

**Etude des mécanismes de revascularisation post-
ischémique chez le rat :
Effets de deux puissants vasodilatateurs, le sildenafil et les
polyphenols végétaux**

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement

Le 21 Septembre 2007

A Angers

Par Mme Baron-Menguy Céline

Devant le jury ci-dessous :

Jean-Sébastien SILVESTRE (Rapporteur)

Pierre PACAUD (Rapporteur)

Alain MOREL (Président du jury et examinateur)

Daniel HENRION (Examineur)

Directeur de thèse : M. le Dr D. Henrion

UMR-CNRS 61888 INSERM 771

Rue Haute de Reculée

49045 ANGERS Cedex 01

Table des matières

Liste des abréviations.....	8
Remerciements.....	9
Avant-propos.....	10

A. Introduction

Chapitre 1 : Le système vasculaire : structure et fonction.....12

I. Le vaisseau sanguin.....15

I.1. Description des parois artérielles.....15

I.1.1 L'intima.....16

I.1.2 La media.....16

I.1.3 L'adventice.....17

I.1.4 L'endothélium.....18

I.1.5 Vaso vasorum.....18

I.1.6 Innervation.....19

I.2. Structure des parois vasculaires.....19

II. La cellule musculaire lisse.....21

III. L'endothélium : une barrière métabolique.....22

III.1 Les cellules endothéliales.....22

III.2 Origine.....23

III.3 Anatomie.....24

III.4 Fonction.....24

III.5 Le circuit sanguin.....25

Chapitre 2 : L'angiogenèse.....	26
I. Les facteurs angiogéniques.....	26
I.1 VEGF.....	26
I.2 Les récepteurs des VEGF.....	30
I.3 Les FGFs.....	32
<i>I.3.1. Les membres de la famille des FGFs</i>	<i>32</i>
<i>I.3.2. Les récepteurs du FGF.....</i>	<i>33</i>
I.4 Angiopoïétines.....	33
<i>I.4.1 Angiopoïétine-1 (Ang-1).....</i>	<i>33</i>
<i>I.4.2 Angiopoïétine-2 (Ang-2).....</i>	<i>34</i>
I.5 Le NO.....	34
<i>I.5.1. Généralités.....</i>	<i>34</i>
<i>I.5.1. Biosynthèse et mode d'action du NO.....</i>	<i>35</i>
<i>I.5.2. Mécanismes de régulation.....</i>	<i>38</i>
<i>I.5.3. Rôles physiologiques du monoxyde d'azote.....</i>	<i>39</i>
II. Différentes étapes de l'angiogenèse.....	41
II.1 Vasculogenèse.....	41
<i>II.1.1 Définition.....</i>	<i>41</i>
<i>II.1.2. Les principaux mécanismes impliqués dans la vasculogenèse.....</i>	<i>42</i>
<i>II.1.2.1. Différenciation des hémangioblastes en angioblastes.....</i>	<i>42</i>
<i>II.1.2.2. Assemblage des cellules endothéliales en tubes endothéliaux.....</i>	<i>43</i>
<i>II.1.2.3. Assemblage des cellules non endothéliales</i>	
<i>Communication entre les cellules endothéliales et les cellules mésenchymateuses.....</i>	<i>43</i>
<i>II.1.3. La vasculogenèse post-natale.....</i>	<i>44</i>

II.2 L'angiogenèse	46
II.2.1. Définition.....	46
II.2.2. L'angiogenèse par intussusception.....	46
II.2.3. L'angiogenèse par bourgeonnement.....	47
II.2.3.1. Augmentation de perméabilité vasculaire et vasodilatation initiale.....	47
II.2.3.2. La dégradation matricielle.....	48
II.2.3.3. Prolifération et migration des cellules endothéliales.....	51
II.2.3.4. Organisation des tubules endothéliaux et survie des cellules endothéliales.....	52
II.2.3.5. Remodelage vasculaire définitif.....	53
II.2.3.6. Différenciation en Artères ou Veines.....	54
II.3 L'artériogenèse	56
II.3.1. Définition.....	56
II.3.2. Les principaux mécanismes de l'artériogenèse.....	56
II.4 Lymphangiogenèse	57
II.4.1. Structure et fonction du système lymphatique.....	58
II.4.2. Lymphangiogenèse embryonnaire et post-natale.....	58
II.4.3. Les marqueurs de la lymphangiogenèse.....	59

Chapitre 3 : Sildenafil et Polyphenols

I. Sildenafil	62
I.1 Généralités	62
I.2 Les phosphodiésterases (PDE)	63
I.2.1. Généralités.....	63
I.2.2. Structure des PDE5 et site d'interaction avec les inhibiteurs.....	64
I.2.3. Distribution tissulaire des PDE5.....	65

I.3. Le GMPc	65
I.4. La protéine kinase dépendante du GMPc (PKG)	66
I.5. Sildenafil et pathologies	66
I.5.1. Sildenafil & dysfonction érectile.....	66
I.5.2. Sildenafil et hypertension artérielle pulmonaire.....	68
I.5.3. Sildenafil et angiogenèse.....	69
I.6. Voie RhoA/Rho kinase	70
I.6.1. Présentation générale de la protéine G RhoA	71
I.6.2. Cycle d'activation et d'inactivation.....	72
II. Les Polyphenols : les composés polyphénoliques du vin rouge	75
II.1. Nature chimique	75
II.1.1. Les composés non-flavonoïdes.....	76
II.1.1.1. Les acides phénoliques.....	76
II.1.1.2. Les stilbènes.....	76
II.1.2. Les composés flavonoïdes.....	77
II.1.2.1. Les flavonols.....	77
II.1.2.2. Les anthocyanes.....	78
II.1.2.3. Les tanins condensés (flavan-3-ols).....	78
II.2. Effets vasculaires des polyphénols du vin rouge	79
II.2.1. Polyphénols et athérosclérose.....	80
II.2.2. Polyphénols et vasorelaxation.....	80
II.2.3. Effet anti-oxydant des polyphenols.....	81
II.2.4. Autres propriétés biologiques des polyphenols.....	81
II.2.5. Le Provinols.....	82

B. But de l'étude.....	83
-------------------------------	-----------

C. Matériel et méthodes.....	86
-------------------------------------	-----------

I. Angiogenèse.....	87
----------------------------	-----------

<i>I.1. Effet du Sildenafil sur la revascularisation.....</i>	87
--	-----------

<i>I.1.1. Préparation de l'animal.....</i>	88
--	----

<i>I.1.2. Mesure des débits sanguins cutanés locaux.....</i>	89
--	----

<i>I.1.2.1. Technique du laser Doppler.....</i>	89
---	----

<i>I.1.2.1. Mesure des débits sanguins cutanés locaux.....</i>	90
--	----

A- Débitmétrie Laser Doppler.....	90
-----------------------------------	----

B- Laser Doppler Imager.....	90
------------------------------	----

<i>I.1.3. Mesure de la densité vasculaire.....</i>	91
--	----

<i>I.1.4. Histologie.....</i>	91
-------------------------------	----

<i>I.2. Effet des Polyphenols du vin rouge sur la revascularisation.....</i>	94
---	-----------

II. Réactivité des artères de résistance.....	96
--	-----------

<i>II.1. Artériographie.....</i>	96
---	-----------

<i>II.2. Acquisition des données.....</i>	97
--	-----------

<i>II.3. Biochimie : SDS PAGE et Westren blotting.....</i>	97
---	-----------

<i>II.4. Zymographie.....</i>	98
--------------------------------------	-----------

<i>II.5. Analyse statistique.....</i>	99
--	-----------

D. Résultats.....	100
--------------------------	------------

Présentation des travaux

Article 1 :

<i>Sildenafil induced-revascularization of rat hindlimb involves PI3K/AKT/eNOS dependent arterial remodeling.</i>	101
--	-----

Article 2:

Phosphorylation of serine 188 protects RhoA from ubiquitin/proteasome-mediated degradation in vascular smooth muscle cells.103

Article 3:

Effects of red wine polyphenols on postischemic neovascularization model in rats: low doses are proangiogenic, high doses anti-angiogenic.105

E. Discussion.....107

F. Conclusions & Perspectives.....113

G. Bibliographie.....115

Liste des abréviations

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

Ang-1 : angiopoïétine-1

CML: cellule musculaire lisse

CMLV : cellule musculaire lisse vasculaire

CMS : cellule musculaire squelettique

PKG: protéine kinase GMPc dépendante

GMPc : guanosine monophosphate cyclique

NO : nitric oxide

NOS : nitric oxide synthase

EGF: epidermal growth factor

Eph: Ephrine

FGF : fibroblast growth factore

GCs : guanylate cyclase soluble

GTP : guanosine triphosphate

HIF : hypoxia-inducible factor

HTAP: hypertension artérielle pulmonaire

LEI : limitante élastique interne

LEE : limitante élastique externe

MMP : métalloprotéinases matricielles

NRP : neuropilin

PIGF : placenta growth factor

PDGF : platelet-derived growth factor

PDE: phosphodiesterase

ROS: reactive oxygen species

VEGF : vascular endothelial growth factor

Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury pour l'honneur qu'ils me font d'évaluer ce travail.

Je remercie sincèrement mon directeur de thèse, Daniel Henrion, pour m'avoir accueillie dans son équipe et pour m'avoir permis de travailler dans de bonnes conditions. Merci pour vos précieux conseils. Vous m'avez montré un autre visage de la recherche et vous m'avez redonné envie de faire ce métier. Grâce à vous, j'ai pu continuer et finaliser ma thèse : ma persévérance n'aura pas été vaine.

Je remercie Laurent Loufrani pour m'avoir encadré et aidé dans l'élaboration et la réalisation des différents protocoles.

Un grand merci à Odile Dumont qui m'a soutenue et encouragée pendant toutes ces années. Pendant les baisses de moral, tu as toujours été présente. Merci pour ton aide précieuse et tes conseils.

Merci également à Anne-Laure, Bertrand et Emilie pour leur aide précieuse.

Un grand merci à toi Robin, pour ta patience mais aussi pour m'avoir soutenue pendant toutes ces années. Tu as toujours été présent, surtout dans les moments difficiles. Grâce à toi, les petits soucis de la journée étaient vite oubliés. Merci également à Anne-Claire pour ton soutien et ton écoute. Grâce à vous deux, j'ai pu arriver au bout de cette thèse.

Mes pensées vont également à Pierre et Jérôme de l'animalerie : je ne vous embêterai plus avec mes gavages sildenafil et polyphénols !

Enfin, une pensée pour tous les animaux utilisés au cours des différents protocoles : sans eux, rien n'aurait été possible !

Merci à celles et ceux que j'ai oubliés et qui se reconnaîtront dans cette phrase.

Avant-propos

Au cours de mes longues années de thèse, j'ai eu l'opportunité d'apprendre de nombreuses techniques allant de l'in vivo à l'ex vivo. J'ai tout d'abord commencé par apprendre à maîtriser les niveaux d'anesthésie et à contrôler la douleur chez un animal. J'ai aussi appris la technique du laser Doppler, technique également utilisée pour mesurer les variations de flux sanguins cutanés après une ischémie de la patte. Les quatre premières années de ma thèse ont donné naissance à un premier article que je ne présente pas, le sujet ne traitant pas des mécanismes de l'angiogenèse. Par conséquent, le travail que je vais vous présenter dans les pages qui suivent porte sur l'étude de la revascularisation post-ischémique chez le rat. Plus précisément, ce travail a consisté à mettre en évidence les différents effets du sildenafil et des polyphénols du vin rouge sur la revascularisation de la patte ischémisée. Ce travail a été effectué sous la direction du Dr Daniel Henrion à partir de mars 2004.

Introduction

Chapitre 1 :

Le système vasculaire

Le rôle fondamental de la circulation artérielle est d'apporter aux organes les nutriments et l'oxygène nécessaires. Les artères élastiques (aorte, carotide) interviennent comme amortisseurs des fortes pulsations engendrées par l'activité ventriculaire après la période d'éjection. Dans les grosses artères, la résistance à l'écoulement est très faible et la vitesse du sang est très élevée. A l'opposé, dans les artérioles, la résistance à l'écoulement est très élevée, ce qui induit une importante chute de pression et la vitesse y reste, elle, élevée. La contractilité des artérioles, possible par la présence des cellules musculaires lisses le long des parois, permet alors de contrôler plus finement le débit jusqu'au niveau capillaire.

Les artères de petit diamètre (inférieur à 200 μ m) sont souvent appelées artères de résistance, étant responsable d'une partie importante des résistances vasculaires périphériques. Les artères de résistance possèdent un tonus vasoconstricteur permanent, ce qui leur permet de se dilater, de se contracter et donc de contrôler efficacement le flux sanguin local. Le tonus basal est aussi une limite fonctionnelle entre les artères de résistance et les artères de compliance. Le tonus micro-vasculaire est contrôlé par les besoins métaboliques des tissus environnants, le système nerveux, le système hormonal local et circulant ainsi que les facteurs mécaniques. Pression et flux sont les principaux facteurs mécaniques influençant le tonus micro-vasculaire. Les augmentations de pression sanguine induisent une contraction appelée tonus myogénique alors qu'une augmentation du flux sanguin induit une augmentation des forces de cisaillement (« shear stress »), ce qui conduit à une dilatation (communément appelée dilatation flux-dépendante). Le tonus basal permet un contrôle rapide et efficace du tonus vasculaire et donc du débit sanguin local.

Toute variation de ces contraintes est perçue au niveau des cellules vasculaires et se traduit, à long terme, par des modifications fonctionnelles et structurales du vaisseau. Si les variations de tonus vasomoteur sont insuffisantes pour compenser les modifications des contraintes mécaniques, les vaisseaux s'adaptent à leur nouvel environnement hémodynamique en ajustant leur calibre et la structure de leur paroi afin de normaliser la contrainte de cisaillement imposée à la surface endothéliale. L'augmentation chronique de débit stimule la production et l'activation de métalloprotéinases matricielles (MMP) qui dégradent alors les fibres élastiques et contribuent directement à la distension du vaisseau.

Cette augmentation du calibre vasculaire étire les cellules musculaires lisses ce qui entraîne à long terme une hypertrophie de la média et par conséquent un remodelage de l'artère. Ce remodelage, ou artériogénèse, intervient souvent :

- après un shear stress important, provoqué par une augmentation de la dilatation au flux,
- après une ischémie, entraînant alors une angiogénèse ou une artériogénèse dans le but de maintenir une homéostasie de l'organisme.

Au cours de ma thèse, mon travail a porté sur l'étude de ce mécanisme : l'angiogénèse. En effet, l'angiogénèse est un mécanisme qui intervient au cours de l'embryogénèse. Ce processus intervient également pendant l'âge adulte, dans des conditions pathologiques comme la croissance tumorale ou la rétinopathie diabétique mais aussi dans des conditions physiologiques (exercice, cycle menstruel de la femme). Je me suis principalement intéressée à l'angiogénèse ischémique en ligaturant l'artère fémorale du rat. Dans ce mécanisme, la structure du vaisseau joue un rôle important et il est donc nécessaire de bien connaître la structure et la fonction des artères pour mieux comprendre les mécanismes de l'angiogénèse.

Structure et fonction du système vasculaire

Le système cardio-vasculaire est composé d'un réseau de " tubes " transportant le sang : *les vaisseaux sanguins*, et d'une " pompe " propulsant le sang dans ces tubes: *le cœur*. Le système vasculaire est un réseau qui commence et se finit au cœur. Le principe de la circulation sanguine fut découvert dès le XVIIe siècle par W. Harvey, un médecin anglais. Le système vasculaire permet de distribuer dans tous les tissus le sang qui transporte toutes les molécules nécessaires au bon fonctionnement des cellules (oxygène, glucose, etc.), et d'éliminer les déchets en les transportant au niveau des reins ou des poumons, par exemple. Dans le système vasculaire, on peut distinguer : ***le réseau artériel*** qui part du cœur vers les organes et ***le réseau veineux*** qui ramène le sang au cœur.

La répartition du sang dans l'organisme impose une structure allant des plus gros vaisseaux (macrocirculation) aux vaisseaux les plus fins (microcirculation). Au contraire, pour ramener le sang au cœur, le système veineux rassemble une multitude de petits vaisseaux afin de former les grosses veines. Les systèmes artériels et veineux sont composés de différents types de vaisseaux selon leurs tailles et leurs fonctions (Tableau I).

	Diamètre de la lumière	Epaisseur de la paroi	CML	Composition de la média		Innervation
				Elastine	Collagène	
Artères élastiques	1 à 2 cm	2 mm	+++	+++	I, III	+
Artères musculaires	1 mm à 1 cm	1 mm	+++	+	I, III	++
Artérioles	30 µm	20 µm	+	+/-	I, III	+++
Capillaires	5 à 8 µm	1 µm	0	0	IV, V	+/-
Veinules post-capillaires	20 µm	2 µm	0	+/-		+/-
Veinules	0,5 cm	0,5 mm	+	+/-		+
Veines	1 à 3 cm	1,5 mm	+	+/-		+

Tableau I : Caractéristiques des différents vaisseaux sanguins chez l'homme.

Il existe deux types d'artères : *les artères élastiques*, qui sont chez l'homme des vaisseaux de 1 à 2 cm de diamètre, très élastiques du fait de leur composition élevée en élastine (environ 40 %) et *les artères musculaires*, beaucoup moins élastiques (seulement 10 % d'élastine), avec un diamètre de 1 mm à 1 cm, contenant comparativement une plus grande proportion de cellules musculaires lisses (CML). Ces artères se divisent pour former des artérioles (vaisseaux importants dans la régulation de la pression artérielle) ayant une composition relativement semblable à celle des artères musculaires. Les plus petites artérioles (métartérioles) déversent leur contenu dans le réseau capillaire. Les capillaires sont de très fins vaisseaux d'environ 5 à 8 µm de diamètre, constitués uniquement d'une couche de cellules endothéliales avec une lame basale et quelques fibres de collagène. Les capillaires n'ont pas de vasomotricité propre ; ce sont des structures rigides dont le diamètre est fixe. La structure des capillaires est adaptée à leur fonction fondamentale qui est de permettre les échanges de substances entre le sang et les tissus vascularisés. Les capillaires sont aussi le lien entre le système artériel et veineux.

Le volume de sang présent dans les capillaires systémiques représente 5% du volume sanguin total. Grâce à une densité capillaire élevée, la surface d'échange entre le sang et les tissus est très importante (comprise entre 0.5 et 2.4m²/100cm³ de tissu). Par conséquent, les distances de diffusion sont très petites et les échanges très efficaces.

Les capillaires ne possèdent pas de CML, tout comme les veinules post-capillaires. Les veinules de plus gros diamètres et les veines sont similaires structurellement aux artères, mais elles ont une paroi plus mince par rapport à leur diamètre et cette paroi contient plus de tissu conjonctif que de tissu musculaire : elles sont donc plus extensibles que les artères.

Les vaisseaux sanguins ont une base structurelle qui diffère selon la taille et la fonction du vaisseau. C'est pourquoi, pour mieux comprendre la fonction des vaisseaux, il faut tout d'abord s'attarder sur la structure même.

I. Le vaisseau sanguin

Les vaisseaux sanguins sont constitués de tuniques morphologiquement distinctes, de l'intérieur vers l'extérieur du vaisseau : *l'intima* avec la limitante élastique interne (LEI), *la média*, la limitante élastique externe (LEE) et *l'adventice* (Figure 1). L'importance et la complexité de ces tuniques dépendent du vaisseau sanguin et peuvent être très grandes ou réduites à une simple monocouche cellulaire.

I.1. Descriptions des parois artérielles

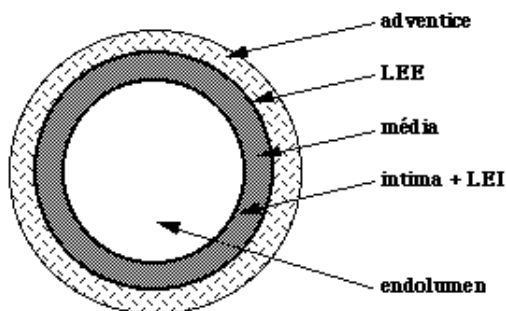


Figure 1 : Schéma de la structure pariétale d'une artère.

I.1.1. L'intima

L'intima est principalement constituée, de l'intérieur vers l'extérieur, d'une monocouche de cellules endothéliales et d'une fine couche de tissu conjonctif. Ces cellules endothéliales sont directement en contact avec le sang circulant et donc avec les métabolites, les hormones et tout ce que peut transporter le sang. Cette couche est identique quel que soit le territoire vasculaire et il y a très peu de différences dans sa structure. Il faut noter cependant que dans les artères élastiques comme l'aorte, l'intima, très épaisse, peut contenir des cellules musculaires lisses particulières dites myointimales. Quel que soit le diamètre de la paroi, il y a toujours une seule couche de cellules endothéliales. Les cellules endothéliales sont en forme de losange et leur juxtaposition constitue une mosaïque. Leur grand axe est allongé dans le sens de l'écoulement sanguin et cette orientation est déterminée par les forces de cisaillement appliquées à leur surface.

I.1.2. La média

La média est constituée de cellules musculaires lisses artérielles disposées au sein d'une matrice extracellulaire dense (fibres élastiques, fibrilles d'élastine, faisceaux et fibrilles de collagène, protéoglycanes). La matrice extracellulaire prédomine sur les cellules musculaires. Cette couche est très variable selon les différents territoires vasculaires, et la présence et l'organisation aussi bien des fibres élastiques que des CML varient selon le type et la fonction des vaisseaux. Dans les artères élastiques (artères brachio-céphaliques, artères sous-clavières, carotides, iliaques, artères pulmonaires et aorte), la média est constituée de plusieurs lames élastiques entre lesquelles on retrouve les CML. Le nombre de ces lames élastiques est fonction du diamètre de l'artère. Les CML et les lames élastiques forment une unité lamellaire [1]. Le nombre d'unités lamellaires est proportionnel au diamètre du vaisseau, et augmente progressivement avec le poids et la taille chez les différents animaux. Cette organisation en structure lamellaire n'existe que dans les artères élastiques, les artères musculaires ne possédant pas cette architecture. La notion d'unité lamellaire a été complétée en 1985 par celle plus précise de feuillet musculo-élastique [2] : c'est un groupe de cellules enveloppées par une matrice constituée d'une lame basale et de fibrilles de collagène, le tout enveloppé dans un tapis de fibres élastiques. Aux artères élastiques est dévolue la fonction de transformer le flot discontinu du sang éjecté par le ventricule gauche en flot pulsé mais

continu à la périphérie : pour ce faire, elles emmagasinent du sang pendant la systole qu'elles restituent pendant la diastole. Les artères musculaires (artères coronaires, fémorales, spléniques, rénales) où l'absence de fibres élastiques est le déterminant principal, distribuent le sang en adaptant leur débit aux besoins des organes cibles. L'ajustement requis du calibre artériel est assuré par la vasomotricité. Cette couche de cellules musculaires lisses assure les propriétés vasomotrices de ce type artériel. Les artères musculaires possèdent une lame élastique interne et externe qui séparent la média respectivement de l'intima et de l'adventice, et quelques lamelles élastiques entre les différentes couches de CML. Dans ces deux types d'artères, les CML sont arrangées de façon concentrique. Dans certains types d'artères, on peut voir la présence de CML entre l'intima et la média (notamment dans les artères coronaires et les artères rénales). Dans les artérioles, il n'y a généralement pas de lamelles élastiques [3], et les couches de CML sont beaucoup moins nombreuses mais toujours arrangées de la même façon (1 à 2 couches de CML).

I.1.3. L'adventice

Dans les artères élastiques (ou de compliance), l'adventice est peu développée et constituée de fibres de collagène, le réseau de collagène prenant naissance à partir de la dernière lame élastique de la média. On y trouve des vaisseaux, qui constituent le vasa vasorum, et des nerfs, qui forment les nervi vasorum.

Dans les artères musculaires de résistance, l'adventice est au contraire très développée et se continue en dehors avec le tissu conjonctif environnant. Elle contient également quelques fibres élastiques épaisses et des fibroblastes. Son organisation est à peu près la même quel que soit le type de vaisseau. L'adventice des artères de résistance contient de l'élastine, du collagène, des fibroblastes, des mastocytes, des macrophages, et parfois des cellules de Schwann associées à des terminaisons nerveuses. L'épaisseur de cette couche est variable en fonction du lit vasculaire et de l'espèce.

Le tissu conjonctif de l'adventice assure l'arrimage de l'artère aux organes environnants. Il assure également l'innervation et, en partie, la vascularisation de sa paroi (vasa-vasorum, dans les grosses artères comme l'aorte).

I.1.4. L'endothélium

Les cellules endothéliales, du fait de leur situation, assurent trois fonctions principales :

1. L'endothélium est une couche thrombo-résistante qui maintient la fluidité du sang au contact de la paroi, au travers de diverses activités qui le situent au coeur de toutes les étapes de l'hémostase (temps plaquettaire, coagulation, fibrinolyse).
2. L'endothélium est une barrière de perméabilité qui filtre et contrôle la pénétration de composants sanguins (molécules, mais aussi cellules) destinés à nourrir les parties internes de l'artère et à en assurer la défense.
3. L'endothélium est enfin un régulateur des vasomotricités artérielles par la sécrétion de substances contractantes (comme l'endothéline ou le thromboxane A₂) et relaxantes (comme la prostacycline ou le monoxyde d'azote ou NO) qui agissent sur le muscle de la média sous-jacente.

I.1.5. Vaso vasorum

Les vaisseaux, comme tous les autres organes, sont constitués de cellules (endothéliales et musculaires) qui doivent recevoir des nutriments et de l'oxygène (O₂) et rejeter des déchets. La proximité immédiate du sang circulant fait que la plupart du temps, les cellules vasculaires effectuent directement leurs échanges avec le sang circulant. Pour les vaisseaux de gros diamètre, la nutrition des cellules constituant la paroi vasculaire est assurée à la fois par le sang circulant dans le vaisseau mais aussi à partir d'un système capillaire : *le vaso vasorum*.

Ce réseau capillaire va apporter des nutriments aux cellules les plus éloignées de la lumière du vaisseau (rôle nourricier des vasa vasorum est restreint à la partie externe de la média). Il est présent dans toutes les artères comportant plus de 29 unités lamellaires [1]. Le vaso vasorum peut, en outre, apporter un certain nombre de médiateurs et d'hormones en contact plus ou moins direct avec les CML des artères les plus grosses.

I.1.6. Innervation

Les vaisseaux sont innervés par des fibres nerveuses dont les afférences aboutissent à la limite de la média et de l'adventice. Selon le modèle proposé par Burnstock et Iwayama [4], l'arborisation terminale de l'axone forme un réseau périvasculaire, qui induit la réponse de toute la tunique musculaire et non pas de chaque CML individuellement. Ces fibres nerveuses agissent directement sur les CML de la couche la plus externe de la média puis la transmission de l'excitation se fera de proche en proche par couplage électrique entre les cellules. La densité de l'innervation est inversement corrélée à la taille et à la résistance du vaisseau. Ainsi, ce sont les petites artérioles pré-capillaires qui sont les plus innervées, ce qui en fait les principales responsables de la résistance vasculaire périphérique. Si la plupart des nerfs vasomoteurs sont noradrénergiques, des terminaisons cholinergiques existent également. D'autres terminaisons ont été mises en avant : elles sont souvent purinergiques, mais peuvent aussi libérer d'autres substances, principalement le peptide vasoactif intestinal (VIP), l'histamine et la dopamine. La sérotonine, la substance P, les enképhalines et le CGRP pourraient aussi être des neurotransmetteurs vasculaires. Enfin, l'action du neuropeptide Y (NPY) comme co-neurotransmetteur du système adrénérgique est bien documentée. Il est libéré avec la noradrénaline dont il renforce l'action, directement en stimulant des récepteurs spécifiques [5].

I.2. Structure des parois vasculaires

La paroi des vaisseaux sanguins présente une structure stratifiée, complexe, où l'on distingue trois constituants fondamentaux :

- 1) Les fibres d'élastine, elles apparaissent sous la forme de lames élastiques concentriques (interne ou externe), et sous la forme de fibres disposées en couches superposées et parallèles au sein de la média,
- 2) Les fibres de collagène forment des boucles lâches, quand la paroi n'est pas étirée. Quand la pression intravasculaire augmente, ces boucles se défont l'une après l'autre. Un tel agencement fait jouer aux fibres de collagène un rôle de "manchon" limitant la dilatation du vaisseau.

- 3) Les fibres musculaires lisses, il en existe deux catégories :

- les *cellules musculaires de tension*, fixées à des fibres élastiques, comme des tendons ; ils peuvent, en se contractant, augmenter la tension du tissu élastique et modifier ainsi le module d'élasticité de la paroi artérielle sans en modifier sensiblement le diamètre (Figure 2).

- les *cellules musculaires en anneau*, reliées les unes aux autres, forment un cordon hélicoïdal. Cet arrangement se retrouve principalement dans les artères de type muscle, les artérioles et les sphincters précapillaires.

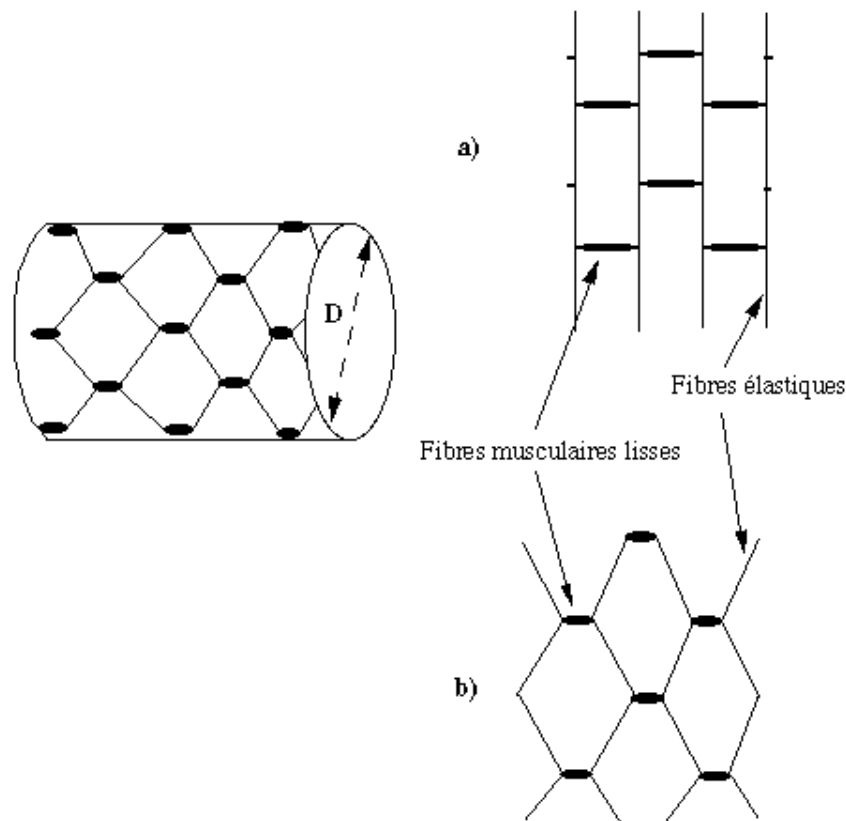


Figure 2 : Structure fonctionnelle de la paroi artérielle. a) fibres musculaires et élastiques au repos, b) Contraction des fibres musculaires

La contraction des fibres musculaires étire les fibres élastiques mais ne modifie pas le diamètre vasculaire. La tension des fibres élastiques augmente et le module d'élasticité de la paroi artérielle est modifié sans changement des diamètres.

II. La cellule musculaire lisse vasculaire

Les cellules musculaires ont une seule et même fonction dans l'organisme : la contraction. Pour cela, les cellules musculaires utilisent de l'énergie et la transforment en force, comme le ferait un moteur. La contraction d'une cellule musculaire aboutit à son raccourcissement. Le travail effectué au sein d'un muscle ou d'un groupe de muscles est utilisé à des fins diverses.

Selon la fonction qu'ils doivent remplir les tissus musculaires sont constitués de différents types de cellules musculaires. Il en existe quatre, constituant autant de types de tissus :

- *le tissu musculaire squelettique*, constitué de cellules musculaires squelettiques (CMS), qui recouvre le tissu osseux et s'y attache, utile au mouvement volontaire et au maintien de la posture.
- *le tissu musculaire cardiaque* constitué de cellules musculaires cardiaques que l'on ne retrouve que dans le cœur où il remplit la fonction de contraction rythmique.
- *le tissu myoépithélial* constitué de cellules myoépithéliales que l'on retrouve au niveau de certaines glandes sécrétrices comme les glandes salivaires, les glandes sudoripares et les glandes lactifères.
- *le tissu musculaire lisse* (également dénommé tissu viscéral par opposition au tissu squelettique) constitué de cellules musculaires lisses et qui forme le tissu contractile des organes creux.

Les vaisseaux sanguins, la trachée, les bronches, le larynx, l'estomac, l'intestin, les sphincters, la vessie et l'utérus sont des organes qui contiennent un grand nombre de CML. Elles permettent à ces organes, souvent creux, de se contracter afin d'expulser leur contenu, d'empêcher ou de contrôler le passage d'aliments ou de déchets. La contraction de ces CML est non volontaire, contrairement aux cellules musculaires squelettiques, et contrôlée par le système nerveux autonome (système neurovégétatif) et par le système hormonal. Ces deux systèmes vont réguler de façon précise l'état de contraction ou de relâchement de ces CML en modifiant le taux d'un important messenger intracellulaire : le calcium (Ca^{2+}). L'état contractile des CML est en effet directement lié au taux du Ca^{2+} intracellulaire libre dans le cytoplasme de ces cellules mais aussi à la sensibilité de l'appareil contractile à ce Ca^{2+} . Dans des conditions physiologiques, les CML sont toujours soumises à une multitude de stimuli, ce

qui fait que les cellules ne sont jamais complètement relâchées en condition basale mais plutôt dans un état semi contracté. Cet état est appelé " tonus " musculaire.

Le tonus vasculaire, tonus musculaire des vaisseaux sanguins, est déterminé par l'état contractile des CML de la paroi des vaisseaux (CML vasculaire : CMLV). Outre le contrôle nerveux, l'état de contraction de ces CMLV va être influencé par un certain nombre de substances hormonales dites vasoactives.

La régulation du taux de Ca^{2+} cytoplasmique dans la CMLV détermine l'état contractile de cette cellule. Ce taux est très finement régulé dans la CMLV et est à la fois fonction des entrées/sorties de Ca^{2+} de la cellule mais aussi de sa libération et de son recaptage par le réticulum sarco-endoplasmique. Les entrées de Ca^{2+} d'origine extracellulaire sont essentiellement modulées par le potentiel de membrane alors que les libérations de calcium des réserves endoplasmiques dépendent plus de messagers intracellulaires.

III. L'endothélium : une barrière métabolique

L'endothélium représente une barrière de 5000m^2 de surface entre le sang et les tissus. C'est un réseau d'informations qui varie d'une façon structurelle et fonctionnelle selon le type de tissus qu'il irrigue. Ceci reflète l'adaptation des cellules endothéliales à leur environnement. La cellule endothéliale est une cellule polarisée. Le côté basal est ancré sur la matrice thrombogène car le sous-endothélium est composé de macromolécules pro-coagulantes, synthétisées par la cellule endothéliale : le collagène et le facteur von Willebrand. La face apicale est en contact avec le sang circulant et représente la surface non thrombogène du fait de son organisation et de sa production de substances anticoagulantes et antiagrégantes.

III.1. Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales tapissent la surface de tous les vaisseaux sanguins. Elles forment une monocouche continue qui représente la barrière métabolique la plus grande de l'organisme. L'endothélium occupe une place anatomique stratégique dans la paroi vasculaire car il est localisé entre le sang circulant et les cellules musculaires lisses vasculaires. Il peut

répondre à des signaux mécaniques et hormonaux provenant du sang. En effet, le sang est source de médiateurs qui peuvent moduler l'état contractile et les réponses prolifératives des cellules musculaires lisses vasculaires, les fonctions plaquettaires, la coagulation ainsi que l'adhésion des leucocytes à la surface endothéliale.

Dans les conditions physiologiques, l'endothélium joue un rôle protecteur en prévenant l'adhésion des cellules sanguines circulantes. Il maintient les vaisseaux dans un état de vasodilatation et inhibe la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires. Dans les états pathologiques comme l'athérosclérose, le dysfonctionnement des cellules endothéliales entraîne une augmentation des réponses vasoconstrictrices, l'adhésion des plaquettes et des monocytes, et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).

III.2. Origine

Au cours de l'embryogenèse, le premier système qui se développe est l'organe cardio-vasculaire. Pendant la gastrulation, les cellules du mésoderme migrent vers le feuillet primitif. Les cellules endothéliales souches, appelées angioblastes, sont définies par leur potentiel de différenciation mais elles n'ont pas encore les marqueurs caractéristiques des cellules endothéliales, ni la capacité de former du lumen. Ultérieurement, la vasculogenèse est mise en place grâce à la différenciation *in situ* des angioblastes vers le phénotype endothélial permettant par la suite la fusion et la formation du lumen, et aboutissant à la formation d'un réseau vasculaire primaire. La prolifération des cellules endothéliales, en formant de nouveaux capillaires, permet l'extension du réseau par élongation et ramification ; la morphogenèse vasculaire est ainsi mise en place. L'angiogenèse, très active pendant l'embryogenèse et le développement de l'enfant, est ralentie chez l'adulte [6,7].

L'endothélium vasculaire est une interface dynamique mutable, avec des propriétés structurales et fonctionnelles qui lui permettent de répondre à une variété de stimuli locaux et systémiques.

III.3. Anatomie

Constitué de cellules endothéliales, l'endothélium d'une membrane basale et d'un sous-endothélium forme une surface relativement imperméable qui limite le transfert passif de solutés, de macromolécules et d'éléments cellulaires ou de fluides entre le sang et l'espace interstitiel. Ce flux est le produit de la transcytose, qui peut être ligand spécifique ou pas, et du passage des fluides à travers des liaisons intercellulaires. Des conditions pathologiques, comme l'inflammation aiguë ou chronique, entraînent la perte de la barrière et conduisent à l'œdème extracellulaire.

Les cellules endothéliales mesurent entre 0.3-0.5µm d'épaisseur, 100µm de long et 10µm de large. Elles ont une forme en losange et leur juxtaposition forme un tapis en mosaïque. Elles sont orientées dans la direction du débit sanguin.

Les cellules endothéliales *in vivo* s'attachent à la surface du vaisseau sanguin par interaction avec le sous endothélium. Celui-ci forme une matrice de molécules parfaitement organisée comprenant collagène, élastine, fibronectine, laminine, thrombospondine, intégrine, vibronectine, facteur de von Willebrand et glycosaminoglycanes comme le dermatane sulfate, l'héparane sulfate et la chondroïtine sulfate. Le sous-endothélium est responsable de l'intégrité structurale, de la tension mécanique (*mechanical strength*) et de l'élasticité des vaisseaux. Le collagène, secrété majoritairement par les cellules endothéliales, représente un des composés fondamentaux du sous-endothélium. Il se lie à la surface endothéliale par interaction avec les β - intégrines, VLA-2 et VLA-3, exprimées par les cellules endothéliales, la liaison avec le collagène permettant d'établir des sites d'attachement. L'intégrine VLA-2 est particulièrement importante car elle peut se lier avec le collagène, la laminine et la fibronectine, et elle peut également s'associer aux fibres d'actine. Celles-ci sont essentielles dans le mécanisme de mécano transduction de l'endothélium.

III.4. Fonction

La recherche sur l'endothélium représente une branche relativement jeune de la science cardio-vasculaire. Il y a seulement 40 ans, l'endothélium était considéré comme une barrière non-thrombogénique relativement inerte. Cependant, Florey en 1966 affirme que l'endothélium est beaucoup plus qu'une feuille de cellophane nucléée[8]. Plus tard, la mise en

route de cultures de cellules endothéliales *in vitro* a permis de mettre en évidence la fonction endothéliale et d'étudier sa capacité de réponse aux changements d'environnement, de type mécanique, chimique et humoral. Les cellules endothéliales saines maintiennent une balance très fine entre :

- la promotion et l'inhibition de la croissance
- la vasoconstriction et la vasodilatation
- l'adhésion et la non-adhésion des cellules sanguines
- l'anticoagulation et la procoagulation, « l'hémostase »

De cette façon, l'endothélium contrôle le tonus vasomoteur, régule la structure vasculaire, maintient les fluides du sang, et régule la réponse inflammatoire et immunologique.

III.5. Le circuit sanguin

Toutes les cellules de l'organisme puisent leur énergie et libèrent leurs déchets dans le circuit sanguin dont aucune n'est éloignée de plus de 100 à 200 μ . La libre circulation du fluide et des cellules à l'intérieur de ce circuit vasculaire est essentielle à la survie de l'organisme et aucune fuite ne doit apparaître. L'endothélium assure l'anti-thrombogénicité du circuit sanguin, favorise la formation de caillots en cas de brèche vasculaire et initie le processus de destruction du caillot par fibrinolyse puis anti-fibrinolyse qui limite l'intensité de cette réaction. L'ensemble de ces processus englobe donc l'hémostase.

Chapitre 2 :

L'angiogenèse

L'angiogenèse débute par une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité cellulaire. Les cellules endothéliales commencent alors à proliférer et à migrer vers le signal angiogénique. Pendant la phase de maturation des cellules, ces dernières vont se différencier pour former un lumen et produire ainsi un assemblage complexe avec la membrane basale. Le recrutement des cellules péri-endothéliales permet ensuite la formation d'un nouveau vaisseau sanguin (artère ou veine). Une balance entre des signaux inhibiteurs et stimulateurs contrôle chaque étape de l'angiogenèse. Ces signaux peuvent être des facteurs de croissance, des cytokines ou encore des protéines de la membrane extracellulaire. La transduction des signaux extracellulaires dans le cytoplasme se fait ensuite par l'intermédiaire de différentes classes de récepteurs présents à la surface des cellules (comme les récepteurs tyrosine kinase ou les intégrines) [9].

I. Facteurs angiogéniques

L'angiogenèse et la vasculogenèse sont essentiellement régulées par différents facteurs de croissance et leurs récepteurs tyrosine kinases associés. Parmi eux se trouve le *vascular endothelial growth factor* ou VEGF.

I.1. VEGF

VEGF-A

VEGF-A, également appelé VPF pour vascular permeability factor, est un important régulateur de la physiologie de la cellule endothéliale identifié depuis approximativement une quinzaine d'années [10,11]. IL a été reconnu comme étant un facteur de croissance majeur spécifique de la cellule endothéliale. VEGF-A est une glycoprotéine dimérique essentielle pour les processus angiogéniques dans les conditions normales ou pathologiques, tels que la vascularisation des tumeurs, principalement en interagissant avec les deux récepteurs,

VEGFR-1 ou Flt-1 (Fms-like tyrosine kinase-1) et VEGFR-2 pour Flk-1 (fetal liver kinase-1) et chez l'homme comme KDR (kinase insert domain-containing receptor) [12-14]. VEGF-A permet deux activités biologiques majeures :

- 1) Stimuler la prolifération des cellules endothéliales vasculaires [10,15,16]
- 2) Augmenter la perméabilité vasculaire [11,17].

VEGF-A intervient également dans la survie et la migration des cellules endothéliales.

Structurellement, VEGF-A appartient à la superfamille des VEGF/PDGF (platelet-derived growth factor). En accord avec les produits de cette famille, 8 résidus cystéine sont conservés à la même position. Ces produits fonctionnent comme un dimère, où 2 des 8 résidus forment un pont disulfure. VEGF-A humain est organisé en 8 exons, séparés par 7 introns [18,19]. VEGF-A possède jusqu'à 9 isoformes dû à l'épissage alternatif d'un gène unique : VEGF 121, VEGF 145, VEGF148, VEGF 162, VEGF 165, VEGF 165b, VEGF 183, VEGF 189 et VEGF 206 [20,21]. VEGF165b est un inhibiteur endogène qui lie VEGFR-2 avec la même affinité que VEGF 165 mais qui n'active pas ou ne stimule pas les voies de signalisation en aval [22]. VEGF est produit dans les cellules endothéliales, les macrophages, les cellules T activées et autres types cellulaires. [23-25]. Bien que peu de choses soient connues sur la régulation des différents isoformes, les principales cellules produisant du VEGF semblent exprimer préférentiellement VEGF 121, VEGF 165 et VEGF 189. VEGF165, isoforme prédominant, est sécrété comme un homodimère de 46kDa, possédant un caractère basique et une affinité modérée pour l'héparine, de par la présence de 15 acides aminés basiques dans les 44 résidus codés par l'exon 7 [10,11,16]. Par contre, VEGF 121, où il manque les résidus codés par les exons 6 et 7, ne lie pas l'héparine. VEGF 189, qui contient une séquence additionnelle codé par l'exon 6, lie fortement l'héparine et est complètement séquestré dans la matrice extracellulaire. Il est alors moins étendu à la surface de la cellule [23].

L'expression de VEGF est régulée par une variété de stimuli tels que l'hypoxie, les oestrogènes, TSH (thyroid-stimulating hormone), les promoteurs de tumeur et le monoxyde d'azote. Bien que tous ces stimuli soient responsables de l'up-régulation du VEGF, le plus intéressant reste l'hypoxie avec son facteur de transcription HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1), qui est un facteur clé de la réponse à l'hypoxie. HIF-1 est un activateur transcriptionnel composé de 2 sous unités : HIF-1 alpha et beta. Ces 2 sous unités sont constitutivement exprimées dans différents types de tumeurs.

VEGF-B

VEGF-B est très largement distribué mais il est particulièrement abondant dans le cœur et le muscle squelettique [26]. VEGF-B humain a deux isoformes générés par épissage alternatif : VEGF-B167 et VEGF-B186. VEGF-B lie et active VEGFR-1 et peut également se lier à NRP-1 [26]. Des études utilisant des souris KO pour VEGF-B (VEGF-B^{-/-}) montrent des résultats contradictoires sur le rôle de VEGF-B dans l'angiogenèse et le développement du système cardiovasculaire. Ces souris KO pour VEGF-B sont viables et fertiles. Cependant, Bellomo et al démontre que les souris VEGF-B ^{-/-} ont des cœurs plus petits, une dysfonction des artères coronariennes et une reperfusion altérée au cours d'une ischémie myocardique [27]. De plus, Aase et al montre que ces souris présente une conduction atrial anormale caractérisé par un intervalle PQ prolongé et que VEGF-B n'est pas nécessaire au développement propre du système cardio-vasculaire pendant le développement ou au cours de l'angiogenèse chez l'adulte [28]. De récentes études utilisant des souris VEGF-B^{-/-} ont démontré le rôle de VEGF-B dans le remodelage vasculaire pathologique au cours d'arthrite inflammatoire [29] et dans la protection cérébrale contre les maladies ischémiques [30].

VEGF-C et VEGF-D

VEGF-C possède environ 30% d'homologie de séquence avec VEGF165 mais il est cependant plus proche de VEGF-D par la présence d'extension N et C-terminal qui ne sont pas trouvés chez d'autres membres de la famille VEGF [31]. VEGF-C et VEGF-D lient et activent VEGFR-3 (Flt-4, un membre de la famille des VEGFR qui ne lie pas VEGF-A) et VEGFR-2. Ils sont également mitogènes pour les cellules endothéliales en culture. VEGF-C lie également NRP-2 [31]. In vitro, VEGF-C et VEGF-D stimule la migration et la mitogenèse de cellules endothéliales en culture [31]. Une récente étude utilisant des souris VEGF-C^{-/-} a démontré que VEGF-C est nécessaire pour l'étape initiale du développement lymphatique et que les allèles VEGF-C sont nécessaires pour le développement lymphatique [32]. Ainsi, VEGF-C est un facteur paracrine essentiel de la lymphangiogenèse. Le rôle de VEGF-D reste encore incertain, mais Stackner et al ont démontré que VEGF-D induit la formation de vaisseaux lymphatiques dans les tumeurs et permet de promouvoir les métastases des cellules tumorales [33].

VEGF-E

Des homologues de VEGF ont été également identifiés dans le génome de parapoxvirus Orf virus [34] et ont été montré pour posséder des activités similaires à VEGF-A. VEGF-E est le

terme collectif pour un groupe de protéines, incluant VEGF-Enz-2 (VEGF de Orf virus NZ-2) [35], VEGF-Enz-7, VEGF-Enz-10, VEGF-Ed1701 et VEGF-Evr634. VEGF-E et ses variantes lient et activent VEGFR-2 mais pas VEGFR-1 ou VEGFR-3. VEGF-Enz-2, VEGF-Enz-10 et VEGF-Ed1701 peuvent lier NRP-1 alors que les deux autres en sont incapables. VEGF-E semble être aussi puissant que VEGF165 pour stimuler la prolifération des cellules endothéliales malgré un domaine basique liant l'héparine manquant.

Sv VEGF

Récemment, une protéine de la famille de VEGF a été trouvée dans le venin de serpent, incluant svVEGF et Tfsv VEGF (*Trimeresurus flavoviridis* svVEGF) [36,37]. svVEGF est une protéine dimérique où chaque chaîne comprend approximativement 110 à 120 acides aminés. Takahashi et al. ont montré que le serpent utilise svVEGF en plus de VEGF-A [37]. Il contribue ainsi à améliorer la toxicité du venin.

PIGF

Il fut découvert dans le placenta humain en 1991 [38]. PIGF est hautement exprimé dans le placenta à tous les stades de la gestation humaine. Des transcrits ont également été trouvés dans le cœur, les poumons, la thyroïde ou le muscle squelettique [39]. PIGF lie VEGFR1 mais pas VEGFR2 [40,41]. Il existe 4 isoformes de PIGF :

- PIGF-1 (PIGF131)
- PIGF-2 (PIGF152)
- PIGF -3 (PIGF203)
- PIGF-4 (PIGF224)

PIGF-1 et 3 ne se lient pas à l'héparine alors que les deux autres peuvent s'y lier. PIGF-2 peut également se lier aux co-récepteurs NRP-1 et NRP-2. La structure cristalline de PIGF-1 humain montre une homologie structurale avec VEGF-A [42]. Malgré une conservation de séquence modérée, PIGF et VEGF-A lient le même interface de liaison de VEGFR-1 et de façon similaire [43]. Cependant, Carmeliet et al. ont montré que chez des souris déficientes en PIGF, l'angiogenèse embryonnaire n'est pas affectée [44]. L'absence de PIGF détériore l'angiogenèse, l'extravasation plasmatique et la croissance collatérale pendant l'ischémie, l'inflammation, la cicatrisation et le cancer, indiquant l'importance des voies de signalisation de VEGFR-1 dans les conditions pathologiques.

I.2. Les récepteurs des VEGFs

Les VEGFs ont une affinité potentielle pour quatre types de récepteurs différents: Flt-1, Flk1/KDR, Flt-4 et la neuropiline. Les récepteurs Flt-1, Flk1/KDR et Flt-4 sont des protéines à activité tyrosine-kinase. Ils sont constitués de sept boucles de type immunoglobuline dans leurs domaines extracellulaires, d'une partie transmembranaire hydrophobe, et d'une partie cytoplasmique contenant le domaine à activité kinase. En revanche, la neuropiline ne possède pas de domaine à activité kinase. Comme la plupart des récepteurs de facteurs de croissance, les récepteurs de la famille des VEGFs peuvent se dimériser (homo ou hétérodimère) par la formation de ponts disulfure.

Le VEGF-R1 ou Flt-1

Le VEGF-R1 est communément appelé Flt-1 (fms-like tyrosine kinase). Cette glycoprotéine transmembranaire de 180 kDa est exprimée par les cellules endothéliales [45], les monocytes et les péricytes [46]. Son expression est augmentée en condition d'hypoxie [47]. Le VEGF se lie au récepteur Flt-1 avec une très forte affinité [45]. L'activité biologique de ce récepteur reste cependant mal connue. La dimérisation de Flt-1 n'entraîne pas de réponse mitogénique ou chimotactique importante [48]. De même, les souris, dont le domaine kinase du récepteur Flt-1 a été délété, ne présentent aucune anomalie phénotypique marquée [49]. En revanche, lorsque le gène codant pour Flt-1 est complètement inactivé, les souris meurent entre les stades embryonnaires E 8 et E 10 [50]. Ces résultats suggèrent que la capacité de fixation du VEGF par Flt-1 est plus importante que la signalisation induite par sa partie cytoplasmique. Le rôle principal de ce récepteur serait de moduler la fixation du VEGF sur le récepteur Flk1/KDR ou de s'hétérodimériser avec ce dernier et de permettre ainsi la régulation de la signalisation intracellulaire induite par Flk1/KDR. Le réseau vasculaire adulte est quiescent et moins sensible au VEGF-A notamment, le récepteur Flt-1 et ses ligands pourraient, dans des situations pathologiques (ischémie, inflammation ou tumeurs malignes), sensibiliser les cellules endothéliales au VEGF-A et ainsi initier le développement vasculaire [44]. L'épissage alternatif de son ARNm produit une forme soluble (sFlt-1), susceptible de réguler négativement les activités biologiques des VEGFs [51,52].

Le VEGFR-2 ou Flk1/KDR

Le VEGF-R2 ou Flk1/KDR (fetal liver kinase-1, Flk-1) est une glycoprotéine de 230 kDa exprimée par de nombreux types cellulaires, particulièrement les cellules endothéliales et leurs précurseurs [53], certaines cellules hématopoïétiques ainsi que leurs précurseurs, les mégacaryocytes [54]. Le récepteur KDR est fortement exprimé dans l'arbre vasculaire. Son expression est augmentée in vivo en condition hypoxique [55]. Les souris dont le gène codant pour KDR a été invalidé meurent au cours du développement embryonnaire de part l'absence de cellules endothéliales différenciées et de structures vasculaires organisées [56].

LE VEGF-R3 OU Flt-4

Le VEGF-R3 ou Flt-4 est principalement exprimé au niveau des cellules endothéliales du système lymphatique [57]. Il joue un rôle majeur dans la lymphangiogenèse. Les souris déficientes pour [58] meurent au stade embryonnaire E 9.5 avec des malformations vasculaires [58]. Récemment, il a été montré que l'inhibition de ce récepteur par des anticorps spécifiques permettait de réduire l'angiogenèse associée au développement tumoral [59], suggérant un rôle de Flt-4 dans le processus de vasculogenèse et d'angiogenèse.

Les Neuropilines

Les Neuropilines (NRP-1) comprennent plusieurs membres, dont le principal est la NRP-1, elles appartiennent à la famille des sémaphorines/collapsines, des médiateurs négatifs de la guidance neuronale [60]. La NRP-1 agit comme un co- récepteur du VEGF-A 165 [61]. La NRP-1 est une glycoprotéine transmembranaire de 130 kDa qui ne possède pas de domaine tyrosine kinase. Elle est exprimée par les cellules endothéliales et les cellules cancéreuses [61]. Elle reconnaît également le VEGF -B [62], le PlGF-2 [63], mais pas l'isoforme VEGF-A 121 [61]. Son rôle a été initialement mis en évidence dans le développement du système nerveux et son expression a été principalement détectée dans les axones des fibres nerveuses sensorielles et motrices [64]. Chez les souris transgéniques sur-exprimant la NRP-1, il a été observé des anomalies au niveau du système cardiovasculaire, en particulier un excès de capillaires et de vaisseaux sanguins accompagné de malformations cardiaques [65]. De même, les souris invalidées pour le gène codant pour la NRP-1 montrent une diminution de la vascularisation neuronale et des malformations des gros vaisseaux comme l'aorte [66]. La co-expression de la NRP-1 avec le récepteur KDR augmente d'un facteur quatre la fixation du

VEGF-A165 sur ce dernier [61]. La NRP-1 est un co-récepteur qui permet d'amplifier les activités biologiques induites par l'activation du récepteur KDR après fixation du VEGF. Ceci expliquerait éventuellement les activités mitogéniques plus importante du VEGF-A 165 comparées à celles induites par le VEGF-A 121. Cependant, on a récemment découvert l'existence d'une nouvelle isoforme de la Neuropiline, la Neuropiline soluble de 90 kDa qui se lie principalement au VEGF-A 165 et semblerait être un antagoniste de ce dernier, susceptible d'augmenter le processus apoptotique et d'inhiber le développement tumoral [67].

I.3. Les FGFs

I.3.1. Les membres de la famille des FGFs

La famille des FGFs comprend actuellement au moins 23 membres qui possèdent entre eux 30 à 70 % d'homologie dans leur séquence protéique. Les FGFs sont caractérisés par la présence d'une partie centrale de 140 acides aminés très conservée entre les différents membres et par une forte affinité pour l'héparine et les héparan-sulfates protéoglycannes. La nomenclature des FGFs utilise le terme FGF pour "Fibroblast Growth Factor" suivi du nombre attribué dans l'ordre chronologique de leur découverte. Les deux premiers membres de cette famille (FGF-1 et FGF-2) purifiés à partir de glandes bovines sont les plus connus et les plus étudiés. Ils ont été initialement caractérisés par leur potentiel mitogénique sur les fibroblastes [68].

FGF-1 (aFGF, FGF de type acide)

C'est une protéine de 155 acide-aminés, de 18 kDa de poids moléculaire, appelée également FGF acide, elle ne possède pas de séquence signal lui permettant d'être sécrétée par la voie classique d'exocytose. Certaines données suggèrent une sécrétion dépendante des protéines de choc thermique [69]. Le FGF-1 possède une séquence de localisation nucléaire [70], permettant sa translocation dans le noyau cellulaire. Cette séquence représente également un domaine important pour l'activation des récepteurs du FGF par le FGF-1. Il existe une forme phosphorylée de FGF-1 qui diminue la dégradation du FGF-1 internalisé.

FGF-2 (bFGF, FGF de type basique)

Il s'agit d'un gène qui code pour cinq protéines différentes, et il possède 55 % d'homologie avec le gène codant pour le FGF-1. La traduction de son ARN messager conduit à la formation de cinq isoformes: 18; 22; 22,5; 24 et 34 kDa [71]. Le FGF-2 de 18 kDa représente la forme majoritaire, il a un mode d'action paracrine ou autocrine et active la prolifération et la migration cellulaire [71]. Les autres isoformes sont appelées HMW-FGF-2 (High Molecular Weight FGF-2).

I.3.2. Les récepteurs du FGF

Il existe actuellement trois familles de récepteurs impliquées dans la liaison des FGFs: des récepteurs de haute affinité avec un domaine tyrosine kinase, des récepteurs de haute affinité sans activité tyrosine kinase et des récepteurs de basse affinité. Ils sont respectivement appelés FGF-R1 (ou flg pour "fms-like gene"), FGF-R2 (ou bek pour "bacterial expressed kinase"), FGF-R3 et FGF-R4. Ils présentent entre eux de fortes homologies de séquences et un haut degré de conservation. Ils sont exprimés principalement au niveau des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses.

I.4. Angiopoïétines

Les angiopoïétines (Ang) -1 et -2 sont des facteurs de croissance qui interviennent précocement dans le développement vasculaire. Les angiopoïétines sont constituées d'une région N-terminale en hélice, et d'un domaine C-terminal de type "fibrinogène-like" qui est la région la plus conservée des angiopoïétines. Cette région possède un haut degré d'homologie avec les domaines analogues de certaines protéines de la matrice extracellulaire comme tenascin-C, fibrinogène β et γ [72-75]. C'est également un important déterminant pour la caractérisation des agonistes et des antagonistes de la molécule.

I.4.1 Angiopoïétine-1 (Ang-1)

Ang-1 est connue comme étant un agoniste du récepteur tyrosine kinase Tie-2. Ce facteur participe à la stabilisation des vaisseaux. La fixation de l'Ang-1 sur son récepteur Tie-2

permet de recruter les péricytes et de former les vaisseaux matures [76]. Tie-2 est un récepteur principalement exprimé dans les cellules vasculaires endothéliales [77] et possède une forte homologie avec les récepteurs des immunoglobulines et les récepteurs EGF (epidermal growth factor) [78]. Ang-1 et Tie2 jouent un rôle important dans la formation des vaisseaux sanguins en améliorant la survie, la migration, le sprouting et la formation d'un réseau de cellules endothéliales vasculaires. En effet, les souris KO pour l'angiopoïétine ou son récepteur ne survivent pas à cause d'un problème de vasculature au niveau du cœur et du cerveau. Aucune interaction cellulaire ne se produit avec la membrane basale et les fibres de collagène se réorganisent peu voire pas du tout dans la membrane basale [79,80]. Des expériences *in vitro* montrent que la survie des cellules endothéliales promues par l'Ang-1 se fait principalement par la voie de signalisation Tie2/PI3K/Akt [81,82]. L'Ang-1 stimule le recrutement de Dok-R (downstream of kinase-R) de façon Tie dépendante. La phosphorylation de Dok-R intervient également dans le recrutement de Ras, protéine activant les GTPases, et Nck, un adaptateur moléculaire qui régule la mobilité cellulaire et le réarrangement des protéines du cytosquelette [81]. Ang-1 est un médiateur de l'interaction cellule - cellule ou cellule - matrice extracellulaire. *In vitro*, la présence d'Ang-1 améliore l'adhésion cellulaire à la fibronectine [83]. Ang-1 potentialise également la migration cellulaire sur la fibronectine [84,85] et induit le sprouting capillaire des cellules endothéliales.

I.4.2 Angiopoïétine-2 (Ang-2)

L'Ang-2, *in vitro*, n'active pas les récepteurs malgré une affinité pour Tie 2 similaire à Ang-1 [73]. Une surexpression d'Ang-2 empêche la phosphorylation du récepteur Tie 2 induit par Ang-1. L'Ang-2 serait donc *in vivo* un antagoniste naturel de l'Ang-1.

I.5. Le NO

I.5.1. Généralités

Furchgott et Zawadski ont démontré en 1980 que la relaxation artérielle induite par l'acétylcholine nécessitait un endothélium intact lequel produisait une substance pouvant diffuser et agir sur les cellules musculaires lisses [86]. Cette substance fut nommée Endothelial Derived Relaxing Factor (EDRF) jusqu'à ce que Palmer et son équipe la caractérisent et découvrent en 1987 qu'il s'agissait du NO [87]. Le NO ayant suscité beaucoup d'intérêt au cours des années qui suivirent, sa découverte fut récompensée par

l'attribution du Prix Nobel de médecine en 1998 à R.F. Furchgott, L.J. Ignarro et F. Murad. Cette molécule gazeuse hydro et liposoluble peut agir à l'intérieur comme à l'extérieur des cellules et possède un large spectre d'actions physiologiques (Figure 3), tant au niveau rénal que cardiovasculaire, pulmonaire et gastrointestinal. En outre, parce que le NO est un puissant vasodilatateur endogène, la baisse de sa biodisponibilité pourrait être en partie responsable de l'élévation des résistances périphériques.

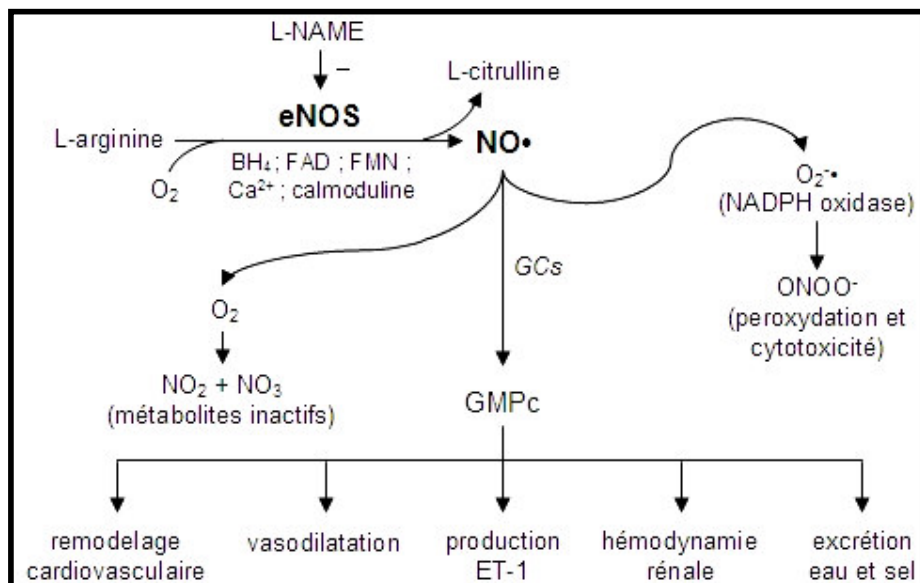


Figure 3: Métabolisme du monoxyde d'azote.

Synthèse, dégradation et actions physiologiques du monoxyde d'azote. (BH₄) tétrahydrobioptérine, (FAD) flavine adénine dinucléotide, (FMN) flavine mononucléotide, (GCs) guanylate cyclase soluble, (ONOO⁻) peroxynitrite, (L-NAME) analogue synthétique de la L-arginine inhibant eNOS.

1.5.2. Biosynthèse et mode d'action du NO

Le NO est un composé diatomique labile possédant une action paracrine et autocrine. En milieu biologique, sa demi-vie est estimée entre 1 et 5 secondes voire 30 secondes étant donné qu'il peut réagir avec le fer des noyaux hémiques, avec les dérivés de l'oxygène ainsi qu'avec les groupements thiols. Le NO est donc rapidement inactivé par les ions superoxydes ou transformé en métabolites inactifs, les nitrites (NO₂⁻) et les nitrates (NO₃⁻) en contact avec l'oxygène. La liaison du NO aux composés possédant des groupements thiols conduit à la

formation de S-nitrosothiol ce qui constituerait un évènement important pour l'activité et le transport du NO. Ces composés peuvent subséquemment agir comme donneurs de NO et ainsi augmenter substantiellement sa demi-vie. Le NO est produit par l'enzyme nitric oxide synthase (NOS) dont il existe trois isoformes : deux sont constitutives, la NOS endothéliale (eNOS) et la NOS neuronale (nNOS), alors que la troisième est inductible (iNOS). Toutes ces isoformes utilisent la L-arginine, l'oxygène et le NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) comme substrats pour aboutir à la formation de NO et de L-citrulline. La tétrahydrobioptérine (BH₄), la calmoduline/Ca²⁺, le FAD (Flavine-Adénine Dinucléotide) et le FMN (Flavine Mononucléotide) sont des cofacteurs nécessaires au processus catalytique. Au niveau cellulaire, le NO se lie à une guanylate cyclase soluble (GCs) intracellulaire (l'unique cible connue du NO). La GCs est une enzyme hétérodimérique constituée d'une sous-unité α de 73 à 88 kDa et d'une sous-unité β de 70 kDa. La sous unité β comprend un hème de type b. Le fer associé à l'hème forme un lien de coordination avec l'histidine proximale 105. Ce lien proximal est le plus faible connu chez les protéines hémiques à ce jour. Lorsque le NO se fixe à la GCs, il y a formation d'un complexe 5C-NO en raison de la rupture du lien proximal [88]. Le modèle d'activation de la GCs par le NO est complexe et montre que la conversion de la forme 6CNO en 5C-NO est catalysée par une seconde molécule de NO [88]. Lorsque de l'imidazole est ajouté à la forme 5C-NO, la forme 6C-NO est obtenue. Le réarrangement conformationnel de la protéine qui fait suite à la rupture du lien proximal lors de la fixation du NO est responsable de l'augmentation de près de 400 fois de l'activité de la GCs. La GCs catalyse la conversion du 5'-guanoside-triphosphate (GTP) en GMPc, un second messenger intracellulaire du NO. De plus, étant donné que la GCs ne fixe pas l'oxygène de façon stable, elle peut faire la différence entre O₂ et NO dans l'organisme [89]. Ce modèle d'activation est présenté au niveau de la figure 4.

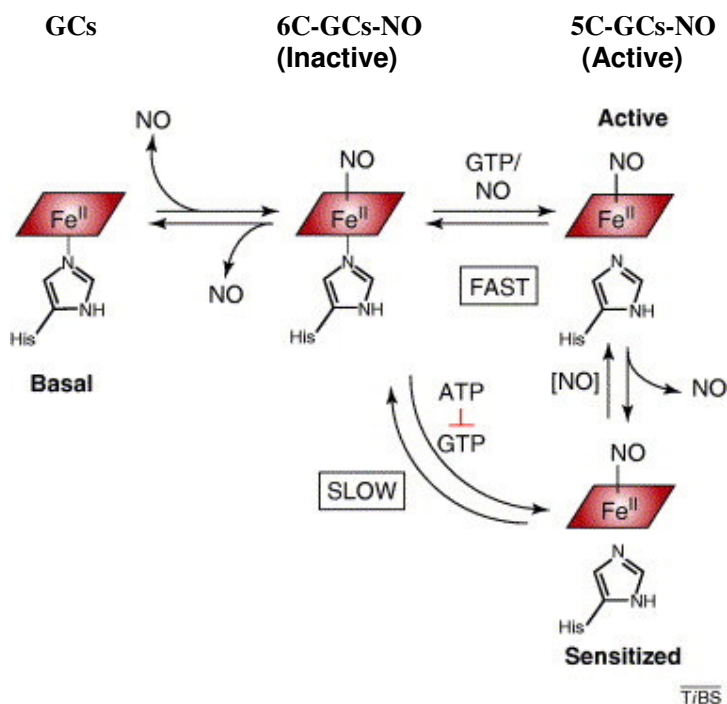


Figure 4: Modèle d'activation de la GCs par le NO. (D'après Cary et al., 2006 [90])

Endothelial nitric oxide synthase : eNOS aussi appelée NOS III est ancrée à la membrane plasmique des cellules endothéliales des vaisseaux de gros et de moyens calibres, des myocytes cardiaques et des plaquettes. eNOS est présente dans la paroi des vaisseaux corticaux et médullaires de tous les segments du rein ainsi que dans les cellules endothéliales glomérulaires [91] avec une prééminence au niveau de la *macula densa* et du tubule collecteur [92]. Il a été établi par ailleurs que les cellules endothéliales mésentériques n'exprimaient pas eNOS bien qu'elles puissent générer du NO via iNOS suite à une stimulation par des cytokines [93]. eNOS est exprimée de façon constitutive, son activité dépend du calcium intracellulaire et de la calmoduline [94]. Elle peut être inhibée de façon compétitive par des analogues synthétiques de la L-arginine dont le NG-nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME) ou le NG-monométhyl-L-arginine (LMMA) [95]. Il existe également des inhibiteurs endogènes d'eNOS. De nombreux stimuli physiques et humoraux augmentent la synthèse de NO par eNOS avec pour voie d'activation commune l'élévation de la concentration intracellulaire de Ca²⁺. L'augmentation de la tension des fibres musculaires exercée par la pression sanguine est l'un des principaux facteurs régulant la synthèse de NO à chaque instant afin de maintenir un tonus basal adéquat [95].

Inducible nitric oxide synthase : iNOS ou NOS II est exprimée dans divers types cellulaires dont les macrophages et les granulocytes et son activité serait indépendante du calcium cytoplasmique. L'exposition *in vitro* et *in vivo* de cellules musculaires lisses à certains médiateurs impliqués lors de l'inflammation dont l'IL-1 et le TNF- α , aux endotoxines microbiennes ou aux lipopolysaccharides provoque une induction d'iNOS. Une fois induite, iNOS demeure active pendant des périodes de 4 à 24 heures, produisant près de 100 fois plus de NO que les NOS constitutives [96].

Neuronal nitric oxide synthase : nNOS ou NOS I possède une localisation cytosolique et se retrouve dans certains neurones centraux et périphériques. nNOS est exprimée en réponse à une stimulation nerveuse. Elle est présente dans toutes les zones du cerveau, mais particulièrement dans le cervelet, l'hippocampe et la zone olfactive [97]. Dans le rein, nNOS est localisé dans les cellules de la *macula densa* et des tubules [91]. Finalement, elle est également retrouvée au niveau du corps caverneux de la verge chez l'homme.

Mode d'action : La plupart des actions cellulaires du NO impliquent l'activation de la guanylate cyclase soluble retrouvée dans le cytosol. Cette enzyme catalyse la formation de GMPc à partir de GTP. L'augmentation de GMPc active PKG qui provoque la phosphorylation de protéines impliquées dans les processus de relaxation musculaire, de prolifération cellulaire, d'agrégation plaquettaire et d'expression de molécules d'adhésion [98].

I.5.3. Mécanismes de régulation

La libération du monoxyde d'azote par l'endothélium est stimulée entre autres par l'Angiotensine II (AngII) (récepteur AT2), l'ET-1 (récepteur ETB), la sérotonine (récepteur 5-HT1D), la bradykinine (récepteur B2) [99], l'histamine, la thrombine, les catécholamines, les peptides natriurétiques [100] et la vasopressine. Ces derniers vont conduire à l'augmentation du taux de calcium libre intracellulaire, activant ainsi eNOS [101,102]. Au contraire, l'activation d'eNOS par les forces d'étirement et de cisaillement subit par l'endothélium survient indépendamment de la variation du calcium intracellulaire. D'un autre côté, certains facteurs sont aussi connus pour inhiber l'expression d'eNOS dont le TNF- α , l'EPO, l'hypoxie et une concentration élevée de LDL oxydés [101,102].

I.5.4. Rôles physiologiques du monoxyde d'azote

Dans la paroi vasculaire, le NO diffuse de l'endothélium vers la cellule musculaire lisse en traversant librement les membranes cellulaires. Ses actions cardiovasculaires sont nombreuses. Au niveau de la cellule endothéliale, il inhibe la production d'ET-1, l'oxydation des LDL, l'expression de molécules d'adhésion et par conséquent, l'adhésion des plaquettes et des leucocytes [95]. Il favorise la relaxation des fibres musculaires lisses des vaisseaux, du coeur, du système digestif, du tractus génito-urinaire, des voies respiratoires et de l'utérus. Il inhibe également l'agrégation plaquettaire et empêche la prolifération des cellules du muscle lisse et module la perméabilité vasculaire de même que les mécanismes inflammatoires [102-104]. Au niveau du cerveau, le NO produit localement agit comme neurotransmetteur et neuromodulateur, contribuant ainsi à l'autorégulation du flux sanguin et à la prévention de vasospasmes cérébraux [95]. Au niveau gastro-intestinal, il agirait dans le plexus mésentérique comme un neurotransmetteur pour réguler la relaxation des fibres musculaires lisses de l'intestin, nécessaire au péristaltisme. Finalement, le NO participe au processus d'érection pénienne, de dilatation bronchique et a récemment été impliqué dans la perception de la douleur [97]. L'augmentation des peroxynitrites (ONOO-) et l'implication du NO dans les maladies d'Alzheimer et de Parkinson reste à confirmer.

On confère au NO de nombreuses fonctions en commençant par un puissant effet vasodilatateur. Sur ce point, le tonus vasculaire musculaire lisse dépendant du NO fait intervenir de nombreuses voies métaboliques : (1) ouverture de canaux potassiques ATP-dépendant conduisant à l'hyperpolarisation cellulaire ; (2) diminution du Ca²⁺ intracellulaire via l'inhibition de canaux calciques associée à une réduction de la libération du Ca²⁺ par le réticulum sarcoplasmique ; (3) inhibition de la phospholipase C ; (4) phosphorylation de protéines accélérant la relaxation et inhibition de la kinase Rho [105]. En plus de ces actions directes sur les cellules, il a été démontré que le NO favorisait la vasorelaxation indirectement (1) en diminuant la dégradation de l'adénosine monophosphate (AMP) via l'inhibition de la phosphodiesterase II, (2) en inhibant la production d'ET-1 ainsi que la synthèse de rénine – et par conséquent d'AngII – et (3) en neutralisant les anions superoxydes O₂⁻ ou d'autres espèces réactives de l'oxygène (ROS). Par ailleurs, il est impliqué dans les mécanismes anti-thrombotiques donc de protection vasculaire et possède un rôle de neurotransmetteur en plus d'agir sur le système immunitaire. Un nombre important de facteurs pro-angiogéniques favorise l'expression d'eNOS stimulant ainsi la production de NO. Le VEGF favorise l'expression de la NOSe, et stimule la biosynthèse du NO dans les cellules humaines de veines ombilicales (HUVECs) [106]. Les mêmes phénomènes ont été observés dans les

segments vasculaires de l'aorte thoracique de lapin, où le VEGF stimule la synthèse de NO. Dans ce modèle, la préincubation de L-arginine augmente la libération du NO d'un facteur 2. De la même manière, lorsque que le TGF- β ou le FGFb sont utilisés comme stimuli pro-angiogéniques, les cellules endothéliales sécrètent du NO [107]. La libération de NO induite par des facteurs pro angiogéniques semble jouer un rôle central dans les effets de ces derniers. De la même façon, l'inhibition de NOS annihile les effets *in vitro* pro angiogénique de la substance P ou du TGF- β . Le NO est aussi un facteur de survie endothéliale, inhibant l'apoptose, et favorisant la prolifération des cellules endothéliales ainsi que leur migration. Cette capacité du NO à favoriser la migration des cellules endothéliales serait due au processus de « podokinesis » [108]. En outre, le NO augmente les interactions cellules endothéliales-matrice via l'induction de l'expression de l'intégrine $\alpha v\beta 3$ et/ou en augmentant la dégradation de la matrice extracellulaire par l'activateur du plasminogène de type urokinase via l'augmentation de la synthèse de FGFb [109]. De plus, les effets vasodilatateurs du NO pourraient contribuer à ses effets pro-angiogéniques. L'augmentation du débit sanguin dans la microcirculation squelettique est un des facteurs capable d'accélérer la prolifération des cellules endothéliales. Le NO pourrait également, en influençant indirectement la croissance des cellules endothéliales, augmenter localement le flux sanguin. Enfin, il faut noter que le NO peut induire la synthèse et la libération de VEGF à partir de cellules vasculaires [110].

II. Différentes étapes de l'angiogenèse

II.1. La vasculogenèse

Au cours des premiers stades de l'embryogenèse, le développement embryonnaire se fait en absence de vascularisation la simple diffusion des éléments nutritifs du sang assure la demande métabolique de l'embryon. L'embryon se transforme alors progressivement en un organisme vasculaire, c'est à dire en une entité dépendante fonctionnellement du plexus capillaire et des vaisseaux sanguins.

II.1.1. Définition

La vasculogenèse fait référence aux événements initiaux de la croissance vasculaire au cours desquels les précurseurs des cellules endothéliales (nommés angioblastes), migrent, se différencient *in situ* et s'organisent pour former le réseau vasculaire primitif. Deux types de vasculogenèse peuvent être identifiés: la vasculogenèse de type I impliquant les angioblastes dérivés du mésoderme splanchnoneural pour former le plancher aortique, et la vasculogenèse de type II qui correspond à l'assemblage des angioblastes dérivés des somites pour ainsi former la veine cardinale.

Le développement des vaisseaux sanguins se produit initialement à la périphérie de l'aire extra-embryonnaire sous la forme d'agrégats de cellules mésenchymateuses constituant des îlots sanguins. La fusion de ces îlots sanguins entre eux conduit alors à l'établissement du plexus vasculaire primitif extra-embryonnaire. Il a longtemps été admis que la vascularisation de l'embryon était réalisée par connexion avec ces vaisseaux sanguins extra-embryonnaires. C'est néanmoins au début du vingtième siècle que la présence d'un réseau vasculaire d'origine intra-embryonnaire a été reconnue avec la démonstration que des cellules isolées d'origine embryonnaire avaient la potentialité de former des vaisseaux sanguins. A la même époque, les angioblastes ont été définis comme les précurseurs des cellules endothéliales et l'existence d'un seul précurseur bipotent à l'origine des cellules endothéliales et des cellules souches hématopoïétiques a également été avancée [7].

Peu de temps après l'émergence du plexus capillaire primitif extra-embryonnaire, les angioblastes apparaissent dans l'embryon lui-même. En effet, les cellules à la périphérie des îlots sanguins se différencient en précurseurs des cellules endothéliales, c'est à dire en

angioblastes alors que les cellules situées au centre des îlots sanguins vont constituer les précurseurs des cellules hématopoïétiques.

La vasculogenèse a tout d'abord été considérée comme spécifique au développement embryonnaire pour permettre l'élaboration du réseau vasculaire primitif. Cependant, les angioblastes migrent non seulement dans le milieu intra-embryonnaire mais circulent et semblent être recrutés in situ pour participer à la néovascularisation post-natale [111,112].

II.1.2. Les principaux mécanismes impliqués dans la vasculogenèse (Figure 5)

Certaines régions de l'épiblaste (feuillet d'où provient l'ensemble de l'embryon) sont constituées de cellules souches pluripotentes, qui vont subir une induction mésodermique sous l'influence du FGF via la protéine kinase C [113]. Les hémangioblastes, précurseurs des lignées hématopoïétiques, mésenchymateuses et vasculaires, vont se différencier de cette sous-population cellulaire.

II.1.2.1. Différenciation des hémangioblastes en angioblastes

Les hémangioblastes vont ensuite se différencier pour donner des cellules précurseurs de chacune des lignées cellulaires pré-citées et notamment en angioblastes qui représentent la population de cellules à l'origine des cellules endothéliales vasculaires. Cependant, la signalisation moléculaire responsable du devenir des hémangioblastes et notamment de leur différenciation soit en précurseurs hématopoïétiques soit en angioblastes reste à préciser. On a toutefois identifié des gènes pouvant être impliqués dans les étapes précoces de cette différenciation tels que *Ets*, *Hex*, *Vezf*, *Hox*, des membres de la famille des GATA, des facteurs de transcription de la famille des basic helix loop helix (b HLH) [114,115], ou encore les id protéines [116]. Les marqueurs précoces communs aux deux lignées, angioblastes et précurseurs des cellules hématopoïétiques sont le CD34, le facteur de transcription SCL/TAL-1 ainsi que le récepteur Flk-1/KDR ou VEGF-R2. Ceci permet de supposer un rôle de ces molécules dans le devenir des hémangioblastes [117]. D'ailleurs, les embryons n'exprimant pas le facteur transcriptionnel SCL/TAL-1, présentent un défaut localisé uniquement dans les cellules de la lignée hématopoïétique. A l'inverse, l'inactivation du gène codant pour le VEGF-R2 chez la souris est létale (7.5-8.5 jours de vie embryonnaire) et se caractérise par une absence de développement des lignées endothéliales et hématopoïétiques soulignant ainsi l'importance de la présence de ce type de récepteur dans la différenciation des hémangioblastes. De plus, lors de la différenciation cellulaire, le VEGF-R2 est régulé

négativement dans les cellules de la lignée hématopoïétique mais pas dans celles des précurseurs des cellules endothéliales. Néanmoins, l'absence d'îlots sanguins observée chez les animaux déficients en VEGF-R2 est un argument en faveur d'une origine commune aux cellules endothéliales et sanguines. Le VEGF-R2 assurerait une localisation correcte des précurseurs mésodermiques dans l'embryon. En revanche, le VEGF-R1 (ou Flt-1) semble avoir un rôle plus tardif dans la vasculogénèse. L'inactivation du VEGF-R1 provoque une létalité à E 8.5 jours et une anomalie de la formation des vaisseaux mais la différenciation des cellules endothéliales reste normale. Les souris déficientes en Flt-1 possèdent bien des angioblastes mais ceux-ci ne peuvent s'assembler pour former des vaisseaux primitifs [50]. La différenciation des angioblastes est ensuite modulée par le VEGF, le VEGF-R2 et le bFGF [115], mais les étapes successives et le rôle respectif des facteurs impliqués dans la différenciation finale en cellules endothéliales sont encore méconnus.

II.1.2.2. Assemblage des cellules endothéliales en tubes endothéliaux.

La vasculature commence à se former vers 7.5 jours post-coïtum chez la souris ; les angioblastes qui ont migré dans le mésoderme du tissu embryonnaire s'assemblent en agrégats qui se différencient ultérieurement en tubes endocardiques à l'origine de la formation de l'aorte dorsale, des veines cardinales et des ébauches embryonnaires des veines et des artères du sac vitellin. L'organisation des cellules endothéliales en tubes endothéliaux, puis les ramifications de ces tubes endothéliaux se font sous le contrôle des angiopoïétines et des récepteurs Tie-2. En effet, les souris déficientes pour le récepteur Tie-2 décèdent entre E9.5 et E10.5 de malformation du réseau vasculaire, les vaisseaux apparaissant dilatés, de taille homogène et sans ramification [79]. Des souris déficientes pour le ligand du récepteur Tie-2, l'Ang-1 présentent un réseau vasculaire également dilaté et sans ramification [118].

II.1.2.3. Assemblage des cellules non endothéliales – Communication entre les cellules endothéliales et les cellules mésenchymateuses.

L'organisation des tubes endothéliaux en une structure mature nécessite le recrutement de différents types cellulaires, et notamment des cellules musculaires lisses et des péricytes. Le PDGF a un rôle dans la prolifération des cellules endothéliales et est mitogène et chimiotactique pour les cellules musculaires lisses et les péricytes [119]. Le PDGF est, en fait sécrété par les cellules endothéliales, engagées dans le processus de vasculogénèse, et

participe au recrutement des précurseurs des cellules musculaires lisses au niveau des tubes endothéliaux où ils s'accumulent de façon asymétrique. Les précurseurs des cellules musculaires lisses se différencient alors en cellules musculaires lisses matures sous l'action du TGF β 1, des endoglines et des protéines SMADs. Après la formation de la lumière vasculaire par les cellules endothéliales, la sphingosine 1 phosphate, via son récepteur Edg-1, induit la migration des cellules musculaires lisses autour de la couche endothéliale [120]. Le TGF β 1 inhibe également la prolifération et la migration des cellules endothéliales et participe à la différenciation des cellules mésenchymateuses en péricytes [121].

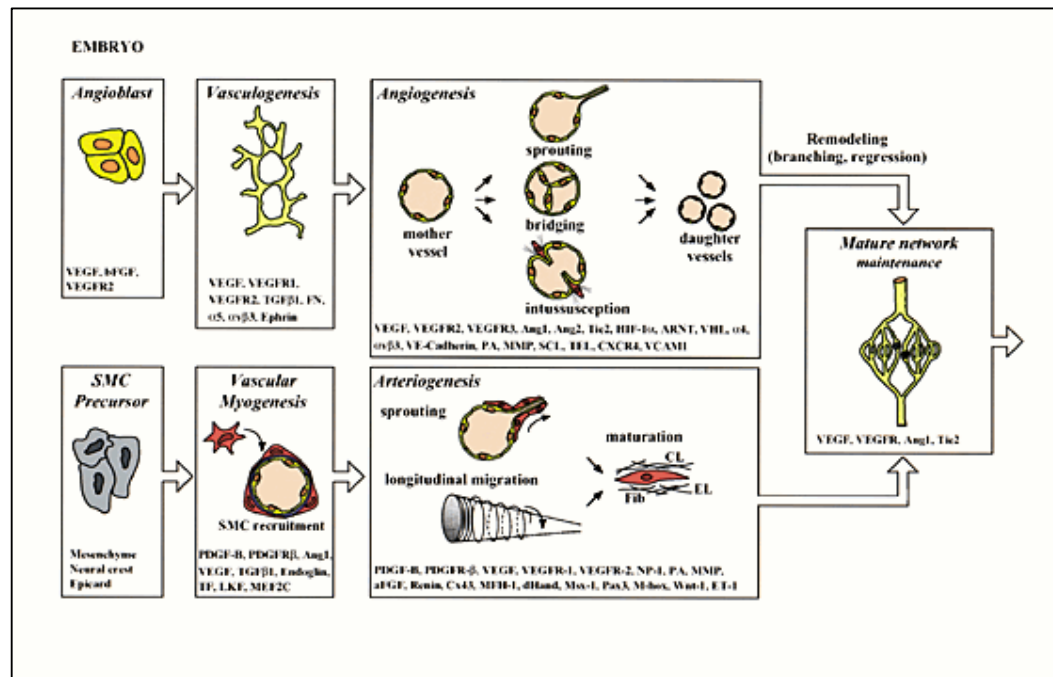


Figure 5: Les précurseurs endothéliaux (angioblastes) dans l'assemblage embryonnaire du réseau primitif (vasculogénèse), qui s'étend et se remodèle (angiogénèse).

II.1.3. La vasculogénèse post-natale (Figure 6)

On a longtemps cru que la vasculogénèse se limitait au développement embryonnaire. Cependant, les angioblastes peuvent non seulement migrer à l'intérieur de l'embryon mais peuvent également circuler dans le réseau vasculaire périphérique au stade post-natal et sont

recrutés in situ au niveau des sites de néovascularisation. Les mécanismes précis contrôlant l'action des angioblastes circulants dans la vasculogénèse post-natale restent à définir. Des facteurs de croissance tels que le VEGF, le PlGF, le GM-CSF (granulocyte monocyte colony stimulating factor) et des récepteurs comme le VEGF-R1 semblent impliqués puisqu'ils induisent la mobilisation et le recrutement des angioblastes issus de la moelle osseuse vers des sites de néovascularisation au stade adulte. Des conditions pathologiques comme l'hypoxie tissulaire ou le développement tumorale sont également à l'origine de la mobilisation, de la prolifération et de la migration des angioblastes circulants vers les foyers de vascularisation [114,115].

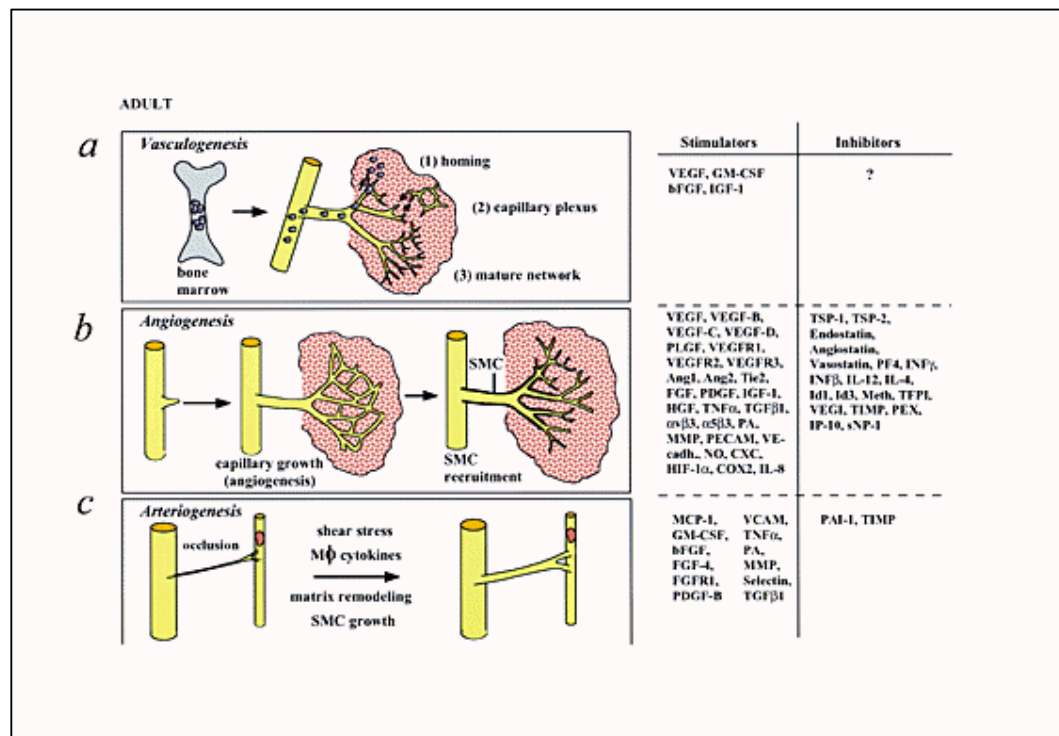


Figure 6 : Différentes étapes de l'angiogénèse à l'âge adulte

II.2. L'angiogenèse

A la suite de la formation du plexus vasculaire primitif, les cellules endothéliales peuvent participer à la croissance de nouveaux capillaires à partir des microvaisseaux originels par un processus appelé angiogenèse.

II.2.1. Définition

L'angiogenèse se définit par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. C'est un phénomène biologique très important et généralisé au cours de l'organogenèse embryonnaire alors qu'au stade adulte, l'endothélium étant majoritairement quiescent, ce processus ne sera activé que dans des conditions pathologiques [122]. On regroupe sous le terme général d'angiogenèse, deux processus différents qui permettent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de l'arbre vasculaire pré-existant: l'angiogenèse par bourgeonnement et l'angiogenèse par invagination ou intussusception.

II.2.2. L'angiogenèse par intussusception

L'angiogenèse par invagination a été moins bien décrite que celle par bourgeonnement. Ce processus a été initialement observé au niveau du réseau vasculaire pulmonaire. In vivo, il se caractérise par une prolifération des cellules endothéliales matures à l'intérieur du vaisseau existant, formant ainsi des piliers transcapillaires traversant le vaisseau, joignant la paroi opposée et créant après remodelage une boucle capillaire ayant un diamètre supérieur à 2,5 μm . Ce concept de développement vasculaire appelé "intussusceptive microvascular growth (IMG)" regroupe également les phénomènes de subdivision d'un large capillaire sinusoïdal en deux capillaires plus fins, lesquels se développent indépendamment permettant l'expansion de l'arbre vasculaire.

Il existe un autre type d'intussusception, "intussusceptive arborisation (IAR)" impliqué dans le remodelage du plexus vasculaire et dans la formation de l'arbre vasculaire et qui semble se produire en aval de l'avènement de l'IMG. Celui-ci a été décomposé en différentes étapes qui regroupent la formation de plusieurs piliers transcapillaires, la formation de septums tissulaires par fusion des piliers transcapillaires, la croissance de

nouvelles entités par fusion des fins septums et enfin l'élaboration de formes plus importantes avec maturation des constituants des vaisseaux [123].

Les mécanismes et les stimuli à l'origine de ces processus d'intussusception restent à définir. Cependant, les facteurs hémodynamiques semblent fortement impliqués dans le processus de régulation de l'IAR. La formation de nouveaux piliers capillaires apparaît, en effet, au niveau des larges capillaires ou des vaisseaux, dépendant parfois des variations du flux sanguin.

II.2.3. L'angiogenèse par bourgeonnement

L'angiogenèse par bourgeonnement est le type de formation vasculaire la plus largement décrite chez l'adulte. En effet, les travaux pionniers de Judah Folkman ont permis de décrire avec précision les étapes de ce processus [124]. L'initiation de ce processus angiogénique est caractérisée par la vasodilatation du vaisseau qui s'accompagne d'une augmentation de la perméabilité de sa couche endothéliale et de la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire environnante. Ainsi libérées, les cellules endothéliales activées sont alors capables de migrer, de proliférer et de s'organiser en une structure tubulaire. Les cellules endothéliales de ces nouveaux vaisseaux doivent alors s'accommoder au milieu tissulaire ainsi qu'à l'environnement vasculaire. De ce fait, les étapes qui caractérisent l'angiogenèse sont complexes et dépendent probablement du tissu considéré ainsi que du type d'angiogenèse (tumorale, ischémique etc....). La compréhension des phénomènes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'angiogenèse reste donc à approfondir. Néanmoins, nous pouvons définir plusieurs étapes dans ce processus.

II.2.3.1. Augmentation de perméabilité vasculaire et vasodilatation initiale.

L'initiation du processus angiogénique s'effectue par une vasodilatation, en grande partie dépendante du NO. Le NO active également la transcription du gène codant pour le VEGF [125]. Celui-ci augmente la perméabilité vasculaire en redistribuant les molécules d'adhésion intercellulaires telles que la PECAM-1 et la VE-cadhérine [126], en altérant les structures des membranes cellulaires via l'induction d'une série de protéine kinase [127] ou enfin, en favorisant la formation de fenestrations. L'extravasation des protéines plasmatiques qui en résulte, également sous le contrôle du VEGF, permet la formation d'un dépôt de fibrine qui fournit une structure de support temporaire pour la migration des cellules endothéliales. L'augmentation de la perméabilité vasculaire est nécessaire pour initier le processus

angiogénique, mais peut être néfaste, et provoquer des oedèmes ou une hypertension intracrânienne. Ainsi, l'hyperperméabilité de la paroi vasculaire induite par le VEGF est très finement régulée par l'Ang-1. Par la suite, le bourgeonnement endothélial est stimulé par l'Ang-2, un inhibiteur de Tie-2 et un antagoniste naturel de l'Ang-1, impliquée dans le détachement des cellules musculaires lisses et dans la perte des interactions avec la matrice extracellulaire permettant ainsi le relâchement des liens inter-endothéliaux, la libération des cellules endothéliales de leur support et donc la migration des cellules endothéliales [73].

II.2.3.2. La dégradation matricielle

La dégradation de la matrice extracellulaire implique une série de métalloprotéinases (MMPs) qui agissent non seulement pour créer un espace pour les cellules endothéliales migrantes mais aussi pour libérer des facteurs de croissance comme le FGF ou le VEGF qui, en l'absence de dégradation, resteraient séquestrés dans la matrice. L'espace extracellulaire n'est pas, en effet, un secteur vide et apte à recevoir les cellules endothéliales migrantes ; il est composé d'un réseau complexe et dense de matrice extracellulaire que les cellules endothéliales doivent dégrader avant de pouvoir migrer.

Caractéristiques de la protéolyse matricielle.

L'angiogenèse est contrôlée par un équilibre entre des molécules qui ont une activité inhibitrice et d'autres qui ont des propriétés activatrices. Cette notion d'équilibre s'applique également à la protéolyse extracellulaire. Bien que la migration et l'infiltration des cellules endothéliales soient associées à une augmentation de la protéolyse, les inhibiteurs des protéases jouent également un rôle important permissif pendant l'angiogenèse pour préserver l'intégrité de la matrice. Une protéolyse excessive peut aboutir à la formation de structures vasculaires aberrantes [128]. Une autre notion importante est la notion de restriction spatiale de la protéolyse. Cet objectif est atteint à travers la production locale d'inhibiteur des protéases et l'association de plusieurs systèmes de protéases sur la surface cellulaire. La protéolyse extracellulaire est également impliquée dans la régulation de l'activité de certaines cytokines comme l'activation de la forme latente du TGF β ou le relargage du bFGF et du VEGF associés à la membrane [129,130]. Enfin, de nombreux fragments protéolytiques sont produits à partir de la dégradation de la matrice extracellulaire. Ces molécules peuvent réguler de manière positive ou négative l'angiogenèse. Ainsi, l'angiostatine et l'endostatine qui résultent de la dégradation du plasminogène et du collagène XVIII ont des activités

inhibitrices. Des molécules qui ne sont pas des composants de la matrice extracellulaire comme le fragment PEX (provenant de la MMP-2) ont également des propriétés régulatrices de l'angiogenèse.

Les différents acteurs de la protéolyse matricielle.

Les MMPs sont une famille d'enzymes dont l'activité est dépendante d'un atome de zinc. Elles peuvent être classées en deux groupes : les MMPs sécrétées et les MMPs associées à la membrane (MT-MMPs) [131]. Les MMPs sécrétées comprennent les collagénases (MMP-1, MMP-8, MMP-13), les gélatinases (gélatinase A, MMP-2 ; gélatinase B, MMP-9), les stromélysines (stromélysine-1, MMP-3 ; stromélysine-2, MMP-10 ; stromélysine-3, MMP-11) et les autres MMPs (MMP-7 et MMP-12). Ces enzymes sont sécrétées sous la forme de pro-enzyme (zymogène) dont l'activation se produit dans le compartiment extracellulaire ou au contact de la membrane plasmique pour la MMP-2. Au moins 5 MT-MMPs ont été identifiées (MMP-14, 15, 16, 17, 21). Elles sont activées à l'intérieur de la cellule. De part sa localisation membranaire, la MT-MMP-1 est impliquée dans le processus de dégradation matricielle au niveau de la surface cellulaire et surtout dans l'activation des précurseurs d'autres protéases comme la MMP-2. En plus de l'activation des zymogènes, l'activité MMP est régulée par les inhibiteurs tissulaires des MMPs, les TIMPs. Quatre inhibiteurs de MMPs ont été identifiés et forment des complexes covalents avec toutes les MMPs actives (et ce avec une stœchiométrie de 1). L'interaction fonctionnelle entre les deux classes de MMPs a fait l'objet d'intense recherche depuis quelques années. Ainsi, la MT-MMP-1 est un récepteur cellulaire et un activateur de la pro-MMP-2 avec laquelle elle forme un complexe tri-moléculaire sur la surface cellulaire avec la TIMP-2 [131].

Activité gélatinase et angiogenèse.

Le premier obstacle que rencontre la cellule endothéliale est formé par la membrane basale constituée essentiellement de collagène IV, de laminine, de fibronectine. La MMP-2, aussi appelée collagénase de type IV, participe à la dégradation de la membrane basale. Une fois cette barrière vasculaire franchie, les cellules endothéliales doivent se frayer un chemin à travers des fibrilles de collagène, d'élastine, de protéines microfibrillaires et de protéoglycanes. La MMP-9 (ou gélatinase B) lyse les fibres d'élastine et les noyaux

protéiques des protéoglycanes. L'importance de l'activité gélatinase et des MMPs dans l'angiogenèse a été largement démontrée. Ainsi, l'inhibition de l'activité MMP est suffisante pour bloquer l'effet pro-angiogénique du bFGF dans la cornée de rat et la réponse angiogénique associée à l'activité musculaire [132,133]. Le BB-94, un inhibiteur des MMPs, et TIMP-2 bloquent la néovascularisation induite par des facteurs de croissance dans un gel de fibrine [134]. Le domaine C-terminal de MMP-2 (le fragment PEX) inhibe également l'angiogenèse induite par le bFGF dans le modèle de la membrane chorioallantoïde de poulet [135]. PEX prévient l'activité collagénolytique à la surface cellulaire en bloquant l'activation et l'activité de MMP-2. PEX bloque également la fixation de MMP-2 sur $\alpha\beta 3$ et ainsi la réponse angiogénique [136]. Des preuves supplémentaires de l'implication des gélatinases dans l'angiogenèse ont été apportées par des études génétiques effectuées chez la souris. Les souris déficientes en MMP-2 et MMP-9 sont viables mais présentent clairement des altérations angiogéniques. Ainsi, l'angiogenèse tumorale est réduite chez les souris dont le gène codant pour MMP-2 a été invalidé [137]. Chez les souris déficientes en MMP-9, l'angiogenèse du tissu osseux est altérée sans doute en raison d'une diminution de la libération de facteurs pro-angiogéniques par le cartilage hypertrophique [138]. Ainsi, l'activité MMP-9 est indispensable pour permettre la transition de la phase pré-vasculaire vers la phase vasculaire. Le nombre de cellules endothéliales et de vaisseaux néo-formés est réduit dans des implants constitués de collagènes résistant à la collagénase et placés dans une membrane chorioallantoïde de poulet [139]. L'activation et la présence d'une matrice extracellulaire dégradable sont donc indispensables à l'effet pro-angiogénique des facteurs de croissance.

Cependant, l'activation coordonnée de nombreuses autres MMPs est capable de cataboliser tous les éléments de la matrice extracellulaire et donc de participer à la phase initiale de l'angiogenèse. De plus, d'autres enzymes élastolytiques comme la cathepsine S sont produites par les cellules endothéliales et participent à la dégradation des tissus extravasculaires. D'autres protéinases comme l'urokinase-type plasminogen activator (u-PA) activent également le processus de dégradation de la matrice fibreuse extracellulaire : l'u-PA est ainsi une protéase essentielle pour la revascularisation myocardique après un infarctus du myocarde alors que les antagonistes de l'u-PA ont des effets anti-angiogéniques *in vivo* [140].

II.2.3.3. Prolifération et migration des cellules endothéliales.

Une fois la barrière de la paroi vasculaire franchie, les cellules endothéliales vont pouvoir migrer et proliférer sous l'influence de nombreux facteurs pro- et anti- angiogéniques.

Les facteurs de croissance. Les différentes formes de VEGF et leurs récepteurs respectifs jouent bien sûr un rôle majeur dans ce processus [141,142]. L'Ang-1, via la phosphorylation du récepteur Tie-2, a également un effet chimiotactique sur les cellules endothéliales, induit le bourgeonnement vasculaire et stimule les interactions entre les cellules constituant la paroi du vaisseau [143]. Cette étape est caractérisée par des interactions étroites entre les différents facteurs de croissance qui permettent une régulation fine de la prolifération et de la migration cellulaire. Ainsi, le PlGF stimule le développement vasculaire au cours de l'embryogenèse mais semble également sensibiliser le réseau vasculaire à l'action du VEGF dans des situations pathologiques [44]. De même, l'Ang-2, en présence de VEGF, est un facteur pro-angiogénique alors qu'en son absence, l'Ang-2 est un facteur de régression vasculaire [73,144].

D'autres facteurs de croissance participent à ce processus. Le bFGF stimule ainsi la croissance des cellules endothéliales et le recrutement des cellules inflammatoires responsables de la sécrétion de différents facteurs angiogéniques au niveau du site de revascularisation [114]. Il a été également montré que le PDGF était impliqué dans l'angiogenèse dite "bourgeonnante" en favorisant le recrutement des cellules musculaires lisses et des péricytes autour des vaisseaux bourgeonnants [145].

Les molécules d'adhésion. L'interaction cellule-cellule constitue un élément fondamental dans le processus de prolifération et de migration des cellules endothéliales. Ces événements sont principalement médiés par la voie de signalisation intracellulaire activée par les intégrines telles que $\alpha v \beta 3$ et $\alpha 5 \beta 1$ qui participent à ce processus angiogénique, via l'activation des MMPs à la surface des cellules [146].

Les autres acteurs. Plus récemment, différentes chémokines telles que MCP-1 ("Monocyte chemotactic protein"), et de nombreuses interleukines ont été mise en évidence pour leur implication dans la croissance des cellules endothéliales [114,147]. De même, le TNF- α a été récemment décrit comme modulant la prolifération endothéliale induite par le VEGF en interférant sur la phosphorylation du récepteur VEGFR-2 [148]. Enfin, plusieurs molécules

vaso-actives telles que l'endothéline, l'angiotensine II, la bradykinine ont également des effets sur la prolifération cellulaire.

II.2.3.4. Organisation des tubules endothéliaux et survie des cellules endothéliales.

Contrôle du diamètre vasculaire. Après avoir proliféré et migré à l'extérieur de leurs vaisseaux d'origine, les cellules endothéliales s'organisent en cordages au sein desquels se forme la lumière du néovaisseau. Ceci s'accompagne de la fusion de ces cordages avec les vaisseaux préexistants afin de créer un vaisseau plus long et de diamètre plus grand. Le diamètre du vaisseau est régulé par différents facteurs. Plusieurs isoformes du VEGF et leurs récepteurs spécifiques sont directement impliqués dans la détermination du diamètre du néovaisseau. Ainsi les isoformes VEGF-A 121 et 165 augmentent le diamètre de la lumière alors que le VEGF-A 189 favorise sa diminution [115]. D'autre part, les molécules d'adhésion telles que les intégrines $\alpha v \beta 3$ et $\alpha 5 \beta 1$ jouent un rôle très important dans la formation de la lumière vasculaire. Ce processus est contrôlé par des inhibiteurs endogènes impliquant la TSP-1 ainsi qu'un gène récemment découvert appelé "tubedown"-1 (tbdn-1)[149]. Ce mécanisme de contrôle est primordial. Par exemple, les vaisseaux tumoraux sont tortueux, vasodilatés et présentent une augmentation du nombre d'embranchements. Il en résulte un débit sanguin modifié, différent d'un site à un autre. Ceci semble être lié à un dérèglement au niveau de l'équilibre entre les régulateurs pro- et anti- angiogéniques comme le VEGF et les angiopoïétines.

Contrôle de la survie des cellules endothéliales. Une fois assemblées, les cellules endothéliales deviennent quiescentes et peuvent survivre plusieurs années. Le taux de renouvellement endothélial est faible mais très différent selon le tissu. En effet, il est de 1 à 2 cellules pour 1000 par jour dans l'aorte thoracique de rat alors que certaines régions soumises à des forces de cisaillement très importantes en particulier au niveau des bifurcations artérielles ont un taux plus important allant jusqu'à 10 cellules pour 100. Ce renouvellement endothélial se fait sans dénudation du sous-endothélium. Les cellules entourant la cellule senescente se glissent sous elle afin de maintenir l'intégrité et la continuité de la couche endothéliale.

Toute diminution de la survie cellulaire s'accompagne d'une régression vasculaire. Ainsi, par exemple, chez l'embryon, la disparition de certains vaisseaux non fonctionnels se fait de

manière physiologique. Il s'agit d'un phénomène appelé apoptose endothéliale. Un certain nombre de facteurs sont impliqués dans le contrôle du processus apoptotique. Ils diffèrent en fonction du site concerné, de la fonction et du type de vaisseau, ainsi que de la nature et de l'intensité du stimulus physiologique et/ou pathologique. On peut retenir en particulier que toute diminution de flux sanguin consécutive à une obstruction vasculaire est suivie d'une augmentation du nombre de cellules apoptotiques dans le vaisseau concerné et à long terme d'une régression vasculaire [150]. A l'inverse, l'augmentation des contraintes de cisaillements favorise la survie cellulaire par l'intermédiaire d'une stimulation du TNF- α [151]. Le VEGF est considéré comme un facteur essentiel à la survie cellulaire. Ce rôle est lié à l'interaction du VEGF à son récepteur VEGFR-2 stimulant la voie de signalisation des PI3-Kinases et des VE-cadherines [152]. L'activation de la PI3K aboutit à celle de la protéine kinase Akt considérée, comme une kinase de survie. Enfin, d'autres facteurs comme l'Ang1 sont capables d'activer Akt. Cette dernière agit sur la diminution du processus apoptotique en activant notamment la phosphorylation du gène anti-apoptotique bcl-2 ou en inhibant les protéines pro-apoptotiques Bad et caspases-9. De nouveau, ce processus est contrôlé par des facteurs pro-apoptotiques comme les radicaux libres de l'oxygène, l'angiostatine, l'Ang-2, la TSP-1, et l'inhibiteur du facteur tissulaire [152].

II.2.3.5. Remodelage vasculaire définitif

Spécialisation des cellules endothéliales. Une fois que les cellules endothéliales sont assemblées, elles se différencient et se spécialisent en fonction de leur tissu hôte. L'environnement tissulaire est un élément essentiel dans la spécialisation cellulaire. Par exemple, le développement du système sanguin cérébral nécessite l'interaction des cellules astrogliales exprimant des protéines fibrillaires acides avec les péricytes et des niveaux adéquats d'angiotensinogène. De même, les membranes plasmiques des cellules endothéliales qui acquièrent une confluence subissent une modification structurale et fonctionnelle, au niveau de leur jonction serrée, cruciale pour le contrôle de la perméabilité vasculaire. En revanche, les cellules endothéliales des glandes endocrines ne possèdent pas de jonctions serrées, leur endothélium est discontinu et fenêtré permettant ainsi le transport d'importantes quantités d'ions et de molécules peptidiques à travers ces discontinuités. Cette spécialisation de l'endothélium en fonction du tissu hôte pourrait être déterminée au niveau des gènes. L'équipe de Ferrara a ainsi identifié un gène le EG-VEGF (endocrine Gland Derived-VEGF)

spécifique des tissus stéroïdogéniques et dont l'expression induit la fenestration de l'endothélium des glandes endocrines [153].

Ramification vasculaire. Plus d'informations sont disponibles en ce qui concerne les mécanismes de ramification de l'arbre vasculaire. Comme il a été décrit précédemment, plusieurs mécanismes peuvent participer à la ramification du réseau vasculaire. Les nouvelles branches vasculaires peuvent apparaître de différentes manières, soit par bourgeonnement, soit par intussusception [123]. Plusieurs types de facteurs contrôlent ces processus de ramification. Le VEGF contribue à la complexité du réseau vasculaire en stimulant le processus de bourgeonnement et d'invagination [115]. Les embryons invalidés pour l'un des allèles du gène codant pour le VEGF-A présentent une insuffisance de ramifications vasculaires ([154]. D'autres facteurs comme l'Ang-1 et son récepteur Tie-2 favorisent l'angiogenèse dite bourgeonnante mais également l'intussusception. Ainsi, l'invalidation des gènes codant pour l'Ang-1 et Tie-2 entraîne l'apparition de gros capillaires linéaires, de taille homogène et, incapables de s'organiser en réseaux fonctionnels et ramifiés.

D'autres gènes ont été impliqués dans la ramification des réseaux vasculaires de manière très localisée: la rénine favorise le processus de ramification au niveau de la vascularisation rénale [155], alors que d'autres études montrent que le FGF-1 joue le même rôle dans la circulation myocardique [156].

II.2.3.6. Différenciation en Artères ou Veines

La régulation de l'angiogenèse nécessite une spécialisation de l'endothélium en fonction de l'environnement tissulaire mais également en fonction des vaisseaux formés. On a longtemps pensé que la différenciation des vaisseaux en artères ou en veines était déterminée uniquement par des facteurs hémodynamiques (la direction et la valeur du flux sanguin), cependant, on a récemment démontré l'implication de molécules spécifiques exprimées à la surface des cellules dans ce processus.

Les Ephrines et leur récepteur. Les protéines de la famille des éphrines et de leurs récepteurs Eph, d'abord connues pour leur rôle dans le développement du système nerveux et spécialement dans le guidage des axones, interviennent de manière importante dans le processus de différenciation artério-veineuse. Les éphrines sont des molécules transmembranaires exprimées par les cellules adjacentes à celles exprimant les récepteurs

Eph. Les récepteurs Eph forment une famille d'au moins 14 récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase qui nécessitent la liaison de leur ligand afin d'être activés. Les éphrines B1 et B2 sont pro-angiogéniques et favorisent le bourgeonnement des cellules endothéliales [157]. La présence d'éphrine B2, est limitée aux territoires artériels, alors que l'un de ses récepteurs (Eph B4) n'est présent que dans les veines [158]. L'invalidation du gène codant pour l'éphrine B2 ne modifie pas, chez la souris, la vasculogénèse; en revanche, elle induit une angiogénèse très perturbée: les réseaux artério-veineux sont mal organisés avec des calibres incohérents et une structure péri-endothéliale mal définie [159]. On a longtemps cru que l'expression de l'éphrine B2 était limitée à l'embryon et permettait la différenciation artério-veineuse des capillaires *in utero*. Très récemment, l'expression stable de l'éphrine B2 a été mise en évidence au stade adulte dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses artérielles [160]. Ce ligand transmembranaire est également retrouvé au niveau de certaines artérioles résistives, ce qui laisse à penser que les micro-vaisseaux et les capillaires ne sont pas indifférenciés, mais possèdent une identité artérielle ou veineuse. D'autres part, les interactions ligands-récepteurs des éphrines et de leurs récepteurs induisent des phosphorylations, une multimérisation et le recrutement de protéines adaptatrices telles que les Grb2, Grb10, et Nck, ou encore l'activation de molécules d'adhésion [161].

Les autres facteurs. D'autres facteurs ont également une expression caractéristique du type de vaisseaux. Ainsi, la neuropiline-1, est exprimée spécifiquement dans l'endothélium artériel alors que le récepteur Tie-2 est majoritairement localisé dans les veines [115]. Certains autres facteurs ne sont pas que de simples marqueurs mais semblent impliqués fonctionnellement dans la différenciation artère-veine. L'équipe de Yancopoulos a montré qu'un même angioblaste pouvait donner lieu à la formation d'angioblastes pré-veineux ou pré-artériels, et que le facteur gridlock semble favoriser une différenciation en angioblastes pré-artériels [162]. D'autres molécules sont impliquées dans ce processus tels que les signaux induits par la famille des Notch qui sont associés à la différenciation de manière indirecte en activant plusieurs types de cellules. Des études récentes ont montré que le ligand de Notch, Delta 4 est exprimé dans l'endothélium artériel, et une mauvaise signalisation de Notch serait responsable d'un remodelage vasculaire défectueux [163]. D'autre part, un effecteur de Notch, Hey-L, est exprimé dans les cellules musculaires lisses de toutes les artères et est associé à l'expression de Notch 3 [164].

II.3. L'artériogénèse

II.3.1. Définition

L'artériogénèse caractérise le remodelage *in situ* d'artères collatérales, en réponse à des stimuli physiologiques provoqués par une occlusion ou une sténose artérielle [165]. Il en résulte une augmentation locale de la vélocité du flux sanguin, qui induit une augmentation des forces de cisaillements responsable de l'activation de l'endothélium.

II.3.2. Les principaux mécanismes de l'artériogénèse

L'activation des cellules endothéliales se caractérise par l'apparition d'un phénotype prolifératif (augmentation du volume du noyau, du réticulum endoplasmique ainsi que du nombre des ribosomes) accompagnée d'une surexpression des molécules d'adhésion et des chémokines comme MCP-1 [166]. L'expression de MCP-1 facilite l'adhésion des monocytes à l'endothélium et la production de facteurs de croissance et de cytokines (TNF-alpha, IL-8) [167]. Par la suite, les facteurs de croissance nécessaires à l'activité mitotique localisés dans le tissu (comme le VEGF et le bFGF séquestrés dans la matrice extracellulaire) ou produits par des cellules invasives comme les monocytes, les lymphocyte-T ou les basophiles [165] favorisent la prolifération endothéliale et celle des cellules musculaires lisses. Parallèlement à la phase de prolifération, ou précédant celle-ci, l'activité protéolytique permet de créer un espace dans la matrice extracellulaire afin que les cellules puissent migrer et proliférer. Durant cette phase, la digestion de la lame élastique interne permet la libération et la migration des cellules musculaires lisses, depuis la média vers l'espace subendothélial formant une couche circulaire et longitudinale autour du vaisseau, créant ainsi une couche néointimale épaisse typique d'une structure artérielle. Enfin, la croissance des collatérales s'achève lors de la phase de maturation caractérisée par un ralentissement de la prolifération, de la migration et de la digestion matricielle, et la restauration d'un phénotype contractile du vaisseau. Une caractéristique majeure des vaisseaux collatéraux est leur forme tortueuse, liée à une croissance non harmonieuse en longueur et en largeur. Le processus d'artériogénèse s'achève probablement au moment où les forces de cisaillements diminuent sous une valeur minimale due à l'élargissement des vaisseaux collatéraux.

Après occlusion d'une ou deux artères épicaudiques chez le chien, les vaisseaux collatéraux augmentent de 20 fois leur diamètre interne et de 10 fois leur débit de perfusion permettant de rétablir de 30 % le flux pré-ischémique. Ceci est la conséquence d'une importante activité mitotique des cellules vasculaires (jusqu'à un facteur 100 pour les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses) [165]. D'autre part, il est important de signaler l'abondance quantitative des facteurs de croissance qui contraste avec leur absence d'activité et leur inefficacité dans des conditions non pathologiques. Ceci permet de suggérer que la régulation se fait au niveau des récepteurs des facteurs de croissance et non pas au niveau de l'expression de leurs ligands. Ainsi, une ischémie tissulaire induite par une ligature de l'artère fémorale chez le lapin augmente l'expression de l'ARNm du récepteur du FGF pendant une période limitée de 12 heures après l'occlusion, rendant ainsi le tissu réceptif aux facteurs de croissance. La régulation de l'artériogénèse est donc probablement dépendante de la disponibilité des récepteurs et non pas de leurs ligands [165,168].

L'activation du processus artériogénique pourrait cependant avoir des effets délétères. En effet, MCP-1, le facteur potentiellement le plus important dans la réaction artériogénique, est également impliqué dans le processus athérogénique de par son effet chémoattractant sur les monocytes qui jouent un rôle clé dans le développement des plaques d'athéromes. De plus, ces cellules inflammatoires sécrètent le facteur tissulaire, expriment également MIP-1 α et MIP-1 β , des cyto-chémiokines exerçant un effet pro-coagulant.

II.4. La lymphangiogénèse

Les vaisseaux lymphatiques ont été décrits pour la première fois au début du 17^e siècle. Cependant, les premiers facteurs de croissance et les marqueurs moléculaires spécifiques pour ces vaisseaux ont été découverts seulement il y a environ une dizaine d'années, ce qui semble assez étonnant quand on pense que le système lymphatique joue un rôle primordial dans le maintien de la balance des fluides dans le corps. De plus, le système lymphatique est fortement impliqué dans la pathogénèse de différentes maladies comme le cancer ou le lymphoedème, ce dernier étant la principale complication chirurgicale du cancer du sein. Il se caractérise par un dysfonctionnement du système lymphatique qui induit une accumulation de liquide dans les tissus interstitiels et provoque ainsi des gonflements, le plus souvent dans les bras ou les jambes.

La lymphangiogenèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux vaisseaux lymphatiques, est moins étudiée manquant de marqueurs histologiques, immunohistologiques et structuraux pour différencier les cellules lymphatiques des cellules endothéliales du sang. Toutefois, il a été démontré que la lymphangiogenèse permettait la prolifération et la dissémination des cellules malignes et donc la propagation des tumeurs cancéreuses [169]. Il semble donc important de s'intéresser de plus près à ce mécanisme qui permettrait peut-être le développement de nouvelles approches thérapeutiques dans la lutte contre le cancer.

II.4.1. Structure et fonction du système lymphatique

Le système lymphatique est composé de ganglions et de capillaires lymphatiques. Ces derniers sont de gros vaisseaux à faible paroi composée d'une simple couche de cellules endothéliales et qui possèdent une membrane basale discontinue. Ce manque de connexions serrées entre les cellules endothéliales semble permettre plus facilement l'entrée et la sortie des cellules immunes ou malignes dans la lumière des vaisseaux lymphatiques. Le système lymphatique est un système de vaisseaux à faible pression qui, dans les conditions physiologiques normales, agissent pour transporter les cellules et les fluides du tissu interstitiel vers la circulation systémique [170]. C'est une voie de dissémination des cellules malignes.

II.4.2. Lymphangiogenèse embryonnaire et post-natale

Chez l'homme, les sacs lymphatiques apparaissent chez les embryons âgés de 6 à 7 semaines et chez la souris, le développement des vaisseaux lymphatiques commence environ à E10. De plus, des données expérimentales sur la souris supportent l'hypothèse émise par Florence Sabin il y a environ 100 ans que les cellules endothéliales augmentent par bourgeonnement des veines embryonnaires dans les aires jugulaire et périmésonephrique. De là, elles migrent pour former sacs et plexus lymphatiques primaires, éléments composés de vaisseaux comme des capillaires. Le système lymphatique est étroitement lié au système vasculaire sanguin, les vaisseaux lymphatiques étant souvent adjacents aux veines.

La croissance, la migration et la survie des cellules lymphatiques est possible par un système de transduction du signal qui est formé par VEGF C et D et leur récepteur VEGFR-3

[57,171-173]. VEGF-C et D se lient à la Neuropilin-2(Nrp2), un récepteur sémaphorine du système nerveux central qui est aussi exprimé dans les capillaires lymphatiques [174].

En fait, de nouvelles études ont tendance à montrer que la lymphangiogenèse est un mécanisme très complexe qui demande encore de nombreuses études pour permettre une meilleure compréhension de ce mécanisme. Des études *in vitro* ont mis en évidence que l'intégrine $\beta 1$ interagit avec VEGFR-3 et induit une activation fragile des tyrosine kinase [175]. Intégrine, FGF2, PDGF B et hepatocyte growth factor (HFG) peuvent stimuler la croissance des vaisseaux lymphatiques.

II.4.3. Les marqueurs de la lymphangiogenèse

Podoplanin : cette glycoprotéine de surface de 43 kDa est un très bon marqueur de différenciation entre les endothéliums vasculaires sanguin et lymphatique. Elle permet la régulation de la perméabilité des vaisseaux lymphatiques et jouerait un rôle dans le maintien de leur intégrité.

Prox-1 : ce marqueur des sous populations de cellules endothéliales joue un rôle clé dans le développement et la différenciation des vaisseaux lymphatiques.

LYVE-1 : ce récepteur de 60kDa, exprimé à la surface des cellules, est très abondant dans les ganglions lymphatiques, la rate, les poumons, le foie fœtale ; il est un peu moins abondant dans les appendices, les muscles, le placenta, la moëlle osseuse et est absent des lymphocytes B, du thymus, du cerveau, du pancréas et des reins.

VEGF : s'il est bien établi que la famille des VEGF joue un rôle clé dans la vasculogenèse et dans l'angiogenèse physiologique et pathologique, notamment tumorale, on sait depuis peu de temps que cette voie de signalisation est également impliquée dans le développement normal et pathologique des vaisseaux lymphatiques [176]. Deux facteurs récemment identifiés, le VEGF-C et le VEGF-D, interviennent spécifiquement dans la lymphangiogenèse. Ces facteurs sont des ligands du récepteur VEGFR-3, essentiellement exprimé par l'endothélium lymphatique. Le VEGF, facteur majeur de régulation de l'angiogenèse, ne se lie pas au VEGFR-3, mais aux récepteurs VEGFR-1 et -2, exprimés par les cellules endothéliales vasculaires. Les travaux récents de quatre équipes de chercheurs mettent aujourd'hui en

lumière le rôle important du VEGFR-3 et des VEGF-C et VEGF-D, non seulement dans la régulation de la croissance des vaisseaux lymphatiques *in vivo*, mais aussi dans la dissémination tumorale par voie lymphatique. Mäkinen *et al.* ont montré le rôle primordial du VEGFR-3 et de ses ligands dans la lymphangiogenèse en utilisant un inhibiteur puissant et spécifique du VEGFR-3, le VEGFR-3 soluble. Ils apportent aussi des preuves supplémentaires en faveur de l'existence de voies distinctes d'activation *in vivo* de l'angiogenèse (par le VEGF) et de la lymphangiogenèse (par le VEGF-D et le VEGF-C). Par ailleurs, leur modèle de souris transgénique présente un phénotype proche de celui du lymphœdème humain (avec un lymphœdème des pattes et une fibrose sous-cutanée). Il pourrait donc être utile pour mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie et évaluer de nouveaux traitements. Les équipes de Skobe, Stacker et Mandriota ont, quant à elles, étudié plus particulièrement les effets du VEGF-C et du VEGF-D [33,177,178]. Leurs travaux apportent les premières preuves expérimentales directes montrant que, contrairement à une opinion longtemps répandue, des vaisseaux lymphatiques peuvent se développer au sein des tumeurs solides. En utilisant un nouveau marqueur spécifique de l'endothélium lymphatique, l'anticorps anti-LYVE-1, les trois groupes de chercheurs ont en effet mis en évidence une augmentation intra- et/ou péri tumorale des vaisseaux lymphatiques dans les tumeurs exprimant le VEGF-C ou le VEGF-D, alors qu'elle n'était pas notée dans les tumeurs témoins. Ils ont aussi montré l'existence d'une corrélation entre l'expression du VEGF-C et du VEGF-D et la survenue de métastases lymphatiques dans des modèles tumoraux murins. Ces résultats ont été étayés par le fait que des anticorps neutralisants anti-VEGF-D diminuent le nombre de métastases lymphatiques dans les tumeurs exprimant le VEGF-D.

Ces observations laissent entrevoir la possibilité de nouvelles approches thérapeutiques, notamment dans la lutte contre les métastases lymphatiques, par l'inhibition de la voie de signalisation de la lymphangiogenèse par le VEGFR-3 soluble, ou des anticorps neutralisants anti VEGF-C ou anti-VEGF-D, par exemple.

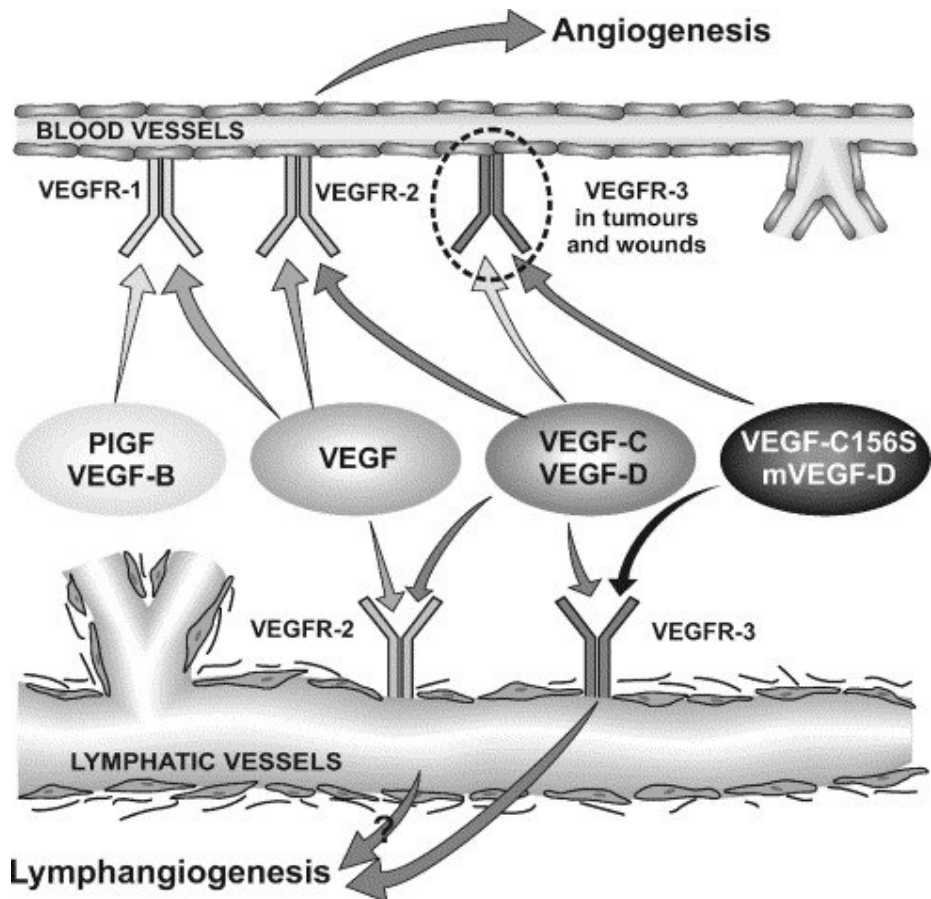


Diagramme de l'action des membres de la famille VEGF et leurs récepteurs sur les cellules endothéliales vasculaires sanguines et lymphatiques [179].

Chapitre 3

I. Le Sildenafil

I.1. Généralités

Un effet NO-mimétique peut être obtenu par stimulation directe de la guanylate cyclase soluble (sGC) comme le fait le NO lui-même, mais aussi par inhibition des phosphodiesterases (PDE) qui inactivent le GMPc (guanosine monophosphate cyclique) formé. L'inhibition de cette inactivation entraîne une élévation de la concentration de GMPc et de ses effets. Les inhibiteurs spécifiques des phosphodiesterases de type 5, iPDE5, enzymes présentes essentiellement au niveau des corps caverneux, sont le sildenafil, le vardenafil et le tadalafil (figure 6). L'inhibition des PDE5 est réversible et disparaît lorsque la concentration du médicament ou de son métabolite actif s'abaisse au dessous du seuil d'activité. Les iPDE5 sont essentiellement utilisés dans le traitement de l'impuissance, appelée maintenant dysfonction érectile.

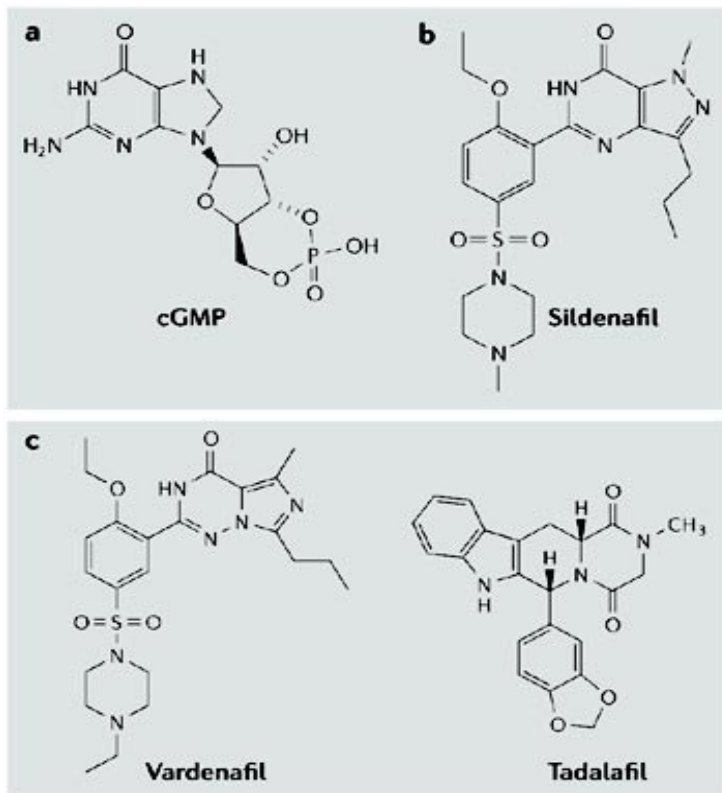


Figure 7 : Structure du cGMP, le substrat, et des inhibiteurs de PDE5 : sildenafil, vardenafil et tadalafil. D'après Ghofrani et al., 2006.

Les 3 iPDE5 possèdent un système en double anneau contenant un nitrogène hétérocycle. Cette structure mime la base purine du GMPc et interagit avec le même cycle catalytique de PDE5. Comme tout médicament actif, l'utilisation d'inhibiteurs de PDE5 peut provoquer maux de tête, congestion nasale, rougeurs faciales ; une hypotension peut même se produire. Le sildenafil, et à un moindre degré le vardenafil, peuvent également donner des troubles visuels transitoires avec altération de la perception des couleurs (problème de perception du vert et du bleu par exemple), photophobie, vision trouble en raison sans doute de leur effet inhibiteur des PDE 6, enzymes présentes au niveau de la rétine.

I.2. Les phosphodiéstrases (PDE)

I.2.1. Généralités

La persévérance de certains chercheurs a conduit ces dernières années à une véritable explosion des données fondamentales sur ces enzymes. Elles ont permis de révéler l'importance des PDEs dans la transduction du signal intracellulaire, impliquée dans de nombreux processus physiologiques tels que : l'inflammation, la vasodilatation, l'agrégation et l'adhésion plaquettaire, la vision, l'angiogenèse, l'érection et bien d'autres. Chaque molécule de PDE contient un domaine catalytique d'environ 270 acides aminés, situé du côté C-terminal et conservé dans les onze familles. La région N-terminale des PDEs est impliquée dans la fonction de régulation de ces enzymes. Cette région, propre à chaque famille, contient les sites de liaison du complexe calcium/calmoduline et de liaison du GMPc, de phosphorylation et enfin, elle est impliquée dans la localisation membranaire. Les phosphodiéstrases, mises en évidence par Sutherland et al [180,181] sont des enzymes qui hydrolysent et inactivent l'AMPc (adenosine monophosphate cyclique) et le GMPc. Les PDE sont classées en 11 familles appelées PDE1, PDE2, PDE11 (Tableau 2). Les PDE1, PDE2, PDE3, PDE4, PDE7 et PDE8 ont comme principal substrat l'AMPc alors que la PDE5 agit préférentiellement sur le GMPc. La PDE6, présente dans la rétine, agit préférentiellement sur le GMPc. Les PDE10 et les PDE11 agissent sur les deux : l'AMPc et le GMPc.

PDE family	Subfamily (number of splice variants)	Substrate
1	A (4), B (1), C (5)	cAMP/cGMP
2	A (3)	cAMP/cGMP
3	A (1), B (1)	cAMP/cGMP
4	A (8), B (3), C (4), D (5)	cAMP
5	A (3)	cGMP
6	A (1), B (1), C (1)	cGMP
7	A (3), B (1)	cAMP
8	A (5), B (1)	cAMP
9	A (6)	cGMP
10	A (2)	cAMP/cGMP
11	A (4)	cAMP/cGMP

cAMP, cyclic adenosine monophosphate; cGMP, cyclic guanosine monophosphate;
PDE, phosphodiesterase.

Tableau 2 : Différentes familles des PDE

I.2.2. Structure des PDE5 et site d'interaction avec les inhibiteurs

Les 3 isoformes de la PDE5 (PDE5A1 à A3) ont été identifiées dans les tissus humains et animaux. L'isoforme prédominante est le PDE5 A2. Les isoformes diffèrent dans leur partie N-terminale, ce qui correspond à des régions 5' de l'ARNm différentes. PDE5A1 et A2 sont largement distribuées alors que PDE5A3 est limitée au muscle lisse du pénis, l'urètre, la prostate, la vessie et l'aorte. La PDE5 (figure 7) est un homodimère, avec une enzyme cytosolique possédant deux sous-unités identiques de 99kDa. Chaque sous-unité est une protéine chimère comprenant un domaine catalytique liant un metal carboxy terminal et un domaine régulateur amino terminal. La PDE5 est une enzyme zinc-dépendante ayant une haute affinité de substrat pour le GMPc. Les iPDE5 se lient exclusivement au domaine catalytique et non au domaine régulateur.

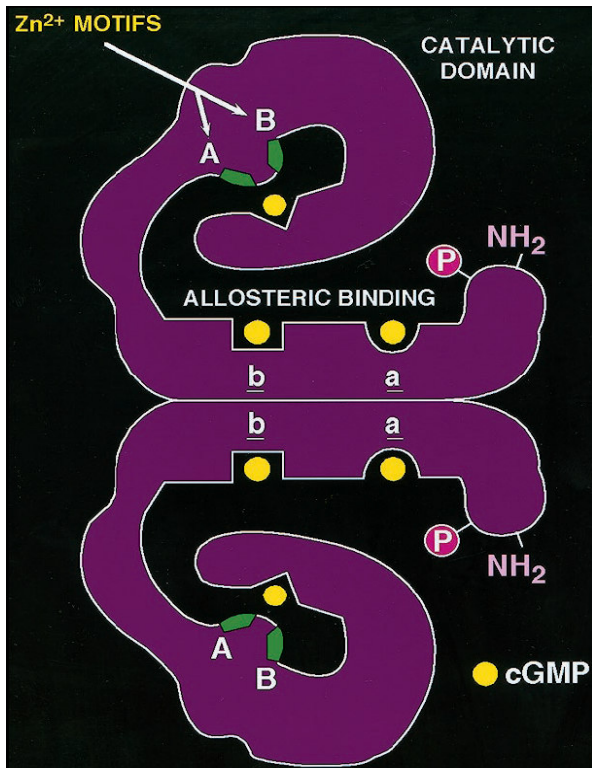


Figure 8: Modèle de la PDE5 [182].

I.2.3. Distribution tissulaire des PDE5

Les PDE5 sont trouvées dans le muscle squelettique, muscle lisse viscéral, muscle lisse vasculaire, dans les plaquettes, les reins, le poumon et le corps caverneux [183]. Elles ne sont pas présentes au niveau myocardique mais sont présentes dans le tissu du muscle lisse vasculaire coronarien. [184]. Sampson et al a également mis en évidence par immunomarquage que la PDE5 était exprimée dans le muscle lisse vasculaire des artères de résistance et au niveau des cellules endothéliales [185].

I.3. Le GMPc

Ce nucléotide cyclique est un second messenger du NO (nitric oxide), qui est impliqué dans la régulation de nombreuses fonctions, incluant le tonus du muscle lisse vasculaire [182]. Le guanosine 3', 5'-monophosphate cyclique (GMPc), découvert par Hardmann [186,187] joue un rôle similaire mais pas identique à celui de l'AMPc [188]. La concentration intracellulaire, et par extension les effets biologiques du GMPc, sont définis par l'équilibre entre sa synthèse par la guanylyl cyclase et sa dégradation par l'hydrolyse de la liaison 3',5'-phosphoester par une enzyme, la PDE.

Métabolisme du GMPc

Le GMPc est produit à partir du GTP par la guanylyl cyclase soluble [189]: l'une particulière, stimulée par les peptides natriurétiques [190], l'autre cytoplasmique, contenant un groupement prosthétique hème. Cette forme soluble est stimulée par le monoxyde d'azote (NO) [191] et le monoxyde de carbone (CO) [192]. Le GMPc agit sur plusieurs cibles intracellulaires. Alors que la principale cible de l'AMPc est la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA), le GMPc possède différentes cibles intracellulaires, notamment la protéine kinase dépendante du GMPc (PKG), mais aussi la PKA, certaines phosphodiésterases et quelques canaux ioniques appelés nucléotides cycliques dépendants [193,194].

I.4. La protéine kinase dépendante du GMPc (PKG)

La PKG fait partie de la grande famille des sérine/thréonine kinases. Il existe deux isoformes de PKG chez les mammifères : la PKG de type I, formée de deux sous-unités identiques de 78 kDa chacune [195], et la PKG de type II, constituée d'un monomère de 86 kDa, localisée jusqu'à présent uniquement au niveau des cellules épithéliales intestinales [196]. La PKG de type I existe sous forme soluble dans de nombreux types cellulaires, notamment dans la CML. L'augmentation du taux de GMPc dans la CML est associée à une activation de la PKG et à la phosphorylation de protéines [197,198]. Dans ces cellules, la phosphorylation des protéines cibles de la PKG a pour conséquence une diminution du calcium libre intracellulaire, qui s'oppose aux mécanismes constricteurs [195]. Ainsi, il semble que la relaxation des CML sous l'effet d'agents induisant l'augmentation intracellulaire du GMPc soit, au moins en partie, régulée par la PKG.

I.5. Sildenafil et pathologies

I.5.1. Sildenafil & dysfonction érectile

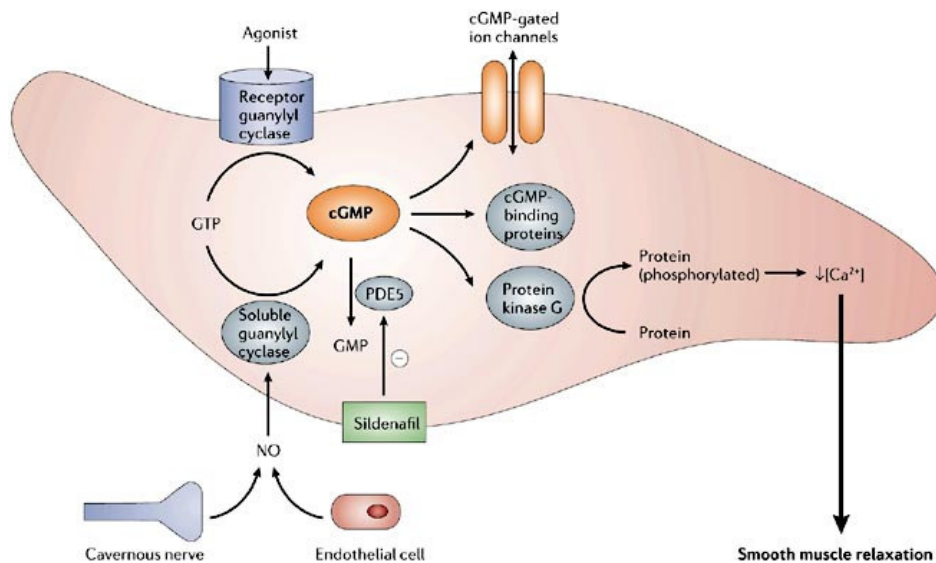
Dans les années 1980, les urologistes ont commencé à considérer la dysfonction érectile comme une pathologie. Dès lors, les médecins traitent les patients par des injections de vasodilatateurs comme la papavérine et la prostaglandine E1, permettant ainsi de moduler

les niveaux d'AMPc. Ce traitement reste cependant une technique invasive, avec tous les risques que cela comporte. Un traitement par voie orale serait plus approprié. Le NO est reconnu comme étant un médiateur clé des effets hémodynamiques et neuronaux qui conduit à l'érection. Dans les années 1990, Ignarro et al montre que les nerfs caverneux libèrent du NO pendant la stimulation sexuelle [199]. Le NO diffuse dans les CMLV du pénis, stimulant la production de GMPc, conduisant à la relaxation du muscle lisse du corps caverneux et donc à l'érection [199,200]. Pfizer suggère alors qu'un inhibiteur de la dégradation du GMPc améliorerait et prolongerait la réponse vasodilatatrice pendant la stimulation sexuelle. Boolell et al démontre que le sildenafil améliore, de façon dose-dépendante, la réponse érectile suite à une stimulation sexuelle [201]. Plusieurs études ont ensuite confirmées l'efficacité du sildenafil dans la dysfonction érectile [202-205] mais aussi chez des patients atteints de diabète [206,207] ou de maladies cardiovasculaires [208]. Le sildenafil est donc devenu et reste à l'heure actuelle le traitement le plus utilisé dans le traitement de la dysfonction érectile [209]. Depuis sa mise sur le marché en 1998, le sildenafil a été utilisé par plus de 20 millions d'homme. Les consultations pour impuissance auraient alors augmentée de 40%, permettant aux médecins de diagnostiquer et de traiter des troubles associés comme le diabète ou l'hypertension. Les hommes traités ont en général plus de 50 ans, 42% étant âgés de 61 ans et plus. Pour 82% des patients, le traitement est efficace avec une dose de 100 mg (contre 74% pour 50mg).

Deux substances, l'AMPc et le GMPc, sont les médiateurs fondamentaux de la relaxation du muscle lisse intra caverneux responsable de l'érection et ils sont inactivés par des phosphodiesterases. Le développement du Viagra® (ou sildenafil) vient de la découverte du rôle d'une enzyme, la PDE de type 5, dans le tissu caverneux et de l'importante relaxation obtenue par son inhibition. Son action vient de l'augmentation des niveaux de GMPc, qui est normalement dégradé par la PDE5.

Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action des inhibiteurs de la PDE5 est résumé dans le schéma qui suit. Le monoxyde d'azote libéré par stimulation sexuelle entraîne la formation de GMPc qui favorise l'érection. Mais les effets du GMPc sont limités par son hydrolyse sous l'influence des PDE de type 5 des corps caverneux. L'inhibition de ces PDE inhibe l'inactivation du GMPc dont la concentration augmente ainsi que son effet vasodilatateur. La durée de l'effet du médicament dépend de la durée de cette inhibition.



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Drug Discovery

Ghofrani *et al.* *Nature Reviews Drug Discovery*, 2006

Figure 9 : Mécanisme d'action des inhibiteurs de la phosphodiesterase 5 [210].

I.5.2. Sildenafil et hypertension artérielle pulmonaire

L'hypertension artérielle pulmonaire est une maladie progressive des artères pulmonaires caractérisée par une augmentation soutenue des pressions pulmonaires qui s'accompagne d'un remodelage vasculaire [211]. Les caractéristiques sont les suivantes :

- augmentation de l'épaisseur de la paroi
- prolifération intimale
- lésions oblitératives
- thrombose in situ

Plusieurs études ont démontré que l'activité de la PDE5 contribue à la physiopathologie de l'hypertension pulmonaire en limitant les effets vasodilatateurs médiés par le GMPc dans la vasculature pulmonaire [212]. Le NO réduit les résistances vasculaires périphériques en stimulant la sGC, ce qui augmente alors les niveaux de GMPc, eux-mêmes activant la PKG du muscle lisse vasculaire pulmonaire [211,213]. Le sildenafil pourrait donc être intéressant dans le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire. Pfizer a décidé de tester l'effet du sildenafil à différentes doses dans l'hypertension pulmonaire. Cette étude

montre que le sildenafil réduit sélectivement la pression pulmonaire et les résistances vasculaires pulmonaires chez plus de 80% des patients souffrant d'hypertension pulmonaire [214]. Les traitements utilisés jusqu'à présent sont certes efficaces mais présentent des inconvénients inhérents à la substance ou à la voie d'administration. La PDE5, abondante dans les tissus pulmonaires, semble être la cible idéale pour le traitement de l'HTAP. Des études ont mis en évidence un effet bénéfique du sildenafil sur la vasoconstriction pulmonaire ischémique [215,216]. Les auteurs suggèrent même l'implication de peptides natriurétiques qui augmentent les niveaux de GMPc par activation des récepteurs de la GC particulaire. Des études faites sur des modèles animaux d'hypertension pulmonaire suggère que l'inhibition chronique de PDE5 atténue le remodelage vasculaire induit par l'hypoxie et l'hypertension [217-220]. Par conséquent, le sildenafil a été reconnu en 2005 comme étant un traitement efficace contre l'HTAP.

I.5.3. Sildenafil et angiogenèse

Un rôle important de la voie NO/GMPc dans le cerveau a également été suggéré [221,222]. Les niveaux de GMPc sont montrés pour être impliqués dans la cicatrisation d'un tissu ischémique cérébral et le sildenafil permet de réduire la taille de la zone infarctée [223]. Zhang et al fut l'un des premiers à mettre en évidence un effet bénéfique du sildenafil sur l'ischémie cérébrale, par augmentation des niveaux de VEGF et de GMPc [224]. Wang et al va plus loin et démontre que le sildenafil induit la neurogenèse dans un modèle de croissance neuronale en up-régulant la phosphorylation d'Akt dans les neurosphères [225]. Cet effet est associé à une augmentation de la phosphorylation de GSK3 (glycogen synthase kinase 3), un effecteur d'Akt. L'utilisation du LY 294002, un inhibiteur de PI3K, diminue la phosphorylation d'Akt. Cette équipe suggère donc que le sildenafil augmente la neurogenèse en activant la voie PI3K/Akt/GSK3. Pyriochou et al, par une étude in vitro, montre que le sildenafil stimule l'angiogenèse en activant la voie PKG/MAPK [226]. Senthikumar et al confirme, par une étude in vivo, que le sildenafil augmente l'angiogenèse par un mécanisme PKG-dépendant [227]. Après traitement au sildenafil des souris KO pour les NOS_e et NOS_i, l'angiogenèse post-ischémique n'est pas inhibée. Cet auteur suggère donc un effet bénéfique du sildenafil sur l'angiogenèse par un mécanisme NO-indépendant.

Toutes ces études ont permis de suggérer un mécanisme d'action probable du sildenafil qui est présenté dans la figure qui suit :

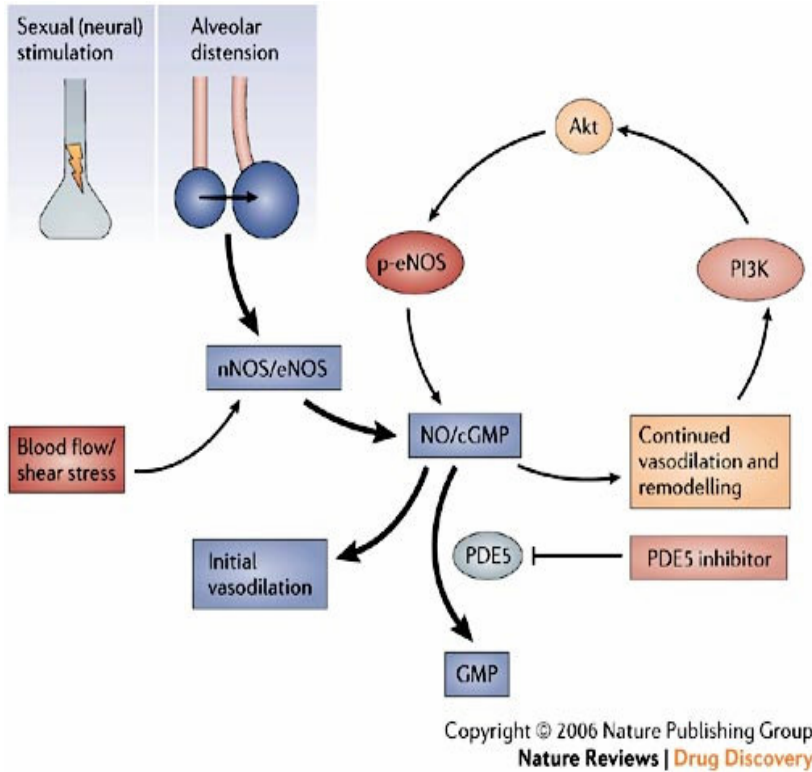


Figure 10 : Mécanisme d'action probable du sildenafil. *D'après Ghofrani et al, 2006*

Le sildenafil permet de faire basculer la balance vasodilatation/vasoconstriction vers la relaxation en augmentant les niveaux de GMPc et en régulant le niveau d'expression de RhoA, petite protéine G [228]. De plus, RhoA joue un rôle important dans l'HTAP, de par son implication dans la contraction ainsi que dans la migration et la prolifération des cellules. Il semble donc intéressant de regarder les effets du sildenafil sur RhoA dans l'HTAP. Une meilleure connaissance de la voie RhoA/Rho-kinase est alors nécessaire.

I.6. Voie RhoA/Rho kinase

Des études menées en culture cellulaire ou sur des vaisseaux de gros calibres mettent en évidence un candidat primordial dans les processus de sensibilisation de l'appareil contractile au calcium : la petite protéine G RhoA [229-233].

I.6.1. Présentation générale de la protéine G RhoA

Les petites protéines G sont capables de fixer du GTP et de l'hydrolyser pour donner du GDP. Elles fonctionnent comme des commutateurs moléculaires qui évoluent entre un état inactif lié au GDP et un état actif lié au GTP. Ces protéines sont dites petites ou monomériques (20-25kDa) en opposition aux protéines G hétérotrimériques que l'on retrouve couplées aux récepteurs à sept domaines transmembranaires. Au début des années 1980, une étude montre que la protéine de 21kDa codée par le proto-oncogène c-Ras exprime une séquence GTPase homologue à celle des sous-unités α des protéines G trimériques [234]. Cette GTPase constitue le premier membre d'une vaste famille devenue par la suite la super famille Ras qui compte aujourd'hui plus d'une centaine de membres. Cette super famille est divisée en cinq familles présentant environ 30% d'homologie de séquence avec Ras : Ras, Rho, Rab, sar1/Arf et Ran [234]. Les zones de forte homologie se trouvent essentiellement au niveau des régions impliquées dans la fixation et l'hydrolyse du GTP [235]. Chacune de ces familles comprend de nombreuses protéines qui possèdent des expressions, des localisations et des fonctions cellulaires différentes. Les fonctions biologiques assurées par les petites protéines G dépendent notamment des modifications post-traductionnelles qu'elles subissent. Les familles Rho, Ras et Rab par exemple possèdent à leur extrémité C-terminale une séquence permettant l'ajout d'un groupement lipidique. Ces modifications orientent la localisation des protéines dans les membranes cellulaires ainsi que les interactions avec leurs effecteurs.

La famille des protéines Rho découverte en 1985 [236] comptent aujourd'hui 22 membres [234,237] contrôlant une multitude de fonctions cellulaires dont les plus fréquentes sont la polarisation cellulaire et l'organisation du cytosquelette d'actine.

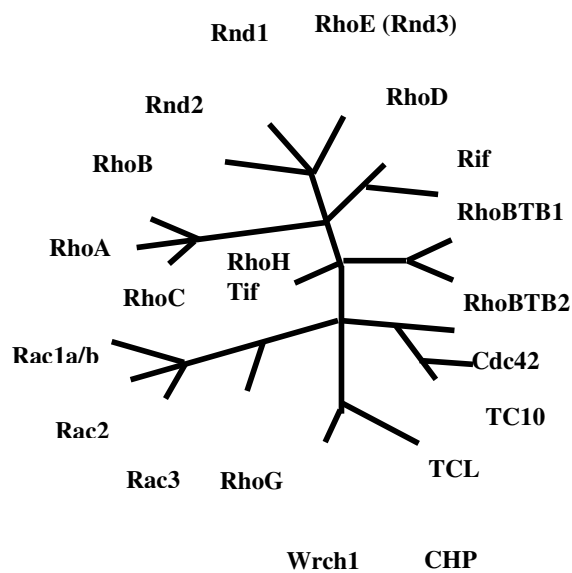


Diagramme représentant les 22 membres composant la famille Rho

Les rôles précis ainsi que les localisations de ces protéines G ne sont toujours pas bien définis. La protéine RhoA est, elle, ubiquitaire et contrôle des fonctions cellulaires telles la transcription, la contraction des CML, l'organisation du cytosquelette d'actine, la prolifération cellulaire [238,239].

I.6.2. Cycle d'activation et d'inactivation

Les petites protéines G Rho peuvent être activées soit par des facteurs solubles via des récepteurs membranaires couplés à une protéine G hétérotrimérique, les récepteurs tyrosine kinase et les récepteurs aux cytokines [237,239,240] soit par l'adhésion cellulaire et le regroupement des intégrines [241-243]. L'un des premiers agonistes activateurs de RhoA caractérisé fut l'acide lysophosphatidique (LPA). Le LPA, présent dans le sérum, active RhoA via ses récepteurs à sept domaines transmembranaires [244,245]. Depuis de nombreux autres agonistes de récepteurs membranaires ont été décrits comme étant des activateurs de RhoA : la thrombine, l'endothéline, le carbachol, la prostaglandine E₂, la bombésine, l'angiotensine, les agonistes α -adrénergiques, les sphingolipides et les nucléotides extracellulaires [246]. Les petites protéines G de la famille Rho, incluant RhoA, fonctionnent comme des commutateurs moléculaires oscillant entre un état actif lié au GTP et un état inactif lié au

GDP. L'activation de ces protéines est accompagnée d'une translocation du cytosol vers la membrane plasmique [229,247,248]. L'activité de RhoA, comme des autres protéines G de la famille Rho, est sous le contrôle direct de protéines régulatrices :

- les protéines inhibitrices de dissociation guanylique (GDI)
- les facteurs d'échange guanyliques (GEF)
- les protéines activatrices de GTPases (GAP).

A l'état basal, les protéines GDI séquestrent RhoA dans le cytosol sous sa forme inactive. Suite à une stimulation, la dissociation de ce complexe permet de démasquer le groupement géranylgeranyl responsable de la localisation membranaire de RhoA. Les GEF interviennent ensuite et permettent l'échange du GDP pour du GTP sur RhoA et ainsi son activation. C'est sous sa forme activée GTP liée et membranaire que RhoA peut interagir et activer ses différents effecteurs. RhoA possède une faible activité GTPasique, mais celle-ci peut être augmentée par l'intervention des GAP qui permettent l'hydrolyse du GTP et le décrochage de RhoA membranaire (figure 11).

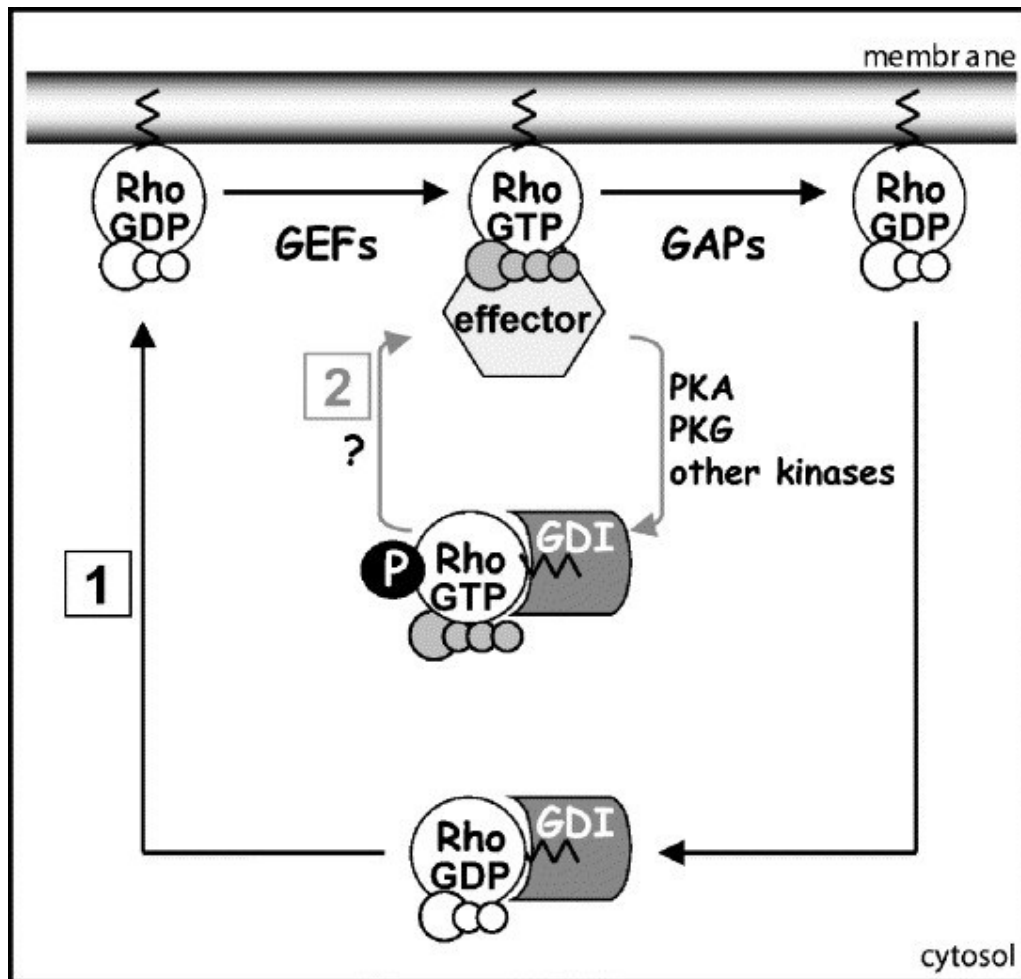


Figure 11 : Cycle d'activation et de translocation de Rho impliquant GEFs, GAPs et GDI.

Rho-kinase a été le premier effecteur de RhoA identifié et caractérisé. Les premières fonctions qui lui ont été attribuées étaient la réorganisation du cytosquelette d'actine et la formation des points d'adhésion focale [249,250]. Il existe deux isoformes de cette protéine : ROCK I nommée également ROK β ou p160ROCK et ROCK II ou ROK α ou Rho-kinase. ROCK II a été la première isoforme décrite comme étant capable de lier la forme active de RhoA [251]. Les protéines ROK sont des sérine/thréonine kinases d'environ 160 kDa exprimées de manière ubiquitaire, néanmoins ROCK II est majoritairement retrouvée dans les tissus musculaires et dans le cerveau [250]. La localisation de ROCK I est plus difficile à déterminer, une étude récente montre cependant une co-localisation avec les centrosomes [252].

II. Les Polyphénols : les composés polyphénoliques du vin rouge

Les polyphénols sont des phytonutriments synthétisés par les végétaux et sont particulièrement abondants dans les fruits et légumes. De nombreuses études sont en faveur d'un impact positif de leur consommation sur la santé. En effet, les polyphénols pourraient permettre de prévenir de nombreuses pathologies comme les cancers [253-257], les maladies dégénératives et cardio-vasculaires [258]. Un encouragement à la consommation de fruits et légumes constitue désormais une des principales recommandations en santé publique. Parmi les antioxydants végétaux, les polyphénols apparaissent parmi les plus efficaces quant à leurs effets protecteurs dans l'organisme.

Le vin rouge, quant à lui, contient des polyphénols dérivés de la levure et du bois et en plus possède une grande quantité de composés polyphénoliques provenant des grappes et plus précisément de la peau des grappes de raisin, qui est retirée pendant la vinification du vin blanc (ce qui explique entre autre l'effet moindre du vin blanc comparé au vin rouge) [259]. De plus, le vin rouge offre une meilleure protection que le vin blanc, la bière ou les spirits [260,261], ce qui explique la définition du paradoxe français [261].

II.1. Nature chimique

La classe des polyphénols végétaux comprend plus de 8000 composés et plus de la moitié des polyphénols sont composés de flavonoïdes, également abondants au niveau du vin rouge. Leurs effets protecteurs au niveau du système cardiovasculaire, leurs propriétés anticancéreuses, antivirales ou antiallergiques ont été largement rapportées au cours de nombreuses expérimentations [262]. Le vin rouge contient entre 1500 et 2500mg/L de polyphénols [263], bien que leurs présences et leur structure soient affectées par de nombreux facteurs tels que les variétés de grappe, exposition au soleil, technique de vinification et âge. Le vin rouge ne possède pas beaucoup de vitamines ni de selenium et leurs effets protecteurs sont attribués aux composés phénoliques.

Les composés phénoliques du raisin

Le raisin contient à sa maturité principalement de l'eau et des sucres (glucose, fructose, pectine et polysaccharides). Il possède aussi d'autres composés comme des terpènes (citrol,

geraniol...), des flavones, des aldéhydes (éthanal, propanal, vanilline...), des anthocyanes (responsables de la couleur) et des tanins.

Les composés phénoliques sont des constituants importants du raisin. Ils sont caractérisés par la présence d'un noyau benzénique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles, pouvant être acylés ou glucosylés. Leur nomenclature est basée sur la distinction entre les composés non-flavonoïdes et les flavonoïdes.

II.1.1. Les composés non-flavonoïdes

Les composés non-flavonoïdes regroupent les acides phénoliques ainsi que les stilbènes. Ils ne possèdent pas de squelette « flavone ».

II.1.1.1. Les acides phénoliques

On distingue tout d'abord les dérivés de l'acide benzoïque, composés d'un squelette à sept carbones. Ils sont principalement représentés dans le raisin par l'acide gallique, qui est généralement lié par une liaison ester à l'épicatéchine. D'autres composés phénoliques sont également présents, comme les dérivés d'esters hydroxycinnamiques possédant une structure du type C6-C3. Les composés les plus fréquents sont l'acide *p*-coumarique, l'acide *t*-caféique, l'acide *t*-fertarique et l'acide *t*-sinapique.

II.1.1.2. Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénoliques contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison, formant un système conjugué. Cette particularité leur confère une grande réactivité due à la résonance des électrons sur la totalité de la molécule. Les plus abondants dans le raisin sont le *trans*-resvératrol et son dérivé glucosylé : le picéide, ainsi que les dimères : le resvératrol *trans*-déhydrodimère et l'e-viniférine.

Les stilbènes sont connus pour leurs propriétés anti-oxydantes vis-à-vis des lipoprotéines à basse densité (LDL) [264]. On leur attribue aussi des activités chimiopréventives contre le cancer [265]. Le resvératrol (figure 12) est connu pour prévenir l'agrégation plaquettaire [266,267]. Cependant, acide gallique, catechin, epicatechin et flavonols [264,267,268] sont tous présents dans le vin rouge à des concentrations beaucoup

plus fortes que le resveratrol et possèdent des propriétés anti-oxydantes et anti-agrégantes similaires, si ce n'est meilleures que le resveratrol [269,270].

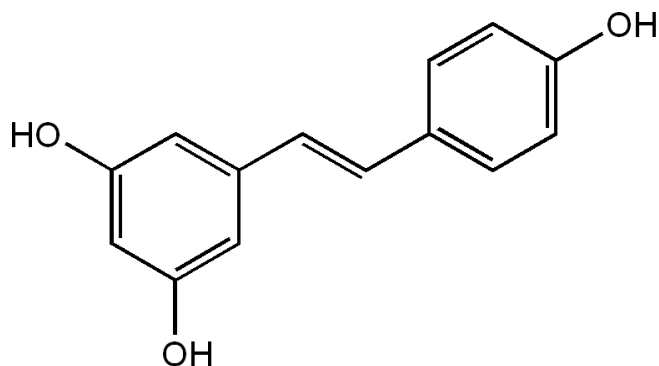


Figure 12 : Structure du Resveratrol

II.1.2. Les composés flavonoïdes (Figure 13)

Les composés flavonoïdes sont formés d'un squelette de base à 15 carbones (C6-C3-C6). Au sens large du terme, ce groupe comprend principalement trois familles de composés : les flavonols, les anthocyanes et les flavan-3-ols, qui se différencient par le degré d'oxydation du noyau pyranique central.

II.1.2.1. Les flavonols

Les flavonols majoritairement présents dans le raisin sont: le kaempférol, la quercétine, la myricétine, l'isorhamnéthine, la fisétine et la morine. Les dérivés de la quercétine sont toujours prédominants. La quercétine joue un rôle important dans les propriétés anti-oxydantes du vin rouge [271]. Bien que les membres de cette famille montrent de fortes capacités anti-oxydantes dans différents systèmes [263,272], ils ne sont probablement pas présents en quantité suffisante pour être considérés comme déterminants majeurs de la capacité anti-oxydante totale du vin rouge.

II.1.2.2. Les anthocyanes

Les anthocyanes jouent un rôle prépondérant dans la coloration des raisins rouges. Leur structure de base est caractérisée par un noyau « flavone » généralement glucosylé en position C-3. Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule. L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment. On distingue entre autres cinq anthocyanidines: la cyanidine, la péonidine, la delphinidine, la pétunidine et la malvidine.

Le pH est un facteur important dans le changement de couleur des anthocyanes. La forme flavylium, de couleur rouge, est stable en milieu acide et se transforme, en milieu basique, en base carabinol (incolore), en chalcone (jaune) ou base quinonique (bleue).

II.1.2.3. Les tanins condensés (flavan-3-ols)

Les tanins condensés, appelés aussi polyphénols ou proanthocyanidines, sont largement répandus dans notre alimentation (fruits, vin, thé...) et jouent un rôle important dans les qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits et spécialement des vins.

Dans la baie de raisin, la pellicule et les pépins sont les zones de concentration des tanins et des composés phénoliques. Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation et leur nombre de substituants galloylés.

Les flavan-3-ols, présents dans le raisin, se rencontrent majoritairement sous la forme de polymères. Les tanins de pépins sont constitués de procyanidines partiellement galloylés, alors que ceux des pellicules contiennent également des prodelfinidines. D'importants travaux ont mis en évidence certaines propriétés biologiques et pharmaceutiques des tanins : antivirales, antitumorales et chimiopréventives. Ce sont également des antioxydants capables de piéger les radicaux libres.

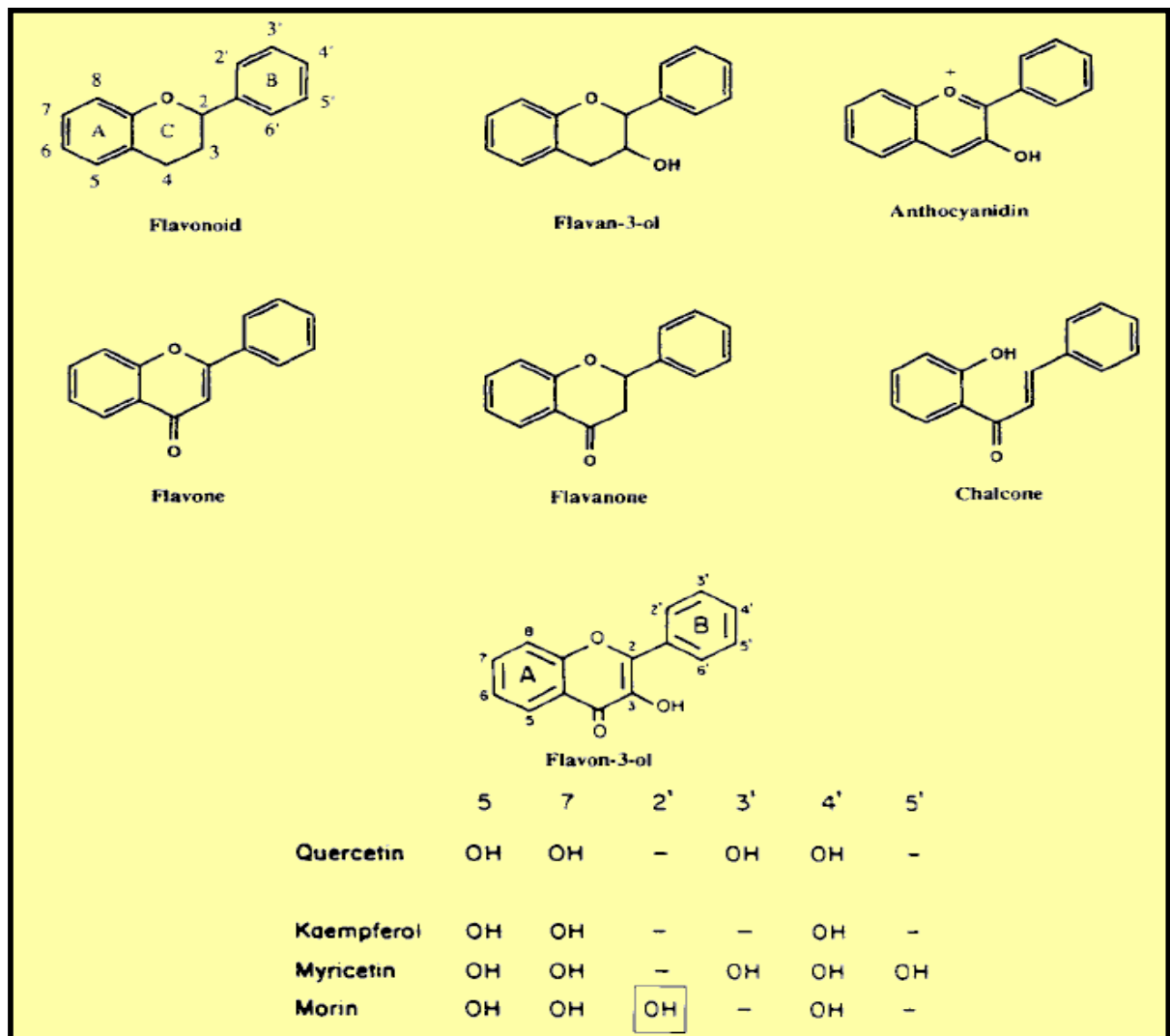


Figure 13 : Représentation schématique des différentes classes de flavonoïdes (Middleton E, 2000)

II.2. Effets vasculaires des polyphénols du vin rouge

De nombreuses études épidémiologiques ont montré une corrélation inverse entre risque cardiovasculaire et consommation des composés polyphénoliques d'origine naturelle. Ainsi, il a été proposé que la faible incidence du risque coronarien observée en France pourrait être due aux propriétés bénéfiques des composés polyphénoliques présents dans le vin rouge, phénomène encore connu sous le nom de "Paradoxe français" [273-276].

II.2.1. Polyphénols et athérosclérose

Les mécanismes des effets protecteurs du vin rouge sur les maladies coronariennes ne sont que partiellement élucidés [277]. Ces effets protecteurs pourraient s'expliquer, en partie, par le fait que le vin rouge est capable de ralentir la progression du processus d'athérosclérose. Il est en effet capable de s'opposer au passage d'un stade de lésions précoces, comme on peut l'observer dans les artères coronaires à l'âge infantile, à un stade de plaques évoluées, promptes à se rompre et entraînant la formation instantanée d'un thrombus mural aboutissant à une ischémie tissulaire. La consommation de vin rouge et de composés polyphénoliques du vin s'oppose à la progression des lésions dans des modèles expérimentaux d'athérosclérose mais semble ne pas pouvoir agir contre l'athérosclérose « installée ». La composante polyphénolique du vin rouge peut expliquer les effets protecteurs des polyphénols, étant donné que les produits dérivés non alcoolisés de raisin et des composés polyphénoliques du vin tels que la quercétine et la catéchine préviennent eux aussi la progression des lésions d'athérosclérose [278,279]. Les effets protecteurs du vin pourraient être attribués, au moins en partie, à leur capacité d'améliorer le profil lipidique, à inhiber l'activation plaquettaire [280], et à empêcher l'expression de molécules pro-athérosclérotiques comme le *monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)*, le *vascular cell adhesion molecule-1(VECAM-1)* et *VEGF* [281-283]

II.2.2. Polyphénols et vasorelaxation

De nombreux travaux ont permis d'étudier les effets directs des polyphénols du vin rouge sur les vaisseaux et les cellules vasculaires [282]. Les polyphénols du vin rouge ont des propriétés anti-athérosclérotiques, anti-angiogéniques, [284,285] et vasorelaxantes. Cette dernière propriété implique la production de NO par les cellules endothéliales [286,287] et d'un facteur hyperpolarisant de type EDHF [288,289]. Un mécanisme d'activation de la NOSe par les polyphénols du vin rouge a récemment été démontré. Il est indépendant du calcium et fait intervenir la voie PI3K/Akt aboutissant à la phosphorylation de la NOSe sur le résidu sérine 1177. Cette voie PI3K/Akt est impliquée dans l'activation de la NOSe en réponse aux forces de cisaillement qu'exercent le flux sanguin sur la surface luminale des cellules endothéliales [290] et aussi en réponse aux oestrogènes et à certains facteurs de croissance tels que le VEGF. Récemment, il a été montré que dans les cellules endothéliales

d'artère coronaire de porc, les composants polyphénoliques du vin induisent une phosphorylation rapide d'Akt et de la NOSe [289].

II.2.3. Effet anti-oxydant des polyphenols

En plus des effets résultant de l'augmentation de l'activité de la NOSe, certains polyphénols contenus dans le vin sont également capables d'augmenter la production de NO par stimulation de l'expression de l'enzyme [291-293]. Les effets protecteurs du vin pourraient être liés aux propriétés anti-oxydantes des polyphénols, qui seraient susceptibles d'augmenter la biodisponibilité du NO endothélial en empêchant sa dégradation par les espèces radicalaires de l'oxygène. Les vins rouges ont la plus grande capacité anti-oxydante [294] variant, *in vitro*, de 13,8 à 25,2 mmol/L et cet effet est directement proportionnel à leur concentration en polyphénols [269]. Les propriétés anti-oxydantes des polyphénols s'expliquent en partie par leur aptitude à réagir directement avec les anions superoxydes, les radicaux hydroxyles et les radicaux produits par la peroxydation lipidique [295,296]. Les autres effets antioxydants des polyphénols incluent l'inhibition de la xanthine oxydase et une stimulation des systèmes antioxydants endogènes [296]. Une autre source enzymatique importante d'anions superoxydes est la NADPH oxydase dont l'expression et l'activité pourrait être diminuée par les polyphénols [297,298].

De par ses différents mécanismes (effet anti-oxydant, production de facteurs comme le NO et l'EDHF, augmentation ou inhibition de l'expression de certains gènes), l'administration aigue ou chronique de polyphénols du vin est susceptible d'exercer des effets protecteurs sur la paroi vasculaire. Ces mécanismes sont mis en jeu par des composés polyphénoliques de structure bien spécifique, mais les déterminants structuraux semblent être différents d'un effet à l'autre [282].

II.2.4. Autres propriétés biologiques des polyphenols

Les polyphenols se comportent comme des scavengers des ROS, chelateurs de metal et des modulateurs d'enzyme [299]. Des études cliniques ont montré une augmentation significative des capacités anti-oxydantes après consommation de vin rouge [300,301]. Il a cependant été suggéré que les polyphenols fonctionnent indirectement comme des anti-oxydants down-régulant les enzymes pro-oxidantes telles que iNOS, NFkappa B, xanthine oxydase [261,302].

Les polyphénols sont également reconnus pour être :

- Anti-agrégants plaquettaires : par la diminution du taux des plaquettes activées [261,303,304], tout comme l'alcool, sans en avoir l'effet "rebond" [305], susceptible de provoquer la mort subite ou des accidents ischémiques graves.

- Anti-inflammatoires : par la protection de l'oxydation des LDL cholestérol [263] et des acides gras poly insaturés (éicosanoïdes) [267,306].

- Anti-cancéreux : plus particulièrement, le resvératrol montre, *in vitro*, une action sur les trois phases principales de cancérisation [265] : initiation, promotion (par diminution du taux d'enzymes caractéristiques de ces états précancéreux : cyclooxygénase-2) et propagation (par induction de la différenciation de cellules cancéreuses = perte de leur caractère "immortel"-apoptose). Cette molécule semble même être capable de lutter contre certaines formes de cancers, de façon préventive, en inhibant l'expression de gènes codant pour des enzymes nécessaires à l'étape d'initiation (protéine kinase C, mARN de COX-2 [307]).

II.2.5. Le Provinols

Le Provinols représente un mélange de composés polyphénoliques isolé du vin rouge. Il implique (en mg/g) 480 proanthocyanidines, 61 anthocyanidines totales, 19 anthocyanidines libres, 38 catechines, 18 acides hydroxycinnamiques, 14 flavonols et 370 tannins polymériques. Une étude montre que le Provinols prévient le développement de l'hypertension [308], de la fibrose myocardique, de l'épaississement des parois aortiques et de la dysfonction vasculaire dans différents modèles d'hypertension [309,310]. Ces effets sont associés à une réduction du stress oxydatif et une augmentation du niveau d'expression de la NOSe.

But de l'étude

Les pathologies ischémiques sont une des premières causes de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés. Actuellement, les stratégies visant à réduire la survenue des accidents thrombotiques ou des lésions ischémiques ont gagné en efficacité mais la protection qu'elles offrent reste insuffisante. Toutes nos cellules ont un besoin vital d'oxygène et particulièrement celles du muscle squelettique, du cerveau et du myocarde, particulièrement intolérantes à l'hypoxie. Si la protection, la réparation ou le remplacement ne suffisent pas ou ne peuvent pas être mis en œuvre à temps, il faut alors stimuler la croissance de néo-vaisseaux de suppléance dans les tissus en souffrance : c'est la pro-angiogenèse. L'initiation du processus angiogénique est caractérisée par la vasodilatation du vaisseau qui s'accompagne d'une augmentation de la perméabilité de sa couche endothéliale. Le NO, régulateur important de l'homéostasie cardiovasculaire, assure la régulation permanente du diamètre des vaisseaux et le maintien d'un environnement anti-prolifératif et anti-apoptotique dans les parois vasculaires [311]. Physiologiquement, les cellules endothéliales sont exposées aux forces hémodynamiques du sang, incluant le shear stress. Ce dernier, via les protéines G, peut activer plusieurs voies de transduction incluant PI3K, ce qui conduit à l'activation de la NOS endothéliale. Le sildenafil, en inhibant la PDE5, permet l'accumulation de cGMP intracellulaire et donc la vasodilatation : le flux sanguin et le shear stress sont alors augmentés [312], permettant l'activation de la NOSe.

Le but de notre travail a tout d'abord été de mettre en évidence un effet bénéfique du sildenafil sur la revascularisation post-ischémique et sur le remodelage vasculaire des artères mésentériques. Le remodelage structural de la paroi ou du réseau vasculaire en général survient en réponse aux stimuli hémodynamiques comme la pression et le flux mais aussi en réponse à un tissu en souffrance [313,314]. Des conditions physiopathologiques comme l'âge, l'athérosclérose ou l'hypertension artérielle favorisent ce type de remodelage. Si on s'intéresse plus particulièrement à l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), des études ont mis en évidence l'implication de RhoA, cette dernière jouant un rôle important dans la contraction mais aussi dans la migration et la prolifération des cellules. Le sildenafil régule les niveaux de cGMP ainsi que les niveaux d'expression de RhoA, permettant de faire basculer la balance vasodilatation/vasoconstriction vers la relaxation. Par des études cellulaires, un travail réalisé en collaboration nous a permis de mieux comprendre le mécanisme d'activation et de désactivation de la voie de signalisation de RhoA. Ces résultats ont été confirmés in vivo sur des artères pulmonaires de rats traités au sildenafil.

Tout comme le sildenafil, les polyphénols du vin rouge possèdent de puissantes propriétés vasodilatatrices. Ils sont également connus pour leurs effets protecteurs contre l'ischémie cérébrale et cardiaque, ce qui implique plutôt des propriétés pro-angiogéniques.. Paradoxalement, des études, essentiellement *in vitro*, ont mis en évidence que les polyphénols inhibent l'expression de deux facteurs pro-angiogéniques majeurs : le VEGF et les MMPs [284,285]. Ces résultats mettent en évidence les propriétés anti-angiogéniques des polyphénols. Le but de ce travail est donc de montrer un effet dose dépendant des polyphénols sur la revascularisation post-ischémique. Enfin, les polyphénols du vin rouge étant un mélange de plusieurs composés polyphénoliques, nous avons voulu savoir quel composé était à l'origine de ces effets pro- et anti-angiogéniques.

Matériel & Méthodes

Les deux études menées sur la revascularisation post-ischémique m'ont amenées à mettre en place le protocole de ligature de l'artère fémorale, protocole mis au point par Couffinhal (1998)[315]. Ce protocole de ligature est bien entendu applicable au rat et permet d'étudier *in vivo* les différentes voies de signalisation impliquées dans l'angiogenèse. Cette technique présente plusieurs avantages :

- L'animal est son propre contrôle (patte non ischémisée)
- L'effet du traitement, étudié sur la patte droite non ischémisée.
- L'étude de l'angiogenèse post-ischémique (rapport de la patte ischémisée sur la patte non ischémisée)

Les deux traitements utilisés pour ce protocole sont deux puissants vasodilatateurs : le Sildenafil, inhibiteur de la phosphodiesterase, et le ProvinolsTM, composés polyphénoliques du vin rouge.

Les différents protocoles réalisés au cours de ma thèse ont nécessité l'utilisation de rats Wistar mâles de 300g environ au début de chacune des études.

Le protocole de ligature est le même pour les 2 études, seul le traitement et les cinétiques diffèrent.

I. Angiogenèse

I.1. Effet du Sildenafil sur la revascularisation

Pour ce protocole, une cinétique à 7 et à 21 jours a été effectuée pour une meilleure compréhension, étape par étape, des mécanismes impliqués dans ce processus. Par conséquent, six groupes de rats ont donc été réalisés :

- deux groupes à 7 jours de ligature, traités par gavage avec du sildenafil (25mg/kg/j) ou de l'eau en fonction des groupes. Pour savoir si le VEGF est impliqué dans la revascularisation induite par le sildenafil, un neutralisant VEGF (2.5µg, intrapéritonéal ou IP 3 fois par semaine, R&D System) a été injecté pendant 7 jours sur les groupes contrôles et sildenafil.
- deux groupes à 21 jours de ligature : un groupe traité par du sildenafil à 25 mg/kg/j et un groupe contrôle gavé avec de l'eau.

I.1.1. Préparation de l'animal

Les différents temps de l'étude :

J0 marque le début du gavage des animaux. Après anesthésie au Thiopental sodique (50mg/kg, IP), une incision est pratiquée sur la face interne de la cuisse du rat (figure 14). L'artère fémorale est dégagée et entourée de deux fils de suture (Flexocrin 5.0) afin de ligaturer l'artère fémorale gauche. La ligature est pratiquée le plus haut possible, avant toute bifurcation de l'artère (voir ci-dessous). Entre les deux points de ligature, l'artère est cautérisée pour éviter tout flux résiduel de sang. L'incision est alors refermée à l'aide du fil de suture 4-0.

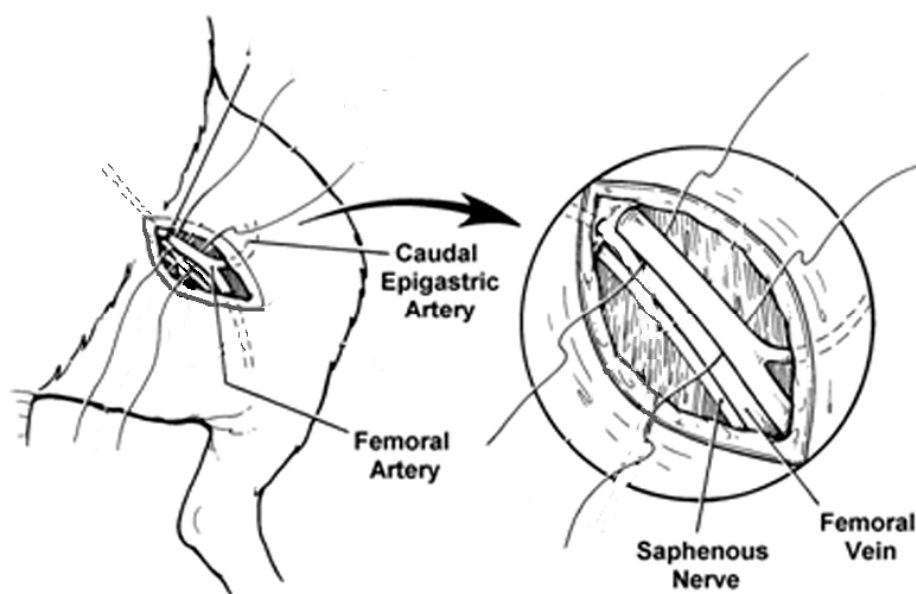


Figure 14 : Schéma représentatif de la zone de ligature de l'artère fémorale gauche du rat.

Après 7 et 21 jours de traitement :

Après anesthésie au Thiopental sodique (50 mg/kg, ip), le rat est mis en décubitus dorsal sur un matelas chauffant pour maintenir sa température corporelle à 37°C. La pression artérielle moyenne (PAM) du rat est mesurée à l'aide d'un cathéter en polyéthylène (PE 10 : $\phi=0.61\text{mm}$, PE 50 : $\phi=0.965\text{mm}$, Clay Adams-USA) dans la carotide gauche. Le cathéter est connecté à un capteur de pression lui-même relié à un système de Biopac qui, via le système

d'acquisition Acqknowledge, nous permet de visualiser et d'enregistrer la pression artérielle moyenne de l'animal pendant 5 minutes.

I.1.2. Mesure des débits sanguins cutanés locaux

I.1.2.1. Technique du laser Doppler

La débitmétrie Laser Doppler est une technique qui permet de mesurer en continu les variations du débit sanguin des microvaisseaux, sur un volume de 1mm^3 (débitmètre laser Doppler, PF3-Perimed-Suède). L'appareil est composé d'un laser hélium-néon de 2mW de puissance, émettant un faisceau laser monochromatique à une longueur d'onde $\lambda=632.8\text{ nm}$. Ce faisceau est alors conduit vers les tissus à travers une fibre optique efférente, tissus qui réfléchissent cette lumière. La lumière émise est ensuite captée par des fibres optiques afférentes et véhiculées vers des photodétecteurs. L'ensemble des fibres constitue la sonde laser Doppler ($\phi=0.8\text{mm}$ -PF 303-Perimed-Sweden).

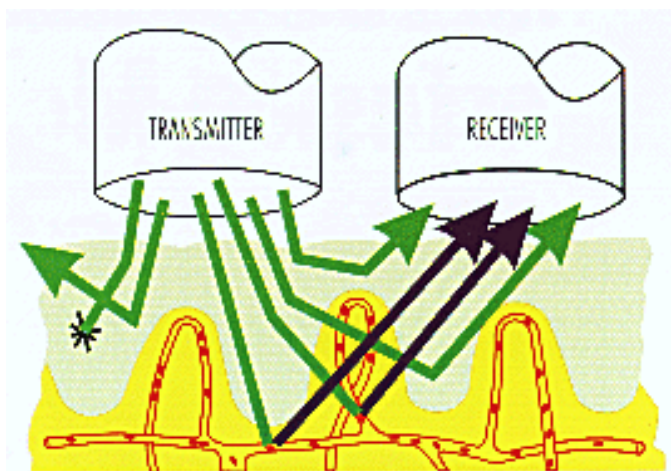


Figure 15 : Représentation schématique de l'effet Doppler.

Presque tous les tissus vivants sont opaques à la lumière. Les éléments qui les composent peuvent donc réfléchir une lumière émise, la lumière n'étant en fait qu'une onde de photons. Si l'onde rencontre un tissu statique, il n'y aura pas d'effet Doppler. En effet, seules les cellules en mouvement, principalement les globules rouges, subissent un décalage de leur longueur d'onde que l'on appelle décalage Doppler ou effet Doppler : c'est une différence de fréquence entre la fréquence de l'onde émise et la fréquence de l'onde reçue, au niveau des photodétecteurs, tout en tenant compte de la vitesse des cellules. L'onde réfléchie formant un angle de réflexion différent selon la vitesse et le nombre des cellules sans relation

avec la direction de leurs mouvements, l'effet Doppler occupe un large spectre de fréquences qui se distribuent de façon aléatoire. Cependant, le seul facteur qui varie dans l'équation Doppler avec les variations du débit est la vitesse des cellules circulantes.

Le laser Doppler permet de définir plusieurs paramètres :

- La vitesse moyenne des hématies
- Le volume des hématies en mouvement par unité de volume de tissu
- Le débit qui résulte du produit du volume et de la vitesse. En réalité, on ne parle pas de débit mais de flux des hématies en mouvement à travers un volume de tissu par unité de temps. Il est communément exprimé en $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 100\text{g}^{-1}$. Les valeurs du débitmètre laser Doppler ne sont pas exprimées en unité conventionnelle mais en unité arbitraire de perfusion (PU : Perfusion Unit), la perfusion étant également appelée flux capillaire.

La valeur de la PU est calculée selon la formule suivante :

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

Dans la littérature scientifique le nombre de cellules en mouvement se cache souvent derrière le sigle **CMBC** qui est l'abréviation anglaise de Concentration of Moving Blood Cells. La vitesse est donnée en Unité de Vitesse (V) et l'unité de Perfusion donnée en $\text{PU} = \text{CMBC} \times V$

Le sens d'écoulement des hématies dans un réseau capillaire n'est pas uniforme. En effet, il dépend de l'orientation des capillaires. La mesure intègre donc l'ensemble des flux des hématies. Du fait de la grande hétérogénéité structurale de la microcirculation, il est préférable d'exprimer les variations par rapport à une valeur de référence afin de pouvoir comparer les valeurs de différents individus.

I.1.2.1. Mesure des débits sanguins cutanés locaux

Au cours des différents protocoles, j'ai utilisé 2 techniques pour l'étude des débits sanguins cutanés : la débitmétrie laser Doppler avec application d'une sonde sur le talon et le laser Doppler imager, qui permet de mesurer les débits sur une plus grande surface.

A – Débitmétrie Laser Doppler

L'animal anesthésié est placé en couveuse à 35°C, en décubitus ventral. Après 10 minutes de stabilisation des différents paramètres, la sonde Laser Doppler est placée alternativement sur le talon droit puis sur le talon gauche de l'animal pour mesurer les débits sanguins cutanés. Chaque mesure de débit est effectuée 2 fois par talon et l'enregistrement du

signal se fait sur une période de 5 minutes. Les variations de température sont régulièrement contrôlées tout au long de l'expérience. Le rapport de la patte ischémisée/patte non ischémisée est ensuite calculé pour chaque groupe.

B- Laser Doppler Imager

Cette technique est similaire à celle de la débitmétrie Laser Doppler, à la différence près qu'aucune sonde n'est posée sur la patte de l'animal. L'animal est placé en decubitus ventral sur un tapis chauffant pour maintenir une température corporelle stable. Le laser doppler imager effectue une mesure globale des pattes inférieures : seuls les débits cutanés du pied de l'animal sont quantifiés. Le rapport de la patte ischémisée/patte non ischémisée est ensuite calculé pour chaque groupe.

I.1.3. Mesure de la densité vasculaire

L'animal est ensuite sacrifié par un bolus de Thiopental sodique. L'aorte abdominale est dégagée pour injecter un produit de contraste, le chlorure de baryum (6g/ml), à l'aide d'une aiguille de 21 Gauge. Le chlorure de baryum est opaque aux rayons X, ce qui permet de quantifier la densité vasculaire de chacune des pattes postérieures de l'animal. Pour cela, une image de chaque membre est prise à l'aide du Faxitron (Faxitron X-Ray Corporation-Specimen Radiography System, Illinois-USA).

Ces images sont ensuite analysées à l'aide du logiciel Histolab (Microvision Instruments, Evry - France) pour permettre une quantification de la densité vasculaire de chacune des pattes. Le rapport de la patte ischémisée sur la patte non ischémisée est ensuite calculé.

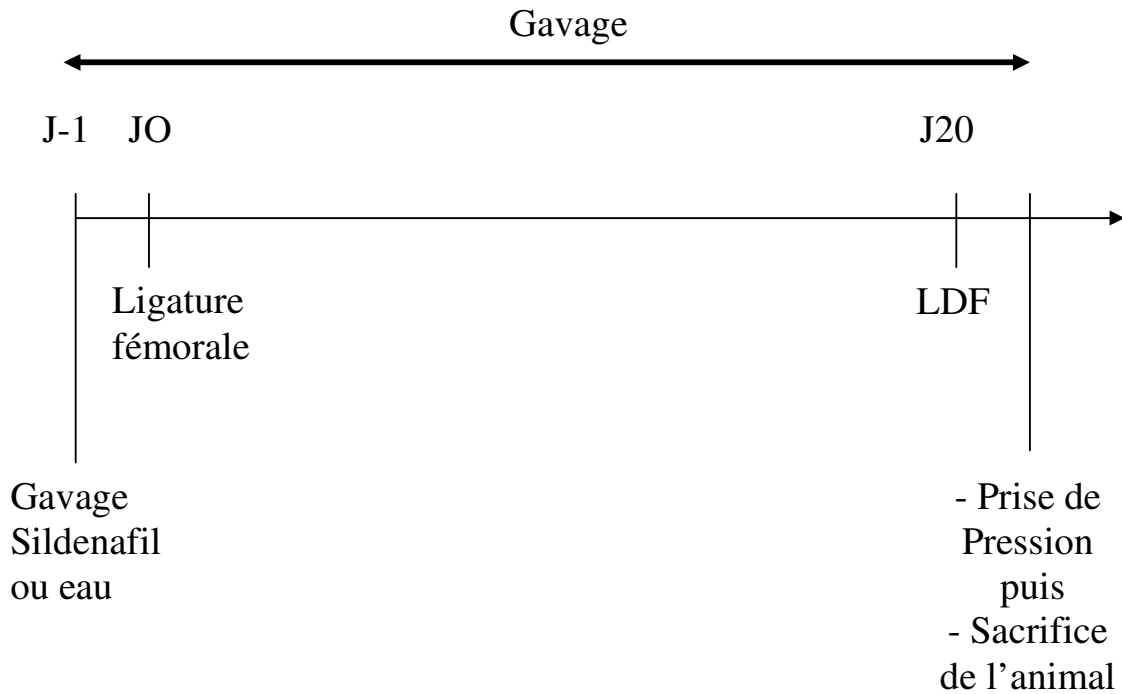
I.1.4. Histologie

Pour vérifier et quantifier l'angiogenèse, les segments de muscles sont incorporés au préalable dans du milieu d'inclusion Tissue-Tek et congelés dans l'isopentane. Les densités capillaire et artériolaire sont ensuite mesurées à partir de coupes de muscles de 7 μ m d'épaisseur. Les coupes sont gardées à -80°C avant d'être traitées. Chaque lame est d'abord séchée puis réhydratée au PBS. Les coupes sont saturées dans du PBS/BSA pendant 45 min puis incubées toute la nuit à 4°C avec un anticorps monoclonal (1/50^e) dirigé contre l' α -actine des cellules musculaires lisses pour identifier les artérols ou avec un anticorps polyclonal

(1/100^e) dirigé contre PECAM pour identifier les capillaires. Le lendemain, après 3 rinçages, l'anticorps secondaire (Fluoprobe Goat 488 Anti-Rabbit lié au FITC-1/200e) est déposé à l'obscurité sur chacune des coupes pendant 1h30 : les artérioles et les capillaires, en vert sur les coupes, sont alors visualisés sous microscope à épi fluorescence (Nikon Eclipse TE 2000-S avec QED in vivo Software). Un comptage des capillaires et des artérioles est ensuite effectué en aveugle et le rapport ischémié/non-ischémié est alors calculé pour chacun des groupes.

Les différents temps du protocole

Le Sildenafil



Mesures effectuées après sacrifice de l'animal:

- Densité vasculaire
- Densité capillaire et artériolaire
- Étude biochimique

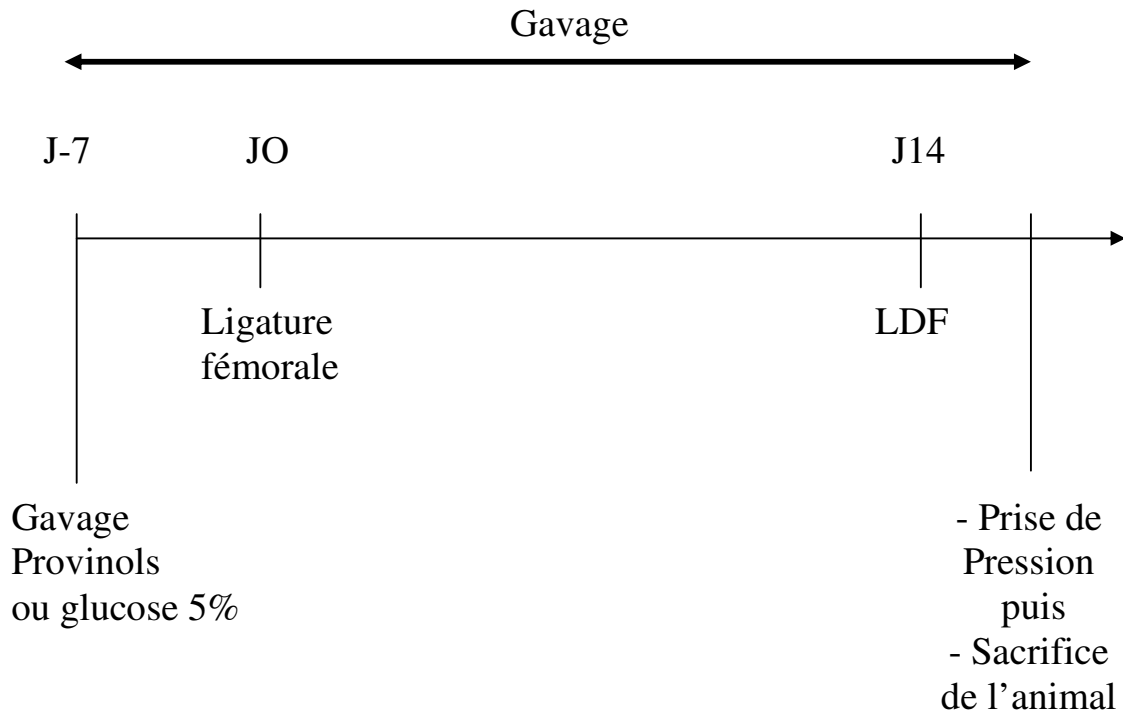
I.2. Effet des Polyphenols du vin rouge sur la revascularisation

Pour ce protocole, la marche à suivre reste la même que pour le protocole sildenafil à quelques exceptions près. Le Provinols, contrairement au sildenafil, est dilué dans du glucose 5%. L'étude a été réalisée sur 3 groupes traités en gavage : le premier groupe reçoit de fortes doses de ProvinolsTM (high dose-HD- 20mg/kg/j/21j), le second de faibles doses de ProvinolsTM (Low dose -LD- 0.2mg/kg/j/21j). Le troisième groupe, groupe contrôle, reçoit en gavage 1ml de Glucose 5%. Une dose intermédiaire de Provinols (2mg/kg/j/21J) a également été testée mais seules la densité vasculaire et la mesure des débits cutanés ont été faites.

Pour mettre en évidence un effet des Polyphenols sur la revascularisation post-ischémique, les animaux ont été traités préventivement pendant 7 jours (J-7). A J0, la ligature de l'artère fémorale gauche est réalisée dans les mêmes conditions que le protocole Sildenafil. Les animaux sont ensuite sacrifiés 15 jours après la ligature (J15). Comme pour le protocole Sildenafil, des mesures de pression artérielle et de débits sanguins de chacune des pattes ont été réalisées avant sacrifice de l'animal. Après prélèvement des muscles des pattes et de l'aorte, des études biochimiques et histologiques ont ensuite été effectuées.

Les différents temps du protocole

Les polyphenols



Mesures effectuées après sacrifice de l'animal:

- Densité vasculaire
- Densités capillaire et artériolaire
- Étude biochimique

II. Réactivité des artères de résistance

La réactivité des artères de résistance a été testée pour les travaux de collaborations. Après prélèvement des mésentères, les artères sont ensuite disséquées pour être montées sur artériographe. Pour le protocole sildenafil, nous avons monté des artères mésentériques pour étudier le remodelage des artères. Par conséquent, nous avons mesuré le diamètre passif des artères.

II.1. Artériographie

Les réactivités vasculaires à la pression et au flux sont étudiées à l'aide d'un artériographe. Un segment d'artère mésentérique est isolé puis canulé in vitro dans un artériographe. Ce segment est visualisé sur un moniteur relié à un système d'analyse d'images qui permet de mesurer le diamètre interne du vaisseau [316]. Le débit est contrôlé par une pompe située en amont du vaisseau (pompe 1). La pression est mesurée en amont (P₁) et en aval (P₂) du vaisseau. La pression moyenne entre P₁ et P₂ est contrôlée par un système de servo-contrôle. Ce système permet de faire varier indépendamment la pression et le débit intraluminaux. Les artères sont plongées dans un milieu physiologique (PSS), à pH 7.4, de composition suivante : 135mM NaCl, 15mM NaHCO₃, 4.6mM KCl, 1.5mM CaCl₂, 1.2mM MgSO₄, 11mM glucose; 10mM N-2-hydroxy-ethylpiperazine-N-2-ethylsulfonic acid (HEPES) bullé en permanence à 37°C avec un mélange de 75% O₂, 20% N et 5% CO₂.

La dilatation flux-dépendante et la relation pression-diamètre sont étudiées en présence de l'endothélium. Pour la dilatation au flux, l'artère est précontractée à 50% de son diamètre par de la phényléphrine (PE: 10⁻²M) à une pression donnée de 75 mmHg. Après un plateau stable de pré-contraction, les paliers de flux sont déclenchés, de 3 à 100µl/min. Pour le tonus myogénique, des paliers de pression sont réalisés, de 10 à 150 mmHg de façon à obtenir un diamètre actif qui sera ensuite soustrait au diamètre passif effectué en fin de manipulation.

À la fin de chaque expérience, le PSS est changé pour une solution riche en EGTA 2mM où le calcium extracellulaire est absent. Du nitroprussiate de sodium (100 µM) est rajouté dans la cuve afin de mesurer le diamètre passif du vaisseau totalement dilaté. Le tonus myogénique et la dilatation flux dépendante peuvent ainsi être calculés.

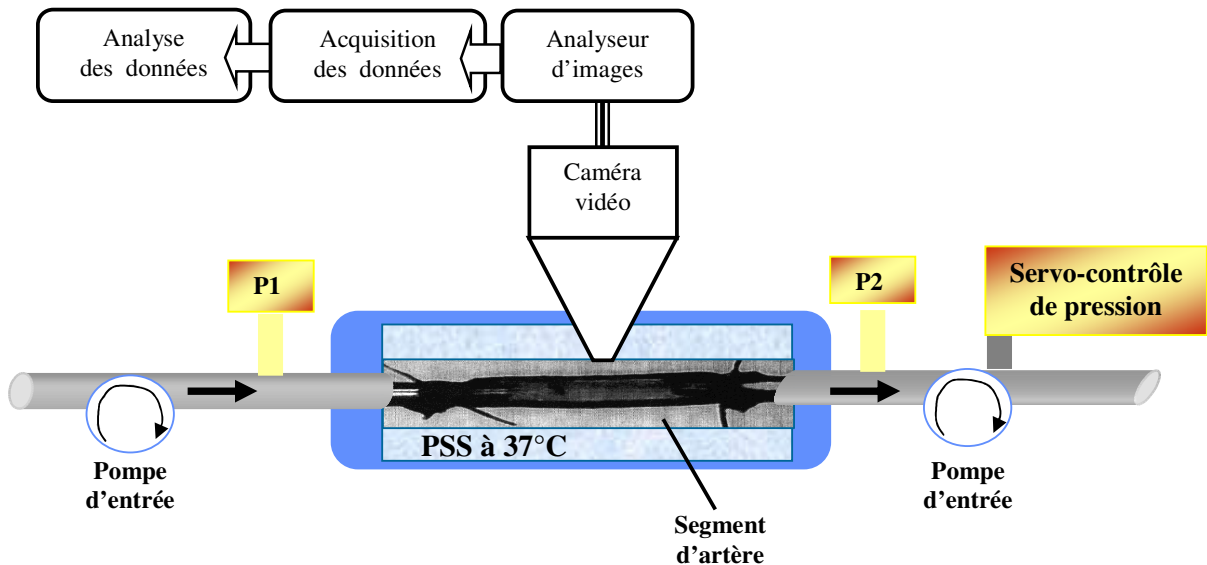


Figure 16 : Schéma représentant une cuve d'artériographe dans laquelle une artère mésentérique est montée sur pipette.

II.2. Acquisition des données

Toutes les données ont été enregistrées à l'aide du logiciel Acqknowledge. Les capteurs de pression étaient reliés à une Biopac.

II.3. Biochimie : SDS PAGE et Western blotting

Le broyage des muscles et de l'aorte se fait à température ambiante dans du tampon de lyse [500mM Tris-HCl pH 7.4, 20% de SDS (sodium dodecyl sulfate), 100mM orthovanadate de sodium, et inhibiteurs de protéases] à l'aide d'un polytron (Polytron Pro 250, Bioblock Scientific, Illkirch, France).

Après centrifugation à 14 000 rotations par minute (rpm) pendant 15 minutes à 15°C, les protéines sont dosées selon la méthode Pierce (BCA protein assay kit). Les lysats contenant 20µg de protéines sont complétés par 70% de tampon Laemmli, dénaturés pendant 5

minutes puis déposés dans un gel de polyacrylamide. Les protéines sont ensuite transférées, pendant 1h30 à 4°C, sur une membrane de nitro-cellulose. Après saturation (2 heures) dans du TBS-T [Tris 100mM pH7,4, NaCl 150mM, Tween 0,1%] en présence de lait écrémé (5%) ou de BSA (Bovin Serum Albumin 2%), les membranes sont incubées avec les anticorps primaires dirigés contre les protéines eNOS, P-eNOS, Akt, P-Akt, HSP 90, Caveolin-1 (Transduction laboratories, 1/8000), RhoA ou α -actine (Santa Cruz, 1/2000) pendant toute la nuit. Les membranes sont ensuite rincées (3 fois pendant 10 min) dans du TBS-T et incubées à température ambiante pendant 1h30 avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase (IgG anti-mouse 1/1000 ou anti-rabbit 1/2000, Amersham). La peroxydase est révélée par chimiluminescence, après rinçage dans du TBS-T (3 fois pendant 10 min), grâce à un kit de détection (ECL-Plus Chemiluminescence kit, Amersham ou femto pour détecter les signaux les plus faibles) et détectée à l'aide du système Fujifilm Las-3000. Les résultats obtenus sont normalisés par rapport à l'actine, permettant d'attester d'un dépôt régulier d'une même quantité de protéines.

II.4. Zymographie

L'activité enzymatique des MMPs dans les extraits protéiques obtenus comme décrit précédemment est analysée par zymographie dans un gel fin de polyacrylamide copolymérisé avec 1 mg/ml de gélatine. Les échantillons sont déposés avec un volume de tampon de dilution de l'échantillon. Après migration, les gels sont incubés 30 min à température ambiante dans une solution de renaturation (2.5% Triton X-100) sous agitation lente. Une incubation sur la nuit à 37°C dans un tampon Tris-base (pH 7.5) contenant du CaCl₂ est ensuite nécessaire. Le lendemain, les gels sont colorés une heure sous agitation lente avec du bleu de Coomassie dans une solution contenant 20% d'éthanol et 10% d'acide acétique puis sont décolorés dans cette même solution ne contenant pas de colorant afin de révéler l'activité enzymatique des MMPs.

II.5. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur standard (sem). Une différence significative entre deux groupes est déterminée par analyse de variance (ANOVA à un ou deux facteurs, ou ANOVA pour mesures répétées), suivi d'un post-test de Bonferroni pour comparer la significativité des différents groupes. Un test t de Student est utilisé pour comparer les moyennes entre deux groupes. Une valeur de P inférieure à 0.05 est considérée comme significative.

Résultats

Présentation des travaux

Article 1:

Sildenafil induced-revascularization of rat hindlimb involves PI3K/AKT/eNOS dependent arterial remodeling.

Baron-Menguy C, Bocquet A, Guihot AL, Toutain B, Rolli-Derkinderen M, Chappard D, Pacaud P, Loirand G, Henrion D, Loufrani L. *En soumission.*

Les maladies ischémiques périphériques touchent un grand nombre de personnes dans le monde et le risque de développer ces maladies augmente avec des pathologies comme le diabète ou l'hypertension. Les perspectives thérapeutiques chez les patients souffrant de ces pathologies sont de favoriser l'angiogenèse ou l'artériogenèse dans les tissus ischémiés. L'angiogenèse est un processus clé permettant la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. En conditions ischémiques, l'hypoxie et l'inflammation induisent une augmentation de VEGF, qui stimule la voie de la NOS endothéliale et donc la production de NO. L'artériogenèse, quant à elle, se définit comme étant la croissance d'artères collatérales fonctionnelles à partir d'anastomoses artério-artériolaires pré-existantes [317]. Le shear stress, et non l'ischémie, est alors le principal stimulus de l'artériogenèse. La voie de signalisation dépendante de RhoA et la voie NO/PKG, connues comme étant des déterminants essentiels du tonus vasculaire, jouent également un rôle important dans les mécanismes de néovascularisation.

Le sildenafil, en inhibant la PDE5, empêche la dégradation du cGMP, ce qui induit l'activation de la PKG et provoque la relaxation du muscle lisse vasculaire. De plus, la PKG activée entraîne une baisse d'activité de RhoA-GTP en favorisant son accumulation dans le cytoplasme. Des études ont mis en évidence que le sildenafil améliore l'angiogenèse après ischémie cérébrale [224,318] mais les mécanismes cellulaires et moléculaires restent encore flous. Le but de notre étude a donc été de mettre en évidence, dans un modèle de ligature de l'artère fémorale, que le sildenafil favorise la revascularisation post-ischémique. Une étude des voies de signalisation impliquées dans cette revascularisation complète ce travail.

Après 7 jours de ligature, la densité vasculaire dans le groupe contrôle est de $33 \pm 2\%$ contre $47 \pm 4\%$ dans le groupe traité au sildenafil. De plus, une augmentation significative des débits sanguins cutanés, évalués par débitmétrie laser Doppler, est également observée avec le sildenafil. Enfin, une étude histologique confirme que le sildenafil améliore la densité

artériolaire comparativement au groupe contrôle, sans toutefois modifier la densité capillaire. L'augmentation de la revascularisation post-ischémique observée à 7 jours est confirmée après 21 jours de traitement au sildenafil.

Une étude biochimique des voies impliquées dans l'angiogenèse est réalisée sur les broyats de muscles. Dans le groupe contrôle, après 7 jours de ligature, seule une diminution de la caveolin-1 est observée, suggérant la mise en place du système. Après 21 jours, la voie PI3K/Akt-NO est active. Contrairement au groupe contrôle, la voie PI3K/Akt-NO est augmentée dès 7 jours de traitement au sildenafil et down-réglée après 21 jours. Pour vérifier l'implication de la voie PI3K, une étude in vitro a permis de mettre en évidence que la migration des cellules stimulées par le sildenafil est significativement diminuée en présence de LY294002, un inhibiteur de PI3K.

Notre étude montre que le sildenafil n'affecte pas les niveaux d'expression de HIF (marqueur d'hypoxie) et de VEGF. Nous avons donc voulu voir si le VEGF, facteur majeur du processus angiogénique, était impliqué dans la revascularisation observée. Après traitement des animaux 3 fois par semaine avec un anticorps neutralisant anti-VEGF, les densités vasculaire et artériolaire sont significativement diminuées dans le groupe contrôle alors que le neutralisant VEGF n'a aucun effet sur les animaux traités au sildenafil. Le VEGF n'intervient donc pas dans la revascularisation induite par le sildenafil.

Enfin, nous avons regardé l'effet du sildenafil sur les artères mésentériques : l'inhibiteur de PDE5 induit une augmentation du flux sanguin associé à une augmentation du diamètre des artères de résistance. Le sildenafil induit donc un remodelage vasculaire.

Ces résultats montrent que le sildenafil améliore la revascularisation post-ischémique par des propriétés non pas pro-angiogéniques mais pro-artériogéniques.

Article 2:

Phosphorylation of serine 188 protects RhoA from ubiquitin/proteasome-mediated degradation in vascular smooth muscle cells.

Rolli-Derkinderen M, Sauzeau V, Boyer L, Lemichez E, **Baron C**, Henrion D, Loirand G, Pacaud P. *Circ Res.* 2005 Jun 10; 96(11):1152-60.

Le tonus vasculaire résulte de l'équilibre entre vasodilatation et vasoconstriction. Au cours d'une hypertension artérielle, cet équilibre est rompu en faveur des vasoconstricteurs. L'hypertension, facteur important de risque cardiovasculaire, est ainsi associée à un nombre important de changements structuraux et fonctionnels de la paroi des vaisseaux sanguins. Ils sont, entre autre, caractérisés par une contraction excessive, une croissance et une prolifération importante des cellules musculaires lisses (CML), ce qui conduit à une augmentation de l'épaisseur de la paroi vasculaire. Différentes études ont mis en évidence que l'activation de RhoA, petite protéine G, joue un rôle important dans la survenue de l'hypertension. Par exemple, l'expression de Rho et son activité sont augmentées dans l'aorte des rats spontanément hypertendus [319] et l'inhibition spécifique de ROCK empêche la contraction des CML induite par un agoniste et réduit la PAM de ces rats [320].

Le niveau d'expression de RhoA est également régulé par la voie NO/PKG, PKG phosphorylant RhoA en Ser188 et inhibant ainsi les fonctions dépendantes de RhoA [105,228,321]. La voie d'activation et de désactivation de RhoA reste cependant complexe. Le but de ce travail a donc été de mettre en évidence que la phosphorylation de RhoA en Ser188, par la PKG, protège RhoA, et plus particulièrement sa forme active, de la dégradation par le protéasome dans les CML vasculaires.

Les fibroblastes Swiss 3T3, qui expriment la PKG, sont transfectés avec la forme sauvage de RhoA (WT-RhoA). Après stimulation de ces cellules avec un analogue du cGMP, la dégradation de RhoA endogène est bloquée, augmentant le niveau d'expression de RhoA. Toutefois, le cGMP n'affecte pas la forme phosphorylée de RhoA. D'autre part, des mesures de demi-vie de la protéine, phosphorylée ou non, ont mis en évidence une stabilité plus importante de la forme phosphorylée, sa dégradation étant plus lente. La localisation de la protéine jouant un rôle important, différentes formes de RhoA ont été recherchées dans les fractions cytosolique et membranaire. Les formes actives sont retrouvées principalement dans la fraction membranaire alors que les formes phosphorylées se retrouvent dans le cytosol. Des études suggèrent que la phosphorylation de la Ser188 favorise l'interaction avec Rho-GDI

[322]. Dans notre étude, les formes phosphorylées sont associées à Rho-GDI alors que la coimmunoprécipitation de la forme active avec Rho-GDI est diminuée de 50% par rapport à WT-RhoA. Par conséquent, la phosphorylation de la Ser188 dans les cellules intactes est suffisante pour extraire constitutivement la forme active RhoA-GTP de la membrane vers le cytosol et pour promouvoir la liaison de RhoA-GTP active à Rho-GDI endogène. Une meilleure stabilité de la forme phosphorylée est donc associée à une redistribution de la protéine dans la fraction cytosolique.

La dégradation de RhoA jouant un rôle essentiel dans la régulation de la protéine, il est important de regarder le niveau d'ubiquitination de la protéine.

Les résultats montrent une ubiquitination fortement diminuée de la forme phosphorylée suggérant que la phosphorylation de la Ser188 rend RhoA moins sensible à l'ubiquitination. La lactacystine, un inhibiteur de protéasome, induit une accumulation dans le temps de RhoA. Ces données suggèrent que l'activité de kinases qui phosphorylent RhoA sur la Ser188 dans les cellules intactes protège RhoA de sa dégradation par le protéasome ; ce mécanisme participe au contrôle des niveaux protéiques de RhoA dans les CML vasculaires.

Cette étude *in vitro* met en évidence un rôle protecteur majeur de la phosphorylation de la Ser188 contre la dégradation de la forme active (GTP) de RhoA via une interaction plus forte avec RhoGDI. Ces résultats ont ensuite été vérifiés *in vivo*, sur des artères pulmonaires de rats traités au sildenafil (25mg/kg) et au L-NNA. Le sildenafil, un inhibiteur de PDE5, est utilisé pour stimuler la voie cGMP/PKG et le L-NNA pour inhiber la production de NO et déprimer la voie cGMP-PKG. Cette étude montre que le sildenafil augmente le niveau d'expression de RhoA et de RhoA phosphorylée, cette dernière co-immunoprécipitant avec RhoGDI. Nous obtenons l'effet inverse avec le L-NNA. Les résultats obtenus *in vitro* sont donc confirmés *in vivo*, à savoir que PKG activée phosphoryle RhoA régulant son interaction avec RhoGDI.

Article 3:

Effects of red wine polyphenols on postischemic neovascularization model in rats: low doses are proangiogenic, high doses anti-angiogenic.

Baron-Menguy C, Bocquet A, Guihot AL, Chappard D, Amiot MJ, Andriantsitohaina R, Loufrani L, and Henrion D. *FASEB J.* 2007 Jun 26.

De nombreuses études épidémiologiques ont montré une corrélation inverse entre risque cardiovasculaire et consommation de composés polyphénoliques d'origine naturelle. Ainsi, il a été proposé que la faible incidence du risque ischémique coronarien observée en France pourrait être due aux propriétés bénéfiques des composés polyphénoliques présents dans le vin rouge, phénomène encore connu sous le nom de "Paradoxe français" [273-276]. Les mécanismes des effets protecteurs du vin rouge sur les maladies coronariennes ne sont que partiellement élucidés. Les polyphenols activent la NO synthase endothéliale et la libération de NO [323,324]. De même, le vin rouge améliore la fonction endothéliale des patients ayant des maladies coronariennes [325]. Ces données suggèrent des processus pro-angiogéniques. Paradoxalement, les polyphenols du vin rouge sont aussi reconnus pour posséder des propriétés anti-angiogéniques en inhibant la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires [326]. Cao Y (1999) a aussi démontré que l'épigallocatechin (EGCG), un constituant du thé vert, bloque la croissance des cellules endothéliales *in vitro* et inhibe la formation de nouveaux vaisseaux sanguins[327].

Le but de notre étude a donc été de mettre en évidence que les effets paradoxaux des polyphenols rapportés dans la littérature sont dus à un effet dose-dépendant des polyphenols. Nous avons testé 3 doses de polyphenols : 20mg/kg/j (forte dose), 2mg/kg/j (dose intermédiaire) et 0.2mg/kg/j (faible dose). Après 15 jours de ligature, la densité vasculaire est de $67.5 \pm 4.5\%$ dans le groupe contrôle. La forte dose de polyphenols diminue significativement la densité vasculaire à $38.4 \pm 2.5\%$ alors que la faible dose favorise la revascularisation ($119.5 \pm 15.8\%$). La dose intermédiaire donnant des résultats comparables à ceux obtenus dans le groupe contrôle, aucune étude biochimique n'a été effectuée pour ce groupe. Après un traitement à forte dose, la baisse de revascularisation est associée à une diminution d'expression de PI3K/Akt et une diminution de l'activation des MMPs. L'effet pro-angiogénique des polyphenols implique une activation de ces mêmes voies, le niveau d'activation des MMP étant toutefois comparable au groupe contrôle. Enfin, le Provinols étant un mélange de plusieurs composés polyphénoliques, nous avons voulu déterminer quel

polyphenol était responsable des différents effets observés. Des études ont montré que la delphinidine possède de puissants effets anti-angiogéniques [328,329]. Nous avons voulu savoir si dans notre modèle, la delphinidine pouvait être responsable des effets paradoxaux des polyphenols. Dans notre étude, une forte dose de delphinidine inhibe la revascularisation post-ischémique alors qu'une faible dose permet seulement de revenir au niveau des contrôles. Ces résultats suggèrent que la delphinidine est responsable des effets anti-angiogéniques des polyphenols mais pas des effets pro-angiogéniques.

Nous avons donc mis en évidence un effet pro et anti-angiogénique des polyphenols dans un modèle d'angiogenèse post-ischémique.

Discussion

Le sildenafil, inhibiteur de la PDE5, présente un intérêt thérapeutique important dans de nombreuses pathologies. A l'heure actuelle, il est principalement utilisé dans les problèmes de dysfonction érectile où il augmente l'afflux de sang dans le pénis. Le sildenafil régule positivement le niveau d'expression de RhoA en activant la voie NO/PKG. Les voies RhoA/Rho-kinase NO/PKG, connues comme étant des déterminants essentiels du tonus vasculaire, jouent un rôle important dans les mécanismes de néovascularisation. Nous avons donc regardé les effets du sildenafil dans une autre pathologie, l'ischémie de la patte. Pour la première fois, nous avons démontré que le sildenafil favorise non pas l'angiogenèse mais l'artériogenèse, ce qui est confirmé par la présence d'un remodelage vasculaire mésentérique. Dans notre étude, ce remodelage se traduit par une augmentation de la lumière du vaisseau. Dans certaines pathologies comme l'HTAP, le remodelage peut s'avérer néfaste. L'HTAP est une maladie complexe et multifactorielle qui se caractérise par une augmentation de la vasoconstriction et donc des résistances pulmonaires. Une exposition chronique à une hypoxie provoque une hypertension pulmonaire importante associée à des changements fonctionnels et structuraux du lit artériel pulmonaire. L'hypoxie induit entre autre une augmentation de la voie Rho-kinase, elle-même down-régulant le niveau d'expression et l'activité de la NOSe [330]. L'utilisation d'un inhibiteur de Rho-kinase réduit le développement de l'HTAP hypoxique [331]. Le sildenafil, et plus largement la voie NO/cGMP, en régulant l'expression de RhoA, semble donc être une cible majeure dans le traitement de l'HTAP. Une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de RhoA par le sildenafil est donc nécessaire afin de mieux appréhender des pathologies comme l'HTAP et les effets du sildenafil sur le remodelage vasculaire en général. Un travail réalisé en collaboration a eu pour but d'analyser le cycle d'activation/désactivation de RhoA dans l'HTAP et l'action du sildenafil sur RhoA. Ce travail nous a ainsi permis de mieux connaître l'action du sildenafil sur l'angiogenèse. Nous avons montré un effet protecteur du sildenafil, puissant vasodilatateur, dans l'ischémie des membres inférieurs. Nous avons voulu tester l'effet d'un autre vasodilatateur, le Provinols, sur l'ischémie de la patte. Des études ont mis en évidence les effets protecteurs des polyphénols dans l'ischémie cérébrale ou cardiaque, suggérant des propriétés pro-angiogéniques des polyphénols [282,325]. Paradoxalement, les polyphénols du vin rouge sont aussi connus pour posséder leurs propriétés anti-angiogéniques. Dans notre étude, nous montrons pour la première fois dans un modèle in vivo un effet dose-dépendant des polyphénols : à forte dose, les polyphénols inhibent l'angiogenèse alors qu'à faible dose, nous découvrons leurs propriétés pro-angiogéniques.

Des nombreuses études ont mis en évidence un effet pro-angiogénique du sildenafil dans des modèles *in vitro* et *in vivo* [224,226,227,332]. Nous avons tout d'abord confirmé l'effet bénéfique du sildenafil sur la revascularisation post-ischémique dans un modèle de ligature de l'artère fémorale. Contrairement aux autres études, nous montrons que le sildenafil augmente significativement cette revascularisation dès 7 jours de traitement, résultat confirmé après 21 jours. Nous n'avons cependant pas observé de modification de la densité capillaire comme dans l'étude de Ladha et al (2005) sur la dysplasie bronchopulmonaire[333]. Toutefois, la dose de sildenafil utilisée est bien supérieure à la nôtre (100mg/kg/j). Nos résultats suggèrent un effet pro-artériogénique et non pro-angiogénique du sildenafil. En approfondissant les mécanismes, nous avons ensuite démontré que cette revascularisation s'accompagne après 7 jours de traitement d'une activation de la voie PI3K/Akt et d'une augmentation de l'activité de la NOS endothéliale. Ces mêmes voies sont down-régulées après 21 jours. En revanche, dans le groupe contrôle, la voie PI3K/Akt-NO n'est active qu'après 21 jours de ligature. L'utilisation du LY 294002, un inhibiteur de PI3K, nous a permis de confirmer *in vitro* l'implication de PI3K dans la migration des cellules stimulées par le sildenafil. De plus, une étude sur des neurosphères a démontré que le sildenafil induit la phosphorylation d'Akt [225]. Notre étude montre une augmentation du niveau d'expression d'Akt total et de P-Akt : le sildenafil favorise donc la revascularisation post-ischémique en activant la voie de signalisation PI3K/Akt-NO dès 7 jours de traitement. Nous n'avons pas observé d'augmentation du niveau d'expression de HIF et VEGF, suggérant qu'ils ne sont pas impliqués dans la revascularisation induite par le sildenafil. Après traitement des groupes contrôle et sildenafil avec un anticorps neutralisant anti-VEGF, nous avons démontré pour la première fois que le sildenafil augmente la revascularisation par un mécanisme VEGF-indépendant, contrairement au groupe contrôle. Senthilkumar et al (2007) a récemment mis en évidence l'effet pro-angiogénique du sildenafil : cet auteur conclut à un mécanisme PKG-dépendant et NO-indépendant, le traitement de souris KO pour les NOS inducible et endothéliale n'induisant aucun effet sur la revascularisation [227]. En conditions ischémiques, l'hypoxie et l'inflammation induisent une augmentation de VEGF, qui stimule la voie de la NOS endothéliale et donc la production de NO. Les résultats de Senthilkumar et al suggèrent donc que le VEGF n'est pas impliqué dans cette revascularisation. De plus, Deindl a démontré qu'après une occlusion de l'artère fémorale chez le lapin, la revascularisation observée ne faisait pas intervenir HIF et VEGF, mettant en jeu un processus artériogénique, tout comme dans notre étude. Nos résultats montrent également une augmentation significative du flux sanguin et de la densité vasculaire des pattes non ischémisées. Par

conséquent, le sildenafil, sans agir sur le niveau d'expression de HIF et VEGF, induit une vasodilatation des vaisseaux sanguins en augmentant les niveaux de cGMP. La stimulation du shear stress active la voie PI3K/Akt, induit une augmentation de la NOSe (activité et expression), favorisant ainsi un processus artériogénique à un processus angiogénique [334]. Pour confirmer les propriétés pro-artériogéniques du sildenafil, nous avons regardé l'effet de ce traitement dans un territoire purement vasculaire, les artères mésentériques. Après 21 jours de traitement avec le sildenafil, des mesures de débits sanguins mettent en évidence une augmentation du flux mésentérique, suggérant une augmentation du shear stress. Ce dernier entraîne alors à long terme une augmentation du diamètre des artères mésentériques et donc un remodelage artériel. Le shear stress active la voie PI3K/Akt [335] et augmente l'expression d'HSP 90 [336], ce qui conduit à la phosphorylation de eNOS [337]. Cette activation nécessite la dissociation de la NOS endothéliale et de CAV-1 [338]. Utilisée à une dose non pressive, l'hydralazine, connue pour ses propriétés vasodilatatrices, augmente le flux local et induit un remodelage [339]. De même, la ligature d'une artère mésentérique induit une augmentation du flux entraînant alors un remodelage expansif [340]. Ce remodelage s'accompagne d'une augmentation du niveau d'expression de eNOS et la vasodilatation NO-dépendante est ainsi améliorée [341]. Le shear stress peut ainsi être activé soit par un puissant vasodilatateur soit par ligature artérielle : la variation de flux induit alors un remodelage qui fait appel à un processus purement artériogénique, comme dans notre étude. Nous avons donc démontré pour la première fois que le sildenafil favorise un remodelage artériogénique.

Le sildenafil, en plus de son effet vasodilatateur dû à l'activation de la voie NO/PKG, régule positivement le niveau d'expression de RhoA. Les voies de signalisation dépendantes de RhoA et la voie NO/PKG sont identifiées comme des déterminants essentiels du tonus vasculaire. De précédentes études ont mis en évidence que PKG, en phosphorylant RhoA en Ser188, inhibe ses fonctions mais régule aussi positivement son expression [105,228,321]. Notre étude va plus loin et met en évidence une régulation plus complexe de RhoA. En effet, elle montre que la phosphorylation en Ser188 maintient RhoA dans le cytosol par sa liaison à Rho-GDI, et protège ainsi la protéine de la dégradation protéasomale par l'ubiquitine. La dégradation de RhoA est un processus physiologique présent à l'état basal qui peut être considéré comme un premier niveau de régulation. L'ubiquitination représente ici un deuxième niveau de régulation de la protéine, augmentant la complexité du contrôle de la voie RhoA/Rho-Kinase.

Ce travail nous a donc permis de mieux comprendre l'effet du sildenafil dans la revascularisation post-ischémique, à savoir qu'en diminuant l'activité de la voie RhoA/Rho-Kinase, il favorise d'autant plus la voie du NO. Nous avons voulu tester un autre puissant vasodilatateur, le Provinols, qui lui n'est pas connu pour influencer directement la voie RhoA/Rho-kinase.

Le Provinols, mélange de plusieurs composés polyphénoliques du vin rouge, est connu pour ces effets anti-tumoraux et anti-angiogéniques par inhibition de l'activité des MMPs et du VEGF [282]. Nous avons voulu vérifier cet effet anti-angiogénique dans un modèle in vivo de revascularisation post-ischémique. Une dose de 20mg/kg/j/21j, qui équivaut à 5-6 verres de vin rouge, entraîne une diminution de la revascularisation par inhibition de VEGF, de la voie PI3K/Akt et de l'activité des MMPs : l'activation du processus angiogénique est alors bloquée. Paradoxalement, le vin rouge est également connu pour protéger tant contre l'ischémie cardiaque que cérébral, suggérant un mécanisme pro-angiogénique. Selon la dose utilisée, les polyphénols du vin rouge possèderaient-ils également des propriétés pro-angiogéniques ? Pour le savoir, nous avons testé deux autres doses : avec 2mg/kg/j de Provinols (1 ou 2 verres), nous obtenons un effet comparable à ceux des contrôles alors qu'une dose de 0.2mg/kg/j (moins d'un verre) induit une augmentation significative de la revascularisation post-ischémique. L'activation des voies VEGF et PI3K/Akt-NO, associée au maintien de l'activité des MMPs favorise l'effet pro-angiogénique des polyphénols. Par conséquent, nous avons mis en évidence un effet dose-dépendant des polyphénols du vin rouge : à forte dose, les polyphénols induisent un effet anti-angiogénique, intéressant à exploiter dans les thérapies anti-cancéreuses ou dans la lutte contre la progression des plaques d'athérosclérose, et à faible dose, les polyphénols permettent d'activer les voies de l'angiogenèse. Cet effet dose dépendant des polyphénols fournit pour la première fois une explication au paradoxe français. En effet, nous supposons que l'absorption des polyphénols est différente en fonction des territoires concernés, favorisant ainsi les effets anti- ou pro-angiogéniques. Le Provinols est un mélange de composés polyphénoliques. La delphinidine est l'un de ses composés dont les propriétés anti-angiogéniques ont largement été démontrées [328,329]. Dans notre étude, la delphinidine à forte dose inhibe la revascularisation post-ischémique alors qu'à faible dose, l'effet est comparable au groupe contrôle. Par conséquent, nous avons mis en évidence que la delphinidine est responsable de l'effet anti-angiogénique des polyphénols utilisés à fortes doses. Toutefois, nos résultats ne nous permettent pas d'attribuer à la delphinidine seule les propriétés pro-angiogéniques des polyphénols.

Les deux traitements testés, le sildenafil et le Provinols, favorisent la revascularisation post-ischémique mais par des mécanismes distincts : le sildenafil induit un effet pro-artériogénique alors que les polyphenols ont un effet pro-angiogénique. Pourquoi ? Comment pourrait-on expliquer cette différence ? De précédentes études ont montré un effet pro-angiogénique du sildenafil [224,226,227,332], avec augmentation de la densité capillaire [333] et du VEGF [225]. Dans ces études, la dose utilisée est beaucoup plus faible (entre 2 et 10 mg/kg/j) excepté pour Ladha et al (100 mg/kg/j) [333]. De plus, Wang et al ont mis en évidence un effet dose-dépendant du sildenafil sur le niveau d'expression du VEGF [225]. Le sildenafil est connu pour augmenter le flux sanguin et donc le shear stress sur les cellules endothéliales [312], ce qui permet alors l'activation de la NOSe. Par conséquent, nous pouvons émettre l'hypothèse que le niveau de shear stress dépend de la dose utilisée : plus on augmente les doses de sildenafil, plus on augmente le shear stress et la production de NO, favorisant ainsi le remodelage vasculaire.

Utilisés à forte dose, les polyphenols, augmentent l'activation de la NOSe et de la voie PI3K/Akt [276,288], tout comme le shear stress [341]. Nous pouvons donc penser que de fortes doses de polyphenols, en augmentant les voies NO et PI3K/Akt, induirait un remodelage artériel. Cependant, des études ont également rapporté que les polyphenols du vin rouge empêchent l'activation de la MMP-2 induite par la thrombine [285]. Sans MMPs actives, le remodelage artériel est inhibé [342]. En diminuant la dose de polyphenols, nous levons l'inhibition de l'activité des MMP qui devient alors comparable à celle des contrôles. Le shear stress est le stimulus majeur de l'expression de la NOSe dans les cellules vasculaires [343]. Une dose plus faible de polyphenols induirait un shear stress moins important et donc une activation moindre de la NOSe. Le faible niveau de shear stress ne serait plus suffisant pour activer l'artériogénèse, favorisant alors un mécanisme angiogénique. Pour vérifier l'hypothèse que la nature du remodelage dépend du niveau de shear stress, des expérimentations supplémentaires sont nécessaires. Dans un premier temps, il faudrait étudier l'effet d'une dose plus faible de sildenafil sur la revascularisation post-ischémique et sur le remodelage artériel. Dans un second temps, une mesure des débits mésentériques après traitement avec du sildenafil et du Provinols permettrait d'évaluer le shear stress et de voir si les artères sont remodelées. Enfin, si notre hypothèse se confirme, il serait intéressant de connaître quel(s) mécano-senseur(s) est (sont) impliqués dans la réponse au shear stress (RhoA, intégrines...).

Conclusions

Et

Perspectives

A l'heure actuelle, le sildenafil est essentiellement utilisé dans les problèmes de dysfonction érectile. De par son rôle important dans la régulation des voies NO/PKG et RhoA/Rho-kinase, le sildenafil devient également intéressant dans le traitement de l'hypertension pulmonaire. L'engouement pour les inhibiteurs de PDE5 ne s'arrête pas là. En effet, nous venons de mettre en évidence que le sildenafil améliore la revascularisation post-ischémique. Les pathologies ischémiques représentant une des premières causes de mortalité dans le monde, le sildenafil, et les inhibiteurs de PDE5 en général, offrent une nouvelle voie thérapeutique dans le traitement des maladies ischémiques. Les polyphénols, eux, présentent une double potentialité : anti-angiogénique à forte dose pour les thérapies anti-cancéreuses et pro-angiogénique à faible dose pour le traitement des maladies ischémiques. Leur utilisation offre en plus l'avantage d'être peu onéreuse.

De nombreuses études portent sur les effets à court terme du sildenafil. De par sa prise de plus en plus régulière, notamment dans le traitement de la dysfonction érectile mais aussi chez les alpinistes pour favoriser leur oxygénation, une étude à long terme permettrait de mieux gérer les traitements et de mieux connaître les éventuels effets secondaires du sildenafil. Nous avons montré que le sildenafil induit à long terme un remodelage artériel expansif. Une étude sur la carotide a montré que ce type de remodelage s'accompagne d'une hypertrophie de la paroi vasculaire [344]. Il serait donc intéressant de regarder si le sildenafil induit un remodelage expansif hypertrophique dans les artères mésentériques. Des études histologiques sont donc nécessaires pour éclaircir ce point. D'autre part, le sildenafil améliore la dilatation flux dépendante chez l'homme et diminue la PAM [211,345,346]. Il régule également la voie RhoA/Rho-kinase en diminuant l'activité de RhoA. Le sildenafil, en régulant les voies NO/PKG et RhoA/Rho-kinase, contrôle la balance vasodilatation/vasoconstriction et joue ainsi un rôle important dans le tonus vasculaire. Une étude de la réactivité vasculaire d'artères traitées avec un inhibiteur de PDE5 permettrait peut-être d'envisager l'utilisation du sildenafil dans le traitement de pathologie comme l'hypertension artérielle. Enfin, le sildenafil est vu comme un potentialisateur de l'effet du NO [333]. Il pourrait alors améliorer les effets des polyphénols, autre puissant vasodilatateur. Par conséquent, on pourrait envisager une étude sur l'effet du sildenafil et des polyphénols sur la revascularisation post-ischémique ou la réactivité vasculaire pour vérifier si le sildenafil potentialiserait l'effet des polyphénols.

Bibliographie

1. Wolinsky H, Glagov S. Nature of species differences in the medial distribution of aortic vasa vasorum in mammals. *Circ Res* 1967;20:409-21.
2. Clark JM, Glagov S. Transmural organization of the arterial media. The lamellar unit revisited. *Arteriosclerosis* 1985;5:19-34.
3. Fernando NV, Movat HZ. The Fine Structure Of The Terminal Vascular Bed. Ii. The Smallest Arterial Vessels: Terminal Arterioles And Metarterioles. *Exp Mol Pathol* 1964;33:1-9.
4. Burnstock G, Doyle AE, Gannon BJ, Gerkens JF, Iwayama T, Mashford ML. Prolonged hypotension and ultrastructural changes in sympathetic neurones following guanacline treatment. *Eur J Pharmacol* 1971;13:175-87.
5. Burnstock G. Purinergic nerves and receptors. *Prog Biochem Pharmacol* 1980;16:141-54.
6. Engerman RL, Pfaffenbach D, Davis MD. Cell turnover of capillaries. *Lab Invest* 1967;17:738-43.
7. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995;11:73-91.
8. Florey. The endothelial cell. *Br Med J* 1966;2:487-90.
9. Carlson TR, Feng Y, Maisonpierre PC, Mrksich M, Morla AO. Direct cell adhesion to the angiopoietins mediated by integrins. *J Biol Chem* 2001;276:26516-25.
10. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306-9.
11. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 1989;246:1309-12.
12. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, et al. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 1990;5:519-24.
13. Matthews W, Jordan CT, Gavin M, Jenkins NA, Copeland NG, Lemischka IR. A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:9026-30.
14. Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 1991;6:1677-83.
15. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 1989;84:1470-8.
16. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:851-8.
17. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983-5.
18. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991;5:1806-14.
19. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991;266:11947-54.

20. Lange T, Guttmann-Raviv N, Baruch L, Machluf M, Neufeld G. VEGF162, a new heparin-binding vascular endothelial growth factor splice form that is expressed in transformed human cells. *J Biol Chem* 2003;278:17164-9.
21. Bates DO, Harper SJ. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vascul Pharmacol* 2002;39:225-37.
22. Woolard J, Wang WY, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO, et al. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res* 2004;64:7822-35.
23. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18:4-25.
24. Melter M, Reinders ME, Sho M, Pal S, Geehan C, Denton MD, et al. Ligation of CD40 induces the expression of vascular endothelial growth factor by endothelial cells and monocytes and promotes angiogenesis in vivo. *Blood* 2000;96:3801-8.
25. Freeman MR, Schneck FX, Gagnon ML, Corless C, Soker S, Niknejad K, et al. Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Res* 1995;55:4140-5.
26. Olofsson B, Jeltsch M, Eriksson U, Alitalo K. Current biology of VEGF-B and VEGF-C. *Curr Opin Biotechnol* 1999;10:528-35.
27. Bellomo D, Headrick JP, Silins GU, Paterson CA, Thomas PS, Gartside M, et al. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (*Vegfb*) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res* 2000;86:E29-35.
28. Aase K, von Euler G, Li X, Ponten A, Thoren P, Cao R, et al. Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice display an atrial conduction defect. *Circulation* 2001;104:358-64.
29. Mould AW, Tonks ID, Cahill MM, Pettit AR, Thomas R, Hayward NK, et al. *Vegfb* gene knockout mice display reduced pathology and synovial angiogenesis in both antigen-induced and collagen-induced models of arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:2660-9.
30. Sun Y, Jin K, Childs JT, Xie L, Mao XO, Greenberg DA. Increased severity of cerebral ischemic injury in vascular endothelial growth factor-B-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004;24:1146-52.
31. Lohela M, Saaristo A, Veikkola T, Alitalo K. Lymphangiogenic growth factors, receptors and therapies. *Thromb Haemost* 2003;90:167-84.
32. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 2004;5:74-80.
33. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 2001;7:186-91.
34. Lyttle DJ, Fraser KM, Fleming SB, Mercer AA, Robinson AJ. Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol* 1994;68:84-92.
35. Wise LM, Veikkola T, Mercer AA, Savory LJ, Fleming SB, Caesar C, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:3071-6.
36. Junqueira de Azevedo IL, Farsky SH, Oliveira ML, Ho PL. Molecular cloning and expression of a functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF)

- from the *Bothrops insularis* pit viper. A new member of the VEGF family of proteins. *J Biol Chem* 2001;276:39836-42.
37. Takahashi H, Hattori S, Iwamatsu A, Takizawa H, Shibuya M. A novel snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF) predominantly induces vascular permeability through preferential signaling via VEGF receptor-1. *J Biol Chem* 2004;279:46304-14.
 38. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:9267-71.
 39. Persico MG, Vincenti V, DiPalma T. Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor (PlGF). *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;237:31-40.
 40. Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 1994;269:25646-54.
 41. Sawano A, Takahashi T, Yamaguchi S, Aonuma M, Shibuya M. Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor. *Cell Growth Differ* 1996;7:213-21.
 42. Iyer S, Leonidas DD, Swaminathan GJ, Maglione D, Battisti M, Tucci M, et al. The crystal structure of human placenta growth factor-1 (PlGF-1), an angiogenic protein, at 2.0 Å resolution. *J Biol Chem* 2001;276:12153-61.
 43. Christinger HW, Fuh G, de Vos AM, Wiesmann C. The crystal structure of placental growth factor in complex with domain 2 of vascular endothelial growth factor receptor-1. *J Biol Chem* 2004;279:10382-8.
 44. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001;7:575-83.
 45. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* 1999;13:9-22.
 46. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996;87:3336-43.
 47. Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* 1997;272:23659-67.
 48. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994;269:26988-95.
 49. Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:9349-54.
 50. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995;376:66-70.
 51. Inoue T, Kibata K, Suzuki M, Nakamura S, Motoda R, Orita K. Identification of a vascular endothelial growth factor (VEGF) antagonist, sFlt-1, from a human hematopoietic cell line NALM-16. *FEBS Lett* 2000;469:14-8.

52. Kendall RL, Wang G, Thomas KA. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226:324-8.
53. Shibuya M, Seetharam L, Ishii Y, Sawano A, Gotoh N, Matsushime H, et al. Possible involvement of VEGF-FLT tyrosine kinase receptor system in normal and tumor angiogenesis. *Princess Takamatsu Symp* 1994;24:162-70.
54. Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, Kimura A, Satow Y. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res* 1995;55:5687-92.
55. Marti HH, Risau W. Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:15809-14.
56. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995;376:62-6.
57. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, et al. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:3566-70.
58. Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, et al. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* 1998;282:946-9.
59. Kubo H, Fujiwara T, Jussila L, Hashi H, Ogawa M, Shimizu K, et al. Involvement of vascular endothelial growth factor receptor-3 in maintenance of integrity of endothelial cell lining during tumor angiogenesis. *Blood* 2000;96:546-53.
60. He Z, Tessier-Lavigne M. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 1997;90:739-51.
61. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998;92:735-45.
62. Makinen T, Olofsson B, Karpanen T, Hellman U, Soker S, Klagsbrun M, et al. Differential binding of vascular endothelial growth factor B splice and proteolytic isoforms to neuropilin-1. *J Biol Chem* 1999;274:21217-22.
63. Migdal M, Huppertz B, Tessler S, Comforti A, Shibuya M, Reich R, et al. Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *J Biol Chem* 1998;273:22272-8.
64. Neufeld G, Cohen T, Shraga N, Lange T, Kessler O, Herzog Y. The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2002;12:13-9.
65. Kitsukawa T, Shimono A, Kawakami A, Kondoh H, Fujisawa H. Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development* 1995;121:4309-18.
66. Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, Matsuda Y, Sanbo M, Yagi T, et al. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 1999;126:4895-902.
67. Gagnon ML, Bielenberg DR, Gechtman Z, Miao HQ, Takashima S, Soker S, et al. Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: In vivo expression and antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:2573-8.
68. Armelin HA. Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973;70:2702-6.

69. Jackson CL, Reidy MA. Basic fibroblast growth factor: its role in the control of smooth muscle cell migration. *Am J Pathol* 1993;143:1024-31.
70. Imamura T, Engleka K, Zhan X, Tokita Y, Forough R, Roeder D, et al. Recovery of mitogenic activity of a growth factor mutant with a nuclear translocation sequence. *Science* 1990;249:1567-70.
71. Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev* 1997;18:26-45.
72. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996;87:1161-9.
73. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997;277:55-60.
74. Nishimura M, Miki T, Yashima R, Yokoi N, Yano H, Sato Y, et al. Angiopoietin-3, a novel member of the angiopoietin family. *FEBS Lett* 1999;448:254-6.
75. Valenzuela DM, Griffiths JA, Rojas J, Aldrich TH, Jones PF, Zhou H, et al. Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:1904-9.
76. Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 1997;277:48-50.
77. Fiedler U, Krissl T, Koidl S, Weiss C, Koblizek T, Deutsch U, et al. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 share the same binding domains in the Tie-2 receptor involving the first Ig-like loop and the epidermal growth factor-like repeats. *J Biol Chem* 2003;278:1721-7.
78. Kim YM, Kim KE, Koh GY, Ho YS, Lee KJ. Hydrogen peroxide produced by angiopoietin-1 mediates angiogenesis. *Cancer Res* 2006;66:6167-74.
79. Dumont DJ, Gradwohl G, Fong GH, Puri MC, Gertsenstein M, Auerbach A, et al. Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev* 1994;8:1897-909.
80. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, et al. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 1995;376:70-4.
81. Jones N, Chen SH, Sturk C, Master Z, Tran J, Kerbel RS, et al. A unique autophosphorylation site on Tie2/Tek mediates Dok-R phosphotyrosine binding domain binding and function. *Mol Cell Biol* 2003;23:2658-68.
82. Kim I, Kim HG, So JN, Kim JH, Kwak HJ, Koh GY. Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signal transduction pathway. *Circ Res* 2000;86:24-9.
83. Takakura N, Huang XL, Naruse T, Hamaguchi I, Dumont DJ, Yancopoulos GD, et al. Critical role of the TIE2 endothelial cell receptor in the development of definitive hematopoiesis. *Immunity* 1998;9:677-86.
84. Witzenbichler B, Maisonpierre PC, Jones P, Yancopoulos GD, Isner JM. Chemotactic properties of angiopoietin-1 and -2, ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *J Biol Chem* 1998;273:18514-21.
85. Kim I, Kim HG, Moon SO, Chae SW, So JN, Koh KN, et al. Angiopoietin-1 induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion. *Circ Res* 2000;86:952-9.
86. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-6.

87. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-6.
88. Ballou DP, Zhao Y, Brandish PE, Marletta MA. Revisiting the kinetics of nitric oxide (NO) binding to soluble guanylate cyclase: the simple NO-binding model is incorrect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:12097-101.
89. Stone JR, Marletta MA. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 1994;33:5636-40.
90. Cary JW, Ehrlich KC, Bland JM, Montalbano BG. The aflatoxin biosynthesis cluster gene, aflX, encodes an oxidoreductase involved in conversion of versicolorin A to demethylsterigmatocystin. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:1096-101.
91. Dussaule JC, Chatziantoniou C. [Role of nitric oxide in the regulation of arterial pressure and renal function]. *Presse Med* 1996;25:1789-93.
92. Gabbai FB, De Nicola L, Peterson OW, Obagi S, Thomson SC, Tucker BJ, et al. Renal response to blood pressure elevation in normal and glomerulonephritic rats. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:2590-9.
93. Papapetropoulos A, Andreopoulos S, Go CY, Hoque A, Fuchs LC, Catravas JD. Regulation of the nitric oxide synthase-nitric oxide-cGMP pathway in rat mesenteric endothelial cells. *J Appl Physiol* 2001;91:2553-60.
94. Brenner T, Pinto F, Abramsky O, Gallily R. Inhibition of nitric oxide production for down-regulation of CNS inflammation and demyelination. *Prog Brain Res* 2001;132:499-506.
95. Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 2004;84:731-65.
96. Schroeder RA, Kuo PC. Nitric oxide: physiology and pharmacology. *Anesth Analg* 1995;81:1052-9.
97. Vallance P. Nitric oxide: therapeutic opportunities. *Fundam Clin Pharmacol* 2003;17:1-10.
98. Schlossmann J, Feil R, Hofmann F. Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *Ann Med* 2003;35:21-7.
99. Agata J, Miao RQ, Yayama K, Chao L, Chao J. Bradykinin B(1) receptor mediates inhibition of neointima formation in rat artery after balloon angioplasty. *Hypertension* 2000;36:364-70.
100. Brunner F, Wolkart G. Endothelial NO/cGMP system contributes to natriuretic peptide-mediated coronary and peripheral vasodilation. *Microvasc Res* 2001;61:102-10.
101. Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280:F193-206.
102. Shaul PW. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol* 2002;64:749-74.
103. Kurowska EM. Nitric oxide therapies in vascular diseases. *Curr Pharm Des* 2002;8:155-66.
104. Shaul PW. Endothelial nitric oxide synthase, caveolae and the development of atherosclerosis. *J Physiol* 2003;547:21-33.
105. Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Smolenski A, Lohmann SM, Bertoglio J, et al. Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 2000;275:21722-9.

106. Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ. VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol* 1998;274:H1054-8.
107. Tiefenbacher CP, Chilian WM. Basic fibroblast growth factor and heparin influence coronary arteriolar tone by causing endothelium-dependent dilation. *Cardiovasc Res* 1997;34:411-7.
108. Noiri E, Lee E, Testa J, Quigley J, Colflesh D, Keese CR, et al. Podokinesis in endothelial cell migration: role of nitric oxide. *Am J Physiol* 1998;274:C236-44.
109. Ziche M, Parenti A, Ledda F, Dell'Era P, Granger HJ, Maggi CA, et al. Nitric oxide promotes proliferation and plasminogen activator production by coronary venular endothelium through endogenous bFGF. *Circ Res* 1997;80:845-52.
110. Dulak J, Jozkowicz A, Dembinska-Kiec A, Guevara I, Zdzienicka A, Zmudzinska-Grochot D, et al. Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:659-66.
111. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999;85:221-8.
112. Kalka C, Asahara T, Krone W, Isner JM. [Angiogenesis and vasculogenesis. Therapeutic strategies for stimulation of postnatal neovascularization]. *Herz* 2000;25:611-22.
113. Krahl K, Mironov V, Risau W, Flamme I. Induction of vasculogenesis in quail blastodisc-derived embryoid bodies. *Dev Biol* 1994;164:123-32.
114. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;6:389-95.
115. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 2001;49:507-21.
116. Lyden D, Young AZ, Zagzag D, Yan W, Gerald W, O'Reilly R, et al. Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature* 1999;401:670-7.
117. Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA, Breitman ML, Rossant J. flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* 1993;118:489-98.
118. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996;87:1171-80.
119. Hirschi KK, D'Amore PA. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res* 1996;32:687-98.
120. Liu Y, Wada R, Yamashita T, Mi Y, Deng CX, Hobson JP, et al. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest* 2000;106:951-61.
121. 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;86:4544-8.
122. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-4.
123. Djonov V, Schmid M, Tschanz SA, Burri PH. Intussusceptive angiogenesis: its role in embryonic vascular network formation. *Circ Res* 2000;86:286-92.
124. Folkman J. Angiogenesis and its inhibitors. *Important Adv Oncol* 1985:42-62.
125. Kimura H, Weisz A, Kurashima Y, Hashimoto K, Ogura T, D'Acquisto F, et al. Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene

- mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood* 2000;95:189-97.
126. Eliceiri BP, Cheresh DA. Adhesion events in angiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:563-8.
 127. Eliceiri BP. Integrin and growth factor receptor crosstalk. *Circ Res* 2001;89:1104-10.
 128. Montesano R, Pepper MS, Mohle-Steinlein U, Risau W, Wagner EF, Orci L. Increased proteolytic activity is responsible for the aberrant morphogenetic behavior of endothelial cells expressing the middle T oncogene. *Cell* 1990;62:435-45.
 129. Flaumenhaft R, Abe M, Mignatti P, Rifkin DB. Basic fibroblast growth factor-induced activation of latent transforming growth factor beta in endothelial cells: regulation of plasminogen activator activity. *J Cell Biol* 1992;118:901-9.
 130. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 1992;267:26031-7.
 131. Pepper MS. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1104-17.
 132. Haas TL, Milkiewicz M, Davis SJ, Zhou AL, Egginton S, Brown MD, et al. Matrix metalloproteinase activity is required for activity-induced angiogenesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H1540-7.
 133. Johnson MD, Kim HR, Chesler L, Tsao-Wu G, Bouck N, Polverini PJ. Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase. *J Cell Physiol* 1994;160:194-202.
 134. Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR, Weiss SJ. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell* 1998;95:365-77.
 135. Brooks PC, Silletti S, von Schalscha TL, Friedlander M, Cheresh DA. Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell* 1998;92:391-400.
 136. Silletti S, Kessler T, Goldberg J, Boger DL, Cheresh DA. Disruption of matrix metalloproteinase 2 binding to integrin alpha vbeta 3 by an organic molecule inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:119-24.
 137. Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, Itohara S. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* 1998;58:1048-51.
 138. Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, et al. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 1998;93:411-22.
 139. Seandel M, Noack-Kunmann K, Zhu D, Aimes RT, Quigley JP. Growth factor-induced angiogenesis in vivo requires specific cleavage of fibrillar type I collagen. *Blood* 2001;97:2323-32.
 140. Heymans S, Lutun A, Nuyens D, Theilmeier G, Creemers E, Moons L, et al. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med* 1999;5:1135-42.
 141. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res* 2000;55:15-35; discussion 35-6.
 142. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 2000;60:203-12.

143. Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, Oldmixon EH, et al. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science* 1998;282:468-71.
144. Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999;18:5356-62.
145. Lindahl P, Johansson BR, Leveen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 1997;277:242-5.
146. Eliceiri BP, Cheresh DA. The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest* 1999;103:1227-30.
147. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, et al. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 2000;68:1-8.
148. Guo DQ, Wu LW, Dunbar JD, Ozes ON, Mayo LD, Kessler KM, et al. Tumor necrosis factor employs a protein-tyrosine phosphatase to inhibit activation of KDR and vascular endothelial cell growth factor-induced endothelial cell proliferation. *J Biol Chem* 2000;275:11216-21.
149. Gendron RL, Adams LC, Paradis H. Tubedown-1, a novel acetyltransferase associated with blood vessel development. *Dev Dyn* 2000;218:300-15.
150. Dimmeler S, Zeiher AM. Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression. *Circ Res* 2000;87:434-9.
151. Dimmeler S, Haendeler J, Rippmann V, Nehls M, Zeiher AM. Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. *FEBS Lett* 1996;399:71-4.
152. Carmeliet P, Collen D. Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;237:133-58.
153. Ferrara N, LeCouter J, Lin R. Endocrine gland vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) and the hypothesis of tissue-specific regulation of angiogenesis. *Endocr Res* 2002;28:763-4.
154. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996;380:435-9.
155. Reddi V, Zaglul A, Pentz ES, Gomez RA. Renin-expressing cells are associated with branching of the developing kidney vasculature. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:63-71.
156. Fernandez B, Buehler A, Wolfram S, Kostin S, Espanion G, Franz WM, et al. Transgenic myocardial overexpression of fibroblast growth factor-1 increases coronary artery density and branching. *Circ Res* 2000;87:207-13.
157. McBride JL, Ruiz JC. Ephrin-A1 is expressed at sites of vascular development in the mouse. *Mech Dev* 1998;77:201-4.
158. Helbling PM, Saulnier DM, Brandli AW. The receptor tyrosine kinase EphB4 and ephrin-B ligands restrict angiogenic growth of embryonic veins in *Xenopus laevis*. *Development* 2000;127:269-78.
159. Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 1998;93:741-53.
160. Shin D, Garcia-Cardena G, Hayashi S, Gerety S, Asahara T, Stavrakis G, et al. Expression of ephrinB2 identifies a stable genetic difference between arterial and venous vascular smooth muscle as well as endothelial cells, and marks subsets of microvessels at sites of adult neovascularization. *Dev Biol* 2001;230:139-50.

161. Huynh-Do U, Stein E, Lane AA, Liu H, Cerretti DP, Daniel TO. Surface densities of ephrin-B1 determine EphB1-coupled activation of cell attachment through alphavbeta3 and alpha5beta1 integrins. *Embo J* 1999;18:2165-73.
162. Thurston G, Yancopoulos GD. Gridlock in the blood. *Nature* 2001;414:163-4.
163. Krebs LT, Xue Y, Norton CR, Shutter JR, Maguire M, Sundberg JP, et al. Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev* 2000;14:1343-52.
164. Leimeister C, Externbrink A, Klamt B, Gessler M. Hey genes: a novel subfamily of hairy- and Enhancer of split related genes specifically expressed during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 1999;85:173-7.
165. Scholz D, Cai WJ, Schaper W. Arteriogenesis, a new concept of vascular adaptation in occlusive disease. *Angiogenesis* 2001;4:247-57.
166. Shyy YJ, Hsieh HJ, Usami S, Chien S. Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:4678-82.
167. Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest* 1998;101:40-50.
168. Schaper W, Buschmann I. Arteriogenesis, the good and bad of it. *Eur Heart J* 1999;20:1297-9.
169. Stacker SA, Hughes RA, Williams RA, Achen MG. Current strategies for modulating lymphangiogenesis signalling pathways in human disease. *Curr Med Chem* 2006;13:783-92.
170. Baldwin ME, Stacker SA, Achen MG. Molecular control of lymphangiogenesis. *Bioessays* 2002;24:1030-40.
171. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Makinen T, Vitali A, Wilks AF, et al. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:548-53.
172. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *Embo J* 1996;15:1751.
173. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, et al. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 1997;276:1423-5.
174. Karkkainen MJ, Jussila L, Ferrell RE, Finegold DN, Alitalo K. Molecular regulation of lymphangiogenesis and targets for tissue oedema. *Trends Mol Med* 2001;7:18-22.
175. Wang JF, Zhang XF, Groopman JE. Stimulation of beta 1 integrin induces tyrosine phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptor-3 and modulates cell migration. *J Biol Chem* 2001;276:41950-7.
176. Plate K. From angiogenesis to lymphangiogenesis. *Nat Med* 2001;7:151-2.
177. Mandriota SJ, Pepper MS. [Lymphangiogenesis and biological activity of vascular endothelial growth factor-C]. *J Soc Biol* 1999;193:159-63.
178. Skobe M, Detmar M. Structure, function, and molecular control of the skin lymphatic system. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2000;5:14-9.
179. Farnsworth RH, Achen MG, Stacker SA. Lymphatic endothelium: an important interactive surface for malignant cells. *Pulm Pharmacol Ther* 2006;19:51-60.
180. Rall TW, Sutherland EW. Formation of a cyclic adenosine ribonucleotide by tissue particles. *J Biol Chem* 1958;232:1065-76.
181. Butcher RW, Sutherland EW. Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this

- enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. *J Biol Chem* 1962;237:1244-50.
182. Corbin JD, Francis SH. Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. *J Biol Chem* 1999;274:13729-32.
 183. Boyle CD, Xu R, Asberom T, Chackalamannil S, Clader JW, Greenlee WJ, et al. Optimization of purine based PDE1/PDE5 inhibitors to a potent and selective PDE5 inhibitor for the treatment of male ED. *Bioorg Med Chem Lett* 2005;15:2365-9.
 184. Corbin JD, Francis SH. Pharmacology of phosphodiesterase-5 inhibitors. *Int J Clin Pract* 2002;56:453-9.
 185. Sampson LJ, Hinton JM, Garland CJ. Evidence for expression and function of phosphodiesterase type 5 (PDE-V) in rat resistance arteries. *Br J Pharmacol* 2001;132:13-7.
 186. Hardman JG, Robison GA, Sutherland EW. Cyclic nucleotides. *Annu Rev Physiol* 1971;33:311-36.
 187. Hardman JG, Beavo JA, Gray JP, Chrisman TD, Patterson WD, Sutherland EW. The formation and metabolism of cyclic GMP. *Ann N Y Acad Sci* 1971;185:27-35.
 188. Coy M, Neilands JB. Structural dynamics and functional domains of the fur protein. *Biochemistry* 1991;30:8201-10.
 189. Fulle HJ, Garbers DL. Guanylyl cyclases: a family of receptor-linked enzymes. *Cell Biochem Funct* 1994;12:157-65.
 190. Garbers DL. Guanylate cyclase, a cell surface receptor. *J Biol Chem* 1989;264:9103-6.
 191. Gerzer R, Bohme E, Hofmann F, Schultz G. Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. *FEBS Lett* 1981;132:71-4.
 192. Morita T, Perrella MA, Lee ME, Kourembanas S. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:1475-9.
 193. Lincoln TM, Cornwell TL. Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *Faseb J* 1993;7:328-38.
 194. Wei JY, Roy DS, Leconte L, Barnstable CJ. Molecular and pharmacological analysis of cyclic nucleotide-gated channel function in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 1998;56:37-64.
 195. Cornwell TL, Lincoln TM. Regulation of intracellular Ca²⁺ levels in cultured vascular smooth muscle cells. Reduction of Ca²⁺ by atriopeptin and 8-bromo-cyclic GMP is mediated by cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1989;264:1146-55.
 196. de Jonge HR. Cyclic GMP-dependent protein kinase in intestinal brushborders. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 1981;14:315-33.
 197. Fiscus RR, Rapoport RM, Murad F. Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced activation of cyclic GMP-dependent protein kinase in rat aorta. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res* 1983;9:415-25.
 198. Rapoport RM, Draznin MB, Murad F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* 1983;306:174-6.
 199. Ignarro LJ, Bush PA, Buga GM, Wood KS, Fukuto JM, Rajfer J. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;170:843-50.
 200. Azadzi KM, Kim N, Brown ML, Goldstein I, Cohen RA, Saenz de Tejada I. Endothelium-derived nitric oxide and cyclooxygenase products modulate corpus cavernosum smooth muscle tone. *J Urol* 1992;147:220-5.

201. Boolell M, Allen MJ, Ballard SA, Gepi-Attee S, Muirhead GJ, Naylor AM, et al. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 1996;8:47-52.
202. Eardley I, Ellis P, Boolell M, Wulff M. Onset and duration of action of sildenafil for the treatment of erectile dysfunction. *Br J Clin Pharmacol* 2002;53 Suppl 1:61S-65S.
203. Goldstein I, Lue TF, Padma-Nathan H, Rosen RC, Steers WD, Wicker PA. Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. Sildenafil Study Group. *N Engl J Med* 1998;338:1397-404.
204. Montorsi F, McDermott TE, Morgan R, Olsson A, Schultz A, Kirkeby HJ, et al. Efficacy and safety of fixed-dose oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction of various etiologies. *Urology* 1999;53:1011-8.
205. Dinsmore WW, Hodges M, Hargreaves C, Osterloh IH, Smith MD, Rosen RC. Sildenafil citrate (Viagra) in erectile dysfunction: near normalization in men with broad-spectrum erectile dysfunction compared with age-matched healthy control subjects. *Urology* 1999;53:800-5.
206. Stuckey BG, Jadzinsky MN, Murphy LJ, Montorsi F, Kadioglu A, Fraige F, et al. Sildenafil citrate for treatment of erectile dysfunction in men with type 1 diabetes: results of a randomized controlled trial. *Diabetes Care* 2003;26:279-84.
207. Rendell MS, Rajfer J, Wicker PA, Smith MD. Sildenafil for treatment of erectile dysfunction in men with diabetes: a randomized controlled trial. Sildenafil Diabetes Study Group. *Jama* 1999;281:421-6.
208. Olsson AM, Persson CA. Efficacy and safety of sildenafil citrate for the treatment of erectile dysfunction in men with cardiovascular disease. *Int J Clin Pract* 2001;55:171-6.
209. Jackson G, Gillies H, Osterloh I. Past, present, and future: a 7-year update of Viagra (sildenafil citrate). *Int J Clin Pract* 2005;59:680-91.
210. Ghofrani HA, Hoepfer MM. [Drug combination treatment for pulmonary arterial hypertension]. *Dtsch Med Wochenschr* 2006;131:S330-3.
211. Runo JR, Loyd JE. Primary pulmonary hypertension. *Lancet* 2003;361:1533-44.
212. Wilkens H, Guth A, Konig J, Forestier N, Cremers B, Hennen B, et al. Effect of inhaled iloprost plus oral sildenafil in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 2001;104:1218-22.
213. Michelakis ED, Tymchak W, Noga M, Webster L, Wu XC, Lien D, et al. Long-term treatment with oral sildenafil is safe and improves functional capacity and hemodynamics in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2003;108:2066-9.
214. Ghofrani HA, Wiedemann R, Rose F, Schermuly RT, Olschewski H, Weissmann N, et al. Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360:895-900.
215. Zhao L, Mason NA, Morrell NW, Kojonazarov B, Sadykov A, Maripov A, et al. Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2001;104:424-8.
216. Zhao L, Mason NA, Strange JW, Walker H, Wilkins MR. Beneficial effects of phosphodiesterase 5 inhibition in pulmonary hypertension are influenced by natriuretic Peptide activity. *Circulation* 2003;107:234-7.
217. Sebkhia A, Strange JW, Phillips SC, Wharton J, Wilkins MR. Phosphodiesterase type 5 as a target for the treatment of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2003;107:3230-5.

218. Schermuly RT, Kreisselmeier KP, Ghofrani HA, Yilmaz H, Butrous G, Ermert L, et al. Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:39-45.
219. Rondelet B, Kerbaul F, Van Beneden R, Motte S, Fesler P, Hubloue I, et al. Signaling molecules in overcirculation-induced pulmonary hypertension in piglets: effects of sildenafil therapy. *Circulation* 2004;110:2220-5.
220. Itoh T, Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Nakanishi N, Hamada K, et al. A combination of oral sildenafil and beraprost ameliorates pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:34-8.
221. Prickaerts J, van Staveren WC, Sik A, Markerink-van Ittersum M, Niewohner U, van der Staay FJ, et al. Effects of two selective phosphodiesterase type 5 inhibitors, sildenafil and vardenafil, on object recognition memory and hippocampal cyclic GMP levels in the rat. *Neuroscience* 2002;113:351-61.
222. Blokland A, Prickaerts J, Honig W, de Vente J. State-dependent impairment in object recognition after hippocampal NOS inhibition. *Neuroreport* 1998;9:4205-8.
223. Richalet JP, Gratadour P, Robach P, Pham I, Dechaux M, Joncquiart-Latarjet A, et al. Sildenafil inhibits altitude-induced hypoxemia and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:275-81.
224. Zhang R, Wang L, Zhang L, Chen J, Zhu Z, Zhang Z, et al. Nitric oxide enhances angiogenesis via the synthesis of vascular endothelial growth factor and cGMP after stroke in the rat. *Circ Res* 2003;92:308-13.
225. Wang L, Gang Zhang Z, Lan Zhang R, Chopp M. Activation of the PI3-K/Akt pathway mediates cGMP enhanced-neurogenesis in the adult progenitor cells derived from the subventricular zone. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25:1150-8.
226. Pyriochou A, Zhou Z, Koika V, Petrou C, Cordopatis P, Sessa WC, et al. The phosphodiesterase 5 inhibitor sildenafil stimulates angiogenesis through a protein kinase G/MAPK pathway. *J Cell Physiol* 2007;211:197-204.
227. Senthilkumar A, Smith RD, Khitha J, Arora N, Veerareddy S, Langston W, et al. Sildenafil Promotes Ischemia-Induced Angiogenesis Through a PKG-Dependent Pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007.
228. Sauzeau V, Rolli-Derkinderen M, Lehoux S, Loirand G, Pacaud P. Sildenafil prevents change in RhoA expression induced by chronic hypoxia in rat pulmonary artery. *Circ Res* 2003;93:630-7.
229. Gong MC, Fujihara H, Somlyo AV, Somlyo AP. Translocation of rhoA associated with Ca²⁺ sensitization of smooth muscle. *J Biol Chem* 1997;272:10704-9.
230. Yoshii A, Iizuka K, Dobashi K, Horie T, Harada T, Nakazawa T, et al. Relaxation of contracted rabbit tracheal and human bronchial smooth muscle by Y-27632 through inhibition of Ca²⁺ sensitization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:1190-200.
231. Loirand G, Cario-Toumaniantz C, Chardin P, Pacaud P. The Rho-related protein Rnd1 inhibits Ca²⁺ sensitization of rat smooth muscle. *J Physiol* 1999;516 (Pt 3):825-34.
232. Kuroda S, Kikuchi A, Hirata K, Masuda T, Kishi K, Sasaki T, et al. Cooperative function of rho GDS and rho GDI to regulate rho p21 activation in smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;185:473-80.
233. Otto B, Steusloff A, Just I, Aktories K, Pfitzer G. Role of Rho proteins in carbachol-induced contractions in intact and permeabilized guinea-pig intestinal smooth muscle. *J Physiol* 1996;496 (Pt 2):317-29.
234. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 2001;81:153-208.
235. Valencia A, Chardin P, Wittinghofer A, Sander C. The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry* 1991;30:4637-48.

236. Madaule P, Axel R. A novel ras-related gene family. *Cell* 1985;41:31-40.
237. Kjoller L, Hall A. Signaling to Rho GTPases. *Exp Cell Res* 1999;253:166-79.
238. Mackay DJ, Hall A. Rho GTPases. *J Biol Chem* 1998;273:20685-8.
239. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998;279:509-14.
240. Vouret-Craviari V, Grall D, Van Obberghen-Schilling E. Modulation of Rho GTPase activity in endothelial cells by selective proteinase-activated receptor (PAR) agonists. *J Thromb Haemost* 2003;1:1103-11.
241. Faccio R, Novack DV, Zallone A, Ross FP, Teitelbaum SL. Dynamic changes in the osteoclast cytoskeleton in response to growth factors and cell attachment are controlled by beta3 integrin. *J Cell Biol* 2003;162:499-509.
242. Arthur WT, Noren NK, Burrige K. Regulation of Rho family GTPases by cell-cell and cell-matrix adhesion. *Biol Res* 2002;35:239-46.
243. Ren XD, Kiosses WB, Schwartz MA. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *Embo J* 1999;18:578-85.
244. Kranenburg O, Poland M, van Horck FP, Drechsel D, Hall A, Moolenaar WH. Activation of RhoA by lysophosphatidic acid and Galpha12/13 subunits in neuronal cells: induction of neurite retraction. *Mol Biol Cell* 1999;10:1851-7.
245. Moolenaar WH. Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors. *Exp Cell Res* 1999;253:230-8.
246. Seasholtz TM, Majumdar M, Brown JH. Rho as a mediator of G protein-coupled receptor signaling. *Mol Pharmacol* 1999;55:949-56.
247. Taggart MJ, Lee YH, Morgan KG. Cellular redistribution of PKCalpha, rhoA, and ROKalpha following smooth muscle agonist stimulation. *Exp Cell Res* 1999;251:92-101.
248. Fujihara H, Walker LA, Gong MC, Lemichez E, Boquet P, Somlyo AV, et al. Inhibition of RhoA translocation and calcium sensitization by in vivo ADP-ribosylation with the chimeric toxin DC3B. *Mol Biol Cell* 1997;8:2437-47.
249. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol* 2000;522 Pt 2:177-85.
250. Leung T, Chen XQ, Manser E, Lim L. The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol* 1996;16:5313-27.
251. Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, Okawa K, Iwamatsu A, Fujita A, et al. The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *Embo J* 1996;15:1885-93.
252. Chevrier V, Piel M, Collomb N, Saoudi Y, Frank R, Paintrand M, et al. The Rho-associated protein kinase p160ROCK is required for centrosome positioning. *J Cell Biol* 2002;157:807-17.
253. Yang CS, Wang ZY. Tea and cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:1038-49.
254. Ahmad N, Mukhtar H. Green tea polyphenols and cancer: biologic mechanisms and practical implications. *Nutr Rev* 1999;57:78-83.
255. Brown MD. Green tea (*Camellia sinensis*) extract and its possible role in the prevention of cancer. *Altern Med Rev* 1999;4:360-70.
256. Mukhtar H, Ahmad N. Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *Am J Clin Nutr* 2000;71:1698S-702S; discussion 703S-4S.
257. Lambert JD, Yang CS. Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols. *Mutat Res* 2003;523-524:201-8.
258. German JB, Walzem RL. The health benefits of wine. *Annu Rev Nutr* 2000;20:561-93.

259. Singleton VL. Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods. *Adv Food Res* 1981;27:149-242.
260. Rimm EB, Klatsky A, Grobbee D, Stampfer MJ. Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine, or spirits. *Bmj* 1996;312:731-6.
261. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992;339:1523-6.
262. Middleton E, Jr., Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 2000;52:673-751.
263. Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 1993;341:454-7.
264. Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* 1993;341:1103-4.
265. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997;275:218-20.
266. Kimura Y, Tani T, Kanbe T, Watanabe K. Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. *Arzneimittelforschung* 1985;35:1144-9.
267. Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta* 1995;235:207-19.
268. Lamuela-Raventos RM, de la Torre-Boronat MC. Beneficial effects of white wines. *Drugs Exp Clin Res* 1999;25:121-4.
269. Landrault N, Poucheret P, Ravel P, Gasc F, Cros G, Teissedre PL. Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages. *J Agric Food Chem* 2001;49:3341-8.
270. Vinson J, Hsu C, Possanza C, Drack A, Pane D, Davis R, et al. Lipid peroxidation and diabetic complications: effect of antioxidant vitamins C and E. *Adv Exp Med Biol* 1994;366:430-2.
271. Robinson EE, Maxwell SR, Thorpe GH. An investigation of the antioxidant activity of black tea using enhanced chemiluminescence. *Free Radic Res* 1997;26:291-302.
272. Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res* 1995;22:375-83.
273. Renaud SC, Gueguen R, Schenker J, d'Houtaud A. Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France. *Epidemiology* 1998;9:184-8.
274. Renaud S, Gueguen R. The French paradox and wine drinking. *Novartis Found Symp* 1998;216:208-17; discussion 17-22, 152-8.
275. Gronbaek M, Tjonneland A, Johansen D, Stripp C, Overvad K. Type of alcohol and drinking pattern in 56, 970 Danish men and women. *Eur J Clin Nutr* 2000;54:174-6.
276. Zenebe W, Pechanova O. Effects of red wine polyphenolic compounds on the cardiovascular system. *Bratisl Lek Listy* 2002;103:159-65.
277. Martin S, Andriantsitohaina R. [Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)* 2002;51:304-15.
278. Hayek T, Fuhrman B, Vaya J, Rosenblat M, Belinky P, Coleman R, et al. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with

- reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2744-52.
279. da Luz PL, Serrano Junior CV, Chacra AP, Monteiro HP, Yoshida VM, Furtado M, et al. The effect of red wine on experimental atherosclerosis: lipid-independent protection. *Exp Mol Pathol* 1999;65:150-9.
 280. Beretz A, Cazenave JP, Anton R. Inhibition of aggregation and secretion of human platelets by quercetin and other flavonoids: structure-activity relationships. *Agents Actions* 1982;12:382-7.
 281. Stoclet JC. Bonum vinum laetificat cor hominum. *Med Sci Monit* 2001;7:842-7.
 282. Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH, El Bedoui J, Chataigneau M, et al. Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol* 2004;500:299-313.
 283. Dell'Agli M, Busciala A, Bosisio E. Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovasc Res* 2004;63:593-602.
 284. Oak MH, Chataigneau M, Keravis T, Chataigneau T, Beretz A, Andriantsitohaina R, et al. Red wine polyphenolic compounds inhibit vascular endothelial growth factor expression in vascular smooth muscle cells by preventing the activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1001-7.
 285. Oak MH, El Bedoui J, Anglard P, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenolic compounds strongly inhibit pro-matrix metalloproteinase-2 expression and its activation in response to thrombin via direct inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2004;110:1861-7.
 286. Andriambelosen E, Kleschyov AL, Muller B, Beretz A, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Br J Pharmacol* 1997;120:1053-8.
 287. Stoclet JC, Kleschyov A, Andriambelosen E, Diebolt M, Andriantsitohaina R. Endothelial NO release caused by red wine polyphenols. *J Physiol Pharmacol* 1999;50:535-40.
 288. Ndiaye M, Chataigneau T, Andriantsitohaina R, Stoclet JC, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenols cause endothelium-dependent EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310:371-7.
 289. Ndiaye M, Chataigneau T, Chataigneau M, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenols induce EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries through the redox-sensitive activation of the PI3-kinase/Akt pathway. *Br J Pharmacol* 2004;142:1131-6.
 290. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999;399:601-5.
 291. Leikert JF, Rathel TR, Wohlfart P, Cheynier V, Vollmar AM, Dirsch VM. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation* 2002;106:1614-7.
 292. Wallerath T, Poleo D, Li H, Forstermann U. Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase: a mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:471-8.
 293. Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K, et al. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2002;106:1652-8.
 294. Lopez-Velez M, Martinez-Martinez F, Del Valle-Ribes C. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2003;43:233-44.

295. Robak J, Gryglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol* 1988;37:837-41.
296. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 2001;74:418-25.
297. Wei IH, Wu YC, Wen CY, Shieh JY. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate attenuates the neuronal NADPH-d/nNOS expression in the nodose ganglion of acute hypoxic rats. *Brain Res* 2004;999:73-80.
298. Seo K, Jung S, Park M, Song Y, Choung S. Effects of leucocyanidines on activities of metabolizing enzymes and antioxidant enzymes. *Biol Pharm Bull* 2001;24:592-3.
299. Pietta PG, Simonetti P, Gardana C, Brusamolino A, Morazzoni P, Bombardelli E. Catechin metabolites after intake of green tea infusions. *Biofactors* 1998;8:111-8.
300. Durak I, Avci A, Kacmaz M, Buyukkokac S, Cimen MY, Elgun S, et al. Comparison of antioxidant potentials of red wine, white wine, grape juice and alcohol. *Curr Med Res Opin* 1999;15:316-20.
301. Whitehead TP, Robinson D, Allaway S, Syms J, Hale A. Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum. *Clin Chem* 1995;41:32-5.
302. Frei B, Higdon JV. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *J Nutr* 2003;133:3275S-84S.
303. Petroni A, Blasevich M, Salami M, Papini N, Montedoro GF, Galli C. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb Res* 1995;78:151-60.
304. Pace-Asciak CR, Rounova O, Hahn SE, Diamandis EP, Goldberg DM. Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects. *Clin Chim Acta* 1996;246:163-82.
305. Renaud SC, Ruf JC. Effects of alcohol on platelet functions. *Clin Chim Acta* 1996;246:77-89.
306. Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Hault JR, Halliwell B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem Pharmacol* 1991;42:1673-81.
307. Subbaramaiah K, Chung WJ, Michaluart P, Telang N, Tanabe T, Inoue H, et al. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 1998;273:21875-82.
308. Buffoli B, Pechanova O, Kojsova S, Andriantsitohaina R, Giugno L, Bianchi R, et al. Provinol prevents CsA-induced nephrotoxicity by reducing reactive oxygen species, iNOS, and NF-kB expression. *J Histochem Cytochem* 2005;53:1459-68.
309. Bernatova I, Pechanova O, Babal P, Kysela S, Stvrtina S, Andriantsitohaina R. Wine polyphenols improve cardiovascular remodeling and vascular function in NO-deficient hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:H942-8.
310. Pechanova O, Bernatova I, Babal P, Martinez MC, Kysela S, Stvrtina S, et al. Red wine polyphenols prevent cardiovascular alterations in L-NAME-induced hypertension. *J Hypertens* 2004;22:1551-9.
311. Sessa WC. eNOS at a glance. *J Cell Sci* 2004;117:2427-9.
312. Musicki B, Palese MA, Crone JK, Burnett AL. Phosphorylated endothelial nitric oxide synthase mediates vascular endothelial growth factor-induced penile erection. *Biol Reprod* 2004;70:282-9.
313. Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med* 1994;330:1431-8.

314. Skalak TC, Price RJ. The role of mechanical stresses in microvascular remodeling. *Microcirculation* 1996;3:143-65.
315. Couffinhal T, Silver M, Zheng LP, Kearney M, Witzendichler B, Isner JM. Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol* 1998;152:1667-79.
316. Halpern W, Kelley M. In vitro methodology for resistance arteries. *Blood Vessels* 1991;28:245-51.
317. Scholz D, Ito W, Fleming I, Deindl E, Sauer A, Wiesnet M, et al. Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis). *Virchows Arch* 2000;436:257-70.
318. Zhang L, Zhang RL, Wang Y, Zhang C, Zhang ZG, Meng H, et al. Functional recovery in aged and young rats after embolic stroke: treatment with a phosphodiesterase type 5 inhibitor. *Stroke* 2005;36:847-52.
319. Seasholtz TM, Zhang T, Morissette MR, Howes AL, Yang AH, Brown JH. Increased expression and activity of RhoA are associated with increased DNA synthesis and reduced p27(Kip1) expression in the vasculature of hypertensive rats. *Circ Res* 2001;89:488-95.
320. Hawkey CJ. Gastrointestinal problems associated with non-steroidal, anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Scand J Gastroenterol Suppl* 1993;200:94-5.
321. Sauzeau V, Rolli-Derkinderen M, Marionneau C, Loirand G, Pacaud P. RhoA expression is controlled by nitric oxide through cGMP-dependent protein kinase activation. *J Biol Chem* 2003;278:9472-80.
322. Forget MA, Desrosiers RR, Gingras D, Beliveau R. Phosphorylation states of Cdc42 and RhoA regulate their interactions with Rho GDP dissociation inhibitor and their extraction from biological membranes. *Biochem J* 2002;361:243-54.
323. Andriantsitohaina R. Regulation of vascular tone by plant polyphenols: role of nitric oxide. *Gen Physiol Biophys* 1999;18 Suppl 1:3-5.
324. Anter E, Thomas SR, Schulz E, Shapira OM, Vita JA, Keaney JF, Jr. Activation of endothelial nitric-oxide synthase by the p38 MAPK in response to black tea polyphenols. *J Biol Chem* 2004;279:46637-43.
325. Whelan AP, Sutherland WH, McCormick MP, Yeoman DJ, de Jong SA, Williams MJ. Effects of white and red wine on endothelial function in subjects with coronary artery disease. *Intern Med J* 2004;34:224-8.
326. Iijima K, Yoshizumi M, Hashimoto M, Kim S, Eto M, Ako J, et al. Red wine polyphenols inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells and downregulate expression of cyclin A gene. *Circulation* 2000;101:805-11.
327. Cao Y, Cao R. Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature* 1999;398:381.
328. Favot L, Martin S, Keravis T, Andriantsitohaina R, Lugnier C. Involvement of cyclin-dependent pathway in the inhibitory effect of delphinidin on angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2003;59:479-87.
329. Lamy S, Blanchette M, Michaud-Levesque J, Lafleur R, Durocher Y, Moghrabi A, et al. Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation. *Carcinogenesis* 2006;27:989-96.
330. Jin HG, Yamashita H, Nagano Y, Fukuba H, Hiji M, Ohtsuki T, et al. Hypoxia-induced upregulation of endothelial small G protein RhoA and Rho-kinase/ROCK2 inhibits eNOS expression. *Neurosci Lett* 2006;408:62-7.
331. McMurtry IF, Bauer NR, Fagan KA, Nagaoka T, Gebb SA, Oka M. Hypoxia and Rho/Rho-kinase signaling. Lung development versus hypoxic pulmonary hypertension. *Adv Exp Med Biol* 2003;543:127-37.

332. Li L, Jiang Q, Zhang L, Ding G, Gang Zhang Z, Li Q, et al. Angiogenesis and improved cerebral blood flow in the ischemic boundary area detected by MRI after administration of sildenafil to rats with embolic stroke. *Brain Res* 2007;1132:185-92.
333. Ladha F, Bonnet S, Eaton F, Hashimoto K, Korbitt G, Thebaud B. Sildenafil improves alveolar growth and pulmonary hypertension in hyperoxia-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:750-6.
334. Schaper W, Scholz D. Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1143-51.
335. Jin ZG, Wong C, Wu J, Berk BC. Flow shear stress stimulates Gab1 tyrosine phosphorylation to mediate protein kinase B and endothelial nitric-oxide synthase activation in endothelial cells. *J Biol Chem* 2005;280:12305-9.
336. Lam CF, Peterson TE, Richardson DM, Croatt AJ, d'Uscio LV, Nath KA, et al. Increased blood flow causes coordinated upregulation of arterial eNOS and biosynthesis of tetrahydrobiopterin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H786-93.
337. Fleming I, Fisslthaler B, Dixit M, Busse R. Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. *J Cell Sci* 2005;118:4103-11.
338. Minshall RD, Sessa WC, Stan RV, Anderson RG, Malik AB. Caveolin regulation of endothelial function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285:L1179-83.
339. Loufrani L, Henrion D. Vasodilator treatment with hydralazine increases blood flow in mdx mice resistance arteries without vascular wall remodelling or endothelium function improvement. *J Hypertens* 2005;23:1855-60.
340. Gorny D, Loufrani L, Kubis N, Levy BI, Henrion D. Chronic hydralazine improves flow (shear stress)-induced endothelium-dependent dilation in mouse mesenteric resistance arteries in vitro. *Microvasc Res* 2002;64:127-34.
341. Tuttle JL, Nachreiner RD, Bhuller AS, Condict KW, Connors BA, Herring BP, et al. Shear level influences resistance artery remodeling: wall dimensions, cell density, and eNOS expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H1380-9.
342. Dumont O, Loufrani L, Henrion D. Key role of the NO-pathway and matrix metalloprotease-9 in high blood flow-induced remodeling of rat resistance arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:317-24.
343. Ranjan V, Xiao Z, Diamond SL. Constitutive NOS expression in cultured endothelial cells is elevated by fluid shear stress. *Am J Physiol* 1995;269:H550-5.
344. O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK, Jr. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *N Engl J Med* 1999;340:14-22.
345. Dishy V, Sofowora G, Harris PA, Kandcer M, Zhan F, Wood AJ, et al. The effect of sildenafil on nitric oxide-mediated vasodilation in healthy men. *Clin Pharmacol Ther* 2001;70:270-9.
346. Katz SD, Balidemaj K, Homma S, Wu H, Wang J, Maybaum S. Acute type 5 phosphodiesterase inhibition with sildenafil enhances flow-mediated vasodilation in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:845-51.