

# Facteurs de croissance et dysfonction endothéliale

C. Bauters, I. Six, T. Meurice et E. Van Belle

Service de Cardiologie B et Laboratoire de Pharmacologie, CHRU de Lille, France

## Abstract

### Growth Factors and Endothelial Dysfunction

Endothelial dysfunction has been implicated in the pathogenesis of many cardiovascular diseases; experimental and clinical studies have shown that endothelial dysfunction may be a key factor in various processes, including abnormal arterial vasomotion, thrombosis or neointimal proliferation. Endothelial dysfunction has been shown to be a characteristic feature of atherosclerotic vessels, sites subject to mechanical injury or collateral vessels that develop in response to severe ischaemia.

Fibroblast growth factor (FGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) are important growth factors for endothelial cells *in vitro*. While VEGF is specific for endothelial cells, FGFs are also potent growth factors for other cell types such as smooth muscle cells.

Recent studies have demonstrated the feasibility of using endothelial cell growth factors *in vivo*. Basic FGF (bFGF) and VEGF have been shown to increase the development of collateral vessels in ischaemic models and to enhance the extent of endothelial regrowth following arterial injury. The marked anatomical improvement associated with the administration of endothelial cell growth factors has promoted questions concerning a possible role for these factors in endothelial dysfunction.

*In vivo* administration of endothelial cell growth factors is associated with significant improvement in endothelium-dependent responses. This effect is observed with bFGF and VEGF in various animal models of endothelial dysfunction such as the collateral circulation, the regenerated endothelium following arterial injury and experimental atherosclerosis. While the precise mechanisms underlying this ubiquitous beneficial effect of endothelial cell growth factors are still to be determined, these results do support the concept of using such factors as a new therapeutic strategy in patients with vascular diseases.

## Résumé

La dysfonction endothéliale peut jouer un rôle important dans des phénomènes divers tels que la thrombose, le spasme et/ou l'hyperplasie néointimale ; elle est classiquement retrouvée lors de l'athérosclérose, dans les suites d'une angioplastie ou au niveau des "néo-vaisseaux" qui forment les circulations collatérales.

Le vascular endothelial growth factor (VEGF) et le fibroblast growth factor (FGF) figurent parmi les plus importants facteurs de croissance pour les cellules

endothéliales *in vitro*. L'administration de basic FGF (bFGF) ou de VEGF permet d'augmenter le développement de la circulation collatérale de suppléance en cas d'ischémie et permet d'obtenir une réendothérialisation plus complète dans les suites d'un traumatisme artériel.

L'utilisation *in vivo* de ces facteurs de croissance est aussi associée à une amélioration des réponses endothélium-dépendantes. Cet effet est observé avec le VEGF et/ou le FGF dans différents modèles expérimentaux de dysfonction endothéliale tels que la circulation collatérale, la régénération endothéliale après traumatisme artériel et l'athérosclérose expérimentale. Les mécanismes exacts par lesquels ces facteurs de croissance corrige la dysfonction endothéliale ne sont pas encore établis avec certitude. Ces résultats sont en faveur d'une possible utilisation de ces facteurs de croissance comme agents thérapeutiques pour certaines pathologies cardiovasculaires.

L'existence d'une "dysfonction endothéliale" a été démontrée dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires. Elle peut jouer un rôle important dans des phénomènes divers tels que la thrombose, la perméabilité aux macromolécules, le spasme et/ou l'hyperplasie néointimale.<sup>[1-8]</sup> Une dysfonction endothéliale est classiquement retrouvée lors de l'athérosclérose,<sup>[3,4]</sup> dans les suites d'une angioplastie,<sup>[5,6]</sup> au niveau des "néo-vaisseaux" qui forment les circulations collatérales.<sup>[7,8]</sup>

Le vascular endothelial growth factor (VEGF) et le fibroblast growth factor (FGF) figurent parmi les plus importants facteurs de croissance pour les cellules endothéliales *in vitro*. Le VEGF a la particularité d'être relativement spécifique pour les cellules endothéliales alors que le FGF est aussi actif sur d'autres types cellulaires comme, par exemple, les cellules musculaires lisses de la paroi artérielle.

Des études récentes (essentiellement expérimentales) ont montré qu'il était possible d'utiliser ces facteurs de croissance en tant qu'agents thérapeutiques *in vivo*. L'administration de basic FGF (bFGF) ou de VEGF permet d'augmenter le développement de la circulation collatérale de suppléance en cas d'ischémie<sup>[9-11]</sup> et permet d'obtenir une réendothérialisation plus complète dans les suites d'un traumatisme artériel.<sup>[12,13]</sup>

Cet article a pour objectif de discuter des travaux qui ont étudié l'effet de ces facteurs de

croissance sur la dysfonction endothéliale lors des situations pathologiques décrites ci-dessus. Il est en effet important de savoir si l'effet des facteurs de croissance endothéliaux se limite à un effet de type "anatomique" sur la paroi artérielle ou s'il associe un bénéfice de type "fonctionnel" en améliorant les fonctions endothéliales. Nous discuterons successivement de l'effet des facteurs de croissance dans 3 modèles expérimentaux de dysfonction endothéliale : (i) la circulation collatérale ; (ii) la régénération endothéliale après angioplastie ; (iii) l'athérosclérose expérimentale.

## 1. Dysfonction endothéliale et circulation collatérale

Dans les suites d'une obstruction artérielle, le développement d'une circulation collatérale de suppléance peut permettre, dans une certaine mesure, la vascularisation du tissu à risque. Sur le plan "anatomique", le degré de développement d'une telle circulation collatérale est très variable. Il est aussi démontré que l'effet bénéfique d'une circulation collatérale ne dépend pas que de son développement anatomique mais est aussi en rapport avec la fonction endothéliale à ce niveau. De nombreux travaux ont démontré l'existence fréquente d'une vasomotricité anormale au niveau des circulations collatérales ; cette vasomotricité anormale est, au moins partiellement, en rapport avec une dysfonction endothéliale.<sup>[14,15]</sup> Le mécanisme de la dysfonction endothéliale en cas

de circulation collatérale n'est pas connu avec exactitude.

L'administration de VEGF ou de bFGF permet d'améliorer le développement de la circulation collatérale en cas d'ischémie myocardique ou périphérique.<sup>[9-11]</sup> Cet effet thérapeutique potentiel pourrait cependant être minimisé par la persistance d'une dysfonction endothéiale au niveau de la circulation collatérale induite. Nous avons, pour cette raison, étudié l'effet d'un traitement par VEGF sur la fonction endothéiale dans un modèle de circulation collatérale de suppléance lors d'une ischémie de membre chez le lapin.<sup>[16]</sup> Dans ce modèle, l'ischémie a été produite par ligature de l'artère iliaque externe (J0). Le débit sanguin a été mesuré à l'aide d'un filament Doppler ; les mesures ont été effectuées au repos et après stimulation par sérotonine et acétylcholine (deux substances ayant des propriétés vasodilatatrices endothélium-dépendantes). Chez les animaux témoins, étudiés à J10 et à J40, l'administration de sérotonine a entraîné une diminution du débit sanguin collatéral (29 et 67% du débit basal, respectivement) ; à l'inverse, chez les animaux traités par VEGF à J10 et étudiés à J40, l'administration de sérotonine a entraîné une augmentation du débit collatéral (119% du débit basal,  $p < 0,05$  par rapport aux animaux témoins). L'administration d'acétylcholine a entraîné une augmentation modérée du débit collatéral chez les animaux témoins (152% à J10 et 177% à J40) ; l'augmentation a été beaucoup plus forte chez les animaux traités par VEGF (254%,  $p < 0,05$  par rapport aux animaux témoins). Ces résultats suggèrent que, dans ce modèle expérimental particulier, le VEGF ne fait pas qu'augmenter le développement de la circulation collatérale mais qu'il permet aussi de rétablir une vasomotricité endothélium-dépendante sensiblement normale.

Au moins deux mécanismes peuvent expliquer l'amélioration de fonction endothéiale après traitement par VEGF. La première hypothèse est que l'amélioration de flux induite par l'administration du facteur de croissance pourrait avoir un effet bénéfique indirect sur la fonction endothéiale. La

deuxième hypothèse est celle d'un effet direct du VEGF sur la cellule endothéiale. A côté de ses effets mitogéniques, le VEGF a aussi été associé à des effets qualitatifs sur la cellule endothéiale.<sup>[17]</sup> On peut donc imaginer que le VEGF module le phénotype des cellules endothéliales de la circulation collatérale et permette ainsi la récupération d'une fonction endothéiale normale. De manière similaire, des travaux récents ont impliqué le bFGF dans l'amélioration de la fonction endothéiale au niveau de territoires myocardiques perfusés par un réseau collatéral.<sup>[18]</sup>

## 2. Dysfonction endothéiale après angioplastie expérimentale

L'angioplastie coronaire est une technique de revascularisation myocardique très largement diffusée. La resténose qui peut survenir dans les six mois qui suivent une procédure réussie demeure cependant une limite importante. Deux mécanismes ont été impliqués dans la physiopathologie de la resténose : l'hyperplasie néo-intimale et le remodelage vasculaire. Dans les modèles expérimentaux, l'hyperplasie néo-intimale, qui est principalement la conséquence d'une réaction de croissance des cellules musculaires lisses, est maximale dans les premières semaines suivant le traumatisme vasculaire. La formation de l'hyperplasie néo-intimale implique plusieurs étapes successives : l'activation, la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses ainsi que la production d'une quantité importante de matrice extracellulaire.<sup>[19]</sup> Le remodelage vasculaire (qui correspond aux changements de taille de l'artère) joue aussi un rôle important dans le phénomène de resténose après angioplastie.<sup>[20]</sup>

La réalisation d'une angioplastie expérimentale est associée à une désendothérialisation quasi complète de la zone concernée. Dans les heures qui suivent l'intervention, les cellules endothéliales adjacentes vont commencer à se diviser pour restaurer la continuité endothéiale. La régénération endothéiale débute habituellement à partir des bords de la zone dénudée et à partir des branches collatérales.<sup>[21]</sup> A distance, même en cas

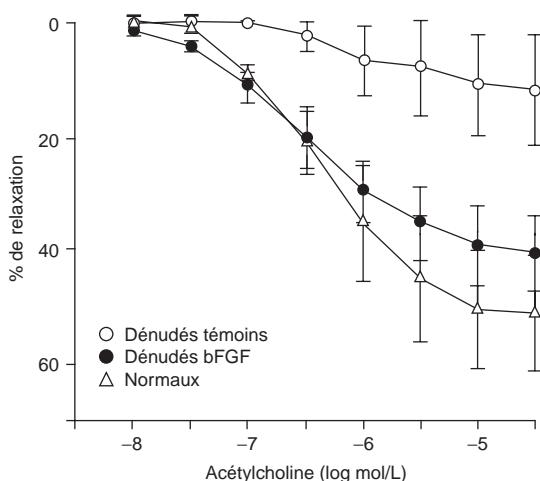
de réendothélialisation complète, les fonctions endothéliales restent altérées. La relaxation endothélium-dépendante aux agonistes tels que l'acétylcholine ou la sérotonine reste, en effet, altérée pendant une longue période après l'angioplastie ; cette constatation a été faite dans les modèles animaux<sup>[5,6]</sup> et aussi chez l'homme.<sup>[22,23]</sup>

Les facteurs de croissance endothéliaux (essentiellement le FGF et le VEGF) ont été utilisés pour améliorer ce processus de réendothélialisation après angioplastie expérimentale.

### 2.1 Le FGF

La première étude démontrant que l'administration de bFGF permettait d'accélérer la réendothélialisation après angioplastie expérimentale est celle de Lindner et al.<sup>[12]</sup> Dans cette étude, les auteurs ont démontré que l'administration de fortes doses de bFGF permettait d'obtenir une réendothélialisation complète en dix semaines dans le modèle de dénudation de la carotide de rat. Il est intéressant de noter que des doses beaucoup plus faibles sont aussi associées à une réendothélialisation significative. Dans un modèle de dénudation de l'artère iliaque de lapin, nous avons observé une accélération de la réendothélialisation après administration de 2,5 µg de bFGF par voie intraveineuse deux fois par semaine.<sup>[24]</sup> Il a été démontré que cet effet bénéfique *in vivo* du FGF existait aussi pour une autre forme de ce facteur de croissance : l'acidic FGF (aFGF).<sup>[25]</sup>

Bien que ces études aient clairement montré l'effet bénéfique du FGF sur la croissance des cellules endothéliales *in vivo*, la question de la fonction de l'endothélium régénéré restait posée. Nous avons récemment rapporté l'effet d'administrations chroniques de bFGF sur les réponses endothélium-dépendantes après traumatisme vasculaire de l'artère iliaque de lapin.<sup>[24]</sup> L'administration de faibles doses de bFGF a non seulement été associée à une accélération de la réendothélialisation mais aussi à une amélioration très spectaculaire des réponses endothélium-dépendantes à l'acétylcholine (fig. 1). Cette amélioration fonctionnelle n'est probablement pas seulement la consé-



**Fig. 1.** Effet du basic fibroblast growth factor (bFGF) sur la réponse endothélium-dépendante à l'acétylcholine après angioplastie expérimentale. Quatre semaines après dénudation artérielle expérimentale, la relaxation en réponse à l'acétylcholine est significativement diminuée chez les animaux témoins (dénudés témoins) par rapport aux animaux normaux (normaux). A l'inverse, les animaux dénudés mais traités par bFGF (dénudés bFGF) ont une réponse à l'acétylcholine quasi normale. Adapté d'après Meurice et al., avec autorisation.<sup>[24]</sup>

quence de l'augmentation de la surface réendothélialisée dans la mesure où il persiste habituellement une dysfonction endothéliale même en cas de réendothélialisation complète.<sup>[6]</sup> De nouveau, comme dans le cas de la circulation collatérale, il faut avancer l'hypothèse d'une modulation de certains aspects qualitatifs des cellules endothéliales par le facteur de croissance.

L'effet de l'administration de bFGF sur l'épaississement néo-intimal après angioplastie expérimentale est variable. De fortes doses de FGF semblent augmenter l'épaississement néo-intimal<sup>[26]</sup> alors que des doses plus faibles n'ont pas d'effet sur ce paramètre (tout en augmentant très significativement la réendothélialisation).<sup>[24]</sup> Ces études suggèrent que l'effet final du FGF sur l'épaississement néo-intimal pourrait être la conséquence d'une stimulation directe et d'une inhibition indirecte de la croissance des cellules musculaires lisses. Il est admis que la présence d'un endothélium fonctionnel peut avoir des pro-

propriétés inhibitrices sur la croissance des cellules musculaires lisses sous-jacentes par l'intermédiaire de substances telles que l'oxyde nitrique (NO) ;<sup>[27]</sup> une réendothélialisation accélérée peut donc inhiber la formation du néointima. A l'inverse, le FGF qui exerce aussi des propriétés de facteur de croissance pour les cellules musculaires lisses artérielles peut directement stimuler l'hyperplasie néo-intimale. Des éléments tels que la dose utilisée, la durée du traitement et le modèle expérimental pourraient alors expliquer ces discordances entre les différentes études.

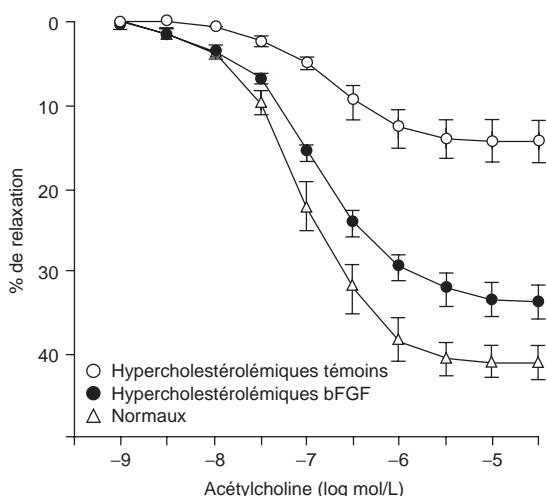
## 2.2 Le VEGF

Il a été démontré que l'administration locale de VEGF pouvait aussi permettre d'accélérer la réendothélialisation après traumatisme artériel. Un effet bénéfique sur les réponses endothélium-dépendantes a été retrouvé après transfert du gène du VEGF dans un modèle d'angioplastie iliaque chez le lapin.<sup>[28]</sup> Le VEGF a la particularité de ne pas favoriser la croissance des cellules musculaires lisses ; cette propriété explique probablement l'effet inhibiteur de l'hyperplasie néo-intimale qui est généralement observé avec le VEGF (le bénéfice indirect par l'intermédiaire de la réendothélialisation n'étant pas masqué par une stimulation directe des cellules musculaires lisses).

## 3. Dysfonction endothéiale et athérosclérose

Il a été démontré depuis de nombreuses années que l'instauration d'un régime hypercholestérolémique aboutissait à une altération de la relaxation endothélium-dépendante.<sup>[29,30]</sup> Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer cette dysfonction endothéiale : (i) une diminution du nombre de cellules endothéliales ; (ii) une diminution de la production ou une augmentation de la dégradation du NO.<sup>[31,32]</sup>

Nous avons récemment étudié l'effet de l'administration de bFGF sur la dysfonction endothéiale dans un modèle d'athérosclérose expérimentale.<sup>[33]</sup> Le régime a consisté en un régime hypercholestérolémique (2%) pendant 6



**Fig. 2.** Effet du basic fibroblast growth factor (bFGF) sur la réponse endothélium-dépendante à l'acétylcholine chez le lapin hypercholestérolémique. Chez les animaux recevant un régime enrichi par 2% de cholestérol (hypercholestérolémiques témoins), la relaxation en réponse à l'acétylcholine est significativement diminuée par rapport aux animaux normaux (normaux). A l'inverse, les animaux hypercholestérolémiques mais traités par bFGF (hypercholestérolémiques bFGF) ont une réponse à l'acétylcholine quasi normale. Adapté d'après Meurice et al., avec autorisation.<sup>[33]</sup>

semaines chez le lapin ; le bFGF a été administré par voie intraveineuse à la dose de 2,5 µg deux fois par semaine. Au terme du suivi, la fonction endothéiale a été très significativement améliorée chez les animaux traités en comparaison des animaux témoins (fig. 2).

## 4. Conclusion

Ces résultats obtenus dans trois modèles différents de dysfonction endothéiale suggèrent un effet qualitatif sur l'endothélium *in vivo*. Les facteurs de croissance endothéliaux apparaissent comme de potentiels agents thérapeutiques dans ces états de dysfonction endothéiale. Des travaux futurs devront préciser les mécanismes responsables de cet effet bénéfique.

## Références

1. Furchtgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-6

2. Vanhoutte PM, Houston D. Platelets, endothelium and vasoconstriction. *Circulation* 1985; 72: 728-34
3. Bossaller C, Habib GB, Yamamoto H, et al. Impaired muscarinic endothelium-dependent relaxation and cyclic guanosine 5'-monophosphate formation in atherosclerotic human coronary artery and rabbit aorta. *J Clin Invest* 1987; 79: 170-4
4. Jayakody L, Senaratne M, Thomson A, et al. Endothelium-dependent relaxation in experimental atherosclerosis in the rabbit. *Circ Res* 1987; 60: 251-64
5. Shimokawa H, Aarhus LL, Vanhoutte PM. Porcine coronary arteries with regenerated endothelium have a reduced endothelium-dependent responsiveness to aggregating platelets and serotonin. *Circ Res* 1987; 61: 256-70
6. Weidinger FF, McLenachan JM, Cybulski MI, et al. Persistent dysfunction of regenerated endothelium after balloon angioplasty of rabbit iliac artery. *Circulation* 1990; 81: 1667-79
7. Orlandi C, Blackshear JL, Hollenberg NK. Specific increase in sensitivity to serotonin of the canine hindlimb collateral arterial tree via the 5-hydroxytryptamine-2 receptor. *Microvasc Res* 1986; 32: 121-30
8. Sellke FW, Kagaya Y, Johnson RG, et al. Endothelial modulation of porcine coronary microcirculation perfused via immature collaterals. *Am J Physiol* 1992; 262: H1669-75
9. Baffour R, Berman J, Garb JL, et al. Enhanced angiogenesis and growth of collaterals by *in vivo* administration of recombinant basic fibroblast growth factor in a rabbit model of acute lower limb ischemia: dose response effect of basic fibroblast growth factor. *J Vasc Surg* 1992; 16: 181-91
10. Banai S, Shou M, Jaklitsch MT, et al. Enhancement of coronary collateral blood flow by intracoronary injection of vascular endothelial growth factor [abstract]. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19: 191A
11. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, et al. Therapeutic angiogenesis: a single intra-arterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hindlimb model. *J Clin Invest* 1994; 93: 662-70
12. Lindner V, Majack RA, Reidy MA. Basic fibroblast growth factor stimulates endothelial regrowth and proliferation in denuded arteries. *J Clin Invest* 1990; 85: 2004-8
13. Asahara T, Bauters C, Pastore C, et al. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates re-endothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation* 1995; 91: 2793-801
14. Sellke FW, Quillen JE, Brooks LA, et al. Endothelial modulation of the coronary vasculature in vessels perfused via mature collaterals. *Circulation* 1990; 81: 1938-47
15. Harrison DG. Neurohumoral and pharmacologic regulation of collateral perfusion. In: Schaper W, Schaper J, editors. *Collateral circulation*. Boston: Kluwer, 1992: 329-43
16. Bauters C, Asahara T, Zheng LP, et al. Recovery of disturbed endothelium-dependent flow in the collateral-perfused rabbit ischemic hindlimb after administration of vascular endothelial growth factor. *Circulation* 1995; 91: 2802-9
17. Peters KG, De Vries C, Williams LT. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8915-9
18. Sellke FW, Wang SY, Friedman M, et al. Basic FGF enhances endothelium-dependent relaxation of the collateral-perfused coronary microcirculation. *Am J Physiol* 1994; 267: H1303-11
19. Bauters C, Meurice T, Hamon M, et al. Mechanisms and prevention of restenosis: from experimental models to clinical practice. *Cardiovasc Res* 1996; 31: 835-46
20. Mintz GS, Popma JJ, Pichard AD, et al. Arterial remodeling after coronary angioplasty: a serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 1996; 94: 35-43
21. Clowes AW, Collazzo RE, Karnovsky MJ. A morphologic and permeability study of luminal smooth muscle cells after arterial injury in the rat. *Lab Invest* 1978; 39: 141-50
22. McFadden EP, Bauters C, Lablanche JM, et al. Response of human coronary arteries to serotonin after injury by coronary angioplasty. *Circulation* 1993; 88: 2076-85
23. Kirigaya H, Aisawa T, Ogasawara K, et al. Incidence of acetylcholine-induced spasm of coronary artery subjected to balloon angioplasty. *Jpn Circ J* 1993; 57: 883-90
24. Meurice T, Bauters C, Auffray JL, et al. Basic fibroblast growth factor restores endothelium-dependent responses after balloon injury of rabbit arteries. *Circulation* 1996; 93: 18-22
25. Bjornsson TD, Dryjski M, Tluczek J, et al. Acidic fibroblast growth factor promotes vascular repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 8651-5
26. Lindner V, Lappi DA, Baird A, et al. Role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation. *Circ Res* 1991; 68: 106-13
27. Scott-Burden T, Vanhoutte PM. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. *Circulation* 1993; 87 Suppl. V: V-51-5
28. Asahara T, Chen D, Kearney M, et al. Accelerated re-endothelialization and reduced neointimal thickening following catheter transfer of phVEGF165. *Circulation* 1996; 94: 3291-302
29. Wines PA, Schmitz JM, Pfister SL, et al. Augmented vasoconstrictor responses to serotonin precede development of atherosclerosis in aorta of WHHL rabbit. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 195-202
30. Wright CE, Angus JA. Effects of hypertension and hypercholesterolemia on vasodilation in the rabbit. *Hypertension* 1986; 8: 361-71
31. Cooke JP, Andon NA, Girerd XJ, et al. Arginine restores cholinergic relaxation of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. *Circulation* 1991; 83: 1057-62
32. Ohara Y, Peterson TE, Sayegh HS, et al. Dietary correction of hypercholesterolemia in the rabbit normalizes endothelial superoxide anion production. *Circulation* 1995; 92: 898-903
33. Meurice T, Bauters C, Vallet B, et al. Basic fibroblast growth factor restores endothelium-dependent responses of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. *Am J Physiol* 1997; 272: H613-7

Correspondance et réimpression: Pr Christophe Bauters, Service de Cardiologie B et Hémodynamique, Hôpital Cardiologique, Bvd du Professeur J. Leclercq, 59037 Lille Cedex, France.