <sup>60</sup> **Seidel CL.** Cellular heterogeneity of the vascular tunica media. Implications for vessel wall repair. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Oct;17(10):1868-71.
- <sup>61</sup> **Faggin E, Puato M, Zardo L, Franch R, Millino C, Sarinella F, Pauletto P, Sartore S, Chiavegato A.** Smooth muscle-specific SM22 protein is expressed in the adventitial cells of balloon-injured rabbit carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Jun;19(6):1393-404.
- <sup>62</sup> **Han CI, Campbell GR, Campbell JH.** Circulating bone marrow cells can contribute to neointimal formation. *J Vasc Res.* 2001 Mar-Apr;38(2):113-9.
- <sup>63</sup> **Timpl R.** Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur J Biochem.* 1989 Apr 1;180(3):487-502.
- <sup>64</sup> **Hagedorn HG, Bachmeier BE, Nerlich AG.** Synthesis and degradation of basement membranes and extracellular matrix and their regulation by TGF-beta in invasive carcinomas. *Int J Oncol.* 2001 Apr;18(4):669-81.
- <sup>65</sup> **Tummalapalli CM, Tyagi SC.** Responses of vascular smooth muscle cell to extracellular matrix degradation. *J Cell Biochem.* 1999 Dec 1;75(3):515-27.
- <sup>66</sup> **Jacob MP, Badier-Commander C, Fontaine V, Benazzoug Y, Feldman L, Michel JB.** Extracellular matrix remodeling in the vascular wall. *Pathol Biol (Paris).* 2001 May;49(4):326-32.
- <sup>67</sup> **Bonfanti L, Mironov AA Jr, Martinez-Menarguez JA, Martella O, Fusella A, Baldassarre M, Buccione R, Geuze HJ, Mironov AA, Luini A.** Procollagen traverses the Golgi stack without leaving the lumen of cisternae: evidence for cisternal maturation. *Cell.* 1998 Dec 23;95(7):993-1003.
- <sup>68</sup> **Pickering JG.** Regulation of vascular cell behavior by collagen : form is function. *Circ Res.* 2001 Mar 16;88(5):458-9.
- <sup>69</sup> **Skinner MP, Raines EW, Ross R.** Dynamic expression of alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrin receptors by human vascular smooth muscle cells. Alpha 2 beta 1 integrin is required for chemotaxis across type I collagen-coated membranes. *Am J Pathol.* 1994 Nov;145(5):1070-81.

- <sup>70</sup> **Li S, Chow LH, Pickering JG.** Cell surface-bound collagenase-1 and focal substrate degradation stimulate the rear release of motile vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2000 Nov 10;275(45):35384-92.
- <sup>71</sup> **Pickering JG, Uniyal S, Ford CM, Chau T, Laurin MA, Chow LH, Ellis CG, Fish J, Chan BM.** Fibroblast growth factor-2 potentiates vascular smooth muscle cell migration to platelet-derived growth factor: upregulation of alpha2beta1 integrin and disassembly of actin filaments. *Circ Res.* 1997 May;80(5):627-37.
- <sup>72</sup> **Clowes AW, Schwartz SM.** Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery. *Circ Res.* 1985 Jan;56(1):139-45.
- <sup>73</sup> **Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM.** Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest.* 1983 Sep;49(3):327-33.
- <sup>74</sup> **Rocnik EF, Chan BM, Pickering JG.** Evidence for a role of collagen synthesis in arterial smooth muscle cell migration. *J Clin Invest.* 1998 May 1;101(9):1889-98.
- <sup>75</sup> **Durante W, Liao L, Reyna SV, Peyton KJ, Schafer AI.** Transforming growth factor-beta(1) stimulates L-arginine transport and metabolism in vascular smooth muscle cells: role in polyamine and collagen synthesis. *Circulation.* 2001 Feb 27;103(8):1121-7.
- <sup>76</sup> **Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P.** Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb.* 1991 Sep-Oct;11(5):1223-30.
- <sup>77</sup> **Schwartz SM, Heimark RL, Majesky MW.** Developmental mechanisms underlying pathology of arteries. *Physiol Rev.* 1990 Oct;70(4):1177-209.
- <sup>78</sup> **Schwartz SM, Stemerman MB, Benditt EP.** The aortic intima. II. Repair of the aortic lining after mechanical denudation. *Am J Pathol.* 1975 Oct;81(1):15-42.
- <sup>79</sup> **Vaday GG, Franitza S, Schor H, Hecht I, Brill A, Cahalon L, HersHKoviz R, Lider O.** Combinatorial signals by inflammatory cytokines and chemokines mediate leukocyte interactions with extracellular matrix. *J Leukoc Biol.* 2001 Jun;69(6):885-92.

- <sup>80</sup> **Nathan C, Sporn M.** Cytokines in context. *J Cell Biol.* 1991 Jun;113(5):981-6.
- <sup>81</sup> **Border WA, Noble NA.** Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med.* 1994 Nov 10;331(19):1286-92.
- <sup>82</sup> **Roberts AB, Sporn MB.** Differential expression of the TGF-beta isoforms in embryogenesis suggests specific roles in developing and adult tissues. *Mol Reprod Dev.* 1992 Jun;32(2):91-8.
- <sup>83</sup> **de Larco JE, Todaro GJ.** Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978 Aug;75(8):4001-5.
- <sup>84</sup> **Sporn MB, Roberts AB.** Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J Cell Biol.* 1992 Dec;119(5):1017-21.
- <sup>85</sup> **Kale S, Biermann S, Edwards C, Tarnowski C, Morris M, Long MW.** Three-dimensional cellular development is essential for ex vivo formation of human bone. *Nat Biotechnol.* 2000 Sep;18(9):954-8.
- <sup>86</sup> **Massague J.** The transforming growth factor- $\beta$  family. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6:597-674.
- <sup>87</sup> **Bennett NT, Schultz GS.** Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg.* 1993 Jun;165(6):728-37.
- <sup>88</sup> **Barbul A.** Role of the immune system. In: *Wound healing. Biochemical and clinical aspects.* 1992. Saunders W.B. (ed) Chap 17, pp282-91.
- <sup>89</sup> **Messadi DV., Berg S, Shhung-Cho K, Lesavoy M, Bertolami CN.** Autocrine TGF- $\beta_1$  activity and glycoaminoglycan synthesis by human cutaneous scar fibroblasts. *Wound Rep Reg.* 1994. 2:284-91.
- <sup>90</sup> **Webb DJ, Roadcap DW, Dhakephalkar A, Gonias SL.** A 16-amino acid peptide from human alpha2-macroglobulin binds transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor-BB. *Protein Sci.* 2000 Oct;9(10):1986-92.
- <sup>91</sup> **Oklu R, Hesketh R.** The latent transforming growth factor beta binding protein (LTBP) family. *Biochem J.* 2000 Dec 15;352 Pt 3:601-10.

- <sup>92</sup> **Dennis PA, Rifkin DB.** Cellular activation of latent transforming growth factor beta requires binding to the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor type II receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Jan 15;88(2):580-4.
- <sup>93</sup> **Attisano L, Wrana JL.** Signal transduction by members of the transforming growth factor-beta superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996 Dec;7(4):327-39.
- <sup>94</sup> **Brown PD, Wakefield LM, Levinson AD, Sporn MB.** Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor-beta's 1, 2, and 3. *Growth Factors.* 1990;3(1):35-43.
- <sup>95</sup> **Lawrence DA, Pircher R, Jullien P.** Conversion of a high molecular weight latent beta-TGF from chicken embryo fibroblasts into a low molecular weight active beta-TGF under acidic conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985 Dec 31;133(3):1026-34.
- <sup>96</sup> **Miyazono K, Heldin CH.** Role for carbohydrate structures in TGF-beta 1 latency. *Nature.* 1989 Mar 9;338(6211):158-60.
- <sup>97</sup> **Lyons RM, Gentry LE, Purchio AF, Moses HL.** Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. *J Cell Biol.* 1990 Apr;110(4):1361-7.
- <sup>98</sup> **Lyons RM, Keski-Oja J, Moses HL.** Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol.* 1988 May;106(5):1659-65.
- <sup>99</sup> **Sato Y, Rifkin DB.** 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.* 1989 Jul;109(1):309-15.
- <sup>100</sup> **Sato Y, Tsuboi R, Lyons R, Moses H, Rifkin DB.** Characterization of the activation of latent TGF-beta by co-cultures of endothelial cells and pericytes or smooth muscle cells: a self-regulating system. *J Cell Biol.* 1990 Aug;111(2):757-63.
- <sup>101</sup> **Nunes I, Gleizes PE, Metz CN, Rifkin DB.** Latent transforming growth factor-beta binding protein domains involved in activation and transglutaminase-dependent cross-linking of latent transforming growth factor-beta. *J Cell Biol.* 1997 Mar 10;136(5):1151-63.

- <sup>102</sup> **Attisano L, Wrana JL, Lopez-Casillas F, Massague J.** TGF-beta receptors and actions. *Biochim Biophys Acta*. 1994 May 26;1222(1):71-80.
- <sup>103</sup> **Massague J.** How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000 Dec;1(3):169-78.
- <sup>104</sup> **Massague J, Chen YG.** Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev*. 2000 Mar 15;14(6):627-44.
- <sup>105</sup> **Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J.** Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*. 1994 Aug 4;370(6488):341-7.
- <sup>106</sup> **Soma Y, Grotendorst GR.** TGF-beta stimulates primary human skin fibroblast DNA synthesis via an autocrine production of PDGF-related peptides. *J Cell Physiol*. 1989 Aug;140(2):246-53.
- <sup>107</sup> **Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, Border WA.** Sustained expression of TGF-beta 1 underlies development of progressive kidney fibrosis. *Kidney Int*. 1994 Mar;45(3):916-27.
- <sup>108</sup> **Branton MH, Kopp JB.** TGF-beta and fibrosis. *Microbes Infect*. 1999 Dec;1(15):1349-65.
- <sup>109</sup> **Noble NA, Harper JR, Border WA.** In vivo interactions of TGF-beta and extracellular matrix. *Prog Growth Factor Res*. 1992;4(4):369-82.
- <sup>110</sup> **Zabner J, Couture LA, Gregory RJ, Graham SM, Smith AE, Welsh MJ.** Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell*. 1993 Oct 22;75(2):207-16.
- <sup>111</sup> **Topol EJ.** Textbook of Interventional Cardiology 3<sup>rd</sup> edition. 1999. Saunders WB (ed), Chap 38, pp703-724.
- <sup>112</sup> **Nabel EG, Gordon D, Yang ZY, Xu L, San H, Plautz GE, Wu BY, Gao X, Huang L, Nabel GJ.** Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes: lack of autoimmunity and gonadal localization. *Hum Gene Ther*. 1992 Dec;3(6):649-56.
- <sup>113</sup> **Das PK, Murray GJ, Zirzow GC, Brady RO, Barranger JA.** Lectin-specific targeting of beta-glucocerebrosidase to different liver cells via glycosylated liposomes. *Biochem Med*. 1985 Feb;33(1):124-31.

- <sup>114</sup> **Sobol RE, Scanlon KJ.** Cancer gene therapy clinical trials. *Cancer Gene Ther.* 1995 Mar;2(1):5-6.
- <sup>115</sup> **Kock H, Harris MP, Anderson SC, Macherer T, Hancock W, Sutjipto S, Wills KN, Gregory RJ, Shepard HM, Westphal M, Maneval DC.** Adenovirus-mediated p53 gene transfer suppresses growth of human glioblastoma cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer.* 1996 Sep 17;67(6):808-15.
- <sup>116</sup> **Smythe WR, Kaiser LR, Hwang HC, Amin KM, Pilewski JM, Eck SJ, Wilson JM, Albelda SM.** Successful adenovirus-mediated gene transfer in an in vivo model of human malignant mesothelioma. *Ann Thorac Surg.* 1994 Jun;57(6):1395-401.
- <sup>117</sup> **Romano G, Pacilio C, Giordano A.** Gene transfer technology in therapy: current applications and future goals. *Stem Cells.* 1999;17(4):191-202.
- <sup>118</sup> **Roth JA, Cristiano RJ.** Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going? *J Natl Cancer Inst.* 1997 Jan 1;89(1):21-39.
- <sup>119</sup> **Cristiano RJ, Smith LC, Kay MA, Brinkley BR, Woo SL.** Hepatic gene therapy: efficient gene delivery and expression in primary hepatocytes utilizing a conjugated adenovirus-DNA complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Dec 15;90(24):11548-52.
- <sup>120</sup> **Curiel DT, Wagner E, Cotten M, Birnstiel ML, Agarwal S, Li CM, Loechel S, Hu PC.** High-efficiency gene transfer mediated by adenovirus coupled to DNA-polylysine complexes. *Hum Gene Ther.* 1992 Apr;3(2):147-54.
- <sup>121</sup> **Kasahara N, Dozy AM, Kan YW.** Tissue-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interactions. *Science.* 1994 Nov 25;266(5189):1373-6.
- <sup>122</sup> **Roth JA.** Modification of tumor suppressor gene expression and induction of apoptosis in non-small cell lung cancer (NSCLC) with an adenovirus vector expressing wildtype p53 and cisplatin. *Hum Gene Ther.* 1996 May 20;7(8):1013-30.
- <sup>123</sup> **Rodriguez R, Schuur ER, Lim HY, Henderson GA, Simons JW, Henderson DR.** Prostate attenuated replication competent adenovirus

(ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res.* 1997 Jul 1;57(13):2559-63.

<sup>124</sup> **Amalfitano A, McVie-Wylie AJ, Hu H, Dawson TL, Raben N, Plotz P, Chen YT.** Systemic correction of the muscle disorder glycogen storage disease type II after hepatic targeting of a modified adenovirus vector encoding human acid-alpha-glucosidase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Aug 3;96(16):8861-6.

<sup>125</sup> **Harrod KS, Hermiston TW, Trapnell BC, Wold WS, Whitsett JA.** Lung-specific expression of adenovirus E3-14.7K in transgenic mice attenuates adenoviral vector-mediated lung inflammation and enhances transgene expression. *Hum Gene Ther.* 1998 Sep 1;9(13):1885-98.

<sup>126</sup> **Millecamps S, Kiefer H, Navarro V, Geoffroy MC, Robert JJ, Finiels F, Mallet J, Barkats M.** Neuron-restrictive silencer elements mediate neuron specificity of adenoviral gene expression. *Nat Biotechnol.* 1999 Sep;17(9):865-9.

<sup>127</sup> **Pastore L, Morral N, Zhou H, Garcia R, Parks RJ, Kochanek S, Graham FL, Lee B, Beaudet AL.** Use of a liver-specific promoter reduces immune response to the transgene in adenoviral vectors. *Hum Gene Ther.* 1999 Jul 20;10(11):1773-81.

<sup>128</sup> **Varda-Bloom N, Shaish A, Gonen A, Levanon K, Greenbereger S, Ferber S, Levkovitz H, Castel D, Goldberg I, Afek A, Kopolovitch Y, Harats D.** Tissue-specific gene therapy directed to tumor angiogenesis. *Gene Ther.* 2001 Jun;8(11):819-27.

<sup>129</sup> **Ghazal P, Lubon H, Reynolds-Kohler C, Hennighausen L, Nelson JA.** Interactions between cellular regulatory proteins and a unique sequence region in the human cytomegalovirus major immediate-early promoter. *Virology.* 1990 Jan;174(1):18-25.

<sup>130</sup> **Ponder KP, Dunbar RP, Wilson DR, Darlington GJ, Woo SL.** Evaluation of relative promoter strength in primary hepatocytes using optimized lipofection. *Hum Gene Ther.* 1991 Spring;2(1):41-52.

<sup>131</sup> **Nabel EG.** Gene therapy for vascular diseases. *Atherosclerosis.* 1995 Dec;118 Suppl:S51-6.

<sup>132</sup> **Li Q, Kay MA, Finegold M, Stratford-Perricaudet LD, Woo SL.** Assessment of recombinant adenoviral vectors for hepatic gene therapy. *Hum Gene Ther.* 1993 Aug;4(4):403-9.

- <sup>133</sup> **Rosenfeld MA, Chu CS, Seth P, Danel C, Banks T, Yoneyama K, Yoshimura K, Crystal RG.** Gene transfer to freshly isolated human respiratory epithelial cells in vitro using a replication-deficient adenovirus containing the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator cDNA. *Hum Gene Ther.* 1994 Mar;5(3):331-42.
- <sup>134</sup> **Horwitz MS.** Adenoviruses and their replication. 1990. In: Fields BN, Knipe DM (eds) *Virology* 2nd edn. Raven Press, New York, pp 1679-1722.
- <sup>135</sup> **Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R.** Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 1977 Jul;36(1):59-74.
- <sup>136</sup> **Mittal SK, Bett AJ, Prevec L, Graham FL.** Foreign gene expression by human adenovirus type 5-based vectors studied using firefly luciferase and bacterial beta-galactosidase genes as reporters. *Virology.* 1995 Jun 20;210(1):226-30.
- <sup>137</sup> **Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gonczol E, Wilson JM.** Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 May 10;91(10):4407-11.
- <sup>138</sup> **Ross R.** The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J Cell Biol.* 1971 Jul;50(1):172-86.
- <sup>139</sup> **Hadrava V, Tremblay J, Hamet P.** Abnormalities in growth characteristics of aortic smooth muscle cells in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1989 Jun;13(6 Pt 1):589-97.
- <sup>140</sup> **Koyano Y, Hammerle H, Mollenhauer J.** Analysis of 3H-proline-labeled protein by rapid filtration in multiwell plates for the study of collagen metabolism. *Biotechniques.* 1997 Apr;22(4):706-8, 710-2, 714.
- <sup>141</sup> **German WJ, Black SPW.** Experimental production of carotid aneurysms. *New England J Med.* 1954;250(3):104-106.
- <sup>142</sup> **Graves VB, Strother CM, Rappe AH.** Treatment of experimental canine carotid aneurysms with platinum coils. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1993 Jul-Aug;14(4):787-93.
- <sup>143</sup> **Venne D, Raymond J, Allas S, Roy D, Leclerc G, Boushira M, Brazeau P.** Healing of experimental aneurysms. II: Platelet extracts can

increase the thickness of the neointima at the neck of treated aneurysms. *J Neuroradiol.* 1999 Jun;26(2):92-100.

- <sup>144</sup> **Li J, Huang SL, Guo ZG.** Platelet-derived growth factor stimulated vascular smooth muscle cell proliferation and its molecular mechanism. *Acta Pharmacol Sin.* 2000 Apr;21(4):340-4.
- <sup>145</sup> **Pukac L, Huangpu J, Karnovsky MJ.** Platelet-derived growth factor-BB, insulin-like growth factor-I, and phorbol ester activate different signaling pathways for stimulation of vascular smooth muscle cell migration. *Exp Cell Res.* 1998 Aug 1;242(2):548-60.
- <sup>146</sup> **Wilcox JN, Smith KM, Williams LT, Schwartz SM, Gordon D.** Platelet-derived growth factor mRNA detection in human atherosclerotic plaques by in situ hybridization. *J Clin Invest.* 1988 Sep;82(3):1134-43.
- <sup>147</sup> **Jawien A, Bowen-Pope DF, Lindner V, Schwartz SM, Clowes AW.** Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty. *J Clin Invest.* 1992 Feb;89(2):507-11.
- <sup>148</sup> **Morisaki N, Kawano M, Koyama N, Koshikawa T, Umemiya K, Saito Y, Yoshida S.** Effects of transforming growth factor-beta 1 on growth of aortic smooth muscle cells. Influences of interaction with growth factors, cell state, cell phenotype, and cell cycle. *Atherosclerosis.* 1991 Jun;88(2-3):227-34.
- <sup>149</sup> **Engel L, Ryan U.** TGF-beta 1 reverses PDGF-stimulated migration of human aortic smooth muscle cells in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1997 Jun;33(6):443-51.
- <sup>150</sup> **Roberts A. B.** Transforming growth factor  $\beta$  : activity and efficacy in animal models of wound healing. *Wound Rep Reg.* 1995 3 : 408-418.
- <sup>151</sup> **Hirschi KK, Rohovsky SA, D'Amore PA.** PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *Cell Biol.* 1998 May 4;141(3):805-14.
- <sup>152</sup> **Lawlor MA, Feng X, Everding DR, Sieger K, Stewart CE, Rotwein P.** Dual control of muscle cell survival by distinct growth factor-regulated signaling pathways. *Mol Cell Biol.* 2000 May;20(9):3256-65.

- <sup>153</sup> **Stice LL, Vaziri C, Faller DV.** Regulation of platelet-derived growth factor signaling by activated p21Ras. *Front Biosci.* 1999 Jan 15;4:D72-86.
- <sup>154</sup> **Claassen GF, Hann SR.** A role for transcriptional repression of p21CIP1 by c-Myc in overcoming transforming growth factor beta -induced cell-cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Aug 15;97(17):9498-503.
- <sup>155</sup> **Ravitz MJ, Wenner CE.** Cyclin-dependent kinase regulation during G1 phase and cell cycle regulation by TGF-beta. *Adv Cancer Res.* 1997;71:165-207.
- <sup>156</sup> **Marshall NJ, Goodwin CJ, Holt SJ.** A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regul.* 1995 Jun;5(2):69-84.
- <sup>157</sup> **Reidy MA.** Factors controlling smooth-muscle cell proliferation. *Arch Pathol Lab Med.* 1992 Dec;116(12):1276-80.
- <sup>158</sup> **Schwartz SM, Campbell GR, Campbell JH.** Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ Res.* 1986 Apr;58(4):427-44.
- <sup>159</sup> **Sirois MG, Simons M, Edelman ER.** Antisense oligonucleotide inhibition of PDGFR-beta receptor subunit expression directs suppression of intimal thickening. *Circulation.* 1997 Feb 4;95(3):669-76.
- <sup>160</sup> **Ding H, Wang R, Marcel R, Fisher DZ.** Adenovirus-mediated expression of a truncated PDGFBeta receptor inhibits thrombosis and neointima formation in an avian arterial injury model. *Thromb Haemost.* 2001 Sep;86(3):914-22.
- <sup>161</sup> **Miao RQ, Murakami H, Song Q, Chao L, Chao J.** Kallistatin stimulates vascular smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and neointima formation in balloon-injured rat artery. *Circ Res.* 2000 Mar 3;86(4):418-24.
- <sup>162</sup> **Murakami S, Toda Y, Seki T, Munetomo E, Kondo Y, Sakurai T, Furukawa Y, Matsuyama M, Nagate T, Hosokawa N, Nagata K.** Heat shock protein (HSP) 47 and collagen are upregulated during neointimal formation in the balloon-injured rat carotid artery. *Atherosclerosis.* 2001 Aug;157(2):361-8.
- <sup>163</sup> **Kanaki T, Morisaki N, Bujo H, Takahashi K, Ishii I, Saito Y.** The regulatory expression of procollagen COOH-terminal proteinase enhancer

in the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Apr 21;270(3):1049-54.

<sup>164</sup> **Massie B, Mosser D.D, Koutroumanis M, Vitté-Mony I, Lamoureux L, Courture F, Paquet L, Guilbault C, Dionne J, Chahla D, Jolicoeur P and Langelier Y.** New adenovirus for protein production and gene transfer. *Cytotechnology.* 1998 28:53-64.

<sup>165</sup> **Boulanger J, Reyes-Moreno C, Koutsilieris M.** Mediation of glucocorticoid receptor function by the activation of latent transforming growth factor beta 1 in MG-63 human osteosarcoma cells. *Int J Cancer.* 1995 May 29;61(5):692-7.

<sup>166</sup> **Antonelli-Orlidge A, Saunders KB, Smith SR, D'Amore PA.** An activated form of transforming growth factor beta is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Jun;86(12):4544-8.

<sup>167</sup> **Marx WE, Cloft HJ, Helm GA, Short JG, Do HM, Jensen ME, Kallmes DE.** Endovascular treatment of experimental aneurysms by use of biologically modified embolic devices: coil-mediated intraaneurysmal delivery of fibroblast tissue allografts. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2001 Feb;22(2):323-33.

<sup>168</sup> **Kallmes DF, Williams AD, Cloft HJ, Lopes MB, Hankins GR, Helm GA.** Platinum coil-mediated implantation of growth factor-secreting endovascular tissue grafts: an in vivo study. *Radiology.* 1998 May;207(2):519-23.

<sup>169</sup> **Abruzzo T, Cloft HJ, Shengelaia GG, Waldrop SM, Kallmes DF, Dion JE, Constantinidis I, Sambanis A.** In vitro effects of transcatheter injection on structure, cell viability, and cell metabolism in fibroblast-impregnated alginate microspheres. *Radiology.* 2001 Aug;220(2):428-35.