

Stimulation pharmacologique de la réponse angiogénique chez l'homme : un nouvel outil thérapeutique ?

La publication récente de deux études [1, 2] rapportant l'utilisation chez l'homme de facteurs de croissance pour stimuler la croissance vasculaire à des fins thérapeutiques, nous donne l'opportunité de faire le point sur les avancées récentes dans ce domaine de recherche.

Mécanismes de la réponse angiogénique à l'ischémie

L'étude de modèles animaux d'ischémie a permis d'individualiser deux grands types anatomiques de réponse vasculaire à l'ischémie : d'une part, une augmentation progressive de la densité capillaire dans les tissus ischémiques et, d'autre part, le développement d'une circulation collatérale visible à l'angiographie (figure 1).

Il est généralement admis que l'augmentation de la densité capillaire se fait par un processus de bourgeonnement vasculaire [3]. Ce processus est à rapprocher de l'angiogenèse telle qu'elle a pu être définie chez l'embryon [3]. Dans le cas du développement de la circulation collatérale, « l'artériogenèse », qui correspond au développement de vaisseaux préexistants de petit calibre, joue un rôle déterminant [3]. Un troisième mécanisme, la « vasculogenèse », fait intervenir des cellules progénitrices des cellules endothéliales produites par la moelle osseuse, les « angioblastes », qui participent à la réponse angiogénique via la circulation sanguine [4].

L'ischémie tissulaire est un élément important du contrôle de l'expression de facteurs de croissance endothéliaux impliqués dans la formation

vasculaire, tels que le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) [5] et le *fibroblast growth factor* (FGF), ainsi que de leurs récepteurs [6]. L'ischémie participe très directement au processus de capillarogenèse. Si sa participation au développement de la circulation collatérale d'amont reste vraisemblable, la dissociation spatiale entre le développement de la circulation collatérale et la zone la plus ischémique a fait rechercher d'autres mécanismes. L'augmentation des forces de cisaillement au niveau des artères collatérales et les phénomènes inflammatoires locaux pourraient participer au contrôle de la croissance des artères collatérales [3].

Des résultats récents suggèrent enfin un rôle important d'un nouveau facteur de croissance, le *scatter factor/hepatocyte growth factor* (SF/HGF) qui stimule les cellules endothéliales directement et via la production de VEGF [7]. Ce facteur ainsi que son récepteur sont induits dans les situations d'ischémie tissulaire [8]. Chez l'animal, l'administration exogène de SF/HGF par voie systémique entraîne à la fois la croissance de la circulation collatérale et une augmentation de la densité capillaire dans les zones ischémiques [7].

L'angiogenèse thérapeutique : les études animales

Malgré le développement de techniques de revascularisation de plus en plus sophistiquées, un certain nombre de patients souffrant d'artériopathie oblitérante ou d'ischémie coronaire sont ou deviennent, avec le

temps et l'évolution de leur maladie, inaccessibles aux techniques de revascularisation classiques. Chez ces patients, la stimulation du processus angiogénique pourrait constituer une option thérapeutique intéressante.

Bien qu'en théorie toutes les interventions qui interfèrent avec la réponse angiogénique peuvent être utilisées, la plupart des travaux se

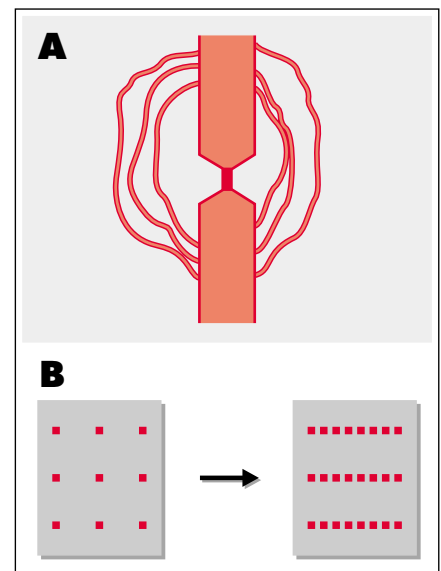


Figure 1. **Constituants anatomiques de la réponse angiogénique à l'ischémie.** A. Développement d'une circulation collatérale autour du site d'obstruction. Ces vaisseaux sont facilement visibles à l'angiographie. B. Augmentation progressive de la densité capillaire au niveau du tissu ischémique, en aval du site d'obstruction. Cette augmentation est associée à une diminution progressive des résistances vasculaires.

sont concentrés sur l'utilisation de facteurs de croissance. Le premier travail à démontrer un effet angiogénique dans un modèle d'ischémie de membre a été réalisé avec le *basic FGF* (bFGF) en 1992 par Baffour (Springfield, MA, USA) [9]. Par la suite, des travaux utilisant le VEGF, l'*acidic FGF* (aFGF) ou le SF/HGF ont confirmé ces résultats et montré une augmentation de la circulation collatérale et de la densité capillaire dans les modèles d'ischémie. La mise en évidence récente de cellules progénitrices endothéliales dans le sang circulant pourrait ouvrir une nouvelle voie de recherche [4]. Ces cellules pourraient, en effet, être utilisées comme agent angiogénique ou comme vecteur thérapeutique.

Outre leurs effets quantitatifs, les facteurs de croissance influent sur le comportement des cellules endothéliales du nouveau système vasculaire, comme en témoigne l'amélioration du flux dépendant de l'endothélium [10, 11]. Ces effets s'accompagnent d'une augmentation du débit sanguin tissulaire et d'une réduction des dégâts tissulaires dans la zone à risque.

Les affections associées comme l'hypercholestérolémie, l'athérosclérose débutante, le diabète et le vieillissement ne semblent pas constituer une limite réelle à l'utilisation des facteurs de croissance dans les modèles animaux [11-13]. On notera même, compte tenu de la présence d'un déficit primitif en facteur angiogénique dans ces circonstances [11-13], l'intérêt tout particulier de l'administration de facteurs de croissance dans ces situations. Ces informations sont d'autant plus importantes que ces affections sont fréquemment rencontrées en cas d'ischémie chez l'homme.

Le choix de l'agent angiogénique tel que l'on pourrait l'utiliser chez l'homme dépendra de trois critères principaux : (1) l'efficacité ; (2) la tolérance immédiate ; (3) les effets indésirables à long terme. La comparaison du VEGF et du bFGF n'a pas montré de différence en terme de réponse angiogénique [14]. Le SF/HGF s'est montré plus efficace que le VEGF en dépit d'une efficacité *in vitro* voisine [7]. Cette observation

est vraisemblablement à attribuer à l'induction de l'expression de VEGF dans les cellules musculaires lisses stimulées par SF/HGF. Enfin, on notera que l'association de plusieurs facteurs de croissance potentialise leurs effets [14].

Malgré une baisse de la pression artérielle de l'ordre de 20 % à 30 % avec le FGF et le VEGF [15, 16], la tolérance des facteurs de croissance est relativement bonne chez l'animal. L'administration de FGF à très fortes doses peut entraîner une toxicité hématologique et rénale [17]. On ne dispose pas d'information équivalente pour le SF/HGF.

En théorie, les principaux effets indésirables de l'administration au long cours de facteurs de croissance sont la stimulation du processus angiogénique là où il n'est pas souhaitable (rétine, stroma tumoral) et la stimulation de la croissance d'autres lignées cellulaires (tumeur). En raison de la restriction de ses récepteurs aux cellules endothéliales, le VEGF ne peut pas entraîner la croissance d'autres lignées que les cellules endothéliales (*figure 2*). Cependant, de tels effets de croissance non spécifique n'ont pas non plus été rapportés avec

le FGF ou le SF/HGF. Les trois facteurs de croissance présentent le même risque théorique d'effets angiogéniques à distance du territoire à revasculariser. Dans les études qui se sont intéressées à cette question, aucun effet angiogénique n'a pu être mis en évidence dans les tissus non ischémiques. En revanche, dans les circonstances dans lesquelles une ischémie est présente à distance de la zone à revasculariser (rétine du sujet diabétique, stroma tumoral), un effet angiogénique est possible, à moins que le facteur de croissance ne soit confiné à la zone à traiter.

Deux grandes méthodes sont en concurrence pour l'administration du facteur angiogénique : l'injection de protéine recombinante ou le transfert du gène codant pour cette protéine. L'administration de protéine recombinante est efficace par voie intramusculaire [18], intra-artérielle au site d'obstruction [19], ou par voie systémique [20]. Des séquences d'administration aussi variées que le simple bolus [19, 20], les injections répétées [7, 11] ou l'administration continue par mini-pompe se sont montrées également efficaces. L'efficacité observée avec

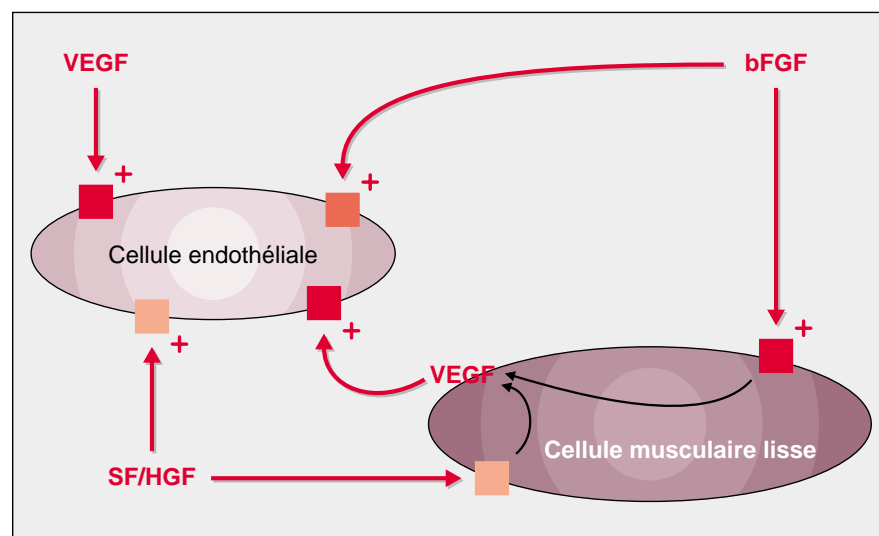
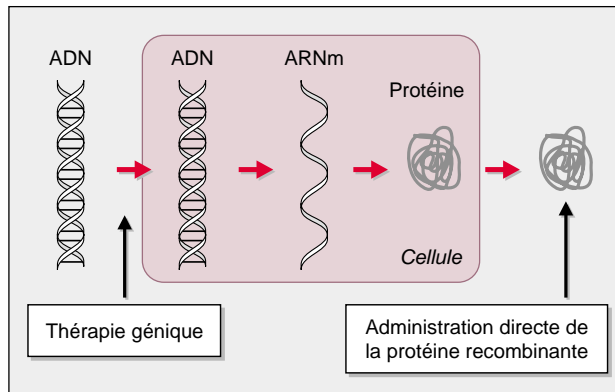


Figure 2. Schématisation de l'action de trois des principaux facteurs de croissance endothéliaux, VEGF, bFGF et SF/HGF, sur les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. + indique la présence d'un effet trophique direct sur le type cellulaire considéré. On notera l'absence d'effet trophique de VEGF et SF/HGF sur les cellules musculaires lisses. VEGF: vascular endothelial growth factor, FGF: basic fibroblast growth factor, SF/HGF: scatter factor/hepatocyte growth factor.

Figure 3. Principes de la thérapie génique et de l'administration directe d'une protéine recombinante.

Dans le cas de la thérapie génique, le matériel génétique délivré doit franchir la membrane cellulaire et se trouver dans le milieu intracellulaire pour permettre la synthèse de la protéine d'intérêt. Les cellules ainsi transfectées sont transformées en « usines » à produire cette protéine.



les bolus tire avantage de la capacité de ces facteurs de croissance de se lier aux produits de la matrice extracellulaire, ce qui peut prolonger leur temps de résidence intratissulaire de plusieurs jours [21].

La thérapie génique a également été utilisée avec succès, soit par administration intravasculaire par un ballon à délivrance locale [22], soit par injection intramusculaire dans le tissu ischémique [23]. La première technique peut être utilisée à la fois au niveau cardiaque ou au niveau des membres inférieurs, la deuxième est limitée à un site facilement accessible comme un membre (figure 4). L'expression du transgène débute 36 à 48 heures après la transfection et dure en général quinze jours à un mois [22].

L'avantage de l'admission de la protéine recombinante est sa relative simplicité. Le problème principal est la difficulté d'obtenir un gradient de concentration entre la zone à traiter et le reste de l'organisme. L'avantage théorique de la thérapie génique est sa relative spécificité de site. Le facteur de croissance étant synthétisé sur place, le gradient de concentration entre la zone à traiter et le reste de l'organisme est relativement élevé. Certains des vecteurs utilisés, notamment les adénovirus, peuvent induire une réaction inflammatoire relativement importante.

Dans le cadre de l'ischémie de membre, l'administration intramusculaire d'un gène de facteur de croissance sous forme de plasmide et sans vecteur viral constitue une option séduisante [23]. C'est cette option qui a été choisie dans le travail rap-

porté récemment par l'équipe de Jeffrey M. Isner à Boston [1].

L'angiogenèse thérapeutique : les études cliniques

Les résultats obtenus chez l'animal ont amené plusieurs investigateurs à proposer des essais de phase I. Pour la pathologie artérielle périphérique, le premier essai est celui proposé par le groupe de J.M. Isner [1, 24, 25]. Les deux particularités de cet essai sont de se concentrer sur la pathologie vasculaire périphérique sévère et d'utiliser la thérapie génique comme vecteur d'administration du facteur de croissance, en l'occurrence le VEGF. Dans cet essai, c'est le plasmide codant pour l'isoforme 165 du VEGF qui est utilisé. L'administration du gène codant

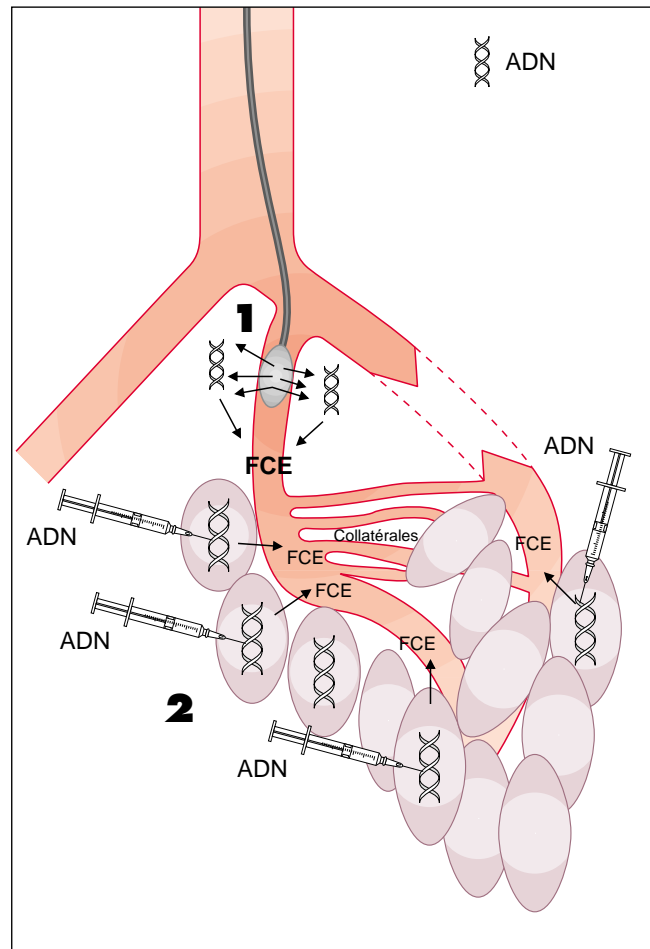


Figure 4. Modalités de transfert de gène au niveau du membre chez le lapin, dans un modèle d'ischémie chronique par résection de l'artère fémorale. Le transfert de gène peut être réalisé au niveau de la paroi de l'artère iliaque interne grâce à un cathéter à ballonnet (1). Dans le modèle, cette artère fournit le réseau artériel collatéral pour l'ensemble du membre inférieur. Cette technique nécessite un abord vasculaire. Le transfert de gène peut être réalisé directement au niveau du muscle squelettique (2). Cette

technique ne nécessite aucun abord vasculaire et plusieurs sites musculaires peuvent être transfectés par voie percutanée. C'est cette technique appliquée à l'homme qui a été utilisée dans l'étude rapportée récemment par l'équipe de J.M. Isner [1]. ADN: gène codant pour le facteur de croissance. FCE: facteur de croissance endothéliale.

pour le VEGF est réalisée par injection intramusculaire directe dans le membre ischémique (voir figure 4 pour la description du principe tel qu'il a été validé chez l'animal).

Comme nous l'avons évoqué précédemment, compte tenu du risque de réponse angiogénique à distance du site à traiter, les critères d'inclusion des patients sont particulièrement sévères. Les patients doivent, en effet, présenter une artériopathie des membres inférieurs avec troubles trophiques sévères, non accessibles à la revascularisation chirurgicale. Le bilan de préinclusion comporte la recherche des marqueurs biologiques de processus tumoral, ainsi que la réalisation d'une radiographie du thorax, d'un scanner abdominal, d'une IRM cérébrale, d'une sigmoidoscopie et d'une mammographie chez les femmes. Une anomalie de l'un de ces examens ainsi que des antécédents personnels de néoplasie, l'existence d'un diabète ou de complications oculaires du diabète constituent des critères d'exclusion [24].

Bien qu'il soit encore impossible de se prononcer de manière définitive sur l'efficacité de cette approche (il s'agit d'un essai de phase I sans groupe témoin), des résultats très encourageants relatifs aux premiers patients ont été rapportés récemment [1, 25].

En ce qui concerne la pathologie coronaire, au moins quatre essais sont en cours dans le cadre de la pathologie ischémique cardiaque [2, 26]. Ces essais utilisent la protéine recombinante du bFGF ou du VEGF. Michael Simons (Boston, MA, USA) coordonne une étude utilisant la protéine recombinante du bFGF. Dans cet essai, sont inclus des patients qui vont bénéficier d'une chirurgie de pontage coronaire. Le FGF est alors appliqué, au sein d'un polymère à relargage progressif, au tissu péri-vasculaire d'une artère qui ne peut pas être revascularisée. L'effet du FGF sur le débit sanguin coronaire sera évalué de manière non invasive grâce à l'imagerie par résonance magnétique à l'état basal et trois mois après traitement. Des résultats encourageants viennent également d'être rapportés par une équipe allemande dans une série de 20 patients [2].

Dans cette série, l'administration locale de aFGF recombinant lors d'un geste de revascularisation chirurgicale coronaire a entraîné une augmentation du réseau vasculaire évalué par angiographie quantitative. Dans les deux autres essais, le bFGF (Ellis Unger, NIH, Bethesda, MD, USA) ou le VEGF (Stuart Bunting, Genentech Inc., San Francisco, CA, USA) sont administrés par injection intracoronaire.

Conclusions

La compréhension des mécanismes impliqués dans la réaction angiogénique à l'ischémie a progressé rapidement ces dernières années. Si l'application thérapeutique chez l'homme constitue déjà une réalité, tout au moins dans le cadre de l'évaluation, de nombreuses questions restent incomplètement résolues. L'importance nouvelle prise par cette thématique de recherche permet d'espérer de nombreuses réponses dans un avenir proche ■

RÉFÉRENCES

1. Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, Isner JM. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998; 97: 1114-23.
2. Schumacher B, Pecher P, von Specht BU, Stegmann T. Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary heart disease. *Circulation* 1998; 97: 645-50.
3. Schaper W, Ito WD. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ Res* 1996; 79: 911-9.
4. Mattot V, Pourtier A, Soncin F, Vandembunder B. La morphogénèse de l'arbre vasculaire: de la compréhension des mécanismes moléculaires aux perspectives thérapeutiques. *Med Sci* 1998; 14: 437-47.
5. Frelin C, Ladoux A, Bauters C. VEGF: médiateur de l'angiogenèse hypoxique. *Med Sci* 1997; 13: 886-91.
6. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359: 843-5.
7. Van Belle E, Witzenbichler B, Chen D, Silver M, Chang L, Schwall R, Isner JM. Potentiated angiogenic effect of scatter factor/hepatocyte growth factor via induction

of vascular endothelial growth factor: the case for paracrine amplification of angiogenesis. *Circulation* 1998; 97: 381-90.

8. Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S. Enhanced expression of hepatocyte growth factor/c-Met by myocardial ischemia and reperfusion in a rat model. *Circulation* 1997; 95: 2552-8.

9. Baffour R, Berman J, Garb JL, Ree SW, Kaufman J, Friedmann P. Enhanced angiogenesis and growth of collaterals by *in vivo* administration of recombinant basic fibroblast growth factor in a rabbit model of acute lower limb ischemia: dose response effect of basic fibroblast growth factor. *J Vasc Surg* 1992; 16: 181-91.

10. Bauters C, Asahara T, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Recovery of disturbed endothelium-dependent flow in the collateral-perfused rabbit ischemic hindlimb after administration of vascular endothelial growth factor. *Circulation* 1995; 91: 2802-9.

11. Van Belle É, Rivard A, Chen D, Silver M, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Bauters C, Isner JM. Hypercholesterolemia attenuates angiogenesis, but does not preclude augmentation by angiogenic cytokines. *Circulation* 1997; 96: 2667-74.

12. Rivard A, Fabre JE, Silver M, Murohara T, Chen D, Asahara T, Isner JM. Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation* 1997; 96 (suppl 1): I-18.

13. Rivard A, Fabre JE, Silver M, Murohara T, Chen D, Asahara T, Isner JM. Diabetes impairs angiogenesis in limb ischemia. *Circulation* 1997; 96 (suppl 1): I-175.

14. Asahara T, Bauters C, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic growth factor on angiogenesis *in vivo*. *Circulation* 1995; 92 (suppl 9): II365-II371.

15. Cuevas P, Carceller F, Ortega S, Zazo M, Nieto I, Gimenez-Gallego G. Hypotensive activity of fibroblast growth factor. *Science* 1991; 254: 1208-10.

16. Horowitz JR, Rivard A, van der Zee R, Hariawala MD, Sheriff DD, Esakof DD, Chaudhry M, Symes JF, Isner JM. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor produces nitric oxide-dependent hypotension. Evidence for a maintenance role in quiescent adult endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2793-800.

17. Mazue G, Bertolero F, Jacob C, Sarmientos P, Roncucci P. Preclinical and clinical studies with recombinant human basic growth factor. *Ann NY Acad Sci* 1991; 638: 329-40.

18. Takeshita S, Pu LQ, Zheng L, Ferrara N, Stein LA, Sniderman AD, Isner JM, Symes JF. Vascular endothelial growth factor induces dose-dependent revascularization in a rabbit model of persistent limb ischemia. *Circulation* 1994; 90: II-228-34.

RÉFÉRENCES

19. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Asahara T, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Therapeutic angiogenesis: a single intra-arterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hindlimb model. *J Clin Invest* 1994; 93: 662-70.

20. Bauters C, Asahara T, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Site-specific therapeutic angiogenesis following systemic administration of vascular endothelial growth factor. *J Vasc Surg* 1995; 21: 314-25.

21. Wilensky RL, Medhi K, Baek SH, March KL. Molecules with increased cellular and extracellular matrix binding exhibit prolonged intramural retention following local drug delivery. *Circulation* 1996; 94: I-202.

22. Takeshita S, Weir L, Chen D, Zheng LP, Riessen R, Bauters C, Symes JF, Ferrara N, Isner JM. Therapeutic angiogenesis following arterial gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of hindlimb ischemia. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 227: 628-35.

23. Tsurumi Y, Takeshita S, Chen D, Kearney M, Rossow ST, Passeri J, Horowitz JR, Symes JF, Isner JM. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation* 1996; 94: 3281-90.

24. Isner JM, Walsh K, Symes JF, Pieczek A, Takeshita S, Lowry J, Rosenfield K, Weir L, Brogi E, Juraj D. Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Circulation* 1995; 91: 2687-92.

25. Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, Rosenfield K, Razvi S, Walsh K, Symes JF. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet* 1996; 348: 370-4.

26. Ware JA, Simons M. Angiogenesis in ischemic heart. Inducing the formation of new blood vessels – a novel approach to treating myocardial ischemia. *Nat Med* 1996; 3: 158-64.

Éric Van Belle

Docteur en médecine, docteur d'Université, chef de clinique-assistant, Service de cardiologie B, Hôpital Cardiologique, boulevard du Professeur-Leclercq, 59037 Lille Cedex, France.

TIRÉS À PART

É. Van Belle.

Cours de Biologie Moléculaire de la Cellule

Enseignement pratique

Ce cours, conjointement organisé par l'Institut Pasteur et l'Institut Curie, se déroulera du **8 mars au 9 avril 1999** à plein temps, à l'Institut Pasteur à Paris. Il est destiné à des chercheurs du secteur public et privé, ayant une formation des facultés de sciences, de médecine, de pharmacie ou des écoles vétérinaires. Les candidats doivent avoir une bonne connaissance, niveau maîtrise, en biologie moléculaire. Les techniques de base de biologie moléculaire ne seront pas enseignées (exemple : clonage, séquençage de gènes, etc.). Ce cours donne lieu à un diplôme de l'Institut Pasteur suite à un examen qui se déroulera à la fin du mois d'avril.

Le thème central de ce cours concerne l'étude de la cellule eucaryote. Cet enseignement est très orienté vers l'initiation expérimentale, et fera une large place aux nouvelles techniques ainsi qu'à la démarche scientifique actuelle pour l'étude des fonctions cellulaires. Les travaux pratiques seront accompagnés de conférences théoriques sur les thèmes suivants :

- Organisation fonctionnelle de la cellule : compartiments membranaires, cytosquelette, polarité cellulaire
- Les routages intracellulaires : transport des protéines membranaires et sécrétées, endocytose des macromolécules
- Les contacts et la communication entre cellules
- La différenciation cellulaire
- La signalisation et la transduction des messagers cellulaires
- Le cycle cellulaire

Les techniques mises en œuvre seront celles de l'analyse génétique, la transfection et l'expression de gènes clonés, la culture cellulaire, la reconstitution *in vitro* des fonctions cellulaires, la visualisation des constituants cellulaires y compris par les techniques les plus récentes de microscopie confocale et d'imagerie.

Avec la participation de : S. Amigorena, Ch. Babinet, M. Bornens, R. Bruzzone, P. Cossart, A. Dautry-Varsat, F. Dautry, M. Dubois-Dalcq, S. Dufour, E. Fabre, B. Goud, B. Hoflack, C. Hopkins, E. Karsenti, O. Kellerman, P. Lazarow, P. Legrain, D. Louvard, P. Mangeat, J.-C. Olivo, J. Pouyssegur, J.P. Thiéry et M. Weiss. Les cours théoriques seront assurés par des enseignants français et européens.

Responsables du cours : A. Dautry-Varsat et D. Louvard

Renseignements et inscriptions, date limite le 1^{er} décembre 1998

Mme Banisso

Secrétariat des Enseignants et des Stages

Institut Pasteur, 28, rue du Dr-Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

Tél. : 01 45 68 81 41 ou 01 40 61 33 62 – Fax : 01 40 61 30 46

E-mail : rbanisso@pasteur.fr