



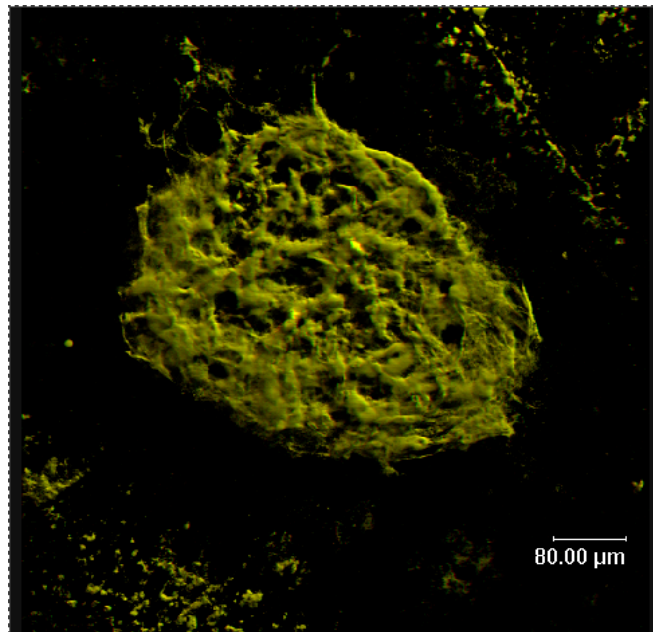
UNIVERSITE DE LIEGE
FACULTE DE MEDECINE



Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement, Université de Liège.

Professeurs Jean-Marie RAKIC - Jean-Michel FOIDART

Rôle des protéinases et de leurs inhibiteurs dans les formes associées à une néovascularisation anormale sous-rétinienne. Caractérisation par l'étude de modèles animaux transgéniques et développements thérapeutiques.



Vincent LAMBERT

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Biomédicales.

Année académique 2004-2005

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je tiens tout particulièrement à remercier et à exprimer toute ma sympathie aux personnes qui m'ont aidé, soutenu et permis de réaliser cette étude.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Jean-Michel Foidart de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur Jean-Marie Rakic qui aura été plus qu'un promoteur pour moi. Nous avons pu associer nos connaissances afin de développer ce nouveau projet, lors de longues conversations riches en idées et pleines d'humour. Je voudrais également remercier le Professeur Agnès Noël pour sa gentillesse, sa patience, sa connaissance et son savoir qu'elle a su partager avec moi durant mon séjour au laboratoire. Un grand merci au Docteur Francis Frankenne pour tous ses conseils judicieux et sa sagesse. Mais plus que tout, je voudrais remercier particulièrement ces quatre personnes qui m'ont donné une nouvelle chance dans la recherche, et sans qui je ne serais pas arrivé là aujourd'hui. A vous tous, merci de m'avoir permis d'aimer mon métier à nouveau et de m'avoir redonné le goût à la recherche.

Ce travail est avant tout aussi le fruit d'une collaboration et d'une équipe. Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire de Biologie des Tumeurs et du développement qui m'ont aidé durant cette thèse. Je voudrais remercier plus particulièrement le Docteur Carine Munaut, pour notre collaboration et son enseignement des techniques de biologie moléculaire, le Docteur Khalid Bajou pour son aide au début de ce travail, Maud Jost pour nos travaux en collaboration, Laurent Naa, Fabrice Olivier, Patricia Gavitelli, Isabelle Dasoul et Guy Roland pour leur inestimable aide technique, ainsi que Tony Lejeune du service d'Ophtalmologie du CHU de Liège pour les longues heures qu'il m'a consacrées, sa gentillesse et son humour, et le Docteur Patrick Motte pour sa patience et sa gentillesse lors de nos séances de mesures au microscope confocal.

Je tiens à remercier chaleureusement mes collègues de bureau, Maria-Luz Alvarez, Sarah Berndt, Laetitia Devy, Laurent Naa, Laurence Melen, Nadine Simon et Pierre Blaise qui m'ont supportés avec calme et amitié durant les bons moments mais aussi pendant les moments plus difficiles.

Je ne peux passer sous silence l'aide financière majeure qui a permis mon engagement depuis 1999, grâce à Madame Fanchamps du service d'Ophtalmologie du CHU de Liège, et grâce à

l'association LES AMIS DES AVEUGLES de Ghlin sans laquelle je n'aurais pu réaliser cette thèse. Je remercie également le ROTARY de Liège pour le prix décerné à ce travail à l'occasion de leur 75^{ème} anniversaire d'existence, le FNRS et la compagnie McKinsey & Co également pour le prix décerné à cette étude. Je remercie également la Fondation Léon Frédéricq et le FRO (Fondation pour la Recherche en Ophtalmologie) pour les subsides de fonctionnement qui nous ont permis de réaliser ses travaux.

Il m'est agréable de pouvoir remercier mes parents qui m'ont toujours assisté dans mes choix d'étude et qui m'ont permis de réaliser mes rêves. Merci pour votre soutien et votre amour. Un grand merci aussi à ma grand-mère qui m'a supporté durant toutes mes années d'études. Je tiens à remercier chaleureusement mon ami Olivier qui a toujours été à mes cotés dans tous les moments importants aussi bien les bons que les autres.

Je voudrais terminer en remerciant Paola pour son soutien et son réconfort, merci à toi de m'avoir supporté dans tous ces moments et merci pour ton amour.

Je dédie cette thèse à mon fils Alexandre.

Sommaire

Liste des abréviations	i
Introduction	1
1 L'angiogenèse	1
1.1 Angiogenèse pathologique versus angiogenèse physiologique	1
1.1.1 Les trois étapes de l'angiogenèse	2
1.2 Le contrôle de l'angiogenèse pathologique	4
1.3 Les VEGFs et leurs récepteurs	8
1.3.1 Les récepteurs du VEGF	10
2 Le système du plasminogène.....	12
2.1 Les inhibiteurs physiologiques du système du plasminogène.....	14
2.2 Le système du plasminogène et l'angiogenèse	15
2.3 Rôle inattendu de PAI-1 dans l'angiogenèse tumorale	16
3 Les Métalloprotéinases Matricielles (MMPs)	17
3.1 La Famille des MMPs	17
3.2 Classification et structure des MMPs.....	18
3.3 Régulation de l'activité des MMPs	24
3.4 Les MMPs : régulateurs de l'angiogenèse	26
4 La dégénérescence maculaire liée à l'âge	28
4.1.1 La photocoagulation au laser.....	29
4.1.2 La thérapie photodynamique	29

4.1.3	La thermothérapie transpupillaire	30
4.1.4	Les traitements chirurgicaux	30
4.1.5	La radiothérapie externe.....	30
4.1.6	Traitements médicamenteux	30
4.1.7	Rééducation orthoptique et aides visuelles	31
4.1.8	Moyens électroniques.....	31
4.2	Etiopathologie de la DMLA.....	31
4.2.1	Fonctionnement normal.....	31
4.2.2	Les étapes de la dégénérescence	32
4.3	Traitements expérimentaux.....	33
	But et Plan.....	35
	Travaux personnels	36
5	Chapitre 1: Rôle des Protéases à Sérine dans la Néovascularisation Choroïdienne	36
5.1	Article 1 : Influence of plasminogen activator inhibitor type 1 on choroidal neovascularization.....	36
5.1.1	Introduction	36
5.1.2	Matériel et Méthodes.....	37
5.1.3	Résultats	38
5.1.4	Discussion	41
5.2	Article 2 : Mice without uPA, tPA, or plasminogen genes are resistant to experimental choroidal neovascularization.....	43
5.2.1	Introduction	43

5.2.2	Matériel et méthodes	43
5.2.3	Résultats	45
5.2.4	Discussion	49
5.3	Article 3 : Dose-dependent modulation of choroidal neovascularization by plasminogen activator inhibitor type I: implications for clinical trials	52
5.3.1	Introduction	52
5.3.2	Matériel et méthodes	52
5.3.3	Résultats	54
5.3.4	Discussion	57
6	Chapitre 2: Rôle des Métalloprotéinases dans la Néovascularisation Choroïdienne	60
6.1	Article 4 : Matrix metalloproteinase-9 contributes to choroidal neovascularization	60
6.1.1	Introduction	60
6.1.2	Matériel et Méthodes.....	61
6.1.3	Résultats	62
6.1.4	Discussion	64
6.2	Article 5 : MMP-2 and MMP-9 synergize in promoting choroidal neovascularization.....	67
6.2.1	Introduction	67
6.2.2	Résultats	67
6.2.3	Discussion	71
7	Discussion générale et perspectives.....	74
7.1	Applications cliniques dirigées contre l'angiogenèse choroïdienne	74

7.1.1	Développement d'un inhibiteur spécifique des gélatinases/MT1-MMP.....	79
8	Bibliographie.....	84
9	Annexes.....	112
9.1	Article 1 : Influence of plasminogen activator inhibitor type 1 on choroidal neovascularization.....	112
9.2	Article 2 : Mice without uPA, tPA, or plasminogen genes are resistant to experimental choroidal neovascularization.....	120
9.3	Article 3 : Dose-dependent modulation of choroidal neovascularization by plasminogen activator inhibitor type I: implications for clinical trials	129
9.4	Article 4 : Matrix metalloproteinase-9 contributes to choroidal neovascularization 137	
9.5	Article 5 : MMP-2 and MMP-9 synergize in promoting choroidal neovascularization.....	145

Liste des abréviations

Ang 1 et 2	:	angiopoïétine 1 et 2
AdCMV	:	adénovirus recombinant comportant un promoteur de cytomégalo­virus
ADN	:	acide désoxyribonucléique (DNA)
AEC	:	3-amino-9-ethylcarbazole
ARN	:	acide ribonucléique (RNA)
aFGF	:	<i>acidic fibroblast growth factor</i>
bFGF	:	<i>basic fibroblast growth factor</i>
CAM assay	:	modèle de membrane chorio-allantoïde d'embryon de poulet
CNV	:	néovascularisation choroïdienne ou membrane néovasculaire
DMLA	:	dégénérescence maculaire liée à l'âge
EMMPRIN	:	inducteurs des métalloprotéinases matricielles extracellulaires
EP	:	épithélium pigmentaire
FGF	:	<i>fibroblast growth factor</i>
GPI	:	glycosylphosphatidylinositol
HIF	:	<i>hypoxia-inducible factor</i>
Ig	:	immunoglobuline
IL	:	interleukine
KO	:	déficiente (<i>knock-out</i>)
LBS	:	<i>lysine-binding site</i>
LPC	:	microdissecteur laser (<i>laser pressure catapulting</i>)
LRP	:	<i>lipoprotein receptor-related protein</i>
MEC	:	matrice extra-cellulaire
MMPs	:	métalloprotéinases matricielles
MT-MMPs	:	métalloprotéinases de type matricielles
PAI-1	:	inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1
PCR	:	réaction de polymérisation en chaîne
PDGF	:	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDGFR	:	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PDT	:	thérapie photodynamique
PECAM	:	molécule d'adhésion des plaquettes et des cellules endothéliales
PEDF	:	facteur dérivé de l'épithélium pigmentaire de la rétine
Plg	:	plasminogène
PIGF	:	placenta growth factor
Pln	:	plasmine
RT-PCR	:	transcription inverse suivie d'une PCR
scuPA	:	activateur du plasminogène de type urokinase simple chaîne
SDS	:	<i>sodium dodecyl sulphate</i>
TGF	:	<i>transforming growth factor</i>
TIMPs	:	inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases matricielles
tPA	:	activateur du plasminogène de type tissulaire
uPA	:	activateur du plasminogène de type urokinase
uPAR	:	récepteur de l'activateur du plasminogène de type urokinase
VBM	:	membrane basale vasculaire
VEGF	:	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	:	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
VHL	:	von Hippel-Lindau
VN	:	vitronectine
VPF	:	facteur de perméabilité vasculaire
WT	:	sauvage (<i>wild-type</i>)

Introduction

1 L'angiogenèse

1.1 Angiogenèse pathologique versus angiogenèse physiologique

Au cours du développement embryonnaire, les vaisseaux sanguins sont formés de novo, à partir de cellules précurseurs de cellules endothéliales, appelées angioblastes, qui s'assemblent en un plexus de capillaires primaires. Ce réseau primitif se différencie par la suite. Ce processus de formation de vaisseaux sanguins est appelé vasculogenèse. De nouveaux vaisseaux peuvent également bourgeonner et se diviser en branchements à partir des capillaires déjà existants. Ce processus est alors appelé angiogenèse [Carmeliet, 2000].

Chez l'adulte, le réseau vasculaire est habituellement quiescent. Les cellules endothéliales font partie des cellules dont la durée de vie est la plus longue, après celle des cellules nerveuses. Le renouvellement physiologique des cellules endothéliales peut se mesurer en années dans les tissus. Les rares organes qui, à l'état adulte, requièrent ce mécanisme, sont les organes reproducteurs femelles. Ces organes sont en effet soumis à une croissance physiologique [Hanahan and Folkman, 1996; Carmeliet and Jain, 2000] et subissent d'importantes modifications tissulaires [Kalluri, 2003].

Cependant, dans des conditions pathologiques, une angiogenèse peut se développer. L'exemple typique est celui des cancers. Ce qui différencie le processus « normal » de l'angiogenèse pathologique, c'est l'équilibre finement régulé entre des facteurs pro- et anti-angiogéniques [Carmeliet and Jain, 2000; Yancopoulos et al., 2000; Liekens et al., 2001].

Pendant l'angiogenèse physiologique normale, les nouveaux vaisseaux deviennent rapidement matures et stables. Par contre, les tumeurs, souvent comparées à des blessures qui ne cicatrisent jamais [Dvorak, 1986], ont perdu ce délicat équilibre entre les facteurs positifs et négatifs de contrôle des vaisseaux. Une des caractéristiques des vaisseaux tumoraux est qu'ils ne deviennent jamais quiescents et sont soumis à une croissance vasculaire constante au sein des tumeurs. La conséquence de ce phénomène, est que le réseau vasculaire tumoral développe des caractéristiques uniques et devient distinct du système d'approvisionnement sanguin normal. Ces observations ont conduit au concept « d'équilibre angiogénique » par

lequel le statut de l'activation endothéliale est déterminé par l'induction de régulateurs positifs et/ou par la perte de régulateurs négatifs [Hanahan and Folkman, 1996; Bergers and Benjamin, 2003] (fig. 1).

Les vaisseaux sanguins tumoraux possèdent une architecture différente des vaisseaux normaux. Ils ont une forme irrégulière. Ils sont dilatés et tortueux, et peuvent former des culs-de-sac. Ils ne sont pas organisés en veinules, artérioles et capillaires comme les vaisseaux normaux. Le réseau vasculaire qui se forme au sein des tumeurs est souvent très perméable et hémorragique. Ceci est partiellement dû à la sur-expression de VEGF (vascular endothelial growth factor, aussi appelé facteur de perméabilité vasculaire ou VPF). Les cellules périvasculaires qui sont habituellement en contact étroit avec l'endothélium deviennent souvent plus lâchement associées et moins abondantes [Benjamin et al., 1999; Morikawa et al., 2002]. La présence de cellules tumorales intégrées au sein des parois des vaisseaux sanguins tumoraux a été également décrite [Folberg et al., 2000; McDonald et al., 2000; Hendrix et al., 2003; Shirakawa et al., 2003; Shirakawa et al., 2002]. La progression d'autres tumeurs implique par contre des phénomènes de vasculogénèse, grâce au recrutement de précurseurs de cellules endothéliales de la moelle osseuse [Rafii, 2000; Lyden et al., 2001]. Les vaisseaux tumoraux peuvent se développer également par intussusception (fig. 2), c'est-à-dire l'insertion d'une colonne tissulaire au sein de la lumière d'un vaisseau pré-existant [Carmeliet and Jain, 2000]. L'augmentation de l'angiogénèse coïncide avec la pénétration de cellules tumorales au sein de la circulation et donc facilite la dissémination des métastases.

1.1.1 Les trois étapes de l'angiogénèse

1.1.1.1 La dégradation de la matrice extracellulaire.

Le bourgeonnement angiogénique est un des mécanismes de formation des vaisseaux chez l'adulte. L'angiogénèse débute par une vasodilatation induite par le VEGF et modulée par le monoxyde d'azote. Cette vasodilatation permet l'extravasation de protéines plasmatiques favorisant la migration des cellules endothéliales. Les protéinases de type activateur du plasminogène, les métalloprotéinases et les molécules de la famille des héparinases influencent l'angiogénèse en dégradant la matrice extracellulaire et en permettant la libération de facteurs piégés dans cette matrice tels que les FGFs (fibroblast growth factors) et le VEGF [Stetler-Stevenson, 1999].

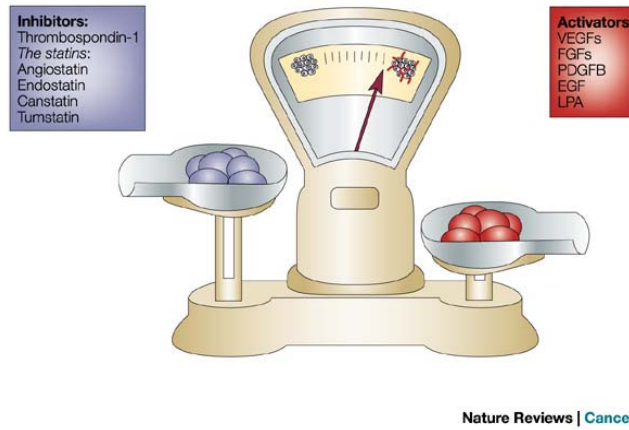


Figure 1: Représentation de l'équilibre angiogénique entre les facteurs pro- et anti-angiogénique d'après [Bergers and Benjamin, 2003].

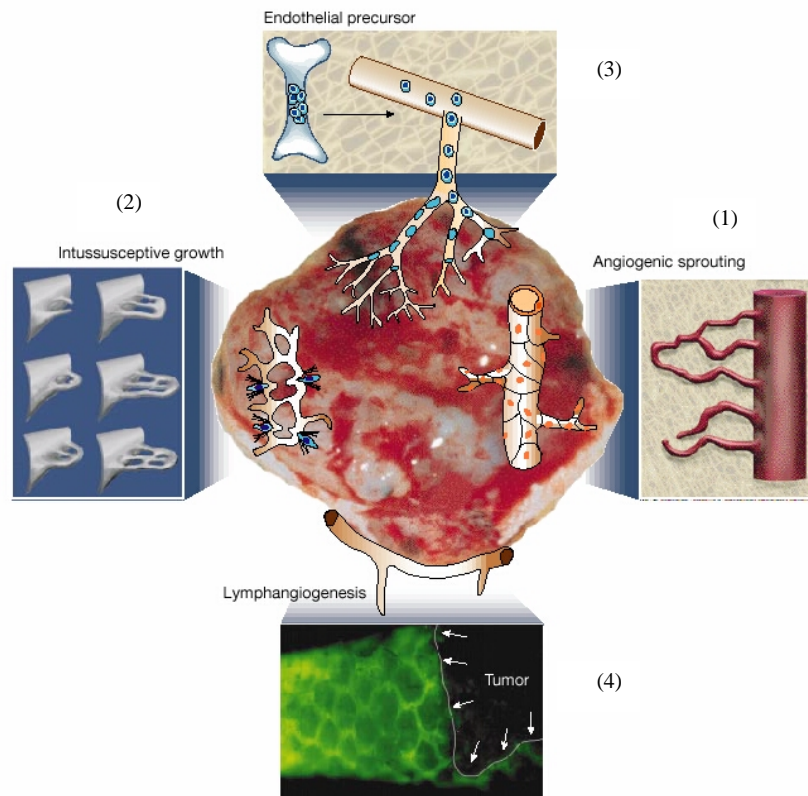


Figure 2 : Mécanismes cellulaires d'angiogénèse tumorale et de lymphangiogénèse. La croissance des vaisseaux tumoraux peut se dérouler selon différents mécanismes : (1) le réseau vasculaire de l'hôte s'étend par bourgeonnement de cellules endothéliales ou par formation de ponts vasculaires, c'est l'angiogénèse ; (2) les vaisseaux tumoraux peuvent être remodelés et s'étendre par insertion de colonnes de tissus interstitiels au sein de vaisseaux pré-existants, c'est l'intussusception ; (3) des cellules endothéliales résidentes précurseurs provenant de la moëlle osseuse ou de la circulation périphérique peuvent se loger au sein des tumeurs et développer une lignée endothéliales de vaisseaux tumoraux, c'est la vasculogénèse. (4) Les vaisseaux lymphatiques drainent le fluide interstitiel tumoral et offrent une porte de sortie pour la dissémination des métastases. [Carmeliet and Jain, 2000]

Le réseau des angiopoïétines (1 et 2) et leur récepteur Tie-2 est impliqué dans le détachement des cellules musculaires lisses et le relâchement de la matrice des vaisseaux [Maisonpierre et al., 1997;Thurston et al., 2000].

1.1.1.2 La prolifération et la migration des cellules endothéliales

La matrice extracellulaire étant dégradée, les cellules endothéliales proliférantes vont migrer à distance. Les VEGF et leurs récepteurs sont largement impliqués dans cette prolifération et cette migration cellulaire [Ferrara, 1999]. Les intégrines sont des molécules qui participent à l'interaction cellule/matrice (...v3 ou $\alpha 5$). À cette étape, les molécules impliquées dans les interactions cellule-cellule ou cellule-matrice comme l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ permettent l'adhésion et l'étalement des cellules endothéliales [Brooks et al., 1994a;Santoni et al., 2001]. L'angiopoïétine-1 apparaît impliquée dans le chimiotactisme des cellules endothéliales potentialisant l'effet du VEGF [Gale et al., 2002]. L'angiopoïétine-1 permet aussi la maturation et la stabilisation du vaisseau [Suri et al., 1998;Hawighorst et al., 2002]. Les membres de la famille des FGF et de la famille des PDGF affectent aussi l'angiogenèse en recrutant des cellules mésenchymateuses ou des cellules inflammatoires [Hirschi et al., 1999;Cao et al., 2003].

Les cellules endothéliales s'assemblent en tubes pleins qui acquièrent par la suite une lumière. Le VEGF en association avec l'angiopoïétine-1 participe à la formation et l'augmentation du diamètre luminal [Suri et al., 1998]. La thrombospondine-1 est un inhibiteur endogène de la formation de la lumière.

1.1.1.3 La différenciation des cellules endothéliales

Afin de s'adapter aux demandes de la physiologie locale, les cellules endothéliales acquièrent des caractéristiques spécialisées, déterminées par l'organe dans lequel elles se situent [Risau, 1997]. Par exemple, le développement de la barrière hématoencéphalique nécessite une interaction des cellules endothéliales avec les cellules astrogliales et les péricytes et nécessite de l'angiotensinogène. C'est le cas également de la rétine qui est protégée par la barrière hémato-rétinienne sensible au VEGF [Antonetti et al., 1999]. Les produits à l'intérieur des vaisseaux ne diffusent pas vers les tissus en raison des jonctions intercellulaires serrées (tight-

junctions). Au contraire, les cellules endothéliales des glandes endocrines impliquées dans l'échange de particules deviennent fenestrées et discontinues. Cette transformation s'effectue par l'entremise des interactions entre le VEGF et la matrice extracellulaire. Les cellules endothéliales dans les tumeurs sont anormales sur plusieurs points. Elles forment des multicouches, des ponts, contiennent des trous intercellulaires, démontrent des propriétés de perméabilité incontrôlée et subissent un remodelage constant [Couffinhal et al., 2001].

La maturation du réseau endothélial implique un remodelage et une uniformisation des capillaires ainsi qu'une organisation régulière et structurée du réseau. Quelques expériences montrent que le VEGF, le récepteur Tie-1, certaines molécules d'adhésion ou des intégrines sont impliquées dans ce remodelage [Carmeliet et al., 1996; Carmeliet et al., 1999; Patan, 1998]. L'établissement d'un réseau vasculaire fonctionnel requiert la maturation des vaisseaux natifs en vaisseaux matures, durables et fonctionnels (fig. 3). C'est l'association de péricytes et de cellules musculaires lisses avec les néo-vaisseaux qui régule la prolifération, la survie, la migration et la différenciation des cellules endothéliales. Le PDGF (Platelet-derived growth factor) et son récepteur le PDGFR ont un rôle essentiel dans la stabilisation de ces vaisseaux natifs en recrutant des cellules progénitrices mésenchymateuses [Carmeliet, 2003]. Le PlGF (Placenta growth factor) contribue également à l'équilibre angiogénique par différents mécanismes. Il affecte les cellules endothéliales en amplifiant l'activité angiogénique du VEGF, il agit sur les cellules musculaires lisses et par conséquent stimule la maturation et la stabilisation des vaisseaux. Le PlGF recrute des cellules inflammatoires qui jouent un rôle crucial dans la croissance latérale des vaisseaux, et enfin il peut mobiliser des cellules souches et progénitrices vasculaires et hématopoïétiques de la moelle osseuse [Autiero et al., 2003].

1.2 Le contrôle de l'angiogenèse pathologique

La plupart des connaissances concernant le contrôle de l'angiogenèse pathologique viennent de l'angiogenèse tumorale. Les régulateurs positifs incluent au moins la famille des VEGF, les FGFs, les angiopoïétines, les cytokines, les chémokines, et leurs récepteurs à tyrosine kinases.

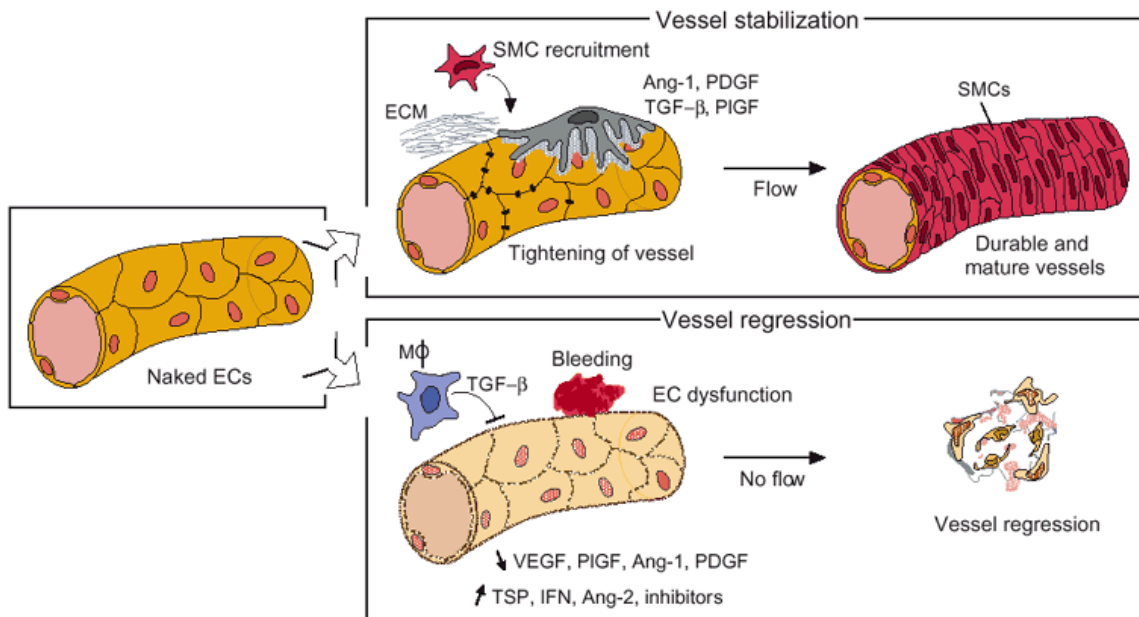


Figure 3 :Les vaisseaux néoformés ne sont constitués que de cellules endothéliales. Le panneau supérieur montre que la maturation des vaisseaux requiert un mélange de facteurs angiogéniques ou artériogéniques tels que l'angiopoïétine-1, le PDGF ou le PIGF afin de conférer une durée de vie suffisante aux vaisseaux, permettant aux cellules endothéliales d'être plus jointives et d'être couvertes par les cellules péri-vasculaires que sont les péricytes et les cellules musculaires lisses. Le panneau inférieur montre la régression des vaisseaux lorsque les facteurs angiogéniques requis sont insuffisants. [Carmeliet, 2003]

Un nombre croissant de régulateurs négatifs a été identifié, tels notamment les inhibiteurs de protéinases, la thrombospondine, les interférons, les chémokines (IP-10 et PF-4), les fragments bio actifs composant de la matrice extra-cellulaire (MEC) [Liekens et al., 2001; Yancopoulos et al., 2000].

L'existence d'une large série d'autres molécules pro-angiogéniques (fréquemment testées sur le modèle cornéen) a été démontrée ces dernières années. Comme elles ont été peu ou pas abordées dans ce travail, nous nous limiterons à en faire une description schématique (Tableau 1).

Il existe également une liste impressionnante de facteurs endogènes capables d'inhiber l'angiogenèse. Parmi ces derniers, il nous semble important de mentionner deux fragments protéolytiques : l'angiostatine (dérivée du plasminogène, [O'Reilly et al., 1994]) et l'endostatine (dérivée du collagène de type XIII, [O'Reilly et al., 1997]). D'autres, comme la thrombospondine, sont des facteurs régulés par les gènes suppresseurs de la croissance tumorale [Dameron et al., 1994]. Enfin, nous ne pouvons passer sous silence un inhibiteur découvert au niveau oculaire, le facteur dérivé de l'épithélium pigmentaire de la rétine, PEDF [Dawson et al., 1999].

Les facteurs angiogéniques, notamment le VEGF, produits par les cellules tumorales, induisent une hyper-perméabilité résultant en l'extravasation de protéines plasmatiques incluant au moins : le fibrinogène, la pro-thrombine, et la vitronectine. Le facteur tissulaire, par le biais de l'activation de la thrombine, déclenchent la formation de fibrine [Folkman, 1996]. Associée avec d'autres protéines d'adhésion telles que la vitronectine, la laminine et la fibronectine, la fibrine forme cette matrice temporaire favorable à l'angiogenèse et à la croissance tumorale [Dvorak et al., 1995]. Ces composants matriciels contrôlent la prolifération, la migration, la survie et l'apoptose cellulaire par l'interaction des molécules d'adhésion exprimées à la surface cellulaire. L'angiopoïétine 1 stabilise le réseau endothélial par stimulation des interactions entre les cellules endothéliales et péri-endothéliales, et réduit la perméabilité vasculaire [Carmeliet and Jain, 2000].

Tableau 1 - Liste (non exhaustive) d'une série de facteurs intervenant dans l'angiogenèse.

Facteur	Propriétés	Influence de la déficience/sur-expression chez la souris
-Récepteurs Tie1/Tie2	<ul style="list-style-type: none"> - expression semblable aux récepteurs de VEGF - propriété tyrosine kinase [Korhonen et al., 1994] 	<ul style="list-style-type: none"> - déficience en Tie1 est létale [Puri et al., 1995] - déficit en Tie2 → perte des branchements [Sato et al., 1995]
- Angiopoïétines 1/2	<ul style="list-style-type: none"> - ligands du récepteur Tie2 - Ang2 est l'antagoniste de Ang1 [Maisonpierre et al., 1997] 	<ul style="list-style-type: none"> - déficit en Ang1 semblable au déficit en Tie2 [Suri et al., 1996] - sur-expression d'Ang2 semblable au déficit en Ang1
- FGF(s)	<ul style="list-style-type: none"> - effet mitogène sur plusieurs types cellulaires dont les cellules endothéliales [Thomas, 1987] - lié à la matrice [Folkman et al., 1988;Soubrane et al., 1990] 	<ul style="list-style-type: none"> - déficience combinée aFGF et bFGF autorise un développement vasculaire normal [Miller et al., 2000]
- PDGF	<ul style="list-style-type: none"> - homo- ou hétéro-dimère de chaîne A et B - mitogène pour muscle lisse et péricytes [Heldin and Westermark, 1999] 	<ul style="list-style-type: none"> - déficit létal par manque de recrutement des péricytes [Lindahl et al., 1997]

- | | | |
|---|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> - TGF-β | <ul style="list-style-type: none"> - sécrété sous forme latente activée par pH acide [Lawrence et al., 1985] ou protéases [Lyons et al., 1988] - effet lié à la dose [Merwin et al., 1991; Pepper et al., 1993b] - effet net anti-protéolytique [Pepper et al., 1990] - stimule le recrutement de cellules inflammatoires | <ul style="list-style-type: none"> - déficience létale avec anomalies de vascularisation [Dickson et al., 1995] - déficience du récepteur létale [Oshima et al., 1996] |
| <ul style="list-style-type: none"> - TNF-α | <ul style="list-style-type: none"> - synergie avec VEGF pour l' effet perméabilisant sur l'endothélium [Clauss et al., 2001] - déficience non létale [Marino et al., 1997] | |
| <ul style="list-style-type: none"> - Angiogénine | <ul style="list-style-type: none"> - ribonucléase isolée dans les tumeurs humaines [Fett et al., 1985; Pavlov and Badet, 2001] - son inhibition exerce un effet anti-tumoral [Kao et al., 2002] | |

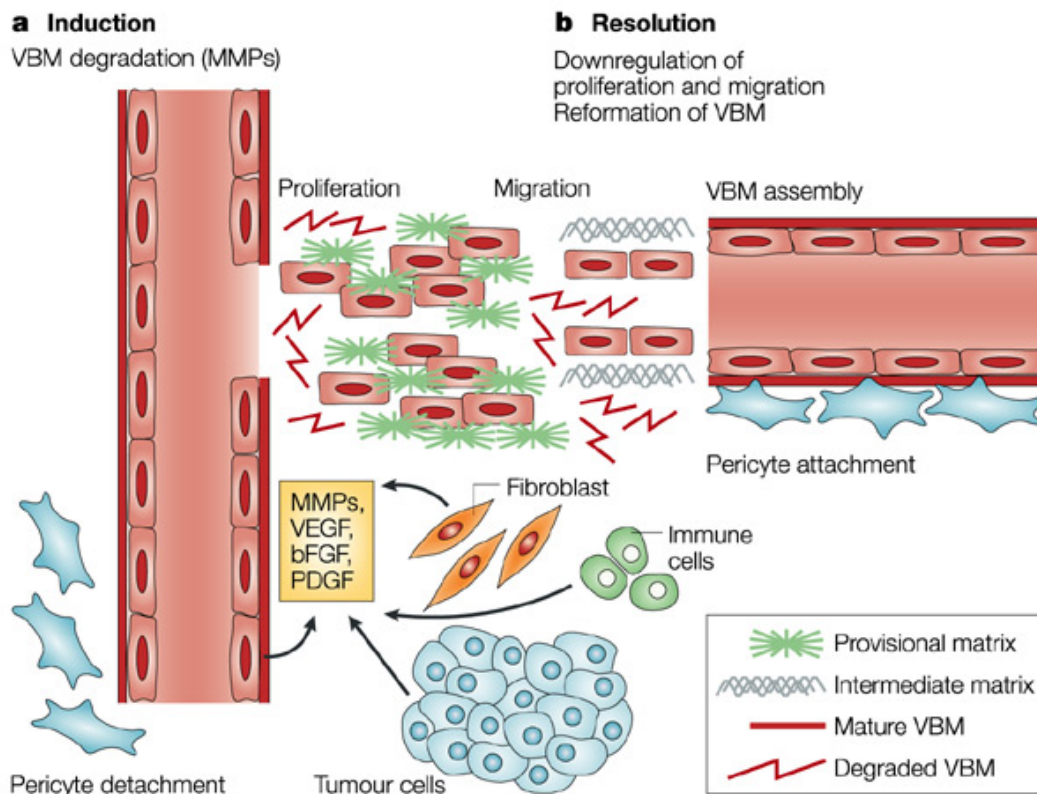
Les molécules d'adhésion les plus importantes dans l'angiogenèse comprennent les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$, les récepteurs à la fibrine et à la vitronectine [Eliceiri and Cheresh, 1999; Brooks, 1996; Scatena and Giachelli, 2002]. Le blocage des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$, par des anticorps monoclonaux ou des petites molécules inhibitrices, empêche la croissance tumorale et l'angiogenèse dans des modèles animaux [Brooks et al., 1994b]. Toutefois, l'angiogenèse induite par les tumeurs se déroule correctement, et est même augmentée chez les souris déficientes pour le β_3 ou doublement déficientes pour le β_3/β_5 . [Reynolds et al., 2002]. Ces données apparemment paradoxales suggèrent que, plutôt que d'être requises pour l'angiogenèse, les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ pourraient fonctionner normalement en la limitant. L'effet réel des agents bloquants des intégrines serait l'activation de ces intégrines, un processus se référant à la « voie de mort cellulaire médiée par les intégrines », conduisant à l'inhibition de l'angiogenèse [Cheresh and Stupack, 2002]. Dans un modèle oculaire de néovascularisation rétinienne induite par hypoxie, le blocage des intégrines chez les souris p53 -/- est inefficace pour empêcher l'angiogenèse rétinienne pathologique, suggérant que les intégrines α_v et le p53 agissent de concert [Stromblad et al., 2002].

Pendant l'angiogenèse, la protéolyse extra-cellulaire est impliquée à différents niveaux, notamment au niveau du remodelage de la matrice provisoire, de la dégradation des membranes basales, de la migration et de l'invasion cellulaire (fig. 4). En plus de la dégradation des composants de la matrice extracellulaire, les protéinases sont aussi impliquées dans l'activation de cytokines, de même que dans la libération de facteurs de croissance séquestrés dans la MEC [Noel et al., 1997; Rifkin et al., 1999; Egeblad and Werb, 2002; Noel et al., 2004].

Nous décrivons plus en détails la famille des VEGFs et les protéases impliquées au cours de l'angiogenèse et qui font l'objet de notre travail

1.3 Les VEGFs et leurs récepteurs

Depuis la découverte du VEGF ou VEGF-A, plusieurs homologues, dont les fonctions spécifiques sont moins bien connues, ont été identifiés : les VEGF-B, -C, -D, -E et le facteur de croissance placentaire PlGF [Papetti and Herman, 2002].



Nature Reviews | Cancer

Figure 4 : L'angiogenèse est associée à la dégradation et à la néoformation de la membrane basale vasculaire (VBM). A) En réponse à des facteurs de croissance et aux MMPs, la membrane basale vasculaire subit une dégradation et des changements structurels. Cette transformation de matrice mature en matrice transitoire permet la prolifération et la migration des cellules endothéliales vasculaires. De tels facteurs de croissance, comme le VEGF (vascular endothelial growth factor), le bFGF (basic fibroblast growth factor) ou le PDGF (platelet-derived growth factor) sont relargués par la membrane basale, et sont aussi produits par les cellules tumorales, les fibroblastes et les cellules immunes. B) L'ensemble formé par les cellules endothéliales, les péricytes et la membrane basale vasculaire va conduire à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. [Kalluri, 2003]

C'est avec le PlGF que la similitude (~ 53%) est la plus forte [Maglione et al., 1991]. Ce dernier est de façon primaire exprimé dans le placenta et dans une moindre mesure, dans le cœur, le poumon, la glande thyroïde et le muscle squelettique [Iyer and Acharya, 2002]. Le PlGF est un ligand spécifique du récepteur au VEGF de type I appelé Flt-1, dont nous reparlerons plus tard. *In vitro*, il est capable d'induire une prolifération et une migration endothéliale [Park et al., 1994]. Comme pour le VEGF, des cibles non-endothéliales ont été décrites, notamment sur les monocytes [Barleon et al., 1996], les ostéoclastes [Niida et al., 1999] ou durant l'invasion cytotrophoblastique [Zhou et al., 2002]. Toutefois, la déficience du PlGF endogène induite sur des souris déficientes s'est montrée compatible avec un développement embryonnaire normal, mais a surtout altéré la réponse angiogénique induite dans une série de modèles pathologiques de l'adulte [Carmeliet et al., 2001]. Certaines études ont suggéré que le PlGF pourrait, par la formation d'hétérodimères avec le VEGF, représenter un mécanisme supplémentaire de régulation des effets du VEGF [DiSalvo et al., 1995;Cao et al., 1996].

Le VEGF-B, qui est exprimé principalement dans le muscle strié et le cœur, possède ~ 43% de similitude au niveau des séquences d'acides aminés avec le VEGF. Comme le PlGF, il active le récepteur VEGFR-1 et est susceptible de former des hétérodimères avec le VEGF [Olofsson et al., 1996a;Olofsson et al., 1996b]. Bien que doté de propriétés mitogéniques sur les cellules endothéliales, sa déficience chez la souris induit un phénotype viable caractérisé surtout par des anomalies cardiaques [Bellomo et al., 2000].

Les autres membres de la famille VEGF présentent une homologie moins forte avec le VEGF. Les VEGF-C et -D activent le VEGFR de type 2 et 3, mais induisent une activité mitotique significativement moindre que celle de VEGF sur l'endothélium [Achen et al., 1998;Lee et al., 1996]. La localisation de VEGF-C et de son récepteur principal (VEGFR-3) suggère un rôle dans le développement et le maintien du système lymphatique [Kukk et al., 1996]. Le VEGF-D pour sa part jouerait un rôle dans le développement pulmonaire [Farnebo et al., 1999].

Enfin, VEGF-E est un terme collectif attribué à un groupe de protéines possédant une homologie avec le VEGF et codées par le virus orf (parapox virus). Ce dernier est principalement pathogène chez les herbivores, mais les lésions cutanées occasionnelles présentées par l'homme sont le siège d'une dilatation et d'une prolifération des vaisseaux dermiques [Lyttle et al., 1994].

En plus de l'induction de la perméabilité cellulaire, de la prolifération et de la migration, la famille des VEGFs contrôle la survie des cellules endothéliales, activité nécessaire au maintien de l'intégrité des vaisseaux non matures durant l'angiogenèse [Benjamin et al., 1999]. Le VEGF augmente également l'expression des métalloprotéinases matricielles (MMPs) et des inhibiteurs de protéinases [Carmeliet and Jain, 2000].

L'expression du VEGF est régulée positivement, en situation hypoxique, par la stabilisation d'une protéine HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1) sur son récepteur. L'importance de l'HIF a notamment été mise en évidence dans la maladie de von Hippel-Lindau (VHL) où, suite à une mutation, la demi-vie du HIF est excessive, aboutissant à des taux élevés de VEGF et à des malformations vasculaires tumorales disséminées (système nerveux central, rein, rétine,...) [Richard et al., 1999; Josko and Mazurek, 2004; Yamakawa et al., 2004; Semenza, 2003].

1.3.1 Les récepteurs du VEGF

Les récepteurs au VEGF font partie de la famille "7-Ig" caractérisée par la présence de sept domaines extracellulaires semblables aux immunoglobulines, un segment trans-membranaire, et un domaine intracellulaire possédant une activité tyrosine kinase [Neufeld et al., 1999]. Le VEGFR-1 (aussi appelé Flt1) lie VEGF, VEGF-B et PlGF. Le VEGFR-2 (encore dénommé Flk1) peut être activé par VEGF, VEGF-C, VEGF-D et VEGF-E. Enfin, VEGFR-3 (ou Flt4) interagit avec VEGF-C et VEGF-D surtout au niveau du système lymphatique.

Bien que possédant une affinité nettement moindre pour le VEGF que VEGFR-1 (fig. 5), le VEGFR-2 activé par son ligand induit une activité mitotique intense au sein de l'endothélium associée à des changements morphologiques et une activité migratrice [Waltenberger et al., 1994]. L'expression de l'ARN messager de VEGFR-2 est intense dans l'endothélium embryonnaire ou dans les tumeurs, alors qu'elle est fortement réduite dans l'endothélium quiescent normal de l'adulte [Millauer et al., 1993]. L'importance de VEGFR-2 dans la vasculogenèse a été démontrée par l'absence totale de réseau vasculaire organisé chez les souris déficientes [Shalaby et al., 1995]. Outre les cellules endothéliales activées et les précurseurs hématopoïétiques, d'autres types cellulaires comme les cellules neurales [Matsuzaki et al., 2001; Oosthuyse et al., 2001], mésangiales [Amemiya et al., 1999] et rétiniennes [Gilbert et al., 1998] expriment aussi ce récepteur. Il faut remarquer que VEGFR-

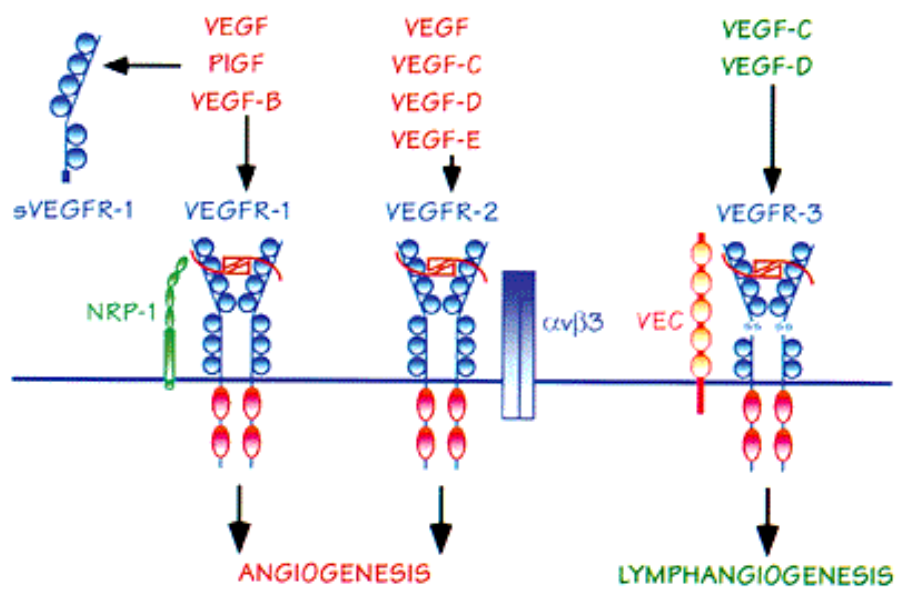


Figure 5: Famille du VEGF. Liste des différents récepteurs ainsi que leurs ligands [Paleolog, 2002].

2 n'est pas, contrairement à VEGFR-1, exprimé dans la lignée monocytaire [Sawano et al., 2001].

Comme c'est le cas concernant VEGFR-2, l'absence de VEGFR-1 est létale chez la souris transgénique [Fong et al., 1995] suite à une désorganisation de l'arbre vasculaire consécutive à des divisions endothéliales et/ou angioblastiques aberrantes [Kearney et al., 2002]. Toutefois, une déficience isolée du domaine intracellulaire porteur de l'activité (faible) tyrosine kinase permet un développement embryonnaire normal [Hiratsuka et al., 1998] et l'utilisation de protéines de VEGF mutées ne se liant que sur un des deux types de récepteurs a, dans certaines conditions, mis en doute les capacités angiogéniques de la voie VEGFR-1 [Gille et al., 2001]. Ces observations ont amené l'hypothèse suivant laquelle le récepteur VEGFR-1 ne représenterait qu'un réservoir de VEGF, et que les effets de ses ligands spécifiques, PlGF et VEGF-B, seraient d'accroître la quantité de VEGF disponible, en les déplaçant, pour se lier sur VEGFR-2. Il semble néanmoins que dans plusieurs conditions pathologiques de l'adulte, VEGFR-1 exerce un effet réellement positif [Carmeliet et al., 2001; Hiratsuka et al., 2001].

2 Le système du plasminogène

Le groupe de protéinases impliquées dans le remodelage de la MEC comprend quatre différentes familles: les sérines, les cystéines, les aspartiques et les métallo-protéinases ou MMPs [Twining, 1994;Puente et al., 2003].

Dans ce travail, nous avons envisagé plus particulièrement l'action des protéases à sérine et des métalloprotéinases (MMPs).

Le système du plasminogène, de la famille des protéinases à sérine, est impliqué dans la fibrinolyse et dans la dégradation de la MEC directement, ou indirectement, par activation des MMPs (fig. 6).

Au cours de la dernière décennie, des souris déficientes pour un des composants du système du plasminogène ont été générées, permettant l'étude directe du rôle de ces composants dans diverses maladies [Carmeliet et al., 1993a;Carmeliet et al., 1993b;Carmeliet et al., 1994;Dewerchin et al., 1996;Lijnen et al., 1999;Ploplis et al., 1995;Ploplis et al., 2000].

Le système du plasminogène est composé de différentes protéines: (i) le plasminogène, une pro-enzyme inactive ; (ii) les activateurs du plasminogène de type urokinase (uPA) ou de type tissulaire (tPA), deux protéinases à sérine qui convertissent le plasminogène en plasmine ; (iii) l'uPAR, un récepteur de surface de l'uPA, lié au glycosylphosphatidylinositol (GPI), et (iv) les inhibiteurs des activateurs du plasminogène de type 1 et 2 (PAI-1 et PAI-2) appartenant à la famille des inhibiteurs de protéinases à sérine (les serpines).

Bien que partageant des fonctions de conversion du plasminogène communes, les deux types d'activateur du plasminogène (uPA et tPA) ont des composantes structurales et fonctionnelles distinctes. Brièvement, le tPA agit principalement comme une enzyme dépendante de la fibrine et à activation intra-vasculaire qui est impliquée de façon majoritaire dans la dissolution de caillots [Collen and Lijnen, 1991]. Par contre, l'uPA opère de façon indépendante de la fibrine. Il est fortement liée à un récepteur de surface de l'activateur du plasminogène et contrôle la protéolyse péri-cellulaire [Andreasen et al., 1997;Carmeliet and Collen, 2000;Blasi, 1997;Blasi and Carmeliet, 2002].

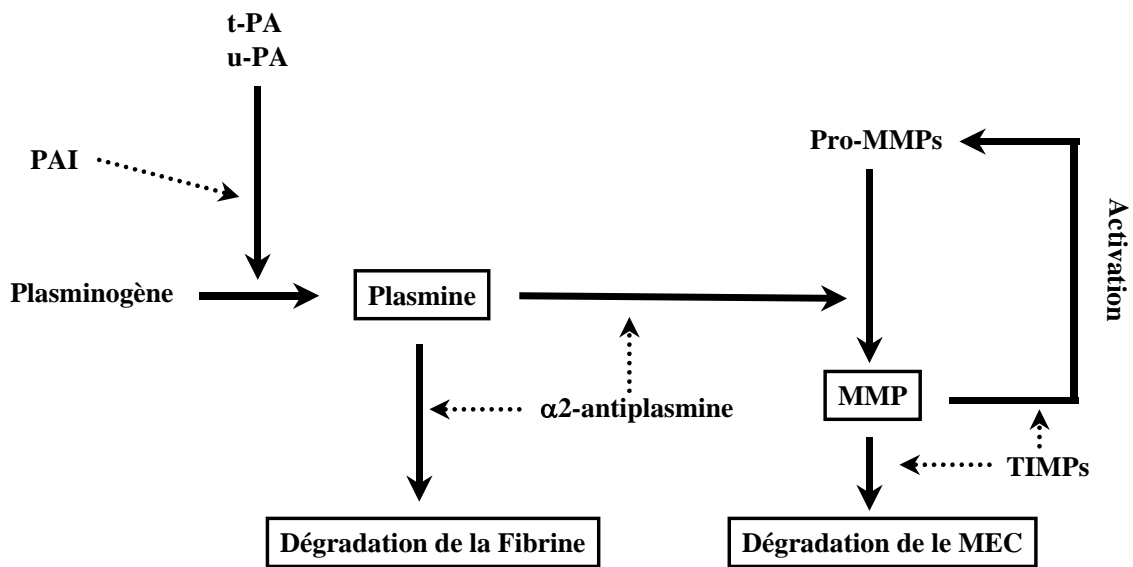


Figure 6: Représentation schématique des interactions potentielles entre le système activateur du plasminogène et le système des métalloprotéinases. Le système fibrinolytique contient une pro-enzyme, le plasminogène, qui est converti en plasmine active par l'activateur du plasminogène de type tissulaire (tPA) ou de type urokinase (uPA). La plasmine dégrade la fibrine et convertit certaines MMPs latentes (Pro-MMP) en formes actives, qui peuvent à leur tour dégrader la matrice extracellulaire (MEC). Ce phénomène d'activation peut être régulé positivement par un mécanisme en boucle durant lequel certaines MMPs peuvent activer d'autres pro-MMPs. Les effets sous la dépendance de la plasmine peuvent être inhibés par l' $\alpha 2$ -antiplasmine, tandis que ceux sous la dépendance des MMPs peuvent être inhibés par des inhibiteurs tissulaires de MMPs, les TIMPs. L'inhibition peut également avoir lieu au niveau des activateurs du plasminogène par des inhibiteurs des activateurs du plasminogène, principalement PAI-1 et PAI-2. [Lijnen, 2002]

La molécule d'uPA est constituée de deux domaines fonctionnels majeurs : le domaine amino-terminal qui se lie à l'uPAR et le domaine catalytique carboxy-terminal. L'activation de l'uPA est initiée au travers d'une cascade d'évènements initiée par l'uPAR. L'uPA est sécrété sous forme d'une enzyme simple chaîne (scuPA) inactive, qui se lie à l'uPAR présent sur la plupart des types cellulaires. Le clivage du pro-uPA le rend actif sous forme d'une double chaîne liée par des ponts disulfures. La plasmine est un activateur physiologique important du scuPA [Binnema et al., 1991]. D'autres protéinases telles que le facteur XIIa, la cathepsine B, et la kallikréine sont également capables d'activer le scuPA, bien que leur rôle soit mal précisé [Lee et al., 2000;Schmaier, 2000].

Chaque molécule de plasmine peut amplifier cette cascade, par activation de plusieurs molécules de scuPA. Ce processus est rendu très efficace par la présence simultanée du plasminogène et du scuPA lié à la surface cellulaire à l'uPAR. La plasmine liée à son récepteur agit grâce à un site LBS (lysine-binding site) associé au domaine kringle de la plasmine ou du plasminogène. Le résultat de cette liaison est une augmentation de l'activation du plasminogène, tout en protégeant partiellement l'enzyme actif d'une éventuelle inactivation par l'alpha2-antiplasmine circulante [Hall et al., 1991]. Malgré tout, la plasmine liée peut être inactivée par l'aprotinine, par compétition avec la fibrine pour le site actif de la plasmine.

Il existe une liste croissante de récepteurs ubiquitaires au plasminogène comprenant l'alpha-enolase, la cytokératine 8 et l'annexine 11 [Plow et al., 1995].

La plasmine présente un large spectre d'activité, et est capable de dégrader de nombreuses glycoprotéines comme la laminine ou la fibronectine, et des protéoglycans de la MEC, ainsi que la fibrine. Elle peut activer d'autres protéinases telles que des pro-métalloprotéinases (MMP-1, MMP-3 et MMP-9). La plasmine peut également activer et libérer des facteurs de croissance de la MEC comme les TGF- β (transforming growth factor), les bFGF (basic fibroblast growth factor) et le VEGF [Rifkin et al., 1999].

L'uPA présent à la surface des cellules est, dès lors, généralement considéré comme l'initiateur d'une cascade de protéinases qui conduira à l'activation de la plasmine, à la rupture de la MEC, et à l'activation et/ou à la libération de cytokines/chémokines ou de facteurs de croissance. De cette façon, l'uPA aide à la migration cellulaire. Différentes observations indiquent que le rôle du système activateur du plasminogène dans la migration

cellulaire ne se limite pas à l'induction de la destruction de la matrice (fig. 7). En effet, en coopération avec l'uPAR et le PAI-1, l'uPA est impliqué dans les activités mitogènes, chémoattractile, d'adhésion et de migration cellulaires [Schmitt et al., 2000;Blasi, 1999b;Blasi, 1999a]. De plus, l'uPAR est aussi associé à la signalisation intracellulaire, et ne peut être considéré comme une simple molécule qui fixe l'uPA à la surface cellulaire [Blasi, 1997;Chapman, 1997]. La liaison de l'uPA sur son récepteur cellulaire de surface concentre son activité à la surface de la cellule, appelé « site d'adhésion focalisé ». Le complexe uPA/uPAR interagit avec la vitronectine, une glycoprotéine multifonctionnelle de la MEC, et avec les intégrines β_1 et β_5 , et, par ce moyen, participe à l'arrimage et à la migration cellulaire [Xue et al., 1997].

2.1 Les inhibiteurs physiologiques du système du plasminogène

Différents inhibiteurs physiologiques naturels de la plasmine, comme l'alpha2-antiplasmine, et des activateurs du plasminogène, comme le PAI-1 et le PAI-2, contrôlent l'activité protéolytique tout au long de la cascade des protéinases à sérine. Le PAI-1 semble être l'inhibiteur de l'uPA à action la plus rapide *in vivo*. Il est sécrété sous une forme active, mais conformationnellement instable. Le manque de ponts disulfure, pour stabiliser sa structure tertiaire, confère vraisemblablement à la molécule de PAI-1, un haut degré de plasticité conformationnelle. Le PAI-1 actif, libre, se transforme spontanément en une forme « latente », inactive, lorsque qu'il est *in vitro*, ou, lorsqu'il est sécrété dans le milieu de culture [Hekman and Loskutoff, 1985]. Quoiqu'il en soit, son activité inhibitrice est stabilisée et est prolongée grâce à sa liaison à la vitronectine, présente dans le plasma, dans les plaquettes et au sein de la MEC [Loskutoff et al., 1999;Salonen et al., 1989;Wiman et al., 1988]. La haute affinité entre la vitronectine et le PAI-1, permet à la vitronectine, de concentrer l'activité inhibitrice du PAI-1 dans une zone tissulaire spécifique. La vitronectine agit donc, comme un co-facteur du PAI-1, en contrôlant aussi bien son activité que sa localisation.

Le PAI-1 ne se fixe pas uniquement sur l'uPA libre, mais également sur l'uPAR lié à l'uPA. Le complexe uPA/PAI-1 interagit avec un récepteur de l'endocytose, le récepteur α_2 -macroglobuline trans-membranaire, protéine en relation avec les LRP (lipoprotein receptor-related protein) de faible densité. Par l'action combinée de l'uPAR et de la LRP, le complexe

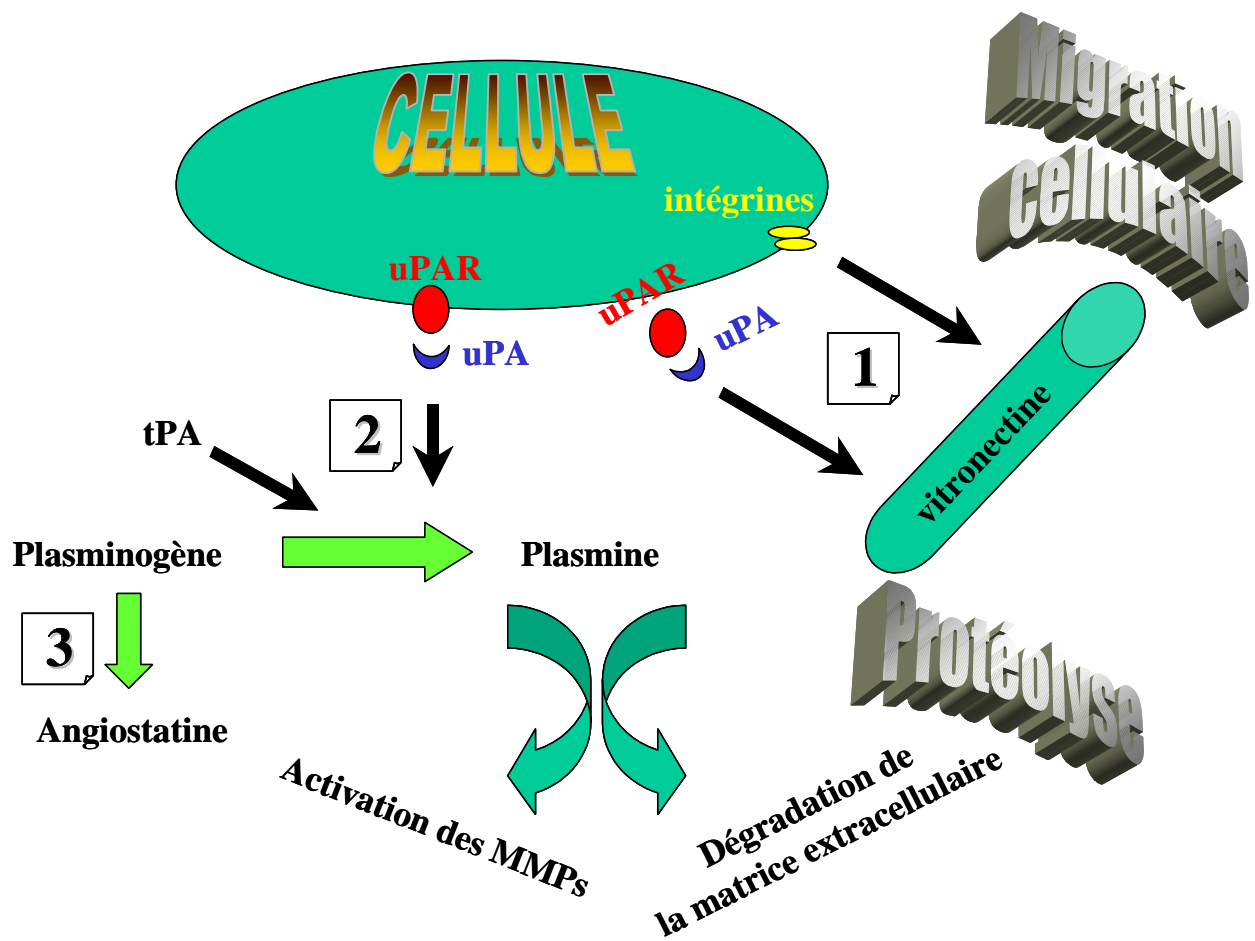


Figure 7 : Différents mécanismes d'action de PAI-1. PAI-1 est une protéine multifonctionnelle qui peut influencer la progression cancéreuse en régulant 1) l'adhésion et la migration cellulaire par son interaction avec la vitronectine, 2) la protéolyse, ou 3) la génération d'agents anti-angiogènes.[Noel et al., 1999]

uPA/PAI-1 est internalisé et dégradé dans les lysosomes. L'uPAR est alors recyclé et est à nouveau présenté à la surface cellulaire [Andreasen et al., 1997;Blasi, 1999a]. PAI-1 jouerait, dès lors, un rôle central dans l'adhésion cellulaire, par le biais des intégrines ou du complexe uPAR/uPA [Chapman, 1997;Loskutoff et al., 1999].

PAI-1 entre en compétition pour la liaison à la vitronectine, avec différentes intégrines telles que l' $\alpha_v\beta_1$, l' $\alpha_v\beta_3$, l' $\alpha_v\beta_5$, l' $\alpha_{IIb}\beta_3$, et l' $\alpha_8\beta_1$ [Sugiura et al., 1999]. Dans les modèles de cellules amnioniques humaines WISH, des cellules de carcinomes épidermoïdes humains Hep-2, et des cellules musculaires lisses, le PAI-1 inhibe la migration sur vitronectine, par sa dépendance aux intégrines [Stefansson and Lawrence, 1996;Kjoller et al., 1997]. Le PAI-1 peut également aider la migration cellulaire, en diminuant l'adhésion cellulaire sur la vitronectine [Waltz et al., 1997]. Ceci pourrait expliquer le fait que des cellules soient relarguées par cette protéine matricielle lorsqu'il y a un excès de PAI-1, par décrochage cellulaire. Par conséquent, PAI-1 pourrait influencer le délicat équilibre existant entre l'adhésion cellulaire et le détachement cellulaire [Deng et al., 1996;Czekay et al., 2003].

2.2 Le système du plasminogène et l'angiogénèse

Les cellules endothéliales quiescentes expriment, de façon constitutive, du tPA, mais la protéolyse résultante est jugulée par l'expression simultanée de PAI-1 [Carmeliet and Collen, 2000;Simpson et al., 1991]. Par contre, lorsque les cellules endothéliales migrent, elles sur-expriment l'uPA, l'uPAR et le PAI-1 [Bacharach et al., 1992;Pepper et al., 1987;Pepper et al., 1992;Pepper et al., 1993a]. L'hypoxie, stimulus majeur de l'angiogénèse, peut également augmenter l'expression de l'uPAR et du PAI-1 [Uchiyama et al., 2000]. Une variété de facteurs angiogéniques, comme les cytokines ou les facteurs de croissance, contrôlent l'expression de l'uPA, du tPA, de l'uPAR et du PAI-1, tandis que le TGF- β diminue l'expression de l'uPA et augmente la production de PAI-1 [Carmeliet and Collen, 2000]. En fonction des conditions, le PAI-1 est exprimé, aussi bien par les cellules endothéliales elles-mêmes, que par les cellules non-endothéliales, telles que les cellules stromales ou épithéliales, où il pourrait jouer un rôle dans la préservation de l'intégrité de la matrice [Carmeliet and Collen, 2000]. Dans un système de co-culture de cellules endothéliales avec des fibroblastes, l'ARNm du PAI-1 et son activité promotrice ne sont présents que dans une seule rangée de

fibroblastes, accolés au bourgeon vasculaire, mais pas dans le reste de l'endothélium [Bacharach et al., 1998]. Une telle induction paracrine peut être importante pendant le bourgeonnement, qui constitue la seule période durant laquelle les cellules endothéliales établissent un contact direct avec les fibroblastes, et pourrait fournir un mécanisme pour contre-balancer la protéolyse péri cellulaire excessive.

Bien que l'inhibition des activateurs du plasminogène réduit la migration des cellules endothéliales *in vitro*, de façon surprenante, le développement embryonnaire et post-natal des souris déficientes pour l'uPA et/ou le tPA, pour le PAI-1, l'uPAR, le plasminogène, ou l'alpha2-antiplasmine, n'est apparemment pas perturbé [Carmeliet et al., 1993a; Carmeliet et al., 1993b; Carmeliet et al., 1994; Dewerchin et al., 1996; Lijnen et al., 1999; Ploplis et al., 1995; Ploplis et al., 2000; Carmeliet and Collen, 2000]. L'absence d'impact sur le développement des embryons et des souris est dûe, soit à une faible importance relative de ces protéinases dans le développement des vaisseaux embryonnaires, soit à une redondance ou à un phénomène de compensation, hypothèses qui restent à démontrer. Dans une étude sur la cicatrisation des souris déficientes pour le plasminogène, bien que la migration des kératinocytes soit sévèrement altérée, l'angiogenèse ne semble pas être affectée chez ces souris [Romer et al., 1996]. Alors que l'angiogenèse associée au développement et à la cicatrisation ne semble pas être modifiée chez les souris déficientes pour l'uPA, l'uPAR et le tPA, certaines études *in vivo* mettent en évidence l'implication de ce système protéolytique, durant différents processus d'angiogenèse pathologique [Carmeliet and Collen, 2000]. Le PAI-1 semble lui être nécessaire dans la cicatrisation par son action sur la motilité des kératinocytes [Providence and Higgins, 2004; Providence et al., 2000].

2.3 Rôle inattendu de PAI-1 dans l'angiogenèse tumorale

En se basant sur ses capacités à bloquer la protéolyse, on a attribué naturellement à PAI-1 un rôle inhibiteur dans l'angiogenèse. Pourtant, des taux systémiques élevés de PAI-1 sont associés à un mauvais pronostic dans une série d'états cancéreux [Duffy, 2004]. Expérimentalement, les métastases pulmonaires, provenant de sous-populations de cellules HT1080, sont augmentées suite à une administration de PAI-1 exogène, et réduites suite à l'injection d'anticorps anti-PAI-1 [Tsujiya et al., 1995]. Enfin, les souris déficientes pour

PAI-1, ont montré la nécessité absolue de PAI-1 pour l'angiogenèse tumorale. Afin d'évaluer le rôle joué par le système protéolytique de l'hôte dans l'invasion et l'angiogenèse tumorale, des kératinocytes malins murins étalés sur un gel de collagène ont été transplantés sur la face musculaire dorsale de souris déficientes pour l'uPA, le tPA, l'uPA et le tPA, l'uPAR, le plasminogène et le PAI-1 [Bajou et al., 1998; Bajou et al., 2001; Bajou et al., 2004]. L'absence de PAI-1 altère fortement l'invasion et la vascularisation tumorale, contrairement à l'absence de l'uPA, de l'uPAR ou du tPA. Comme pour le PAI-1 produit par les cellules tumorales, l'effet génotypique de l'angiogenèse tumorale est attribuable au PAI-1 produit par les cellules mésenchymateuses et/ou par les cellules endothéliales bourgeonnantes. L'importance de la protéolyse sous le contrôle de la plasmine dans ce modèle a été démontré plus tard, par la mise en évidence d'un retard d'angiogenèse pour les souris déficientes pour le plasminogène [Bajou et al., 2001]. Depuis lors, la nécessité du PAI-1 de l'hôte durant l'angiogenèse tumorale a été confirmée dans un modèle de fibrosarcome chez les souris déficientes pour le PAI-1 [Gutierrez et al., 2000]. L'angiogenèse induite par bFGF est également altérée chez des souris déficientes pour le PAI-1 [McMahon et al., 2001]. En outre, ces observations *in vivo* sont confirmées par les résultats obtenus *in vitro* dans un modèle d'anneaux d'aortes de souris [Davy et al., 2002].

3 Les Métalloprotéinases Matricielles (MMPs)

Les métalloprotéinases matricielles constituent le deuxième groupe de protéases étudié dans notre travail.

3.1 La Famille des MMPs

Les MMPs sont des endopeptidases, appelées aussi matrixines, caractérisées par la présence d'un atome de zinc dans leur site actif [Puente et al., 2003]. Elles sont capables de cliver virtuellement tous les composants de la MEC. Beaucoup d'événements de signalisation extracellulaire, qui se déroulent sur, ou près de la membrane cellulaire, sont régulés par la protéolyse péri-cellulaire [Werb, 1997]. Certaines métalloprotéinases matricielles, les MT-MMPs (Membrane-Type-MMPs) sont liées à la membrane cellulaire grâce à un domaine

trans-membranaire, ce qui représente la manière la plus évidente de localiser l'activité des MMPs à la surface de la cellule [Zucker et al., 2003]. Les autres MMPs solubles et secrétées peuvent, malgré tout, être localisées à la surface cellulaire, en se liant aux intégrines [Brooks et al., 1996], au CD44 [Yu and Stamenkovic, 1999; Yu et al., 2002] ou au travers d'interactions avec des protéoglycans héparanes sulfates associés à la surface cellulaire, au collagène de type IV, ou aux inducteurs de MMPs extracellulaires (EMMPRIN, extracellular matrix metalloproteinase inducer) [Sternlicht and Werb, 2001].

3.2 Classification et structure des MMPs

La première activité de MMP découverte, a été celle d'une collagénase dans la queue de têtard, pendant sa métamorphose [Gross and Lapiere, 1962; Nagai et al., 1966]. La famille des MMPs se compose aujourd'hui de 25 membres chez les vertébrés dont 24 trouvés chez l'homme [Puente et al., 2003]. On peut trouver des matrixines chez les hydres [Leontovich et al., 2000], les oursins de mer [Lepage and Gache, 1990], et chez *Arabidopsis* [Maidment et al., 1999].

Historiquement, les MMPs étaient classées en collagénases, gélatinases, stromélysines et les matrilysines, en fonction de leur spécificité pour les composants de la MEC. Leur nom commun est le reflet de cette classification [Visse and Nagase, 2003].

Naturellement, la liste des substrats des MMPs ayant grandi, une adaptation du système de numérotation des MMPs a, dès lors, été nécessaire. Leurs MMPs sont maintenant groupées en fonction de leur structure en domaines. Il existe, aujourd'hui, 8 classes structurelles distinctes de MMPs dont 5 sont secrétées, et 3, sont des MMPs de type membranaire (MT-MMPs) [Egeblad and Werb, 2002; Visse and Nagase, 2003] (tableau 2).

La comparaison de la structure primaire des différentes MMPs révèle un certain nombre de domaines conservés (fig. 8):

- un peptide signal, ou pré-domaine ;
- un pro-domaine, inhibiteur de l'activité catalytique et dont le clivage protéolytique est nécessaire à l'activation de l'enzyme ;
- un domaine catalytique contenant le site de fixation du zinc ;
- un domaine (à l'exception des Matrylisines) de type hémopexine (homologie relative à l'hémopexine plasmatique) qui pourrait être impliqué dans la spécificité du substrat [Woessner, Jr., 1998].

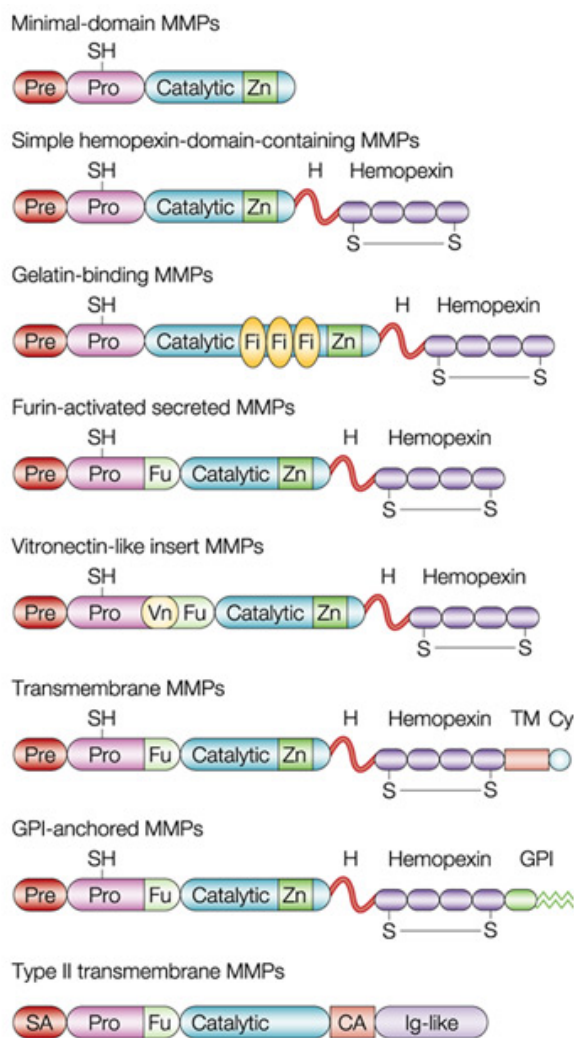


Figure 8: Schéma des différentes classes de MMPs d'après [Egeblad and Werb, 2002].

Enzyme	Substrats de la MEC	Autres types de substrats
3.2.1.1.1.1 MMPs avec domaine minimum		
MMP-7 : Matrylisine-1, matrine, PUMP1, MMP du petit intestin	Collagènes de type I et II, gélatine, élastine, fibronectine, vitronectine, laminine, entactine, tenascine, SPARC, aggrecane, décorine, protéine basique de la myéline, fibuline, versican	Autolytique, α 1-PI, α 2-macroglobuline, proTNF α , caséine, transférine carboxyméthylée, ostéopontine, proMMP-1, proMMP-2, proMMP-7, proMMP-9, plasminogène, pro- α -défensine, fas-L, intégrine β 4, E-cadhérine,
MMP-26 : Matrylisine-2, endométase	Collagène de type IV (?), gélatine, fibronectine, vitronectine	α 1-PI, α 2-macroglobuline, fibrinogène, proMMP-9
3.2.1.1.1.2 MMPs contenant un domaine hémapexine simple		
MMP-1 : Collagénase-1, collagénase interstitielle	Collagènes type I, II, III, VII, VIII, X et XI, gélatine, fibronectine, vitronectine, laminine, entactine, tenascine, aggrecane, protéine basique de la myéline, versican	Autolytique, C1q, α 2-macroglobuline, ovostatine, α 1-PI, α 1-antichymotrypsine, IL1- β , proTNF α , IGFBP-2, IGFBP-3, caséine, sérum amyloïde A, proMMP-1, proMMP-2, proMMP-9
MMP-3 : Stromélysine-1, transine-1, protéoglycanase, protéine d'activation des pro-collagénases	Collagènes de type III, IV, V, VII, IX, X et XI, collagènes télopeptides, gélatine, élastine, fibronectine, vitronectine, laminine, entactine, ténascine, SPARC, aggrecane, décorine, protéine basique de la myéline, perlécane, versican, fibuline	Autolytique, α 2-macroglobuline, ovostatine, α 1-PI, α 2-antiplasmin, α 1-antichymotrypsine, IL1- β , proTNF α , IGFBP-3, substance P, kininogène-T, caséine, transférine carboxyméthylée, antithrombine III, sérum amyloïde A, fibrinogène, plasminogène, osteopontine, proMMP-1, proMMP-3, proMMP-7, proMMP-8, proMMP-9, proMMP-13, IGFBP-3, E-cadhérine, pro-HB-EGF, uPA, fibrine, PAI-1
MMP-8 : Collagénase-2, collagénase des neutrophiles	Collagènes de type I, II et III, aggrecane	Autolytique, C1q, α 2-macroglobuline, ovostatine, α 1-PI, substance P, fibrinogène, angiotensine I, angiotensine II, bradykinine, inhibiteur de la plasmin C1

Enzyme	Substrats de la MEC	Autres types de substrats
3.2.1.1.1.3 MMPs contenant un domaine hémopexine simple (suite)		
MMP-10 : Stromélysine-2, transine-2	Collagènes de type III, IV et V, gélatine, élastine, fibronectine, aggrécane	Autolytique, caséine, proMMP-1, proMMP-7, proMMP-8, proMMP-9
MMP-12 : Métalloélastase, élastase des macrophages	Collagènes de type I, V et IV, gélatine, élastine, fibronectine, vitronectine, laminine, entactine, ostéonectine, aggrécane, protéine basique de la myéline	α 2-macroglobuline, α 1-PI, proTNF α , fibrinogène, facteur XII, caséine, plasminogène
MMP-13 : Collagénase-3	Collagènes de type I, II, III, IV, VI, IX, X et XIV, collagène télopeptide, gélatine, fibronectine, SPARC, aggrécane, perlécan, tenascine-C large	Autolytique, C1q, α 2-macroglobuline, caséine, fibrinogène, factor XII, α 1-antichymotrypsine, ProMMP-9
MMP-18 : Collagénase-4 (Xenopus) (pas d'analogue humain)	Collagène de type I (rat)	inconnu
MMP-19 : RASI-1	Collagène de type IV, gélatine, laminine, entactine, ténascine-C large, fibronectine, aggrécane, COMP (cartilage oligomeric matrix protein)	Autolyse, fibrinogène, fibrine
MMP-20 : Enamélysine	Amélogénine, aggrécane, COMP (cartilage oligomeric matrix protein)	Autolyse
MMP-22 : CMMP (poulet, pas d'analogue chez l'humain)	inconnu	Inconnu
MMP-27 : CMMP (gallus)	Gélatine	Autolyse, caséine
N.A. : Mcol-A (souris)	Inconnu	Inconnu
N.A. : Mcol-B (souris)	Inconnu	Inconnu

Enzyme	Substrats de la MEC	Autres types de substrats
3.2.1.1.1.4 MMPs liant la gélatine		
MMP-2 : Gélatinase A, gélatinase de 72 kDa, collagénase de type IV de 72 kDa, gélatinase des neutrophiles	Collagènes de type I, II, III, IV, V, VII, X et XI, gélatine, élastine, fibronectine, vitronectine, laminine, entactine, ténascine, SPARC, aggrecane, galectine-3, versican, décorine, protéine basique de la myéline	Autolytique, α 2-macroglobuline, α 1-antichymotrypsine, IL1- β , proTNF α , IGFBP-3, IGFBP-5, substance P, sérum amuloïde A, proMMP-1, proMMP-2, proMMP-9, proMMP-13, TGF β latent, MCP-3 (monocyte chemoattractant protein-3), FGFR1 (fibroblast growth factor receptor 1), grande endothéline-1, plasminogène
MMP-9 : Gélatinase B, gélatinase de 92 kDa, gélatinase de type IV de 92 kDa	Collagènes de type IV, V, XI et XIV, gélatine, élastine, vitronectine, laminine, SPARC, aggrecane, galectine-3 versican, décorine, protéine basique de la myéline	Autolytique, α 2-macroglobuline, ovostatine, α 1-PI, IL1- β , proTNF α , substance P, caséine, transférine carboxyméthylée, angiotensine I, angiotensine II, plasminogène, proTGF β 2, IL-2R α , relarguage de VEGF (substrat non connu)
N.A. : Gélatinase 75 kDa	inconnu	Inconnu
3.2.1.1.1.5 MMPs sécrétées activées par la furine		
MMP-11 : Stromélysine-3	Gélatine, fibronectine, collagène de type IV, laminine	α 1-PI, α 2-macroglobuline, ovostatine, IGFBP-1, caséine, α 2-antiplasmin, PAI-2, transférine carboxyméthylée.
MMP-28 : Epilysine	inconnu	Caséine
3.2.1.1.1.6 MMPs possédant une insertion vitronectine		
MMP-21 : XMMP, homologue du Xenopus	Gélatine	Caséine
3.2.1.1.1.7 MMPs transmembranaires		
MMP-14 : MT1-MMP, MT-MMP1	Collagènes de type I, II et III, gélatine, fibronectine, ténascine, vitronectine, laminine, entactine, aggrecane, perlecan	α 2-macroglobuline, ovostatine, α 1-PI, proTNF α , fibrinogène, facteur XII, fibrine, CD44, transglutaminase tissulaire, proMMP-2, proMMP-13
MMP-15 : MT2-MMP, MT-MMP2	Fibronectine, ténascine, entactine, laminine, aggrecane, perlecan	proTNF α , transglutaminase tissulaire, proMMP-2

Enzyme	Substrats de la MEC	Autres types de substrats
3.2.1.1.1.8 <u>MMPs transmembranaires (suite)</u>		
MMP-16 : MT3-MMP, MT-MMP3	Collagène de type III, gélatine, fibronectine, vitronectine, laminine	α 1-PI, α 2-macroglobuline, caséine, proMMP-2, transglutaminase tissulaire
MMP-24 : MT5-MMP, MT-MMP5	Fibronectine, gélatine, protéoglycan chondoïtine sulfate, protéoglycan dermatane sulfate	ProMMP-2, transglutaminase tissulaire
3.2.1.1.1.9 <u>MMPs ancrées par un groupement glucosylphosphatidylinositol (GPI)</u>		
MMP-17 : MT4-MMP, MT-MMP4	Gélatine	Fibrinogène, fibrine, proTNF α , proMMP-2 (?)
MMP-25 : MT5-MMP, MT-MMP5, leucylsine	Collagène de type IV, gélatine, fibronectine, protéoglycan chondoïtine sulfate, protéoglycan dermatane sulfate	Fibrinogène, fibrine, α 1-PI, proMMP-2
3.2.1.1.1.10 <u>MMPs transmembranaires de type II</u>		
MMP-23 : CA-MMP (cysteine array MMP), femalysine, MIFR	Gélatine	Inconnu
Table 2: D'après [Egeblad and Werb, 2002] et [Visse and Nagase, 2003]. N.A :nom non-attribué		

3.3 Régulation de l'activité des MMPs

Les MMPS sont contrôlées à plusieurs niveaux :

(1) au niveau de la régulation de la transcription (de façon générale, l'expression basale est faible - à l'exception notable de la MMP-2- et activée en cas de besoin par une série de cytokines et de facteurs de croissance; [Fini et al., 1998;Puente et al., 2003]),

(2) au niveau de l'activation du zymogène inactif, et

(3) au niveau de l'enzyme actif par les inhibiteurs tissulaires (TIMPs) de MMPs dont 4 membres ont été décrits et qui forment avec l'enzyme actif un complexe stoechiométrique 1 : 1 [Sternlicht and Werb, 2001] [Nagase and Woessner, Jr., 1999;Noel et al., 2004].

Les MMPs sont synthétisées sous forme d'un zymogène inactif, appelé pro-MMP. Elles sont maintenues inactives grâce à l'interaction entre un groupement cystéine-sulphydryl du pro-domaine et l'ion zinc lié au domaine catalytique. L'activation des MMPs nécessite l'excision protéolytique du pro-domaine du propeptide [Sternlicht and Werb, 2001].

Les zymogènes inactifs peuvent être activés par trois voies :

extracellulaire (la plupart des MMPs),

intracellulaire (comme la proMT1-MMP, la MMP-11) et

péricellulaire (la pro-MMP-2).

Les mécanismes impliqués sont à la fois protéolytiques par d'autres protéases (la plasmine, la trypsine, les cathepsines...) et non protéolytiques (les radicaux libres, les agents dénaturants comme le dodecyl sulphate -SDS- ou le thiocyanate de sodium). Il existe aussi des mécanismes d'amplification : ainsi, la MMP-9 est activée par la MMP-2, la MT1-MMP est à la fois un récepteur et un activateur de la pro-MMP-2 [Murphy et al., 1999]. Les MMPs peuvent aussi moduler l'activité d'autres classes de protéases, qui elles-mêmes ont des effets sur les MMPs [Ugwu et al., 1998].

La plupart des MMPs sont activées hors de la cellule, par d'autres MMPs déjà activées, ou par des protéinases à sérine. Les MMP-11, MMP-28 et les MT-MMPs peuvent être activées par

des protéinases à sérine « furin-like » intra-cellulaires, avant leur accession à la surface cellulaire [Sternlicht and Werb, 2001].

La MMP-2 est activée à la surface cellulaire par un mécanisme unique en plusieurs étapes (fig. 9) [Zucker et al., 2003]. Ce processus nécessite la présence de la MMP-14 ou MT1-MMP, de l'inhibiteur tissulaire de la MMP-2 ou TIMP-2 [Strongin et al., 1995]. Le TIMP-2 se fixe sur la partie amino-terminale de la MT1-MMP et le pro-MMP-2 sur sa partie carboxy-terminale. La partie non-inhibée, adjacente de la MT1-MMP va pouvoir cliver la partie libre de la pro-MMP-2. Mais la MMP-14 ne peut pas activer totalement seule la MMP-2. Elle nécessite une autre MMP-2, déjà activée, afin de soustraire la portion résiduelle du propeptide de la MMP-2 [Deryugina et al., 2001]. La pro-MMP-2 peut également être activée par la MT2-MMP par un mécanisme qui ne requiert pas de TIMP-2 [Morrison et al., 2001; Sounni et al., 2003].

L'activité des MMPs est contrôlée finement par des inhibiteurs endogènes. Le principal inhibiteur de MMPs, au sein des fluides tissulaires, est l' α 2-macroglobuline, une protéine plasmatique abondante [Sottrup-Jensen and Birkedal-Hansen, 1989]. L' α 2-macroglobuline se lie aux MMPs et le complexe formé est alors fixé par un récepteur « scavenger » (éboueur). Ce complexe sera alors éliminé de façon irréversible par endocytose. De manière identique aux α 2-macroglobulines, la thrombospondine-2 forme un complexe avec la MMP-2, qui facilite l'endocytose médiée par les récepteurs scavengers et aide donc à leur élimination [Yang et al., 2001]. Par contre, la thrombospondine-1 se fixe aux pro-MMP-2 et -9 et inhibe directement leur activation [Bein and Simons, 2000; Rodriguez-Manzaneque et al., 2001]. Curieusement, la thrombospondine-1 a été décrite comme pouvant également augmenter l'activation de la MMP-2 et de la MMP-9 [Taraboletti et al., 2000].

Les inhibiteurs endogènes de MMPs les plus étudiés, sont les TIMP-1, -2, -3 et -4 [Edwards, 2001]. Ils diffèrent au point de vue de leur expression spécifique tissulaire et, dans leur capacité à inhiber les différentes MMPs [Edwards, 2001]. Ils pourraient aussi, malgré ce que leur nom indique, activer certaines MMPs. Ainsi, des études sur des souris déficientes pour le TIMP-2, ont montré que, la fonction physiologique principale du TIMP-2 était l'activation de la MMP-2 [Wang et al., 2000].

Le spectre de pathologies où les MMPs sont impliquées, est très large et inclut, entre autres, la polyarthrite rhumatoïde [Jackson et al., 2001], les cancers, l'athérosclérose [Lijnen, 2001],

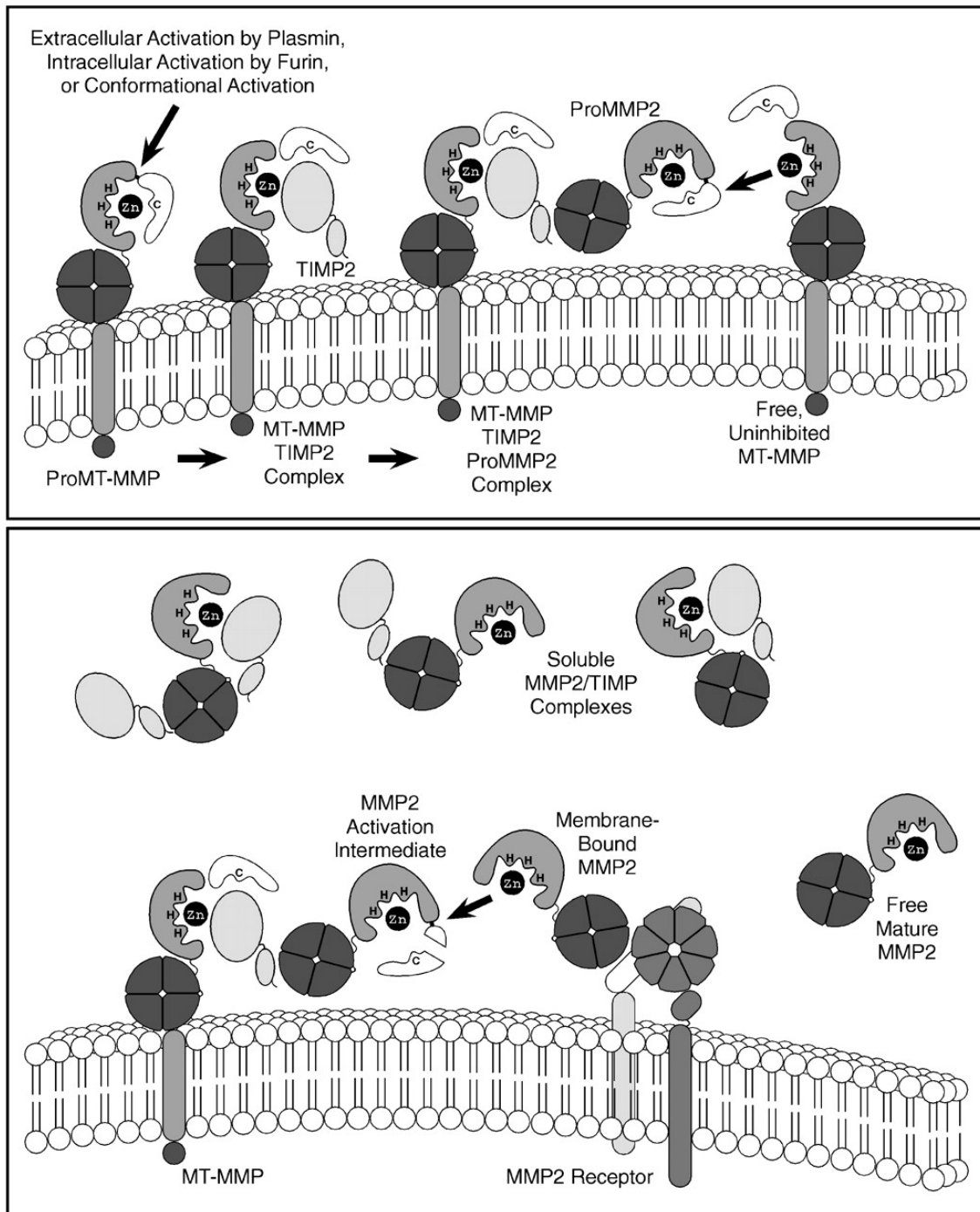


Figure 9: Activation de la MMP-2 à la surface cellulaire. Une pro-MT1-MMP est activée durant le transport vers la surface cellulaire par une sérine protéase intracellulaire, à la surface cellulaire par la plasmine, ou par des changements conformationnels non-protéolytiques. La MT1-MMP activée est inhibée par le TIMP-2 et le domaine hémopexine de la pro-MMP-2 se lie à la portion carboxy-terminale du TIMP-2 pour former un complexe trimoléculaire. Une MT1-MMP non inhibée active alors partiellement la pro-MMP-2 en retirant la plus grande partie du pro-peptide de la MMP-2. Le restant du pro-peptide est alors excisé par une autre molécule de MMP-2 à la surface de la cellule afin de former une molécule pleinement active de MMP-2. La MMP-2 mature peut alors être relarguée de la surface cellulaire ou être liée à la surface cellulaire par une autre protéine de stockage de MMP-2. Elle peut aussi être inhibée par une molécule de TIMP-2 ou être laissée sous forme active non-inhibée en fonction du rapport molaire local entre les MMPs et les TIMPs [Sternlicht and Werb, 2001].

l'anévrisme, les maladies néphrotiques, les ulcères tissulaires, des fibroses [Woessner, Jr., 1998] et une série de pathologies oculaires [Sivak and Fini, 2002]. Les inhibiteurs tissulaires des MMPs, les TIMPs, sont des inhibiteurs spécifiques des matrixines qui participent aussi au contrôle de l'activité locale des MMPs au sein des tissus [Gomez et al., 1997; Brew et al., 2000]. Nous rappellerons ici principalement leur rôle dans l'angiogenèse.

3.4 Les MMPs : régulateurs de l'angiogenèse

La réponse angiogénique est essentielle lors de la croissance tumorale [Hanahan and Folkman, 1996]. Les inhibiteurs endogènes ou synthétiques des MMPs réduisent l'angiogenèse tumorale expérimentalement chez des animaux [Rodriguez-Manzaneque et al., 2001; Oh et al., 2001; Martin et al., 1999; Li et al., 2001; Gatto et al., 1999], indiquant indirectement que les MMPs sont des régulateurs positifs importants. Les MMPs peuvent simplement agir en dégradant la MEC, ce qui permet aux cellules endothéliales d'envahir le stroma tumoral. En effet, le clivage du collagène de type I est nécessaire à l'invasion de la MEC par les cellules endothéliales et à la formation de vaisseaux [Seandel et al., 2001]. L'importance de la MMP-9 pour l'angiogenèse a également été démontrée dans deux modèles de souris transgéniques de progression tumorale, un modèle de cancer de la peau K14-HPV16 [Coussens et al., 2000; Bergers et al., 2000] et un modèle de carcinogenèse des îlots pancréatiques RIP1-TAg2 [Bergers et al., 2000]. De façon surprenante, la MMP-2 n'est pas nécessaire à l'angiogenèse dans le modèle RIP1-TAg2 [Bergers et al., 2000].

La MT1-MMP (MMP-14) semble également promouvoir l'angiogenèse tumorale. En effet, l'utilisation d'anticorps, dirigés contre le domaine catalytique de la MT1-MMP, bloque la migration et l'invasion des cellules endothéliales et bloque la formation de tubes capillaires *in vitro* [Galvez et al., 2001]. La MT1-MMP peut dégrader la matrice de fibrine entourant les nouveaux vaisseaux [Hiraoka et al., 1998], ce qui va permettre aux cellules endothéliales d'envahir plus profondément le tissu tumoral [Sounni et al., 2003]. Il est à noter que les souris MT1-MMP et MMP-9-null ont une angiogenèse défailante durant leur développement [Vu et al., 1998; Zhou et al., 2000]. La MT1-MMP régule positivement l'expression du VEGF au niveau transcriptionnel, renforçant l'idée du rôle de ces MMPs dans l'angiogenèse [Sounni et al., 2002; Sounni et al., 2004; Noel et al., 2004; Deryugina et al., 2002].

Les MMPs produisent aussi des fragments inhibiteurs de l'angiogénèse (fig. 10) [Egeblad and Werb, 2002]. Le clivage du plasminogène par la MMP-2, la MMP-3, la MMP-7 et la MMP-12 génère de l'angiostatine [Dong et al., 1997; Cornelius et al., 1998; Gorrin-Rivas et al., 2000]. La MMP-3, la MMP-9, la MMP-12, la MMP-13 et la MMP-20 semblent être impliquées dans la génération de l'endostatine, le fragment carboxy terminal du collagène de type XVIII de la membrane basale [Ferrerias et al., 2000]. Aussi bien l'angiostatine, que l'endostatine, peuvent diminuer la prolifération des cellules endothéliales [O'Reilly et al., 1994; O'Reilly et al., 1997]. De plus, l'endostatine peut entraver l'invasion des cellules endothéliales par l'inhibition de la MMP-14 (MT1-MMP) et de la MMP-2 [Kim et al., 2000]. Des études récentes suggèrent que l'angiostatine peut être créée à partir d'une protéolyse limitée du plasminogène par la plasmine, l'uPA, le tPA ou des MMPs [Stack et al., 1999; Gately et al., 1997]. La MMP-12 peut aussi inhiber l'angiogénèse tumorale, en clivant et en détachant l'uPAR, fixé à la surface cellulaire, nécessaire à l'invasion des cellules endothéliales dans la fibrine [Koolwijk et al., 2001].

Les MMPs peuvent aussi avoir une action anti-angiogénique en clivant le plasminogène et le collagène de type XVIII. Il en résulte la création des facteurs inhibiteurs que sont l'angiostatine et l'endostatine. Il existe d'autres régulateurs négatifs tels que les fragments du collagène de type XV, la restine [Ramchandran et al., 1999] ; du collagène de type IV, tel que l'arrestène ; de la chaîne $\alpha 1$ [Colorado et al., 2000] ; la canstatine, de la chaîne $\alpha 2$ [Kamphaus et al., 2000] ; et la tumstatine, de la chaîne $\alpha 3$ [Maeshima et al., 2000; Maeshima et al., 2001a; Maeshima et al., 2001b] [Egeblad and Werb, 2002] [Hamano et al., 2003]. Des fragments produits à partir de molécules autres que celles appartenant à la MEC peuvent avoir une activité angio-inhibitrice incluant au moins la MMP-2 (PEX), l'antithrombine [O'Reilly et al., 1999], la calréticuline ou vasostatine [Pike et al., 1998], et le domaine 5' du kininogène de haut poids moléculaire, la kinostatine [Colman et al., 2000].

Bien qu'une grande quantité d'informations ait été collectée concernant l'activité anti-angiogénique de ces fragments, peu de choses sont connues concernant les voies d'action protéolytique conduisant à leur production et concernant la pertinence de leur activité biologique *in vivo*.

La MMP-9 agit en augmentant la biodisponibilité du facteur pro-angiogénique VEGF [Bergers et al., 2000], du FGF-2 (fibroblast growth factor) et du TGF- β . Ces facteurs stimulent la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Le FGF-2 est libéré par

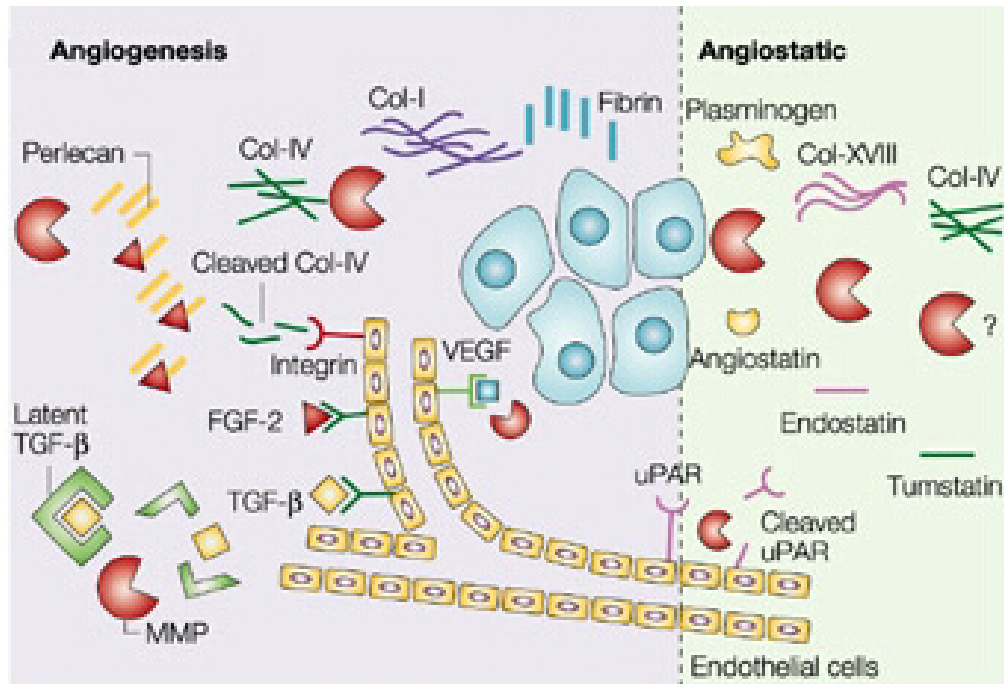


Figure 10: Production de fragments inhibiteurs de l'angiogenèse par les MMPs d'après [Egeblad and Werb, 2002]. Les MMPs peuvent stimuler l'angiogenèse en augmentant la biodisponibilité de facteurs de croissance pro-angiogéniques tels que le VEGF, le FGF-2, et le TGF- β . Ces facteurs stimulent la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Le FGF-2 est libéré par clivage du perlecan, une protéine de la matrice extracellulaire, alors que le mécanisme responsable de l'augmentation de la disponibilité du VEGF est encore inconnu. De plus, les MMPs peuvent promouvoir l'invasion des cellules endothéliales en clivant des composants structurels de la matrice extra cellulaire, tels que le collagène de type I (Col-I) et de type IV (Col-IV), ainsi que la fibrine. Le Col-IV clivé agit en tant que facteur pro-angiogénique en se liant aux intégrines $\alpha\beta3$. Les MMPs peuvent avoir un rôle anti-angiogénique par le clivage du plasminogène et du collagène de type XVIII (Col-XVIII), dont il résulte la production de facteurs anti-angiogènes tels que l'angiostatine et l'endostatine respectivement. Les MMPs peuvent aussi participer à la formation de tumstatine, un fragment du Col-IV. Le clivage de l'uPAR à la surface des cellules endothéliales peut également inhiber l'angiogenèse, car l'uPAR est requis pour l'invasion des cellules endothéliales *in vitro*.

clivage du perlécan de la MEC, alors que le mécanisme responsable de l'augmentation de la biodisponibilité du VEGF reste inconnu. Les MMPs aident à l'invasion des cellules endothéliales en dégradant les composants de la MEC, tels que les collagènes de type I et IV, ainsi que la fibrine. Le collagène de type IV clivé, peut avoir une action pro-angiogénique en se liant à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

4 La dégénérescence maculaire liée à l'âge

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes de l'angiogenèse pathologique, nous avons choisi d'étudier une maladie oculaire : la dégénérescence maculaire liée à l'âge.

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est une maladie dégénérative rétinienne chronique, évolutive et invalidante, qui débute après l'âge de 50 ans. Elle atteint de manière sélective la macula, partie centrale de la rétine où l'acuité visuelle est maximale, en provoquant une dégénérescence secondaire des cellules visuelles rétiniennes. Trois formes histopathologiques de DMLA ont été décrites, une forme dite précoce et deux formes dites évolutives :

- 1) la forme précoce est caractérisée par la présence de drusen séreux sous la macula;
- 2) la forme atrophique est caractérisée par des altérations de l'épithélium pigmentaire et un amincissement de la macula consécutif à l'évolution des drusen ; son évolution lente peut durer des années;
- 3) la forme exsudative est caractérisée par le développement de néovaisseaux sous la macula; ils peuvent être extra, juxta ou rétrofovéolaires, visibles ou occultes en angiographie à la fluorescéine; l'évolution de cette forme peut être très rapide, faisant perdre la vision centrale (acuité visuelle $< 1/10$) en quelques semaines ou mois.

Les principales complications de la DMLA sont les décollements et déchirures de l'épithélium pigmentaire de la rétine et les hémorragies rétiniennes ou sous-rétiniennes qui en aggravent le pronostic.

La DMLA serait la première cause de malvoyance dans les pays industrialisés. Sa prévalence a été estimée entre 1 et 2 % entre 50 et 60 ans, et supérieure à 30 % après 80 ans. La forme précoce de la DMLA représenterait 20-30 % des cas, la forme exsudative 10-30 % et la forme atrophique 50-60 %.

La gravité du handicap entraîné par la DMLA n'est pas toujours ressentie par le patient dans sa forme initiale, ou par son entourage dans sa forme évoluée. En effet, même des patients qui ne peuvent plus lire, écrire, se livrer à leurs activités quotidiennes, ou simplement reconnaître des visages, peuvent continuer à se déplacer sans aide, grâce aux capacités fonctionnelles de la rétine périphérique.

Il existe plusieurs traitements de la forme exsudative de la maladie : la photocoagulation au laser, la thérapie photodynamique, la thermothérapie transpupillaire, la chirurgie, la radiothérapie externe, les traitements médicamenteux, la rééducation orthoptique et les aides visuelles. (Données recueillies d'après le rapport de septembre 2001 de l'agence national d'accréditation et d'évaluation en santé)

4.1.1 La photocoagulation au laser

Le traitement laser a pour but de cautériser les néovaisseaux par une élévation thermique tissulaire. L'effet secondaire majeur est la destruction de la rétine sensorielle au niveau de la zone traitée. Le traitement au laser monochromatique (argon vert ou krypton rouge) de la totalité des néovaisseaux choroïdiens est plus efficace que l'abstention thérapeutique pour prévenir la dégradation de la vision. La photo coagulation au laser, de par ses complications, n'est malheureusement envisageable que pour des vaisseaux extrafovéolaires, ce qui représente la minorité des cas.

4.1.2 La thérapie photodynamique

La thérapie photodynamique a pour objectif de traiter les néovaisseaux sans endommager les tissus adjacents. Elle consiste en l'injection intraveineuse d'une substance photosensibilisante, la vertéporfine, qui se fixe préférentiellement dans les néovaisseaux, suivie d'une photo-illumination laser. Les indications validées dans l'autorisation de mise sur le marché obtenue en 2000 étaient le « traitement de la DMLA chez des patients présentant une néovascularisation choroïdienne rétro-fovéolaire à prédominance visible ».

Pendant les 48 heures qui suivent l'injection de vertéporfine, les patients doivent éviter de s'exposer au rayonnement solaire et aux éclairages de forte intensité.

Cette technique ne possède qu'une efficacité partielle. Néanmoins, elle permet de diminuer le risque d'évolution vers la cécité de l'ordre de 20%.

4.1.3 La thermothérapie transpupillaire

La thermothérapie transpupillaire a pour objectif de provoquer une fibrose au niveau des membranes néovasculaires, et de diminuer ainsi les phénomènes exsudatifs. Elle utilise un laser à diodes dont le rayonnement, proche de l'infrarouge, induit une faible hyperthermie tissulaire. Cette nouvelle technologie qui s'adresse aux cas où la photothérapie n'est pas indiquée, est trop récente que pour en évaluer la réelle efficacité.

4.1.4 Les traitements chirurgicaux

Différents types de traitements chirurgicaux ont été évalués dans la DMLA : la chirurgie d'exérèse des membranes néovasculaires et la translocation maculaire rétinienne. Les effets indésirables observés sont un décollement de rétine et une prolifération vitréo-rétinienne. Les récurrences néovasculaires sont fréquentes. Si la chirurgie de la DMLA semble techniquement intéressante, son intérêt fonctionnel reste à évaluer. Les greffes d'épithélium pigmentaire, de photorécepteurs, ou les implants cristalliniens sont des techniques expérimentales.

4.1.5 La radiothérapie externe

La radiothérapie dans la DMLA utilise soit une irradiation par photons gamma ou par électrons produits par un accélérateur linéaire, soit une irradiation par protons produits par un cyclotron.

L'efficacité de la radiothérapie dans la DMLA n'a pas été démontrée.

4.1.6 Traitements médicamenteux

De nombreux médicaments ont été proposés dans le traitement de la DMLA : médicaments à visée vasculaire, à visée antioxydante, modificateurs de la réponse immunitaire. En France, aucun de ces traitements n'a obtenu d'autorisation de mise sur le marché pour le traitement spécifique de la DMLA. Le premier traitement qui pourrait obtenir une autorisation est un inhibiteur du VEGF, le Macugen[®].

4.1.7 Rééducation orthoptique et aides visuelles

La rééducation orthoptique et les aides visuelles sont utilisées afin de développer et utiliser au mieux les capacités visuelles fonctionnelles restantes et permettre au patient de conserver le plus longtemps possible son autonomie malgré son handicap visuel. Ces aides visuelles, qui peuvent être optiques ou non optiques, ont pour fonction d'agrandir les images rétiniennes, d'améliorer leur définition en modifiant les conditions de contraste et d'éclairement. Les aides visuelles ont une utilité démontrée dans les activités quotidiennes des patients, en particulier pour maintenir une capacité de lecture. C'est en général l'aide visuelle la plus simple qui sera la plus utilisée.

Idéalement les patients atteints de DMLA devraient être pris en charge par des équipes pluridisciplinaires comprenant : un ophtalmologiste, un orthoptiste, un opticien, un ergothérapeute, un psychologue, une personne chargée des activités de la vie quotidienne, un instructeur en locomotion et une assistante sociale.

4.1.8 Moyens électroniques

Par analogie à la surdité, des prothèses à implants sur la rétine sont en développement pour remédier à la perte de photorécepteurs. Bien que ces prothèses, dont aucune n'est commercialisée, s'adressent pour l'instant à des personnes atteintes de cécité complète. Il s'agit d'une progression importante et il n'est pas inconcevable qu'avec l'amélioration des techniques, elles puissent aussi être proposées à des patients atteints de dégénérescence maculaire avancée.

4.2 Etiopathologie de la DMLA

4.2.1 Fonctionnement normal

La lumière réagit avec les composants des disques des cellules photoréceptrices, les cônes (C) et les bâtonnets (B), créant ainsi le signal transmis au nerf optique via les cellules ganglionnaires des couches internes de la rétine. Cette réaction de photolyse détruit les composants des disques, ce qui provoque un stress oxydatif dans la cellule photoréceptrice.

Les cellules de l'épithélium pigmentaire (EP) ont des rôles multiples :

La mélanine absorbe l'excès de photons et piège une partie des radicaux libres photo-induits.

Les cellules participent au renouvellement des disques en les phagocytant. Le produit de dégradation des disques s'accumule dans les cellules sous forme de lipofuscine.

La choroïde est riche en capillaires (fig. 11). Les éléments nutritifs franchissent la membrane de Bruch, double membrane basale séparant la choroïde de l'épithélium pigmentaire, pour nourrir cet épithélium pigmentaire et les cellules photoréceptrices.

4.2.2 Les étapes de la dégénérescence

Le renouvellement des composants des disques n'est plus assuré (fig. 12). Les mécanismes de lutte contre le stress oxydatif sont dépassés, soit par simple effet du vieillissement, soit par l'excès de lumière reçue au cours de la vie. Certaines anomalies génétiques favorisent cette situation.

Les cellules de l'épithélium pigmentaire ne parviennent plus à assurer leur rôle nettoyant. La lipofuscine s'accumule dans les cellules puis à l'extérieur des cellules (fig. 13). Elle participe à la formation des dépôts sur la membrane de Bruch, les drusen. Puis les cellules dégèrent.

Avec l'âge, la membrane de Bruch s'épaissit (fig. 14). Cet épaississement est encore augmenté par la présence de drusen. Les facteurs nutritifs passent de moins en moins bien, augmentant encore le dysfonctionnement.

Le nombre de vaisseaux capillaires de la choroïde diminue par simple effet du vieillissement majoré éventuellement par des facteurs de risques vasculaires, tels que le tabagisme ou l'hypertension artérielle, mais aussi en réponse à l'altération des cellules de l'épithélium pigmentaire.

L'ischémie qui s'installe aggrave la pathologie. Elle peut entraîner la libération de facteurs de croissance qui favorisent l'installation d'une néovascularisation post-ischémique (fig. 14 et 15).

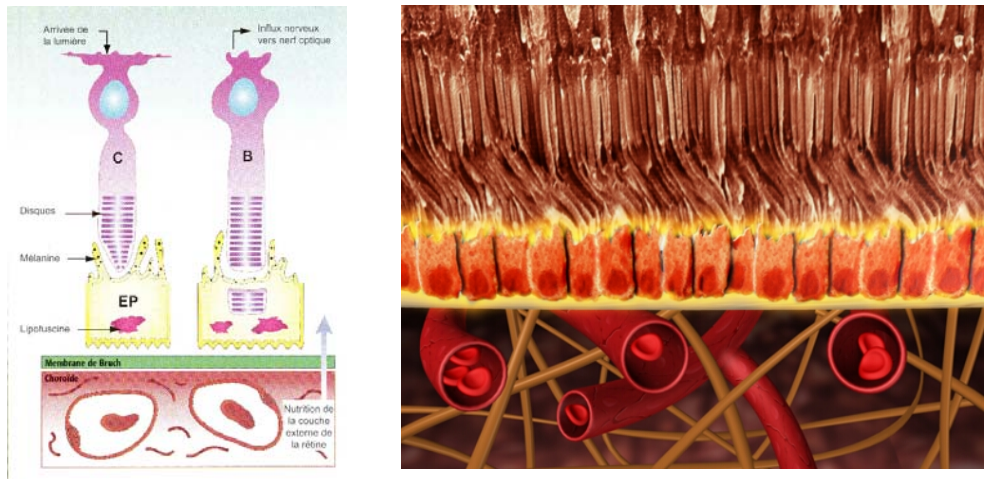
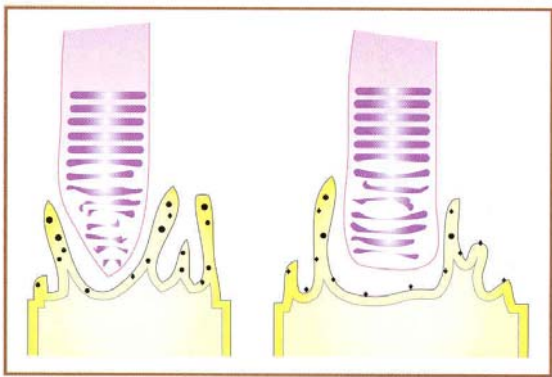
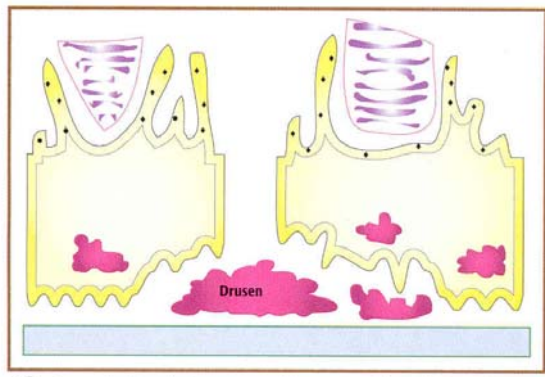


Figure 11 : Anatomie normale du complexe formé par la choroïde et l'épithélium pigmentaire.



1 Mauvais renouvellement des disques.

Figure 12 : Principalement avec l'âge, un dysfonctionnement dans la phagocytose des disques des cônes et des bâtonnets provoque une mauvaise élimination des déchets.



2 Accumulation de drusens au pôle externe des cellules de l'épithélium pigmentaire

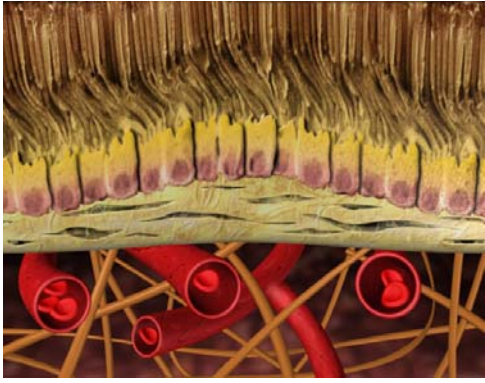
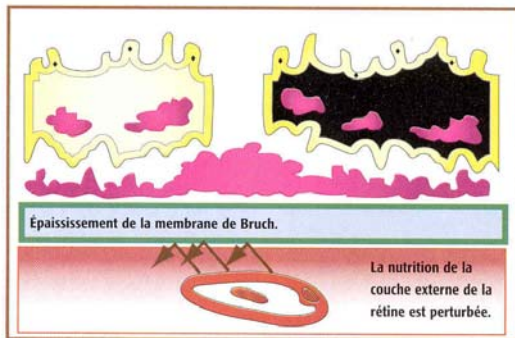


Figure 13 : Une accumulation de drusens au niveau de la membrane de bruch provoque un épaissement de celle-ci.



3 Perturbation de la nutrition, dégénérescence de l'ensemble des cellules de la macula.

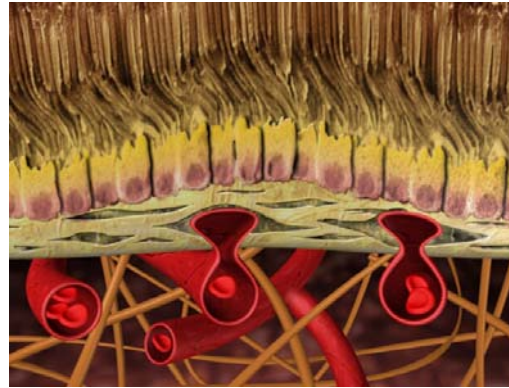


Figure 14 : Cet épaississement peut engendrer une hypoxie locale et induire la production de facteurs pro-angiogéniques.

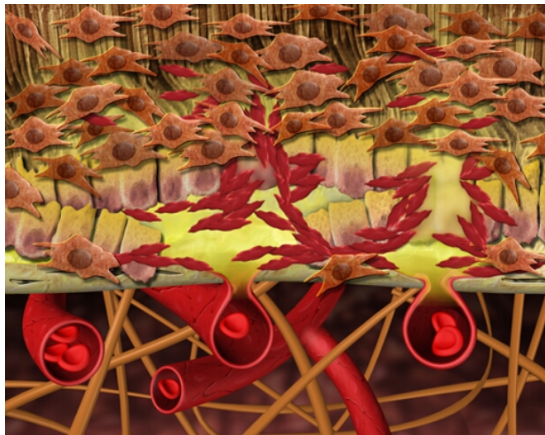


Figure 15 : La production de facteurs pro-angiogéniques conduit à une néovascularisation sous-rétinienne avec de nombreux saignements, pouvant engendrer un décollement rétinien suivi de la dégénérescence de la macula.

4.3 Traitements expérimentaux

La néovascularisation joue un rôle important dans diverses pathologies comme la croissance tumorale, l'arthrite, les rétinopathies diabétiques, et la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Nous ne savons pas si les signaux moléculaires impliqués dans les processus néovasculaires de ces diverses pathologies sont similaires ou non. Certaines différences sont attendues car les cellules endothéliales ont des caractéristiques différentes en fonction de l'organe [Janzer and Raff, 1987]. De même, la matrice extracellulaire et le tissu de soutien étant tissu-spécifiques, on peut raisonnablement s'attendre à des particularités en ce qui concerne la construction des néovaisseaux. Donc, bien qu'il soit largement admis que la néovascularisation découle d'un déséquilibre de la balance entre inhibiteurs et activateurs de l'angiogenèse, l'effets de stimulateurs ou d'inhibiteurs peuvent varier en fonction des maladies et des tissus atteints. De plus, la part jouée par la vasculogenèse par rapport à l'angiogenèse pourrait dépendre des pathologies considérées. Ceci rend hasardeux la prédiction du comportement d'une protéine ou d'une drogue qui inhibe la néovascularisation dans un type de maladie, dans une autre.

La rétine et la choroïde sont des tissus hautement spécialisés avec un réseau vasculaire unique rendant difficile la prédiction de la réponse à des agents inhibiteurs ou activateurs. Par exemple, le TIMP-1 a été employé comme inhibiteur de la migration des cellules endothéliales dans les chambres de Boyden [Johnson et al., 1994], mais il stimule la néovascularisation induite par le VEGF dans la rétine [Yamada et al., 2001] L'interféron $\alpha 2a$ provoque une involution drastique d'hémangiome [Ezekowitz et al., 1992] et inhibe la néovascularisation de l'iris dans un modèle de rétinopathie ischémique [Miller et al., 1993]. Ces résultats suggèrent que cet interféron $\alpha 2a$ pourrait inhiber la néovascularisation choroïdienne. Néanmoins, une étude multicentrique randomisée a démontré que des patients atteints de néovascularisation choroïdienne et ayant reçu de l'interféron $\alpha 2a$ n'avaient pas d'involution de la néovascularisation choroïdienne et qu'en fin d'étude, ils avaient même une vision plus mauvaise que les patients traités avec le placebo [Pharmacological Therapy for Macular Degeneration Study Group, 1997].

C'est pourquoi, des essais sur différents modèles animaux représentatifs du stade exsudatif de la maladie sont nécessaires afin de prédire les effets de protéines ou de médicaments sur la néovascularisation oculaire. Il convient d'insister sur le fait que la présence d'une macula

n'est retrouvée que chez les primates. Les modèles murins ne reproduisent que la néovascularisation choroïdienne, et non les stades initiateurs de la maladie, tels que les drusen et les altérations de l'épithélium pigmentaire.

But et Plan

Lorsque nous avons entamé notre travail, le rôle des protéases à sérine et de leur inhibiteur PAI-1, ainsi que le rôle des métalloprotéinases dans la progression de la DMLA n'étaient pas connus. Nous avons développé un modèle expérimental dans le laboratoire, et nous l'avons appliqué à des souris déficientes en PAI-1, en uPA, en tPA, en Plg, en uPAR, en MMP-2, en MMP-9 et à des souris doublement déficientes pour la MMP-2 et la MMP-9. Nous avons également mis en relation nos résultats avec les expressions des mRNA correspondants exprimés dans les membranes néovasculaires humaines obtenues chirurgicalement.

Nous avons déjà rappelé plus haut l'efficacité très relative des traitements disponibles dans la DMLA. Le consensus qui semble se dégager actuellement est que le seul moyen de traiter ou de prévenir la survenue de néovaisseaux serait au moyen de thérapies médicales dirigées contre l'angiogenèse. Nous avons dès lors cherché à définir une série d'enzymes qui s'avéreraient des candidats potentiels pour servir de cible thérapeutique. Nous avons testé un inhibiteur spécifique de métalloprotéinases pouvant être utilisé dans le traitement de la DMLA.

Ce travail s'articulera en deux phases :

- L'étude du rôle des protéases à sérine dans la néovascularisation choroïdienne.
Dans ce volet nous avons évalué l'effet de la déficience en PAI-1, en uPA, en tPA, en Plg, en uPA et en uPAR sur des souris dans notre modèle expérimental. De plus, nous avons mis en évidence l'effet dose-réponse *in vivo* du PAI-1 sur cette néovascularisation.
- L'étude du rôle des métalloprotéinases dans la néovascularisation choroïdienne.
Dans cette partie, nous avons démontré la coopération de la MMP-2 et de la MMP-9 dans notre modèle expérimental murin, ainsi que le potentiel thérapeutique d'un inhibiteur spécifique de ces deux métalloprotéinases.

Travaux personnels

5 Chapitre 1: Rôle des Protéases à Sérine dans la Néovascularisation Choroïdienne

5.1 Article 1: *Influence of plasminogen activator inhibitor type 1 on choroidal neovascularization*

V. Lambert, C. Munaut, A. Noel, F. Frankenne, K. Bajou, R. Gerard, P. Carmeliet, M. P. Defresne, J. M. Foidart, and J. M. Rakic.

FASEB J. 15 (6):1021-1027, 2001.

5.1.1 Introduction

Comme nous l'avons rappelé dans l'introduction de ce travail, les signaux moléculaires impliqués dans le développement de néovascularisation choroïdienne ne sont pas actuellement bien connus. Les intégrines α_v montrent un profil d'expression spécifique pendant l'angiogenèse rétinienne [Brooks et al., 1994a]. Des anticorps, dirigés contre ces intégrines ou contre leurs protéines de liaison telles que la vitronectine, inhibent la néovascularisation dans différents modèles animaux [Friedlander et al., 1996; Luna et al., 1996; Hammes et al., 1996]. Parmi les facteurs de croissance, plusieurs indices suggèrent une implication importante du VEGF dans la pathogenèse de la DMLA, depuis que d'une part, la présence de cette cytokine a été découverte dans certains échantillons pathologiques [Kvanta et al., 1996; Aiello et al., 1994], et que d'autre part, le VEGF est exprimé dans certains modèles de néovascularisation rétinienne induites par hypoxie [Pierce et al., 1995]. Malgré cela, la sur expression du VEGF seul est incapable d'induire la néovascularisation choroïdienne dans un modèle de souris transgéniques [Okamoto et al., 1997], suggérant soit une spécificité rétinienne dans les mécanismes contrôlant l'angiogenèse, soit l'intervention d'autres molécules pro-angiogéniques dans la DMLA. Dans l'œil intact, la sécrétion polarisée du VEGF par l'épithélium pigmentaire pourrait jouer un rôle important dans la maintenance d'une structure choriocapillaire normale et fonctionnelle [Blaauwgeers et al., 1999]. Une autre étude suggère aussi un rôle du Fas ligand dans le contrôle de la néovascularisation choroïdienne [Kaplan et al., 1999].

L'angiogenèse est un processus invasif qui requiert la protéolyse de la matrice extracellulaire, la prolifération et la migration des cellules endothéliales avec une synthèse simultanée de nouveaux composants matriciels. De tels événements migratoires et de remaniements matriciels sont régulés par différents systèmes protéolytiques comprenant les métalloprotéinases matricielles (MMPs) et les protéinases à sérine du système du plasminogène/activateur du plasminogène.

Afin d'évaluer le rôle joué par PAI-1 dans l'angiogenèse pathologique sous-rétinienne, nous avons induit une néovascularisation choroïdienne *in vivo* à l'aide d'un laser à l'argon [Tobe et al., 1998] chez des souris déficientes pour le PAI-1 et des souris sauvages contrôles.

5.1.2 Matériel et Méthodes

5.1.2.1 Animaux génétiquement modifiés et modèle

Des souris homozygotes déficientes pour PAI-1 (PAI-1^{-/-}) et leurs contrôles correspondants « sauvages » ont été utilisées [Carmeliet et al., 1993a].

Un modèle de néovascularisation choroïdienne induite au laser (4 impacts par œil autour du nerf optique) a été appliqué sur les animaux comme décrit précédemment [Tobe et al., 1998]. Au jour 14 après induction, et après un contrôle angiographique permettant d'estimer le pourcentage de lésions développant une néovascularisation (critères similaires à ceux utilisés chez les patients atteints de DMLA), les animaux sont sacrifiés et les globes oculaires énucléés pour analyse histologique ou étude de l'ARN messager par RT-PCR.

Dans une seconde expérience, afin de vérifier si le phénotype observé chez les animaux modifiés était exclusivement le résultat de l'absence du gène de PAI-1, le même protocole a été appliqué cette fois avec injection intra-veineuse d'adénovirus contrôles (AdRR5) ou d'adénovirus recombinants vecteurs respectivement du gène de la β -galactosidase (AdCMVlacZ), pour localiser les régions ayant intégré l'ADN viral, et du gène humain du PAI-1 (AdCMVPAI-1). Un contrôle sanguin des taux de PAI-1 est effectué par ELISA au jour 5 [Bajou et al., 1998].

5.1.2.2 Quantification de la néovascularisation et immunohistochimie

La taille de la réaction néovasculaire est estimée par une évaluation morphométrique à l'aide d'un système informatisé d'analyse d'images à partir de coupes congelées. Ces dernières sont

soit, simplement colorées à l'hématoxyline, soit examinées en immunofluorescence en utilisant deux anticorps simultanés permettant de localiser les structures vasculaires (anti-CD31 appelé aussi anti-PECAM, et anti-collagène de type IV).

L'estimation se fait par la mesure du rapport B/C entre, d'une part, l'épithélium pigmentaire et le sommet de la réaction néovasculaire (B), et d'autre part, l'épaisseur de la couche choroïdienne intacte adjacente (C). Ce système de quantification a été préféré à une mesure de surface des lésions car il est indépendant de l'orientation des sections histologiques. (fig. 16)

5.1.2.3 Expression de l'ARN messager de PAI-1 par RT-PCR

L'ARN total est extrait par kit (RNeasyMini Kit, QIAGEN) des segments postérieurs des yeux de souris injectées avec l'adénovirus recombinant AdCMVPAI-1. La séquence des deux oligonucléotides utilisés est rapportée dans la publication. Après 35 cycles d'amplification (GeneAmp ThermoStable rTth reverse transcriptase RNA PCR, kit Perkin Elmer) pour PAI-1 et 18 cycles pour le 28S ribosomiale (contrôle), les bandes d'ADN complémentaires sont mises en évidence sur gel de polyacrylamide.

5.1.2.4 Statistiques

La signification statistique ($p < 0,05$) des données obtenues respectivement sur les souris déficientes (PAI-1^{-/-}) et les contrôles est évaluée à l'aide du test « χ^2 » et du test « t » de Student pour données non appariées.

5.1.3 Résultats

5.1.3.1 Néovascularisation choroïdienne *in vivo* chez les souris PAI-1^{-/-} et sauvages

Afin de déterminer si l'absence de PAI-1 influence la néovascularisation *in vivo*, nous avons utilisé un modèle murin de photocoagulation rétinienne à l'aide du laser à argon. La photocoagulation induit un traumatisme au niveau de la rétine externe, de l'épithélium pigmentaire et de la membrane de Bruch, permettant à la néovascularisation choroïdienne d'envahir l'espace sous-rétinien, de façon similaire à ce qui est observé chez les patients atteints de DMLA. La rupture de la membrane de Bruch est immédiatement identifiée ophtalmologiquement par l'apparition d'une bulle traumatique rétinienne à l'endroit de l'impact laser.

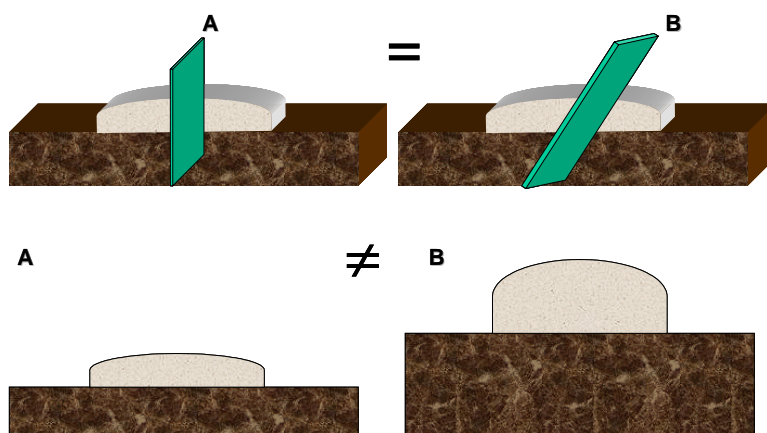


Figure 16: Ce schéma nous montre le problème de l'incidence de coupe. Grâce au calcul du rapport de l'épaisseur mesurée au niveau de l'impact sur la mesure de l'épaisseur de la choroïde (en brun) considérée comme constante, quelque soit l'incidence de coupe, le rapport sera toujours identique.

Les angiographies réalisées au jour 14 (fig. 17 a,b) montrent l'apparition de nouveaux vaisseaux. Le pourcentage de zones hyperfluorescentes (hot spots) retrouvées par rapport au nombre d'impacts réalisé s'élève à 72% (32/44). L'incidence de « hot spots » est réduite à 21% chez les souris déficientes pour le PAI-1 (fig. 17 c, $p < 0,001$).

Les analyses histologiques et les immunofluorescences à l'aide d'anticorps anti-PECAM et anti-collagène IV confirment la présence de capillaires néoformés au sein des lésions identifiées par angiographie (fig. 17). Les souris sauvages montrent des aires de néovascularisation induites par le laser en forme de « champignon », accompagnées d'une migration des cellules de l'épithélium pigmentaire le long des microvaisseaux nouvellement formés (fig. 18a). La blessure n'est habituellement pas recouverte d'une couche cellulaire continue provenant de l'épithélium pigmentaire. Chez les souris déficientes pour le PAI-1, la réaction néovasculaire est beaucoup plus réduite et consiste principalement en un épaissement diffus et modéré couvert par une couche d'épithélium pigmentaire confluyente (fig. 18b). Dans la plupart des cas, les lésions sont identifiées indirectement par la présence des altérations de la rétine. Les analyses par immunofluorescence avec les anticorps anti-PECAM et anti-collagène IV n'ont pas permis de mettre en évidence une angiogenèse significative sur le site de la cicatrice des souris déficientes pour le PAI-1 (fig. 18d).

L'estimation de la néovascularisation par l'utilisation du rapport B/C montre une diminution de 45% de l'angiogenèse chez les souris déficientes pour le PAI-1 comparées aux souris sauvages ($p < 0,001$).

5.1.3.2 PAI-1 est présent dans la zone néovasculaire

Les marquages immunofluorescents prouvent la présence de PAI-1 exclusivement au sein de la membrane néovasculaire, mais pas dans les zones normales intactes adjacentes chez les souris sauvages (fig. 19a). Le contrôle dans lequel l'anticorps primaire a été pré-absorbé par du PAI-1 recombinant reste négatif (fig. 19b). Aucun marquage n'est évidemment observé chez les souris déficientes pour le PAI-1 (fig. 19c).

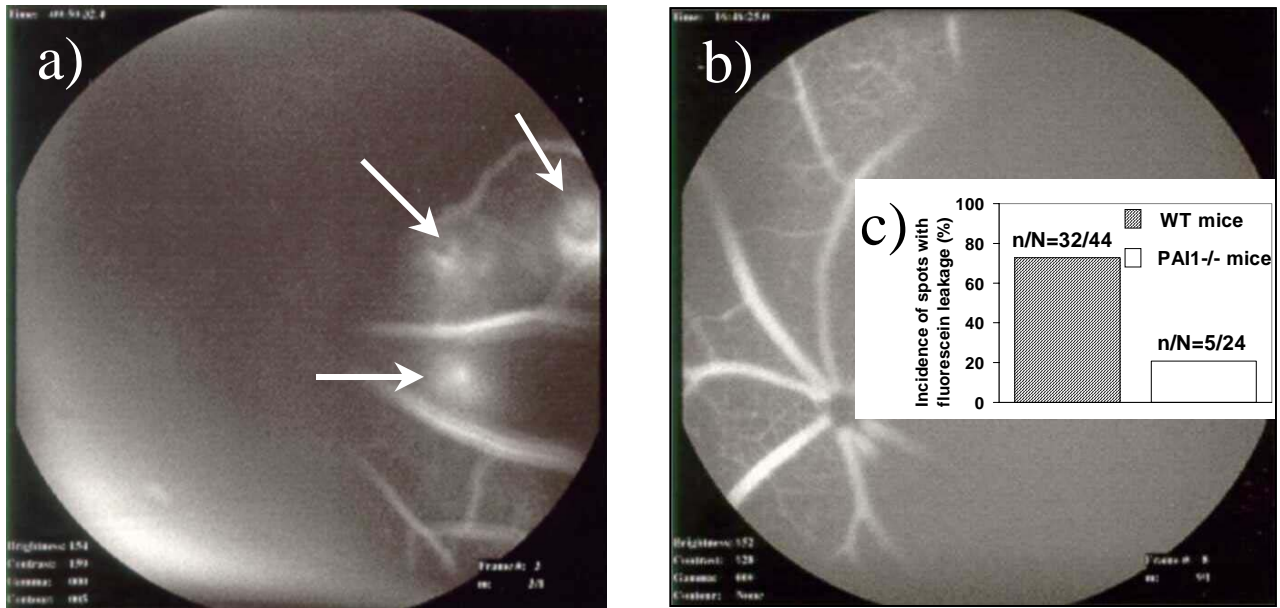


Figure 17: Angiographie réalisée 14 jours après induction laser. Les taches de fluorescence (flèches) venant des néovaisseaux choroïdiens, appelées hot spots, sont observées chez les souris sauvages (a), mais pas chez les souris déficientes pour le PAI-1 (b). Une réduction de l'ordre de trois fois du pourcentage de hot spots est obtenue chez souris PAI-1^{-/-} (c). n/N = nombre de hot spots / nombre d'impacts laser réalisés ($\chi^2=16,8$, $P<0,0001$).

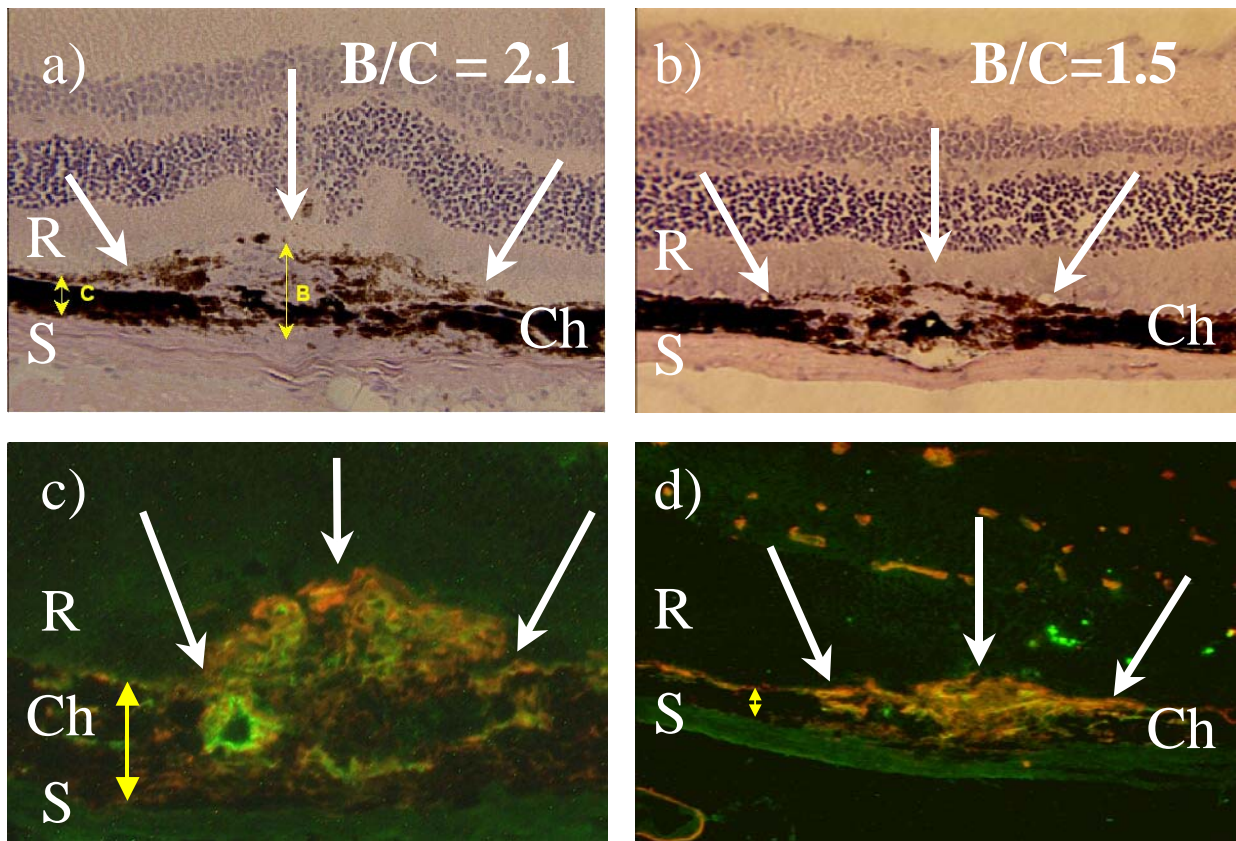


Figure 18: Coloration hématoxyline-éosine (a et b) et marquages immunofluorescents anti-PECAM (vert) et anti-collagène IV (rouge) 14 jours après le traitement laser, chez des souris sauvages (a et c) et chez des souris déficientes pour le PAI-1 (b et d). R : neurorétine ; Ch : choroïde ; S : la sclère ; les flèches blanches délimitent la zone de trauma laser. L'estimation se fait par la mesure du rapport B/C entre, d'une part, l'épithélium pigmentaire et le sommet de la réaction néovasculaire (B), et d'autre part, l'épaisseur de la couche choroïdienne intacte adjacente (C). Grossissement de travail 200X.

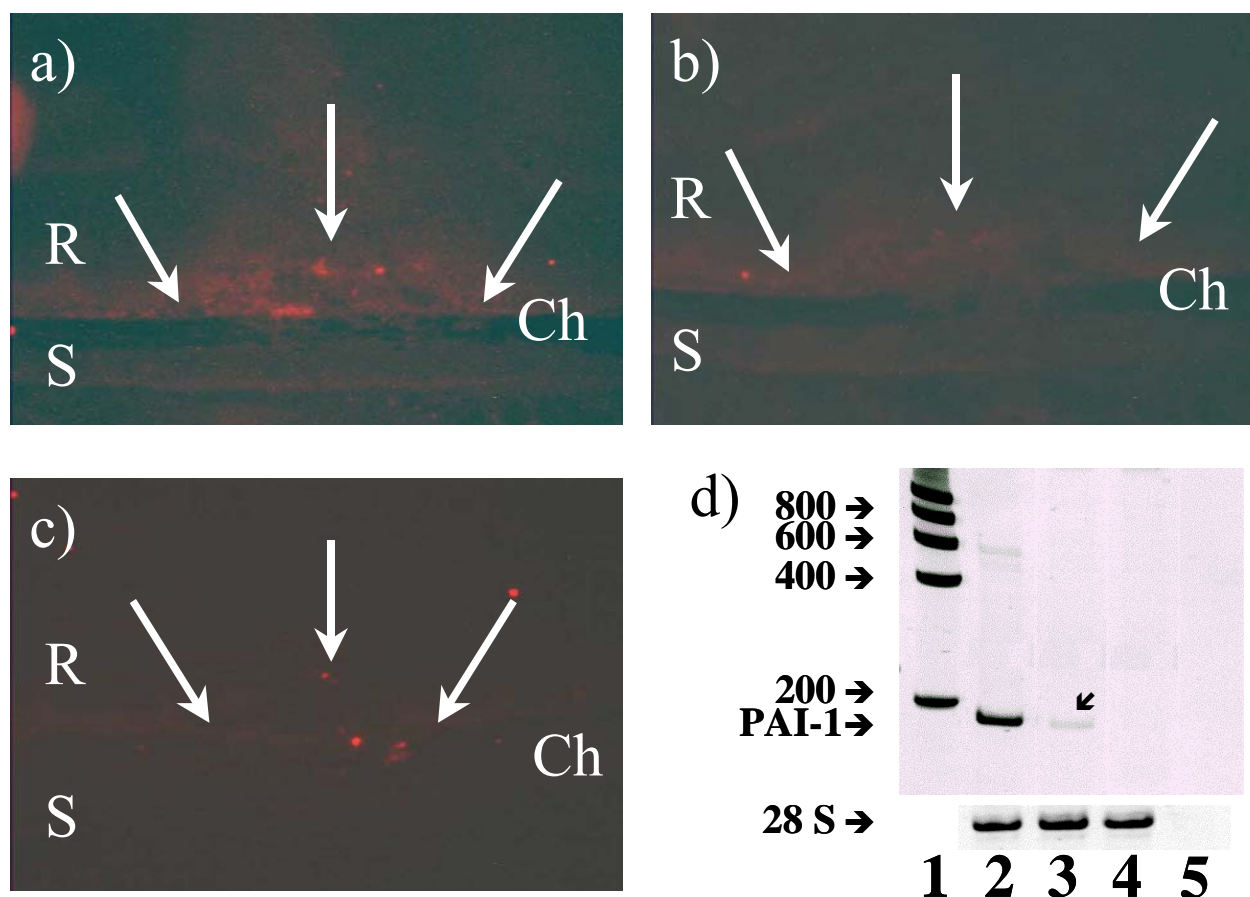


Figure 19: Marquage immunofluorescent et RT-PCR pour le PAI-1. 14 jours après le traitement laser, le PAI-1 n'est détecté seulement que dans la zone néovasculaire des souris sauvages (a) et pas chez les souris déficientes pour le PAI-1 (c). L'immunomarquage disparaît lorsque l'anticorps primaire est pré-absorbé avec du PAI-1 recombinant (1 μ g/ml) (b). Les flèches blanches délimitent la zone du trauma laser. Le grossissement de travail est de 200X. Les analyses par RT-PCR (d) ont identifié l'expression de l'ARN messager de PAI-1 dans les yeux des souris sauvages (colonne 2) et chez les souris déficientes pour le PAI-1 injectées avec le AdCMVPAI-1 (colonne 3). La colonne 1 contient les marqueurs de poids moléculaires, la colonne 4 les yeux des souris PAI-1^{-/-} et la colonne 5 contient le contrôle négatif.

Les RT-PCR réalisées sur les yeux montrent, 14 jours après l'injection d'adénovirus vecteurs du AdCMVPAI1, une faible expression de l'ARN messager du PAI-1 humain chez les souris déficientes pour le PAI-1 (fig. 19d).

5.1.3.3 L'injection d'adénovirus vecteurs du PAI-1 recombinant restaure l'angiogenèse choroïdienne

Afin de confirmer le rôle joué par le PAI-1 dans l'angiogenèse choroïdienne, des souris PAI-1^{-/-} et sauvages ont été injectées en i.v. un jour après l'induction laser avec un adénovirus recombinant (AdCMVPAI1) vecteur de l'ADNc du PAI-1 humain, un virus contrôle

(AdRR5), ou un vecteur de l'ADNc du LacZ (AdCMVLacZ). Les immunomarquages réalisés à l'aide d'anticorps anti-PECAM et anti-collagène IV montrent une angiogenèse significative chez les souris déficientes pour le PAI-1 injectées avec AdCMVPAI1 (fig. 20a), mais pas chez les souris PAI-1^{-/-} injectées avec le virus contrôle (fig. 20b). L'injection du virus vecteur de l'ADNc du LacZ résulte en une expression β -galactosidasique dans les cellules de l'épithélium pigmentaire (fig. 20c). Ceci démontre bien que les adénovirus recombinants injectés en intra veineux sont capables de transduire l'ADNc du PAI-1 au sein des cellules à proximité de la lésion au laser. Quatre jours après l'injection de l'AdCMVPAI1, des mesures de PAI-1 humain dans le plasma sanguin ont été réalisées, et montrent des valeurs plus élevées chez les souris PAI-1^{-/-} injectées (moyenne 7340 ng/ml, range 1850-12600) que le PAI-1 murin chez les souris sauvages (2 ng/ml). PAI-1 devient indétectable après 2 semaines. La quantification de la néovascularisation sur lames congelées (fig. 20d) montre que l'expression du PAI-1 humain chez les souris déficientes pour le PAI-1 résulte dans un rapport B/C de l'épaisseur de néovascularisation de l'ordre de 90% de celui observé chez les souris sauvages. Par contre, le rapport B/C estimé chez les souris PAI-1^{-/-} injectées avec l'AdRR5 est semblable à celui observé chez les souris déficientes pour le PAI-1.

5.1.4 Discussion

L'angiogenèse est considérée comme un processus cellulaire invasif qui requiert l'activité fonctionnelle d'une variété de molécules tels que les facteurs de croissance, les protéines de la matrice extracellulaire, des récepteurs d'adhésion et des enzymes protéolytiques [Folkman and D'Amore, 1996]. Des concentrations mesurables de tPA et de PAI ont été détectées dans de précédentes études cliniques dans l'humeur aqueuse d'yeux normaux [Smalley et al., 1994;Steinkamp et al., 1993]. Dans le vitré de patients diabétiques souffrants de rétinopathie proliférative, des concentrations élevées de tPA et de PAI-1 [Hattenbach et al., 1999] ont été associées avec un taux élevé de VEGF. Comme PAI-1 inhibe indirectement l'activation des MMPs, il est logique de penser que PAI-1 diminuerait la néovascularisation choroïdienne. Effectivement dans la rétinopathie du prématuré, le traitement par des doses élevées de PAI-1 exogène protège de la néovascularisation rétinienne [Penn and Rajaratnam, 2003;Penn et al., 2001].

Paradoxalement, nos résultats démontrent qu'une expression minimale de PAI-1 est nécessaire pour l'angiogenèse choroïdienne. L'effet du PAI-1 est restreint à la

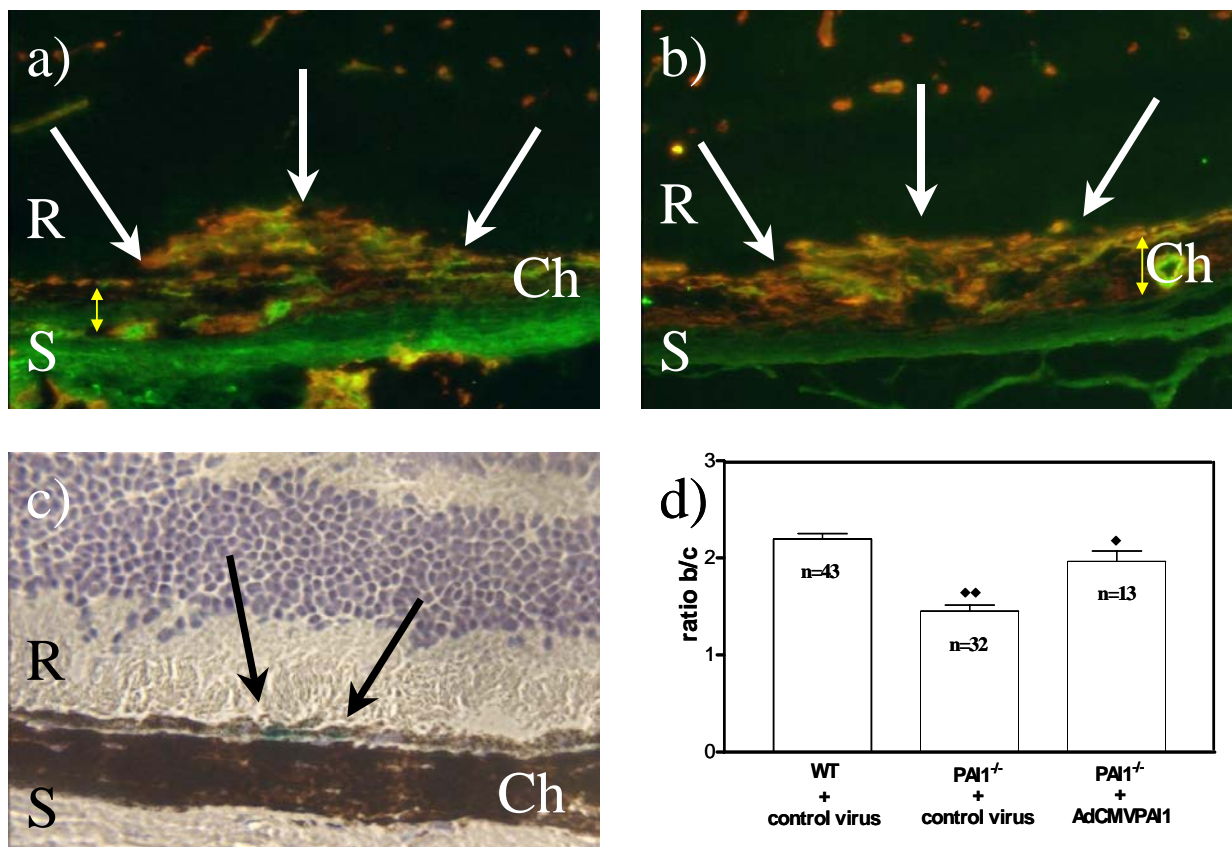


Figure 20: Injection d'adénovirus vecteurs après induction laser. L'analyse des souris déficientes pour le PAI-1 injectées avec l'adénovirus vecteurs de l'ADNc du PAI-1 humain (a) montre une présence de néovaisseaux par marquages immunofluorescents identiques à ceux observés chez les souris sauvages injectées avec le virus contrôle (non illustré), alors que les souris PAI-1^{-/-} injectées avec ce même virus contrôle ne montrent aucune néovascularisation (b). L'expression du LacZ (en bleu) est détectée dans les cellules de l'épithélium pigmentaire (flèches) des souris injectées par le virus vecteurs de l'ADNc de la β -galactosidase (c). La quantification de la néovascularisation par le rapport B/C montre une diminution significative chez les souris PAI-1^{-/-} injectées avec le virus contrôle (t test, $p < 0,001$), tandis que les souris PAI-1^{-/-} injectées avec l'AdCMVPAI1 ont un rapport B/C ($p = 0,06$) similaire à celui calculé chez les souris sauvages (d). n représente le nombre de lésions analysées. R : la neuro-rétine ; Ch : la choroïde avec les flèches délimitant la lésion ; S : la sclère.

néovascularisation tumorale et oculaire pathologique, mais n'est pas observé dans la placentation, le développement embryonnaire et la réaction de cicatrisation, qui sont essentiellement normaux chez les souris déficientes pour le PAI-1 [Bajou et al., 2001].

Bien que le mécanisme d'action de PAI-1 reste à élucider, au moins trois hypothèses peuvent être formulées.

Le PAI-1 pourrait prévenir une dégradation excessive de la matrice contre la protéolyse médiée par l'uPA. De cette façon, il fournirait un substrat d'adhésion cellulaire pour la migration des cellules endothéliales. Il a été démontré *in vitro* qu'une protéolyse excessive empêche l'assemblage coordonné des cellules endothéliales en capillaires [Montesano et al., 1990].

Le PAI-1 pourrait jouer le rôle d'un déclencheur moléculaire qui gouvernerait l'adhésion et le décrochage des cellules par le biais de l'uPA et/ou d'intégrines [Noel et al., 1999;Czekay et al., 2003;Devy et al., 2002].

Le PAI-1 pourrait également promouvoir l'angiogenèse par une diminution de la production d'angiostatine par le plasminogène, grâce à son inhibition de la plasmine, de l'uPA et du tPA [Gately et al., 1997].

Pour conclure, la néovascularisation choroïdienne induite par laser chez la souris est un modèle de recherche fondamentale très utile dans le cadre de l'angiogenèse choroïdienne, bien que ce modèle diffère des événements naturels se déroulant lors de la DMLA. Nos observations renforcent l'idée du rôle essentiel joué par le PAI-1 dans le développement de la néovascularisation sous-rétinienne et identifie clairement le PAI-1 comme une cible thérapeutique potentielle dans l'élaboration de stratégies thérapeutiques pour la lutte contre l'angiogenèse sous-rétinienne.

5.2 Article 2: Mice without uPA, tPA, or plasminogen genes are resistant to experimental choroidal neovascularization

J. M. Rakic, V. Lambert, C. Munaut, K. Bajou, K. Peyrollier, M. L. Alvarez-Gonzalez, P. Carmeliet, J. M. Foidart, and A. Noel.

Invest Ophthalmol.Vis.Sci. 44 (4):1732-1739, 2003.

5.2.1 Introduction

La première observation de l'effet pro-angiogénique de l'uPA a été démontré dans un modèle de néovascularisation cornéenne [Berman et al., 1982]. Certaines études ont entrepris, plus tard, l'analyse de l'implication du système protéolytique dans la néovascularisation rétinienne associée au diabète [Grant and Guay, 1991;Das et al., 1999a;Hattenbach et al., 1999]. Toutefois, les données concernant l'angiogenèse sous-rétinienne à partir de la choroïde ne sont pas disponibles.

Nous avons préalablement montré, dans l'article 1, l'importance de l'expression de PAI-1 dans la néovascularisation choroïdienne [Lambert et al., 2001]. Comme il a été rapporté que la présence de fibrine était une constante dans les membranes néovasculaires de la DMLA [Lopez et al., 1991;Lopez et al., 1993], nous avons étendu notre étude à l'expression et l'activité des autres membres du système fibrinolytique chez l'homme et dans la néovascularisation choroïdienne induite au laser chez la souris.

5.2.2 Matériel et méthodes

Pour rendre la lecture de ce travail plus aisée en évitant les répétitions, nous limiterons dorénavant volontairement la description de cette section aux éléments non décrits précédemment. La description détaillée des procédures de RT-PCR, la séquence des oligonucléotides et la taille attendue des produits sont disponibles dans la publication. Il en va de même pour l'induction du modèle, la mise en évidence des néovaisseaux et la quantification de la réponse néovasculaire.

5.2.2.1 Profil d'expression du système fibrinolytique par RT-PCR

Nous avons examiné successivement l'expression des ARN messagers dans des segments postérieurs intacts prélevés sur des yeux de donneurs d'organe et, dans des membranes néovasculaires prélevées au cours de chirurgies de translocation maculaire. Les données cliniques de 4 patients représentatifs sont rassemblées dans le tableau 3.

Pour obtenir un profil d'expression temporel semi-quantitatif (évidemment impossible à obtenir sur les tissus humains obtenus à un stade avancé de la maladie), nous avons induit au laser de multiples ruptures (n=30) de la membrane de Bruch chez la souris. Pour exclure la possibilité d'un effet lié simplement à l'application d'un traitement au laser, un contrôle additionnel a été réalisé en effectuant le même nombre d'impacts de façon subliminaire, c'est à dire sans aboutir à l'explosion de la membrane de Bruch (bien visible au moment de l'impact par l'apparition d'une bulle).

5.2.2.2 Animaux génétiquement modifiés

Le modèle expérimental de néovascularisation choroïdienne induite par 4 impacts laser a été effectué sur des souris homozygotes déficientes respectivement pour le gène uPA (uPA^{-/-}), tPA (tPA^{-/-}), uPAR (uPAR^{-/-}) et Plg (Plg^{-/-}) ainsi que sur leurs contrôles sauvages ("wild-type" ou WT). Ces souris ont été générées et caractérisées auparavant [Carmeliet et al., 1994; Carmeliet and Collen, 1998; Ploplis et al., 1998].

5.2.2.3 Immunohistochimie

La localisation des anticorps anti-collagène de type IV, anti CD-31, anti uPA, anti-tPA et anti-uPAR a été examinée en immunofluorescence. Celle des anticorps anti-fibrinogène/fibrine a été réalisée en lumière visible avec une coloration orange à l'AEC.

Les méthodes de fixation, les valeurs de dilution, les contrôles et les anticorps secondaires sont indiqués dans la publication 3.

5.2.2.4 Zymographie

Pour détecter les endroits dans lesquels les activateurs du plasminogène étaient actifs, nous avons employé la technique de zymographie *in situ* à la caséine [Bajou et al., 1998; Bajou et al., 2001] en recouvrant des sections congelées pendant 4 heures avec un mélange de caséine

(2%), d'agar (0.9%) et de plasminogène (600 μ l). L'activité caséinolytique de la plasmine est visible par l'apparition de zones plus sombres aux endroits où uPA et/ou tPA actifs sont présents (microscope à champ obscur). L'incubation avec un inhibiteur spécifique de l'uPA (amiloride, 2mM) permet, après une exposition plus longue, de déceler les zones de caséinolyse induites spécifiquement par la présence de tPA activé.

Pour mettre en évidence l'activité gélatinolytique de MMP-2 et MMP-9, les protéines ont été extraites des segments postérieurs murins au jour 3 après induction de multiples lésions de la membrane de Bruch. Après dissolution avec du SDS, les échantillons (5 ng) sont déposés sur le gel de polyacrylamide contenant la gélatine et soumis à l'électrophorèse. Après activation, l'activité gélatinolytique est révélée (en blanc) par coloration au bleu de Coomassie. Le contrôle contenant les différentes formes de MMP-2 et MMP-9 est constitué par le milieu conditionné des cellules tumorales HT 1080 [Munaut et al., 1995].

5.2.3 Résultats

5.2.3.1 Analyse par RT-PCR des membranes néovasculaires

	M 71 (1)	F 76 (2)	M 79 (3)	F 75 (4)
Acuité visuelle préopératoire	1//10	1/20	1/60	1/10
Sang sous la rétine	-	++	++	+
Taille de la lésion (DD)	1,5	2	4	3
Classification (angiographie)	Occulte	Non visible	Non visible	Occulte +DEP
Traitements antérieurs	-	-	PDT 2X	-
Etat de l'autre œil	NV fibrosé	NV fibrosé	Disciforme	DMLA sèche

Tableau 3 : Données cliniques de patients dont les membranes néovasculaires ont été analysées dans la figure 21. Le sexe et l'âge sont donnés avec, entre parenthèse, le numéro attribué à la membrane néovasculaire. DD=diamètre papillaire; DEP=décollement de l'épithélium pigmentaire; PDT=thérapie photodynamique; NV=néovaisseaux; ++ correspond à une quantité de sang empêchant une angiographie au vert d'indocyanine.

Les ARN messagers de l'uPA, du tPA et de l'uPAR ont été détectés dans toutes les membranes néovasculaires humaines obtenues après chirurgie. L'historique de ces patients

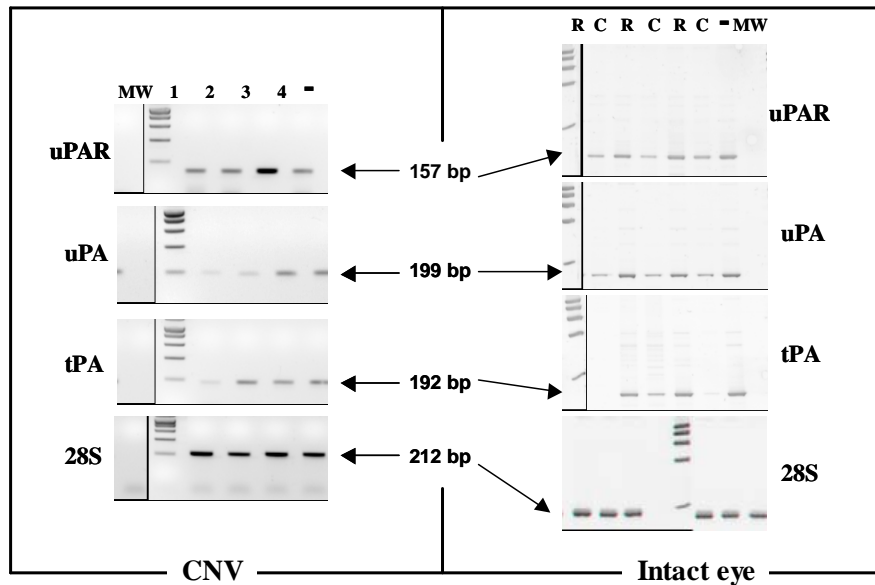


Figure 21 :Exemples représentatifs de l'expression de l'ARN messager de l'uPAR, de l'uPA et du tPA de membranes néovasculaires humaines extraites chirurgicalement de patients (1 à 4 dont l'historique est décrit dans le tableau 3) atteints de DMLA et de pôles postérieurs d'yeux intacts de donneurs. L'ARN total (environ 10 ng) a été analysé par RT-PCR. L'ARNr 28S est utilisé comme référence afin d'estimer la quantité d'ARN chargé. M : marqueurs de poids moléculaires ; La taille attendue (bp) est indiquée à droite ; R : rétine ; C : complexe choriode-épithélium pigmentaire.

atteints de membranes néovasculaires agressives est documenté dans le tableau 3. Ces ARN ont été aussi documentés chez des donneurs sains [Wang et al., 1995; Hackett and Campochiaro, 1993] (fig. 21).

Afin de définir le profil d'expression du PAI-1 en fonction du temps, nous avons eu recours à une analyse par RT-PCR semi-quantitative (normalisée par rapport au 28S ribosomal) réalisée sur des membranes néovasculaires murines induites par laser à différents temps (du jour 3 au jour 40 après initiation). Comme illustré figure 22, les ARN messagers de l'uPA et de l'uPAR montrent la plus forte sur-expression durant le développement de la néovascularisation choroïdienne murine, suivie d'une décroissance de l'expression, pour l'uPA, 10 jours après l'initiation, coïncidant avec la période de stabilisation du bourgeon néovasculaire. Une telle induction n'est pas observable lorsqu'un traitement laser de basse puissance contrôle est appliqué.

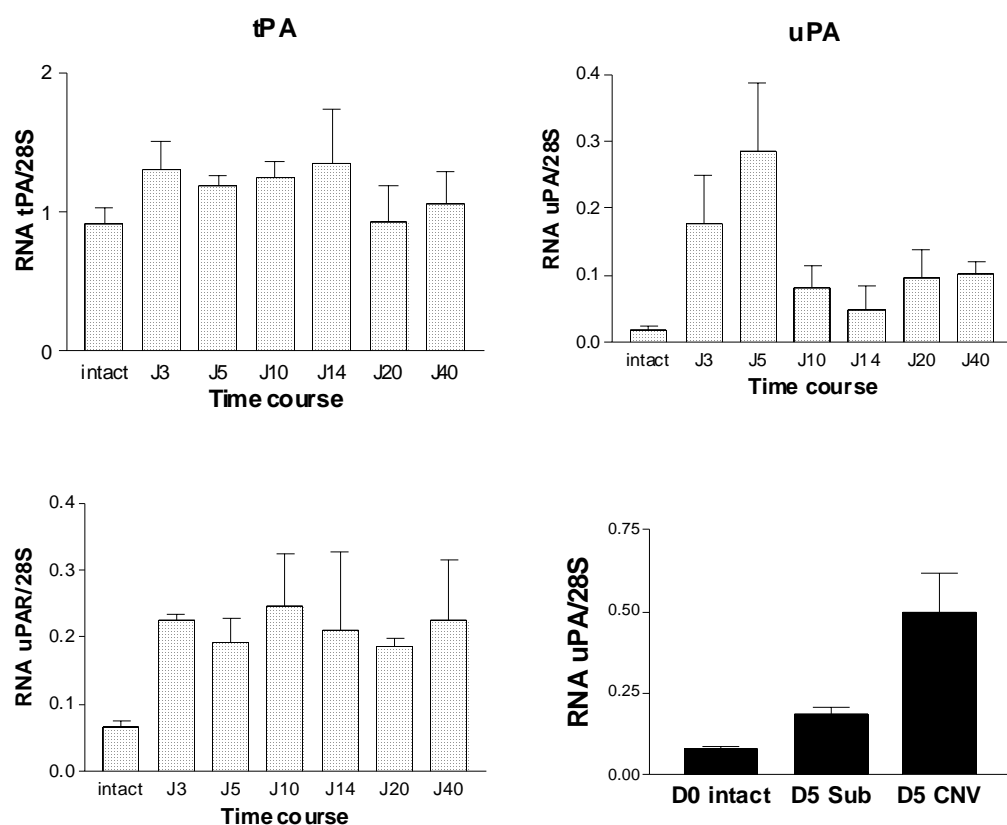


Figure 22 :Analyse par RT-PCR de l'expression des ARN messagers des activateurs du plasminogène durant le développement de la néovascularisation choroïdienne induite par laser chez la souris. Les histogrammes correspondent à une analyse densitométrique des ARN messagers du tPA (A), de l'uPA (B) et de l'uPAR (C) normalisés par rapport au signal du 28S à différents temps après de multiples inductions laser. Comme contrôle, une évaluation similaire a été réalisée pour l'uPA au jour 5 avec de multiples impacts laser subliminaires (D). D5sub : traitement laser subliminaire au jour 5 ; D5 CNV : traitement laser au jour 5 avec rupture de la membrane de Bruch.

5.2.3.2 *Présence et activité de l'uPA, du tPA et de l'uPAR dans les membranes néovasculaires expérimentales*

Les colorations par immunofluorescence démontrent la présence des protéines de l'uPA, du tPA et de l'uPAR à l'endroit du trauma infligé par l'impact laser, au niveau de l'épithélium pigmentaire et de la couche choroïdienne (fig. 23 A-C). Aucun marquage n'a été observé chez les souris $uPA^{-/-}$, $tPA^{-/-}$ et $uPAR^{-/-}$ pour leur protéine déficitaire correspondante (non illustré). La protéine uPAR a été aussi bien détectée dans le bourgeon néovasculaire que dans la zone intacte avoisinante (fig. 23 B). La zymographie in situ réalisée sur des souris sauvages nous révèle que l'activité des activateurs du plasminogène a lieu dans et autour de la zone de néovascularisation induite par laser (fig. 23 E), mais peut également se retrouver, après une longue incubation, dans l'épithélium pigmentaire (fig. 23 F). Une activité caséinolytique a également été retrouvée, mais à plus faible intensité, lorsque l'uPA est inhibé par l'amiloride, suggérant une participation partielle du tPA dans l'activité protéolytique observée (fig. 23 G).

5.2.3.3 *Développement néovasculaire choroïdien in vivo chez les souris $uPA^{-/-}$, $tPA^{-/-}$, $uPAR^{-/-}$ et $Plg^{-/-}$*

Afin de déterminer si l'absence des membres du système des activateurs du plasminogène peut influencer le développement néovasculaire sous-rétinien, nous avons évalué la sévérité de la réaction angiogénique par immunofluorescence anti-PECAM et histologiquement par la mesure du rapport B/C, comme déjà décrit précédemment. La néovascularisation induite par laser est extrêmement réduite chez les souris $uPA^{-/-}$, $tPA^{-/-}$ (non illustré), et $Plg^{-/-}$, mais est très développée chez les souris $uPAR^{-/-}$ et sauvages (non illustré) (fig. 24 A-C). On observe une diminution de l'ordre de 50% du rapport B/C chez les souris $uPA^{-/-}$, $tPA^{-/-}$ et $Plg^{-/-}$ ($p < 0,001$) comparées aux souris sauvages (fig. 24 D).

5.2.3.4 *Zymographie sur gel de gélatine*

Afin d'évaluer l'influence potentielle de l'absence des activateurs du plasminogène ou du plasminogène sur l'activité des MMPs, l'activité de la MMP-2 et de la MMP-9 a été analysée par zymographie sur gel de gélatine à partir de segments postérieurs ayant subis de multiples impacts laser chez des souris sauvages et déficientes. La forme latente de la MMP-2, qui

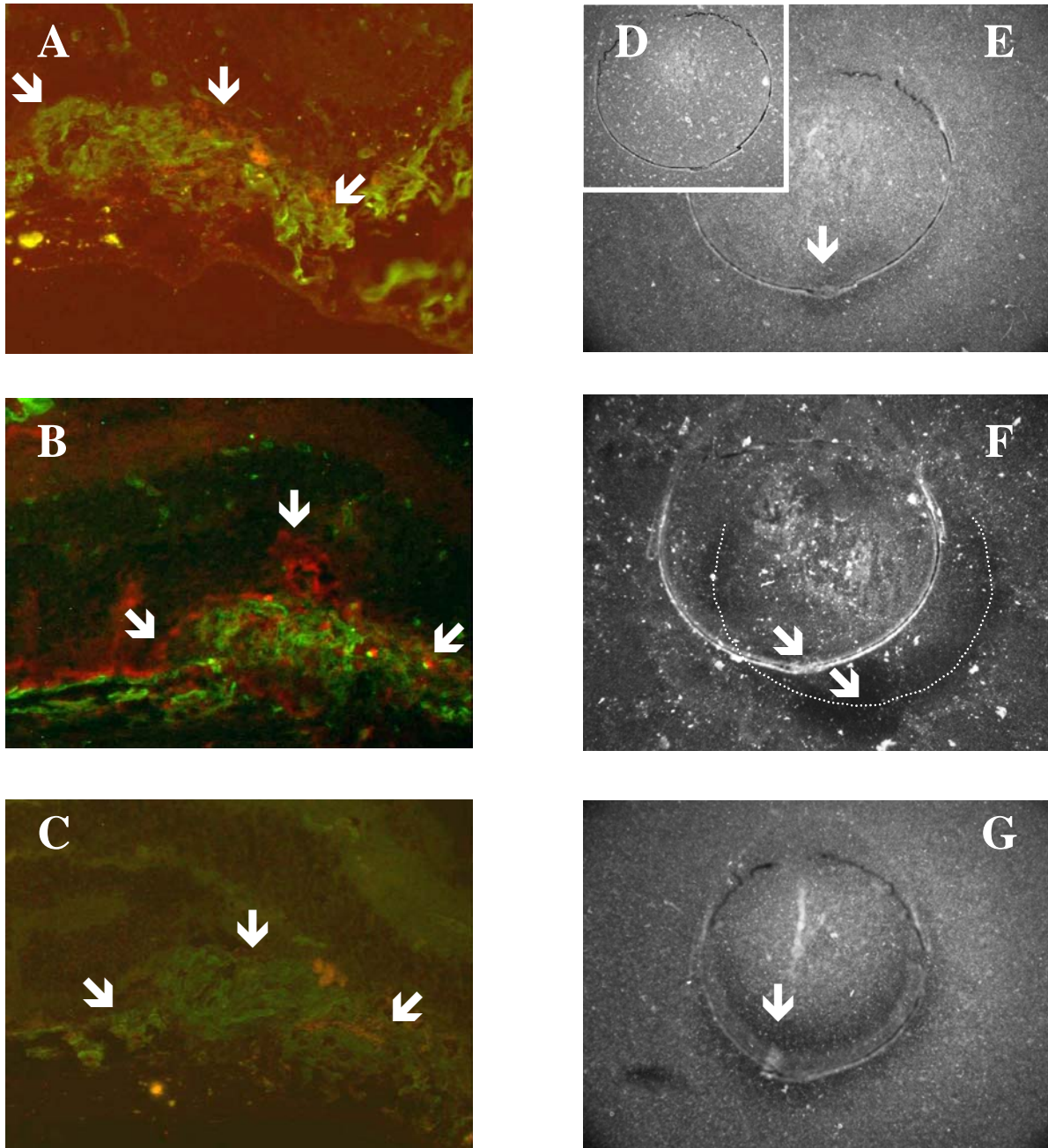


Figure 23 : Présence et activité des activateurs du plasminogène dans la néovascularisation choroïdienne murine. Immunolocalisation en rouge de l'uPA (A), de l'uPAR (B) et du tPA (C) sur coupes froides d'yeux contre-colorées avec un anticorps anti-collagène de type IV en vert, au jour 14 après induction laser chez des souris sauvages. Zymographies *in situ* sur coupes oculaires de souris sauvages réalisées 3 jours après induction laser. L'activité totale des activateurs du plasminogène est visualisée par les zones de lyse foncées après 4 heures (E) et 12 heures (F) d'incubation. Après 12 heures, la localisation de l'activité des activateurs du plasminogène s'étend le long de l'épithélium pigmentaire intact. Le gel de caséine a glissé vers la droite sur cette image. En présence de 2mM d'amiloride durant 24 heures, seule l'activité du tPA est détectée (G). Le contrôle négatif est représenté en D. Ret : rétine ; Le : lentille ; Ir : Iris ; les flèches délimitent l'aire néovasculaire. Grossissement de travail 400X (A-C) et 25X (E-G).

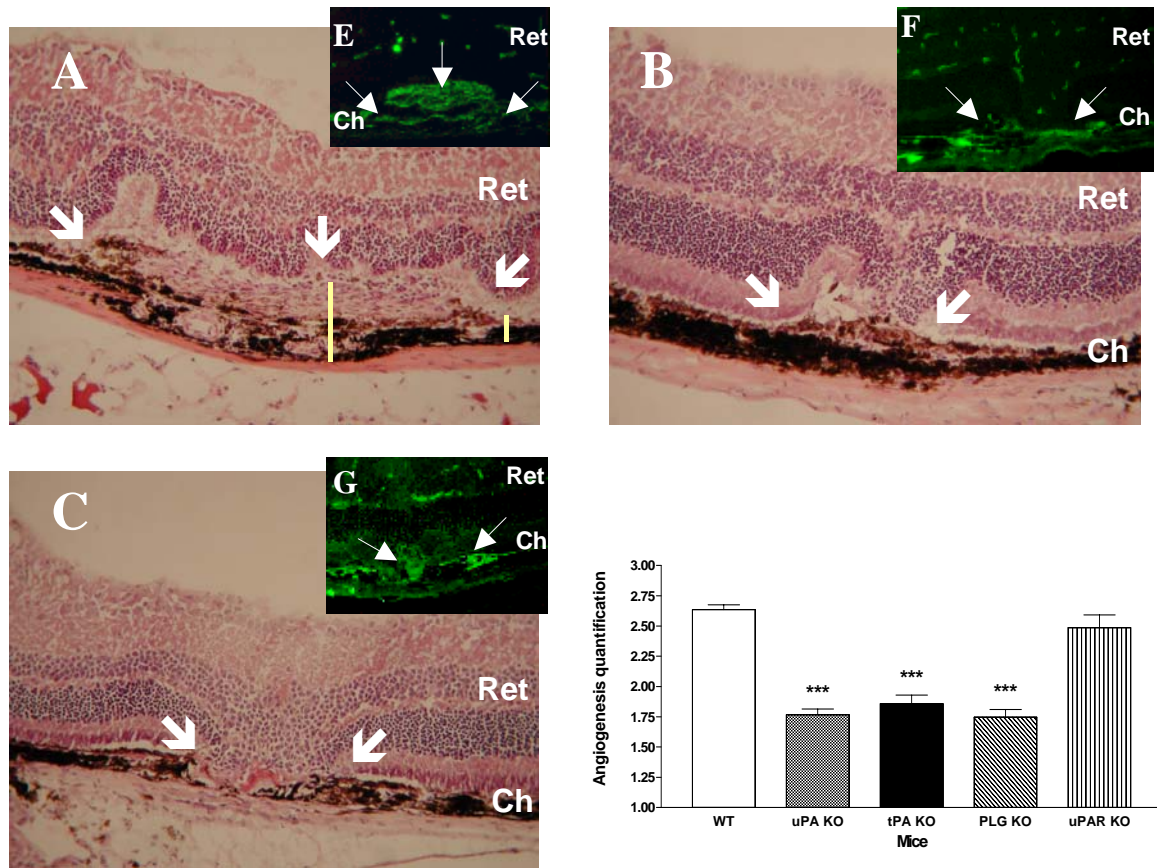


Figure 24 : Coloration hématoxyline-éosine des zones néovasculaires choroïdiennes induites par laser chez des souris déficientes pour l'uPAR (A), l'uPA (B) et le Plg (C). La néovascularisation est totalement absente chez les souris déficientes pour l'uPA (F) et le Plg (G) lorsqu'une immunolocalisation est réalisée à l'aide d'un anti-corps anti-PECAM en vert comparée aux souris contrôles (non illustré) ou aux souris déficientes pour l'uPAR (E). Ret : rétine ; Ch : Choroïde ; les flèches délimitent l'aire néovasculaire. La réaction néovasculaire a été estimée par la mesure du rapport B/C au jour 14 après induction laser (D) sur des souris sauvages et déficientes pour un gène. *** $p < 0,001$; barres d'erreur = erreur standard. Grossissement de travail 200X (A-C) et 400X (E-F).

comme nous le verrons plus tard est exprimée de façon constitutive dans l'œil, a été détectée dans tous les extraits tissulaires (fig. 25). L'activité de la MMP-9, par contre, n'est pas apparente dans les yeux intacts, contrairement aux yeux traités dans lesquels une forte activité est décelée. Quoi qu'il en soit, l'activité de la MMP-9 semble diminuer et celle de la MMP-2 augmenter chez les souris déficientes pour les activateurs du plasminogène ou déficientes pour le plasminogène comparées aux souris sauvages contrôles.

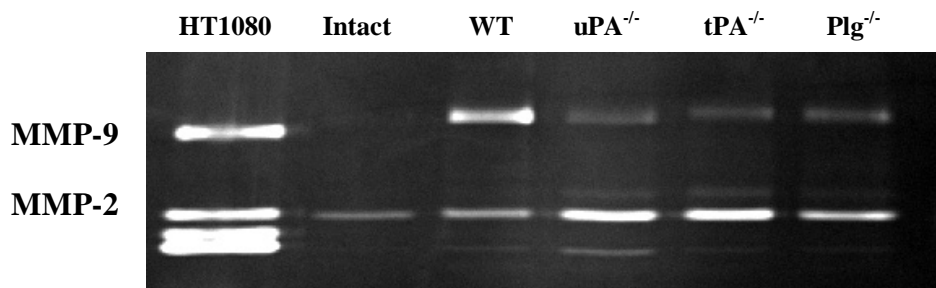


Figure 25 : Analyse zymographique sur gel de la MMP-2 et de la MMP-9 sur des souris sauvages et déficientes pour le plasminogène et les activateurs du plasminogène. Les tissus sont extraits depuis le pôle postérieur d'yeux possédant une néovascularisation induite par laser ou bien intacts. Comme contrôle positif, du milieu conditionné de cellules d'HT1080 humaines a été inséré. Tous les puits ont été chargés avec la même quantité de matériel (5 ng de protéines).

5.2.3.5 Dépôt de fibrinogène/fibrine chez les souris $uPA^{-/-}$, $tPA^{-/-}$ et $Plg^{-/-}$

Les souris présentant une simple déficience en uPA ou en tPA sont susceptibles de thrombose après provocation d'un trauma ou d'une réaction inflammatoire. Il a été démontré que le fibrinogène est le responsable de ce phénotype chez les souris $Plg^{-/-}$ [Bugge et al., 1996]. Afin d'étudier la responsabilité d'un excès de fibrinogène dans la diminution de la néovascularisation choroïdienne, des immunohistochimies fibrinogène/fibrine ont été réalisées au jour 3 après induction laser sur des souris déficientes pour les activateurs du plasminogène et pour le plasminogène (fig. 26 A-D). Les souris sauvages montrent une présence modeste de fibrinogène/fibrine aux alentours du bourgeon néovasculaire induit. Les souris $uPA^{-/-}$, $tPA^{-/-}$ et $Plg^{-/-}$, quant à elles, présentent une accumulation massive de fibrinogène/fibrine dans les vaisseaux rétiniens et à la base du trauma induit par laser agissant tel un bouchon.

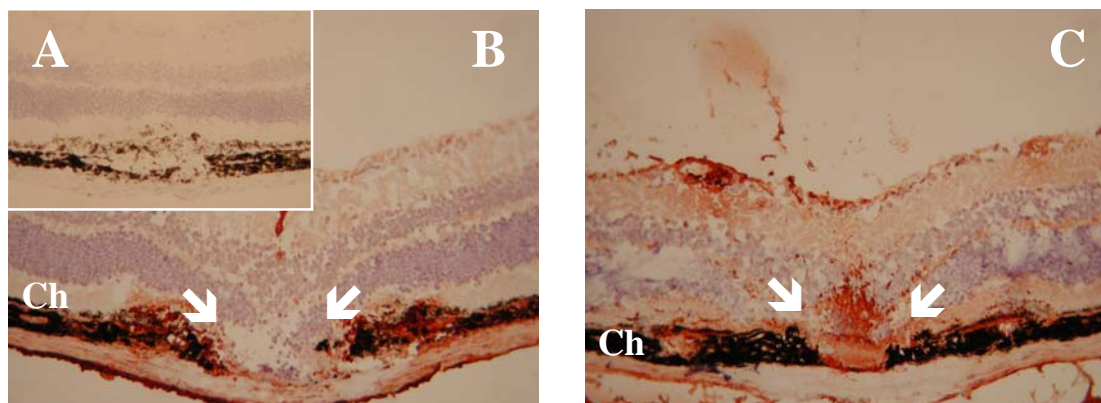


Figure 26 : Coloration immunohistochimique fibrinogène/fibrine de trauma induit par laser sur des coupes froides oculaires de souris sauvages (B), uPA^{-/-} (C), tPA^{-/-} (D) et Plg^{-/-} (E) révèlent la présence de quantité limitée de fibrine chez les souris sauvages comparée avec l'accumulation massive de fibrine chez les souris déficientes pour le plasminogène et les activateurs du plasminogène à l'endroit du trauma choroïdien et des vaisseaux rétiniens. Le contrôle négatif est en A. grossissement de travail 200X.

5.2.4 Discussion

Nos données montrent pour la première fois l'expression des ARN messagers du tPA, de l'uPA et de l'uPAR aussi bien dans les membranes néovasculaires humaines extraites chirurgicalement que dans les membranes néovasculaires murines expérimentales. Ceci suggère, mais ne prouve pas définitivement, que ces molécules sont impliquées dans le processus de néovascularisation humaine, d'autant plus qu'une expression basale de ces molécules est aussi présente dans l'œil intact, plus principalement dans le complexe formé par l'épithélium pigmentaire et la choroïde. Ces observations étendues à la souris par immunolocalisation et zymographie *in situ*, montrent une activité des activateurs du plasminogène sur le site du trauma induit par laser. Nous avons dès lors recherché l'influence de l'absence des acteurs du système plasminogène/activateurs du plasminogène sur le développement expérimental de la néovascularisation choroïdienne.

Les souris sauvages contrôles et déficientes pour l'uPAR montrent une réponse angiogénique forte. Il n'y a pas de développement conséquent de la néovascularisation expérimentale chez les souris déficientes pour l'uPA, pour le tPA et le Plg, suggérant une contribution de ces protéases dans l'altération chorio-rétinienne. En effet, il a été démontré que la choroïde intacte est une source de sécrétion continue de tPA [Wang et al., 1995], et l'épithélium pigmentaire une source pour l'uPA [Hackett and Campochiaro, 1993]. L'activité urokinase est augmentée dans la néovascularisation rétinienne expérimentale et dans les membranes néovasculaires diabétiques [Das et al., 1999a; Das et al., 1999b]. Un taux intra-oculaire élevé de tPA a été associé avec la rétinopathie diabétique proliférative [Hattenbach et al., 1999] et des

observations préliminaires ont suggéré qu'une inhibition de l'uPA peut prévenir la néovascularisation rétinienne induite par hypoxie (Mcguire PG, Jones TR, Talaric N, Warren E, Das A, ARVO Abstract 1261, 2002). L'absence d'effet secondaire de la déficience en uPAR pourrait être expliquée par le fait que la liaison de l'uPA sur l'uPAR n'est pas requise pour fournir une protéolyse péri-cellulaire suffisante de la plasmine médiée par l'uPA [Carmeliet et al., 1998].

Le phénotype observé chez les souris $uPA^{-/-}$, $tPA^{-/-}$ et $Plg^{-/-}$ ne peut être imputé directement à une déficience au niveau endothélial. En effet, premièrement, la néovascularisation choroïdienne n'est pas une maladie exclusivement causée par la prolifération de cellules endothéliales pathologiques isolées. Des données cliniques [Grossniklaus et al., 2000] et expérimentales comme nous le montrerons dans l'article 4 suivant, ont montré la présence d'une composante inflammatoire importante dans la maladie suggérant que la néovascularisation choroïdienne est une réponse non-spécifique de cicatrisation [Spraul et al., 1999]. Deuxièmement, des études précédentes ont montré que la migration des cellules endothéliales dans un gel de fibrine n'est pas sévèrement altérée par la déficience isolée d'un composant du système plasminogène/activateurs du plasminogène, mais que la MT1-MMP active est essentielle [Hiraoka et al., 1998]. Le fait que la déficience en uPA et en tPA endogènes n'altère pas la migration des cellules endothéliales a été confirmée dans un modèle d'anneaux d'aorte [Devy et al., 2002] et dans un modèle d'angiogenèse tumorale induite par l'implantation de kératinocytes malins [Bajou et al., 2001]. Pourtant, l'angiogenèse dans ces deux modèles est toujours dépendante de la présence de plasminogène, indiquant que la protéolyse médiée par la plasmine est un événement clé à prendre en compte lors de la mise au point d'expériences particulières.

Récemment, un rôle critique pour le tPA pendant l'invasion et l'angiogenèse de cellules tumorales pancréatiques a été suggéré [Diaz et al., 2002]. De plus, la présence de l'uPA et du Plg est essentielle pour l'angiogenèse capillaire durant la revascularisation due à un infarctus [Heymans et al., 1999]. Ce phénotype particulier est partiellement expliqué par le défaut d'activation de la MMP-9 du cœur ayant subi un infarctus secondaire à l'absence de l'uPA et de la plasmine. Dans notre modèle, la MMP-9 semble diminuer tandis que la MMP-2 semble augmenter lorsque que le plasminogène ou les activateurs du plasminogène sont déficients. L'ensemble de ces données soutient l'idée que le besoin des activateurs du plasminogène durant l'angiogenèse pourrait être modulé par la composition de la matrice extra-cellulaire ou

par le profil d'expression des protéinases dans les différentes situations physiologiques ou pathologiques.

Dans cette étude, en absence d'uPA, de tPA ou de Plg, une accumulation excessive de fibrinogène/fibrine prend place au niveau du trauma induit par laser, en même temps que la présence d'une activité de type MMP. Ce dépôt de fibrine peut agir comme une barrière physique pour certains composants de la néovascularisation normale tels que les cellules endothéliales, les fibroblastes ou les monocytes. Ce bouchon ne peut être éliminé à temps sans fibrinolyse médiée par la plasmine. L'ensemble de ces données suggère que dans la choroïde, le programme angiogénique est plus dépendant de l'axe plasminogène/activateurs du plasminogène que de la fibrinolyse dirigée par les MMPs.

Les capillaires choroïdiens formant des membranes néovasculaires pathologiques apparaissent extrêmement sensibles aux variations de l'équilibre protéolytique sous la conduite des activateurs du plasminogène. L'excès de fibrinolyse, comme chez les souris PAI-1^{-/-}, ou le défaut de fibrinolyse, comme chez les souris déficientes pour le plasminogène ou les activateurs du plasminogène, peuvent tous deux prévenir le développement néovasculaire, et peuvent être proposés, à condition d'un contrôle approprié, comme une stratégie anti-angiogénique pharmacologique.

5.3 Article 3: Dose-dependent modulation of choroidal neovascularization by plasminogen activator inhibitor type I: implications for clinical trials

V. Lambert, C. Munaut, P. Carmeliet, R. D. Gerard, P. J. Declerck, A. Gils, C. Claes, J. M. Foidart, A. Noel, and J. M. Rakic.

Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 44 (6):2791-2797, 2003.

5.3.1 Introduction

Certains résultats expérimentaux montrent un effet inhibiteur de l'angiogenèse avec de haut taux de PAI-1, ce qui semble paradoxal. Ainsi, des cellules tumorales transfectées par de l'ADNc de PAI-1 engendrent une diminution de la croissance des tumeurs primaires et de l'angiogenèse associée aux tumeurs [Soff et al., 1995]. L'effet inhibiteur des stéroïdes angiostatiques sur la néovascularisation a été attribué à une diminution de l'expression de l'uPA et une augmentation de l'expression du PAI-1 [Penn et al., 2001; Blei et al., 1993; DeFaller and Clark, 2000]. Un de ces composés, l'anécortave d'acétate, diminue la néovascularisation choroïdienne humaine et est testé en phase clinique II et III impliquant des centaines de patients [D'Amico et al., 2003b]. Curieusement, de faibles doses (15 mg en intra-oculaire) semblent efficaces alors que de plus fortes doses (30 mg injecté) sont inefficaces [Soubrane et al., 2002]. Une courbe dose-réponse biphasique de PAI-1 a été observée dans des modèles *in vitro* (anneaux d'aortes) et *in vivo* (matrigel dans le CAM assay) [Devy et al., 2002; Stefansson et al., 2001; McMahon et al., 2001].

Une explication de ces résultats conflictuels est que le PAI-1 pourrait avoir un rôle pro- ou anti-angiogène en fonction de sa concentration. La vérification de cette hypothèse a fait l'objet de cette étude.

5.3.2 Matériel et méthodes

Les animaux PAI-1^{-/-} et PAI sauvages ont été décrits dans la section qui précède, de même que la méthode de quantification, les méthodes statistiques, l'analyse angiographique, et les techniques de mise en évidence par immunohistochimie des néovaisseaux.

5.3.2.1 Analyse par RT-PCR de l'expression de PAI-1 dans les membranes néovasculaires

Les membranes choroïdiennes humaines ont été extraites chez des patients au cours d'interventions chirurgicales de translocation maculaire (Dr C. Claes, Middelheim, Antwerpen). Ces membranes sont, dès leur extraction, immergées dans de l'azote liquide et conservées à -80°C.

Pour caractériser l'expression temporelle de PAI-1, nous avons sacrifié des animaux respectivement aux J3, J5, J14 et J40 après induction par laser. Pour déterminer l'expression spatiale de PAI-1, nous avons utilisé la technique de microdissection par laser ("Laser Pressure Catapulting"- LPC) qui permet d'extraire, à partir de sections histologiques montées sur des membranes de polyéthylène, les zones à analyser par RT-PCR [Emmert-Buck et al., 1996;Bohm et al., 1997]. Après extraction de la région envahie par le processus néovasculaire, une zone saine adjacente de même volume est également retirée comme contrôle.

La technique de RT-PCR est semblable à celle exposée plus haut. Soulignons simplement, en raison d'une quantité moindre de matériel, le nombre accru de cycles d'amplification pour l'analyse des échantillons provenant du LPC (45 cycles pour PAI-1 et 33 cycles pour le 28S ribosomal).

5.3.2.2 Injection de protéines recombinantes et de leurs variants mutés

Les souris déficientes et contrôles ont subi, à partir du moment de l'induction par laser de la réponse néovasculaire, une injection intra-péritonéale quotidienne de 10 ou 100µg de protéines recombinantes.

Ces protéines ont été produites et caractérisées par l'équipe de Declerck [Gils et al., 1996;Nar et al., 2000].

Le variant PAI-1-stab possède une demi-vie nettement accrue par rapport à la protéine non modifiée (~150 h).

PAI-1-stab-Q123K fait référence au mutant ayant une interaction beaucoup moins efficace avec la vitronectine (réaction 40X plus lente). Pour information, le chiffre et les lettres indiquent la position et l'acide aminé substitué (fig. 27 B).

5.3.2.3 *Injection d'adénovirus recombinants*

Dans une deuxième série d'expériences et dans le but de vérifier les résultats obtenus avec les protéines recombinantes administrées par voie générale, nous avons injecté les animaux avec des adénovirus recombinants porteurs du DNA de PAI-1 intact (AdCMVPAI-1) ou muté dans le but de produire les protéines qui viennent d'être décrites (AdCMVPAI-1^{Q123K}). Ces virus recombinants proviennent de l'équipe de Gerard [Gerard and Meidell, 1995; Shubeita et al., 1990].

Les souris ont été injectées en intra-veineuse au J1 après induction de la réaction néovasculaire, soit avec les virus recombinants qui viennent d'être décrits, soit avec un virus contrôle (AdRR5) ou un virus permettant indirectement la localisation de l'expression d'ADN recombinant (AdCMVlacZ).

5.3.3 Résultats

5.3.3.1 *Profil d'expression de PAI-1 dans les membranes néovasculaires*

L'ARN du PAI-1 a été détecté par RT-PCR dans toutes membranes néovasculaires humaines obtenues après chirurgie (voir exemple fig. 27 A). Afin d'évaluer la répartition spatiale de l'expression du PAI-1 au sein des membranes néovasculaires et dans la rétine adjacente, de façon distincte, nous avons eu recours à la microdissection laser (LPC pour Laser Pressure Catapulting) sur des coupes froides sériées d'yeux de souris. Cette technique nous a permis de mettre en évidence à tous les temps (jour 3, 5, 14 et 40) chez des souris sauvages, la présence de l'ARN messager de PAI-1 uniquement dans les membranes néovasculaires. Le PAI-1 est absent à tous les temps de la rétine intacte adjacente (fig. 27 B). Afin de définir le profil d'expression du PAI-1 en fonction du temps, nous avons eu recours à une analyse par RT-PCR semi-quantitative (normalisée par rapport au 28S ribosomal) réalisées sur des membranes néovasculaires murines induites par laser à différents temps (du jour 3 au jour 40 après induction). L'induction de l'ARN messager de PAI-1 est conséquente durant le développement néovasculaire (fig. 27 C et D), avec un retour au niveau basal après 10 jours, ce qui correspond à la période de stabilisation du bourgeon néovasculaire.

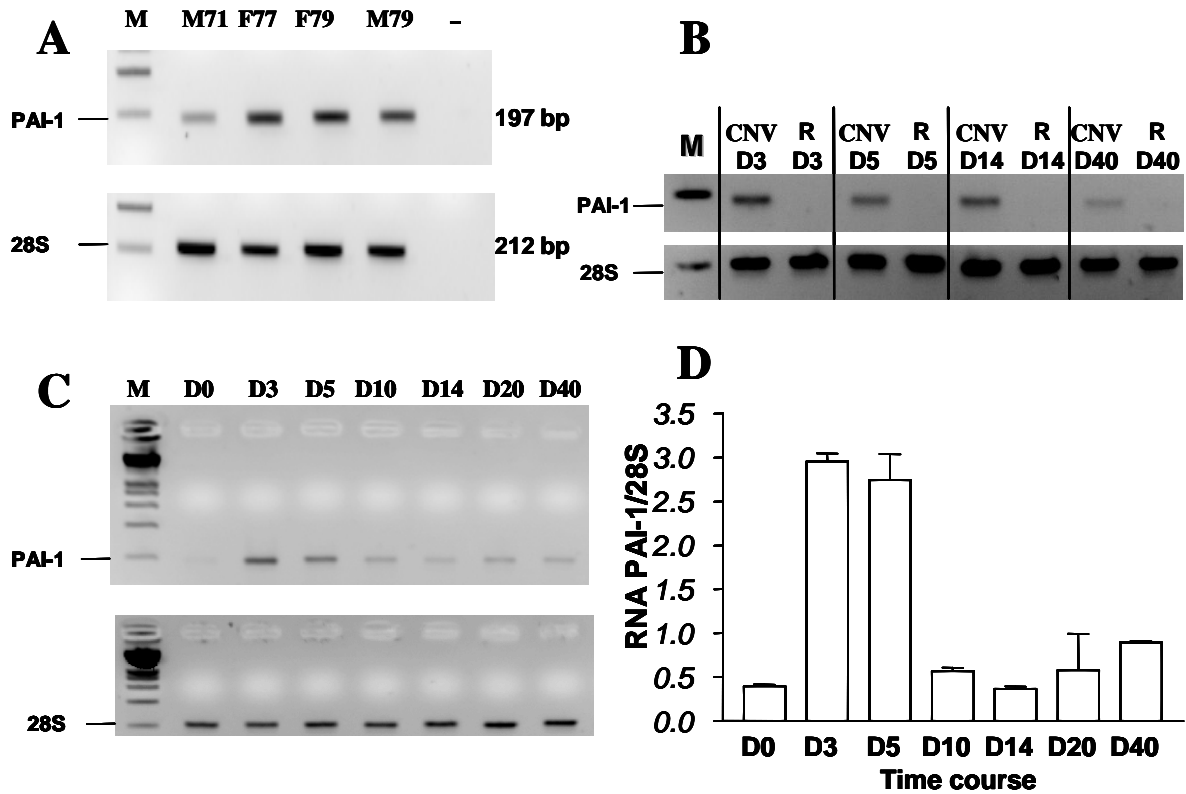


Figure 27: A) RT-PCR de PAI-1 et du 28S ribosomal réalisées sur des prélèvements de membranes néovasculaires humaines. La lettre correspond au genre du patient (M : homme ; F : femme) et le nombre son âge. B) RT-PCR sur produit de microdissection laser chez des souris sauvages à différents temps. CNV : membrane néovasculaire ; R : rétine intacte ; D3-5-14 et 40 pour jour 3, 5, 14 et 40. C) gel représentatif et histogramme densitométrique (D) correspondant à la quantification de l'ARN messager de PAI-1 normalisé par rapport au signal du 28S réalisé à différents temps du développement néovasculaire. Cette évaluation a été réalisées sur les pôles postérieurs entiers après induction d'impacts multiples sur la membrane de Bruch. L'ARNr 28S est utilisé afin d'évaluer la quantité d'ARN total chargé. Les tailles attendues des produits de RT-PCR sont de 197 pb pour le PAI-1 et de 212 pb pour le 28S.

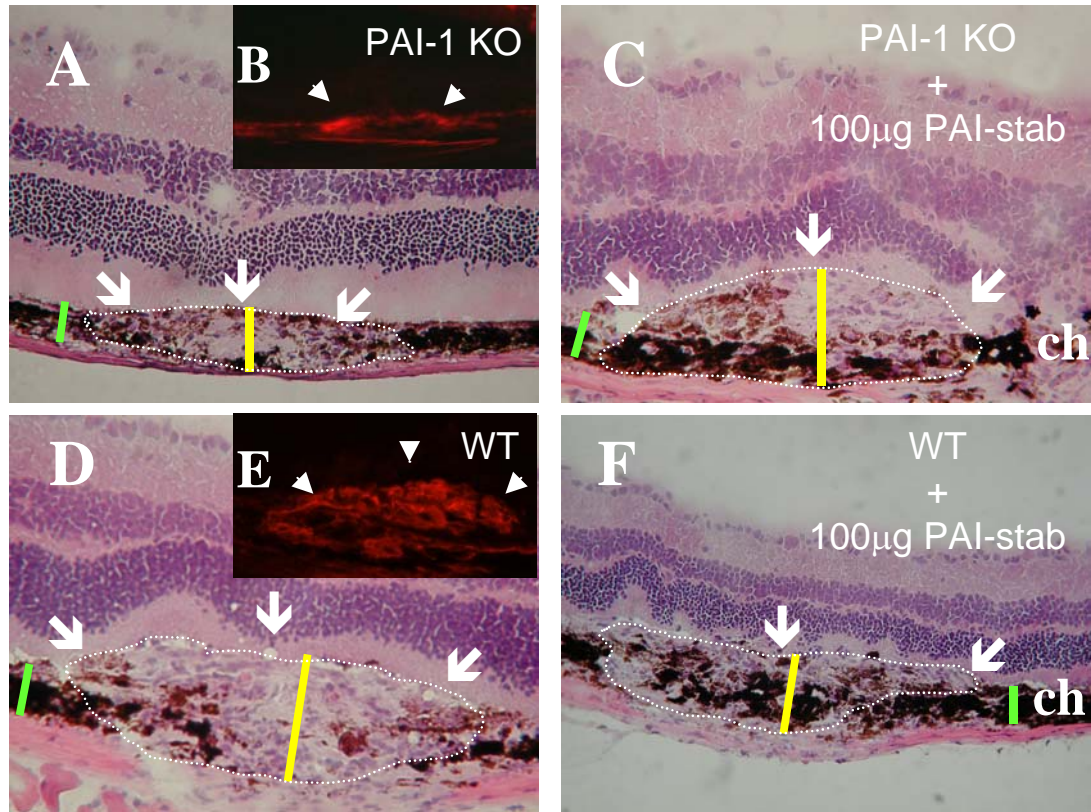


Figure 28: Effet dose-réponse du PAI-1 sur la néovascularisation choroïdienne. Analyses histologiques et immunofluorescences en rouge avec un anticorps anti-CD31 (B et E) chez des souris PAI-1^{-/-} et des souris sauvages traitées avec de hautes doses de PAI-1 ou traitées avec le véhicule seul (A-F). Coloration hématoxyline-éosine de la zone représentative de néovascularisation réduite réalisée sur une souris PAI-1^{-/-} traitée avec le véhicule seul (A) et d'une néovascularisation restaurée grâce à l'injection de 100µg/jour/souris de protéine PAI-1 recombinante stable chez ces mêmes souris (C). Par contre la néovascularisation est réduite chez les souris sauvages traitées par 100 µg/jour/souris de protéine PAI-1 recombinante (F) comparée à celle de ces mêmes souris traitées avec le véhicule seul (D). Estimation de la néovascularisation par le rapport B/C. Ch : choroïde ; les flèches délimitent la zone de néovascularisation ; les barres jaunes correspondent à la mesure du B et les barres vertes à la mesure du C utilisées pour le calcul du rapport B/C. Le grossissement de travail est de 400X.

5.3.3.2 Effet dose-dépendant du PAI-1 recombinant sur la néovascularisation

La néovascularisation est estimée par la mesure du rapport B/C, comme décrite dans l'article 1, et par immunomarquage à l'aide d'anticorps anti-CD31. La néovascularisation à l'endroit de l'impact laser est très réduite, ce qui est attendu au vu des résultats du chapitre I, ou absente chez les souris déficientes pour le PAI-1 (fig. 28 A), mais augmente suite à des injections quotidiennes de 10 μg (non illustré) et 100 μg de protéine recombinante de PAI-1 (fig. 28 C). L'effet opposé a été observé lors des injections quotidiennes chez les souris sauvages (fig. 28 D) avec les hautes doses de PAI-1 recombinant (fig. 28 F). Un effet dose-réponse a été mesuré avec les concentrations croissantes de PAI-1 recombinant actif (PAI-stab, 10 ou 100 $\mu\text{g}/\text{jour}/\text{souris}$) chez les souris déficientes pour le PAI-1 (fig. 29 G). Chez les souris sauvages, une réduction d'environ 35% du rapport B/C a été observée suite au traitement par les hautes doses de PAI-1 recombinant ($p < 0,0001$) comparée à l'utilisation du placebo (véhicule seul).

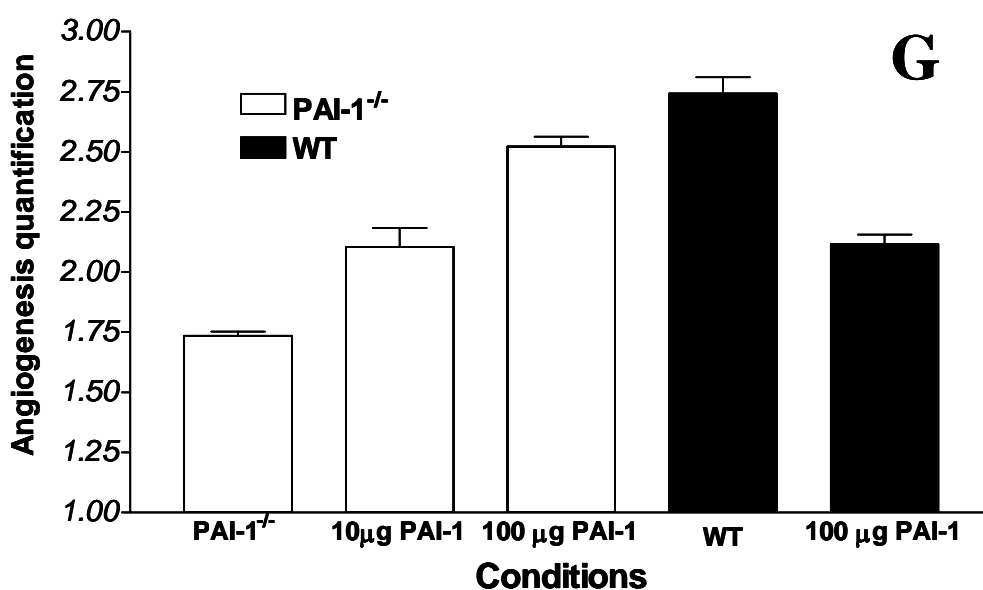


Figure 29: Estimation de la néovascularisation par le rapport B/C (G) avec les barres d'erreurs et mise en évidence de l'effet dose de PAI-1.

5.3.3.3 Mécanismes par lesquels PAI-1 conduit l'angiogenèse choroïdienne

Afin d'étudier l'influence d'un des deux mécanismes d'action de PAI-1, en l'occurrence son effet sur la migration oculaire au travers de sa capacité de fixation sur la vitronectine, des souris déficientes pour le PAI-1 ont été injectées quotidiennement par 100 μg de PAI-1-stab-

Q123K ou par une injection intraveineuse d'AdCMVPAI-1^{Q123K} un jour après l'induction laser. Les contrôles négatifs sont les souris PAI-1^{-/-} traitées avec le véhicule seul ou avec l'adénovirus AdRR5 et les contrôles positifs sont les souris PAI-1^{-/-} dans le phénotype est restauré par l'injection de 100 µg de protéine PAI-1 recombinante stabilisée ou injectées par l'adénovirus AdCMVPAI-1. Une injection quotidienne de protéine PAI-1-stab-Q123K restaure totalement le phénotype néovasculaire comme observé chez les souris traitées avec la protéine PAI-1-stab (p= 0,73, fig. 30 A). La construction adénovirale possédant une affinité moindre pour la vitronectine, restaure également le phénotype observé chez les souris PAI-1^{-/-} infectées avec AdCMVPAI-1 (p= 0,03, Fig 30 B)

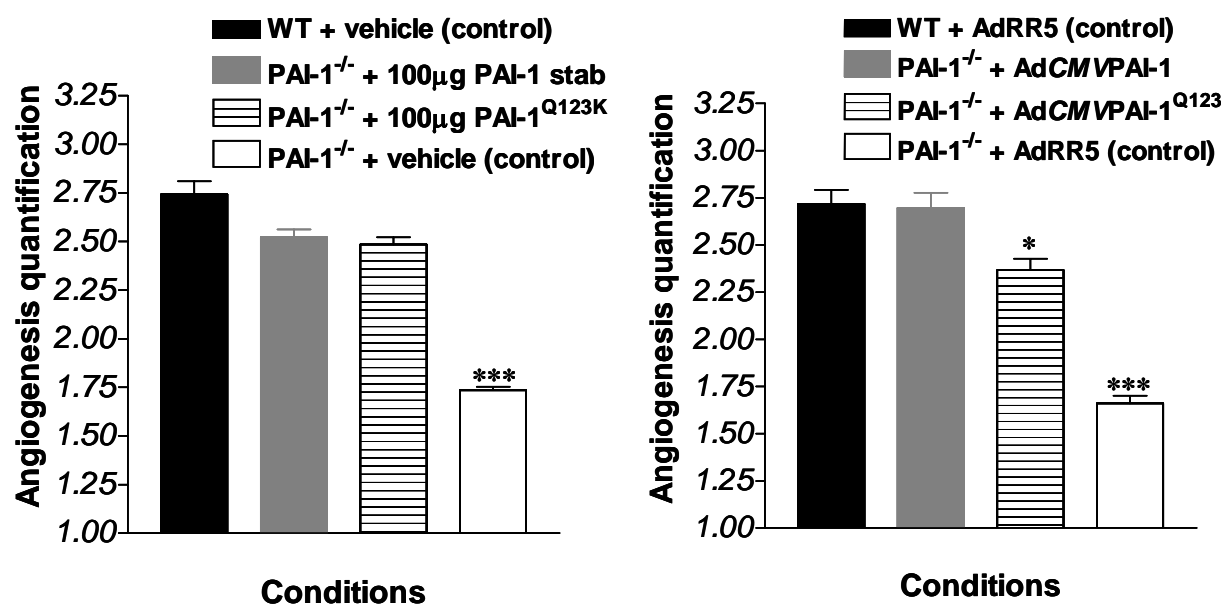


Figure 30 : L'injection de PAI-1 recombinant, déficient pour la liaison sur la vitronectine, restaure le phénotype angiogénique. En A les souris PAI-1^{-/-} sont injectées avec de la protéine PAI-1 mutée (injection quotidienne de 100 µg de PAI-1-stab-Q123K) ou en B infectées par un adénovirus vecteur du gène du PAI-1 humain muté (injection simple en intraveineuse d'AdCMVPAI-1^{Q123K}, un jour après induction laser). Les contrôles négatifs sont les souris PAI-1^{-/-} traitées avec le véhicule seul ou avec l'adénovirus AdRR5. Les contrôles positifs sont les souris PAI-1^{-/-} dont le phénotype est restauré par l'injection de 100 µg de protéine PAI-1 recombinante stabilisée ou injectées par l'adénovirus AdCMVPAI-1. La quantification est réalisée sur base du calcul du rapport B/C. Les protéines mutantes déficientes pour la liaison à la vitronectine restaurent un rapport B/C égal (p=0,73 en A) ou très similaire (p=0,03 en B) aux résultats obtenus avec les protéines de PAI-1 intactes.

Ceci suggère que l'autre mécanisme d'action, c'est-à-dire le contrôle de la protéolyse, joue un rôle majeur. Effectivement, si on évalue l'activité protéolytique indirectement par immunomarquage fibrinogène/fibrine, on constate que l'absence complète de ce marquage est évidente chez les souris PAI-1^{-/-}, ce qui correspondrait à une activité protéolytique intense. Ce constat est plausible au vu d'une activité fibrinolytique excessive due au défaut d'inhibition de l'uPA et du tPA (fig. 31 A). La coloration fibrinogène/fibrine est présente normalement

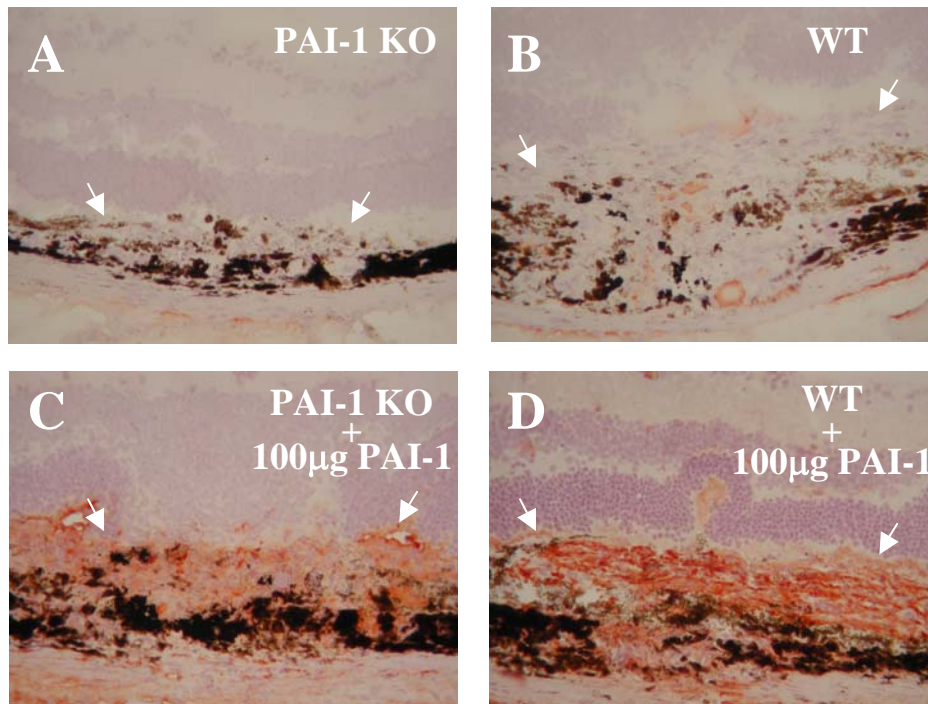


Figure 31 :Immunolocalisation du Fibrinogène/fibrine dans les zones de néovascularisation induites par laser. La comparaison des souris PAI-1^{-/-} (A) et sauvages (B) avec des animaux traités par 100µg de protéine PAI-1 recombinante (C et D), révèle l'absence de fibrine (coloration AEC+) chez les PAI-1^{-/-} et une quantité limitée chez les souris sauvages, contrastant avec l'accumulation massive de fibrine chez les animaux traités avec des hautes doses de protéines de PAI-1 recombinantes. Grossissement de travail 400X.

dans les souris contrôles (fig. 31 B), tandis qu'une accumulation massive de fibrinogène/fibrine est présente aussi bien dans les souris sauvages que PAI-1^{-/-} injectées avec des hautes doses de protéine PAI-1 recombinante, démontrant une inhibition sévère du système activateur du plasminogène (fig. 31 C et D).

5.3.4 Discussion

Le profil d'expression spatio-temporel de l'ARN messager de PAI-1 mis en évidence dans ce travail est en accord avec les observations précédentes démontrant une induction de l'expression de PAI-1 dans les cellules endothéliales en migration, une expression limitée à l'épithélium ciliaire dans les yeux intacts de rongeurs et avec nos résultats précédents d'immunolocalisation de PAI-1 dans les bourgeons néovasculaires choroïdiens [Lambert et al., 2001; Pepper et al., 1992; Masos et al., 2000].

L'expression consistante de PAI-1 dans les membranes néovasculaires humaines tendrait à soutenir le rôle joué par PAI-1 pendant la progression de la forme exsudative de la DMLA. Cliniquement, un taux élevé de PAI-1 a été mis en évidence dans les rétinopathies diabétiques humaines, alors que des taux minimums sont observés dans les rétines normales [Grant et al., 1996]. L'âge peut également être un autre facteur de risque indépendant, non seulement pour la DMLA [Hyman and Neborsky, 2002], mais aussi dans le cadre de la néovascularisation choroïdienne expérimentale [Espinosa-Heidmann et al., 2002]. Une sur-expression de PAI-1 en relation avec l'âge a été reportée dans les cellules endothéliales vasculaires humaines [Comi et al., 1995] et dans les fibroblastes [Mu and Higgins, 1995] alors que d'autres serpinés comme le PEDF (pigment epithelium derived factor), qui sont de forts inhibiteurs de l'angiogenèse [Dawson et al., 1999], sont régulés négativement dans l'épithélium pigmentaire plus âgés [Tombran-Tink et al., 1995].

A notre connaissance, ce travail est le premier montrant un effet clair de l'effet dose-réponse de PAI-1 sur l'angiogenèse dans un modèle pathologique chorio-rétinien. En testant diverses concentrations de PAI-1 recombinants actifs en injections intra-péritonéales, nous avons fourni des preuves des effets opposés de PAI-1 pendant le développement néovasculaire choroïdien. PAI-1 a un comportement pro-angiogénique aux faibles concentrations et une action anti-angiogénique aux plus fortes concentrations. Ces affirmations sont étayées par les observations suivantes :

- Le développement néovasculaire choroïdien est inhibé chez les souris PAI-1^{-/-} [Lambert et al., 2001].
- La formation du bourgeon néovasculaire est restaurée chez les souris PAI-1^{-/-} par l'injection de protéine PAI-1 recombinante, et la restauration est proportionnelle à la dose injectée.
- L'injection de fortes doses de PAI-1 recombinant (100 µg/jour) aux souris sauvages inhibe significativement le développement néovasculaire.

Ces données sont en parfait accord avec celles obtenues sur le modèle des anneaux aortiques montrant l'effet pro-angiogénique de PAI-1 aux concentrations physiologiques (de l'ordre du nanomolaire) et son effet anti-angiogénique aux plus fortes concentrations [Devy et al., 2002; Bajou et al., 2004]. La co-localisation de l'uPA et du PAI-1 dans les cellules endothéliales migrantes [Pepper et al., 1992] et dans les cellules tumorales [Liu et al., 1995] met en évidence l'importance de la production simultanée des protéases et de leurs inhibiteurs, et conduit au concept de « balance protéolytique ». En protégeant la matrice extracellulaire d'une dégradation excessive, le PAI-1 peut stabiliser l'échafaudage matriciel nécessaire à la migration des cellules endothéliales et à l'assemblage coordonné de ces cellules en capillaires [Pepper and Montesano, 1990]. En association avec les autres glycoprotéines adhésives, les dépôts de fibrinogène/fibrine servent d'échafaudage afin d'aider au maintien des liaisons avec les facteurs de croissance. Ces dépôts aident également la réponse cellulaire pour l'adhésion, la prolifération et la migration pendant l'angiogenèse [Simpson-Haidaris and Rybarczyk, 2001]. Les intenses modulations dans les dépôts de fibrinogène/fibrine induites par les variations du taux de PAI-1 ont été démontrées par immunolocalisation dans notre modèle de néovascularisation expérimentale.

Afin de faire la part entre l'activité inhibitrice des protéases et l'activité de liaison à la vitronectine de PAI-1 impliquées dans la migration cellulaire [Waltz et al., 1997; Stefansson and Lawrence, 1996], nous avons injecté des souris PAI-1^{-/-} avec des protéines recombinantes mutées de PAI-1 (PAI-1-stab-Q123K) déficientes pour la liaison à la vitronectine ou avec des adénovirus exprimant ce même mutant (AdCMVPAI-1^{Q123K}). Les deux formes mutées, injectées ou exprimées de façon endogène par les adénovirus, restaurent l'une comme l'autre la réaction pathologique choroïdienne, suggérant que l'inhibition des activateurs du plasminogène par le PAI-1 est probablement le mécanisme d'action majeur impliqué dans la promotion de l'angiogenèse dans notre modèle.

Nos résultats peuvent ainsi expliquer, au moins en partie, l'efficacité dose-dépendante de certains médicaments tel que l'anécortave acétate, déjà testé en phase clinique contre la forme exsudative de la DMLA. L'augmentation du dosage de cet agent permet une augmentation locale de l'expression de PAI-1 sans toutefois atteindre les taux suffisamment élevés que pour inhiber l'angiogenèse. Il est donc logique d'observer que des plus hautes doses d'anécortave (30mg) sont moins efficaces comparées à l'utilisation du placebo ou à des doses plus basses [Soubrane et al., 2002].

L'existence d'une courbe biphasique dose-réponse met, de façon plus générale, en garde contre les stratégies pharmacologiques incontrôlées dans lesquelles les agonistes et les antagonistes de PAI-1 sont utilisés pour l'inhibition de la néovascularisation [Calabrese, 2001].

6 Chapitre 2: Rôle des Métalloprotéinases dans la Néovascularisation Choroïdienne

6.1 Article 4: *Matrix metalloproteinase-9 contributes to choroidal neovascularization*

V. Lambert, C. Munaut, M. Jost, A. Noel, Z. Werb, J. M. Foidart, and J. M. Rakic.

Am.J.Pathol. 161 (4):1247-1253, 2002.

6.1.1 Introduction

Le rôle précis et spécifique des MMPs et de leurs inhibiteurs dans les pathologies oculaires reste encore à élucider. Une mutation du gène du TIMP-3 provoque l'apparition d'une forme rare de dystrophie maculaire familiale associée avec une néovascularisation sous-rétinienne [Weber et al., 1994]. Le TIMP-3 est exprimé par l'épithélium pigmentaire humain, et son accumulation est associée à des changements de la rétine dans la dégénérescence maculaire [Ruiz et al., 1996; Kamei and Hollyfield, 1999].

La MMP-2 et la MMP-9, appelées aussi gélatinases A et B, sont d'un intérêt particulier. En effet, leurs substrats spécifiques incluent le collagène de type IV, qui peut être dégradé afin de faciliter la migration des cellules endothéliales. Ces deux MMPs présentent une augmentation de leur expression dans une variété de tumeurs et de situations pathologiques [Pepper, 2001]. L'expression de la MMP-2 et la MMP-9, a été démontrée dans les membranes néovasculaires choroïdiennes humaines [Steen et al., 1998]. Des études génétiques chez la souris ont montré que ces MMPs étaient nécessaires durant l'angiogenèse. La MMP-2 est impliquée dans le déclenchement angiogénique lors de la progression tumorale dans un modèle de transplant sous-cutané [Itoh et al., 1998], alors que la MMP-9 est nécessaire de façon spécifique dans un modèle murin de carcinogenèse des cellules β pancréatiques [Bergers et al., 2000]. Les effets des MMPs sont loin de se cantonner à la dégradation de la matrice extra-cellulaire [Chang and Werb, 2001]. Les facteurs de croissance peptidiques séquestrés au sein des protéines de la MEC sont rendus disponibles une fois que celle-ci est dégradée par la MMP-9 [Manes et al., 1999]. Les MMPs peuvent augmenter la biodisponibilité du VEGF [Bergers et al., 2000] mais aussi générer des inhibiteurs de l'angiogenèse tels que l'angiostatine par clivage du plasminogène [Dong et al., 1997]. Dans l'œil, des taux élevés de MMP-9 et de MMP-2 ont été mesurés dans le liquide vitréen et dans les membranes épi-rétiniennes extraites

chirurgicalement chez des patients atteints de rétinopathie diabétique proliférative [Das et al., 1999a; Kosano et al., 1999; Jin et al., 2001]. Les membranes néovasculaires humaines extraites chirurgicalement de patients souffrants de DMLA montrent aussi une forte expression de ces MMPs, suggérant qu'elles pourraient coopérer dans la progression de l'angiogenèse choroïdienne [Steen et al., 1998].

Dans cette étude, nous allons caractériser le profil d'expression spatio-temporel de la MMP-9 dans un modèle murin de néovascularisation choroïdienne induite au laser. Nous utiliserons différentes approches telles que l'immunohistochimie, l'utilisation de souris transgéniques exprimant le gène rapporteur de la β -galactosidase sous la dépendance du promoteur de la MMP-9, et des analyses par RT-PCR des structures néovasculaires choroïdiennes micro-disséquées au laser. Afin de définir la contribution relative de la MMP-9 dans le développement de l'angiogenèse choroïdienne, la néovascularisation sous-rétinienne chez des souris déficientes pour la MMP-9 sera comparée avec celle des souris sauvages.

6.1.2 Matériel et Méthodes

6.1.2.1 Animaux génétiquement modifiés

La construction de la lignée murine transgénique 7700ExIn-LacZ a déjà été décrite [Munaut et al., 1999]. Cette construction a pour avantage de lier l'activité du promoteur de MMP-9 à l'activité du gène de la β -galactosidase. Les cellules où ce gène est actif se colorent en bleu après incubation avec le substrat correspondant (X-gal), ce qui permet *in fine* de localiser les régions où le promoteur de MMP-9 est exprimé [Behringer et al., 1993]. Comme témoin positif, nous avons appliqué une brûlure thermique sur la surface de la cornée [Mohan et al., 1998].

Dans les expériences de quantification de la réponse néovasculaire sous-rétinienne, nous avons utilisé les souris déficientes pour la MMP-9 décrites par le groupe de Werb et les témoins appropriés [Vu et al., 1998].

6.1.2.2 Immunohistochimie

En plus des anticorps utilisés habituellement pour mettre en évidence les néovaisseaux (anti-CD31 et anti-collagène de type IV), nous avons utilisé des anticorps dirigés contre la gélatinase B murine, les polynucléaires neutrophiles (anticorps polyclonal de rat) et les monocytes (anti-CD11b)

6.1.2.3 RT-PCR des échantillons obtenus en microdissection

Les séquences d'oligonucléotides, le nombre de cycles et la taille attendue des produits de PCR figurent dans la publication 4.

6.1.3 Résultats

6.1.3.1 Induction et évolution de la MMP-9

Dans notre modèle de néovascularisation choroïdienne, une immunolocalisation montre la présence de la protéine de la MMP-9, en rouge, exclusivement sur le lieu de l'impact laser, au niveau de l'épithélium pigmentaire et de la choroïde, mais pas au niveau de la zone intacte adjacente (fig. 32 A). Une contre coloration à l'aide d'un anticorps anti-collagène IV en vert permet de mieux visualiser les structures. L'intensité du marquage est maximale au jour 3 (fig. 32 A), avant même l'apparition de nouveaux micro vaisseaux apparents.

Le marquage est déjà plus faible au jour 5 (fig. 32 B) et disparaît complètement plus tard. Aucun marquage de la MMP-9 n'a été mis en évidence dans les souris MMP-9^{-/-} (non illustré). Un contrôle positif réalisé par brûlure de la cornée est également maximal au jour 3 et est présent uniquement dans le stroma adjacent à la lésion (fig. 32 C) comme précédemment décrit [Mohan et al., 1998]. L'activité promotrice de la MMP-9, mise en évidence grâce au gène rapporteur de la β -galactosidase, est indétectable dans la rétine ou dans la cornée des yeux intacts. Dans les yeux traités, elle ne co-localise pas exactement avec la présence de la protéine de la MMP-9. Le produit de la réaction de la β -galactosidase n'est pas détecté avant le jour 5 (fig. 32 D) aussi bien dans la zone néovasculaire (fig. 32 E), que dans l'épithélium cornéen utilisé comme contrôle positif (fig. 32 F). Cette activité n'est détectée qu'occasionnellement après le jour 5. La coloration X-gal est localisée au front de migration et de croissance de la réaction néovasculaire au-delà du plan de l'épithélium pigmentaire. L'activité promotrice de la MMP-9 coïncide avec l'arrivée des premiers macrophages détectés par immunofluorescence (fig. 33 A-D). Les cellules polynucléaires sont absentes au jour 5 mais infiltrant la lésion à un stade plus précoce (fig. 33 E et F).

Les analyses réalisées par RT-PCR sur des membranes néovasculaires murines choroïdiennes, extraites par microdissection laser, à différents temps d'évolution de l'angiogenèse sous-rétinienne induite par laser, nous confirment l'expression de la MMP-9 uniquement au jour 5 et au sein de la membrane néovasculaire (fig. 34). Ces résultats coïncident avec ceux obtenus

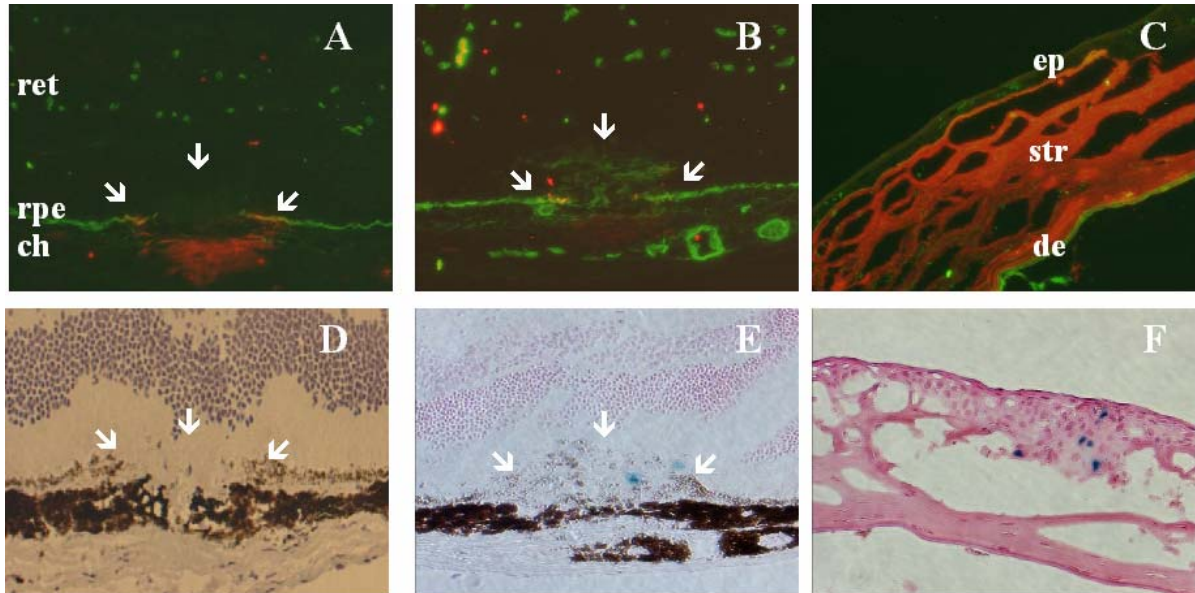


Figure 32 : Immunofluorescence de la protéine MMP-9, en rouge, et du collagène IV, en vert, (A-C), et expression de la β -galactosidase, en bleu, sous l'influence du promoteur de la MMP-9 (D-F) au jour 3 (A et D) et au jour 5 (B-C, E-F) sur le site de néovascularisation induite par laser (A-B, D-E) et après brûlure de la cornée utilisée comme contrôle positif (C et F). Les flèches blanches délimitent la zone de l'impact laser ; ret : rétine ; rpe ; épithélium pigmentaire ; ch :couche choroïdienne ; ep :épithélium cornéen ; str :stroma cornéen ;de :membrane de Descemet. Grossissement de travail 100X.

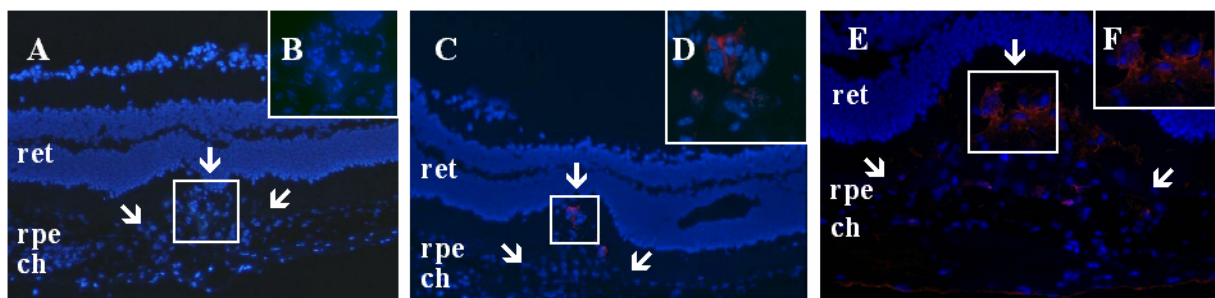


Figure 33 : Immunofluorescence des cellules mononucléaires (A-D) et polynucléaires (E-F) inflammatoires durant le développement néovasculaire induit. L'immunomarquage anti-Mac-1, en rouge, sur coupes froides contre-colorées au bis-benzimide est absent au jour 3 (A-B) et apparaît au jour 5 (C-D) au sein de l'impact laser. Les neutrophiles, en rouge, sont présents dès le jour 3 (E-F) au sein de l'impact mais disparaissent au jour 5 (non illustré). Les flèches blanches délimitent l'impact laser. Grossissement de travail A, C 100X ; B, D, E 400X et F 360 X.

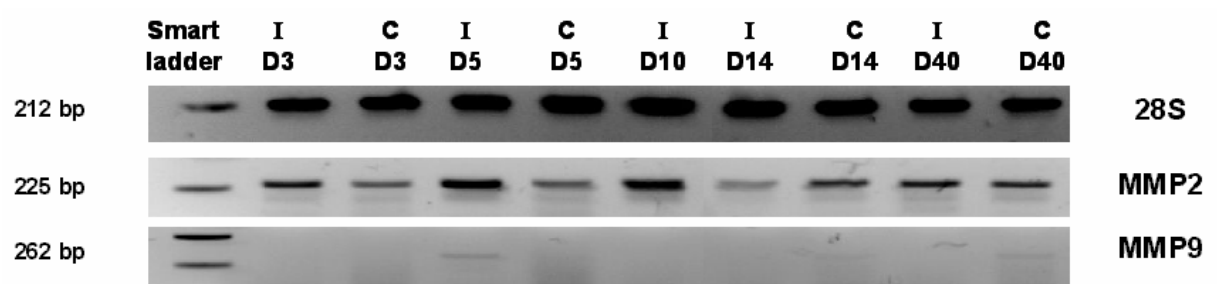


Figure 34 : RT-PCR sur gel d'agarose à partir de membranes néovasculaires extraites par LPC montrant l'évolution du profil d'expression de MMP-2 et MMP-9 en fonction du délai depuis l'induction. CNV=membrane néovasculaire; R=zone de rétine adjacente intacte.

par l'étude du transgène de la β -galactosidase. Les échantillons de rétine prélevés au voisinage de l'aire de néovascularisation restent négatifs pour l'expression de la MMP-9 à tous les temps étudiés. Par contre, l'expression de la MMP-2 reste relativement constante du jour 3 au jour 14 avec un petit pic d'expression au environ du jour 10 (fig. 34). Contrairement à la MMP-9, l'expression de la MMP-2 n'est pas cantonnée à l'aire néovasculaire, mais est aussi exprimée de façon constitutive au voisinage de la zone de lésion.

L'activité de la MMP-2 et de la MMP-9 du segment postérieur des yeux intacts et de membranes néovasculaires induites au laser de souris sauvages, a été analysée par zymographie sur gel. La forme latente de la MMP-2 a été mise en évidence dans tous les extraits tissulaires étudiés (fig. 35). Son niveau est plus élevé dans les membranes néovasculaires induites et dans cette condition la forme active est également présente. La MMP-9 active n'est pas détectée dans les yeux intacts, mais de fortes quantités sont présentes dans les yeux traités au laser.

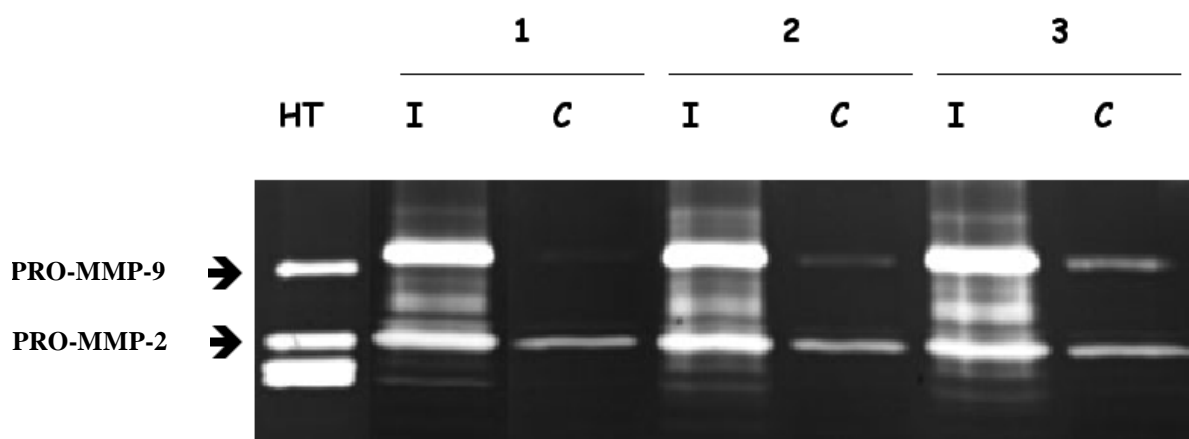


Figure 35 : Analyse zymographique de l'activité MMP-2 et MMP-9 dans un milieu conditionné de cellules tumorales (HT, contrôle positif), dans le segment postérieur de 3 yeux murins intacts (C, contrôle négatif) ou sièges d'une prolifération néovasculaire (I) (extraction J3)

6.1.3.2 Néovascularisation choroïdienne *in vivo* chez les souris *MMP-9^{-/-}* et sauvages

Afin de déterminer si l'absence de la MMP-9 pourrait influencer la néovascularisation choroïdienne *in vivo*, nous avons tout d'abord évalué l'incidence des hot spots fluorescents par angiographie au jour 14, après induction laser de souris sauvages et *MMP-9^{-/-}*. Des micro vaisseaux néoformés avec une émission de fluorescence ont été observés dans 75% des lésions induites par laser. L'incidence des hot spots retrouvés dans les souris *MMP-9^{-/-}* n'est pas significativement différentes de celle observée chez les souris sauvages (données non

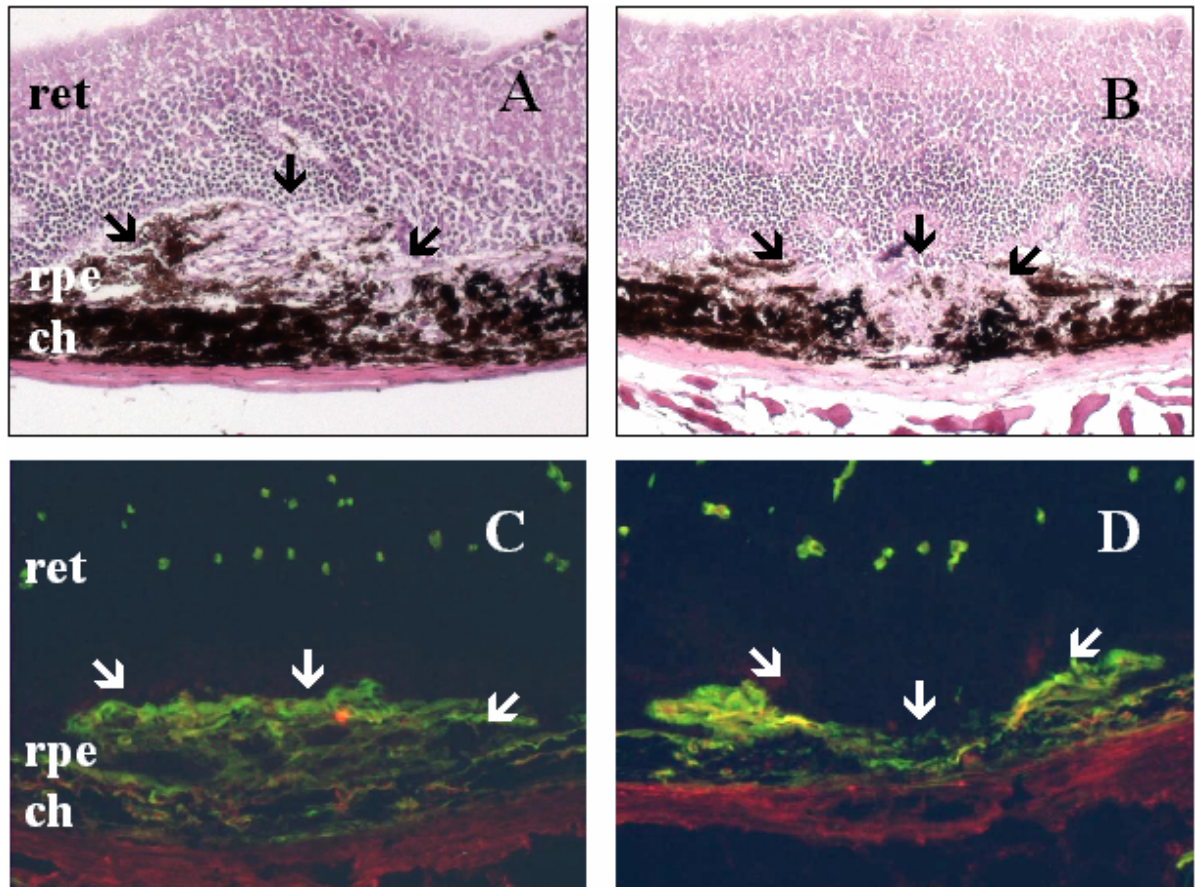


Figure 36 : photographies de la réponse néovasculaire au jour 14 dans les souris témoins (A-C) et les animaux déficients pour la MMP-9 (B-D). La coloration hématoxyline-éosine (A-B) nous permettra de réaliser les mesures du rapport B/C. Les vaisseaux sont mis en évidence en immunofluorescence (en vert, anticorps anti-collagène de type IV; en rouge, anticorps anti-CD31) (C-D). Grossissement de travail 200X.

illustrées). La néovascularisation a ensuite été estimée par immunofluorescence à l'aide d'anticorps anti-PECAM et anti-collagène IV, et par mesure histologique du rapport B/C (fig. 36). La néovascularisation induite est plus restreinte chez les souris MMP-9^{-/-} (fig. 36 B et D) que chez les souris sauvages (fig. 36 A et C).

L'étude du rapport B/C montre une réduction statistiquement significative ($p < 0,001$) de la zone de néovascularisation de l'ordre de 20% chez les souris déficientes par rapport aux souris sauvages (fig. 37).

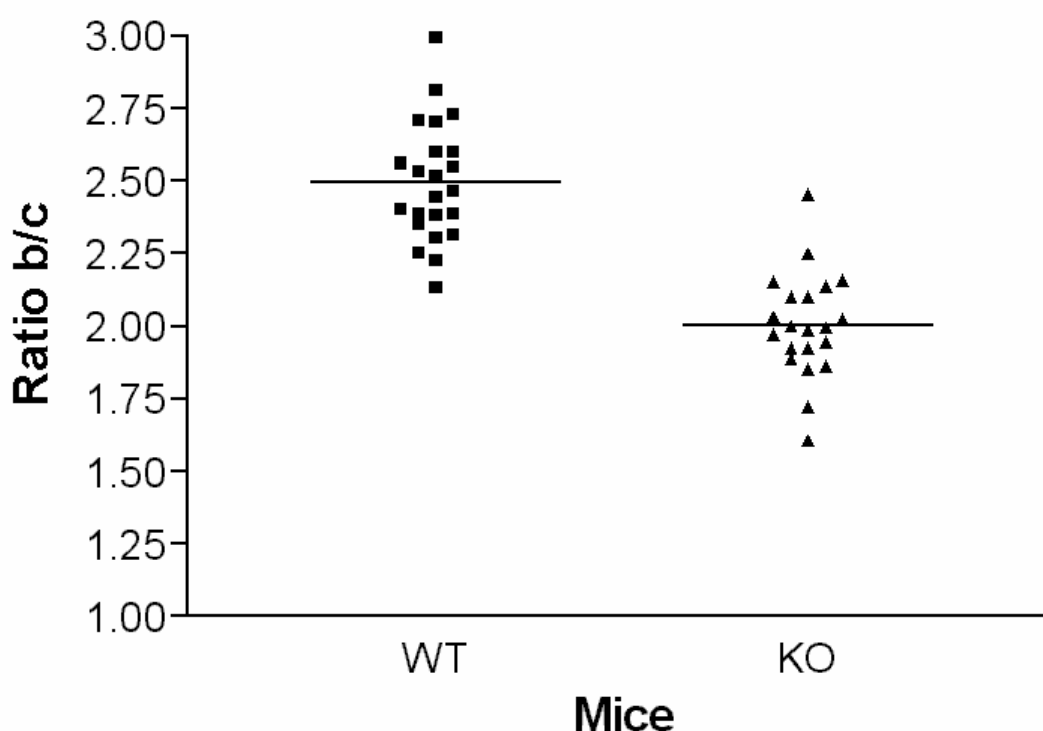


Figure 37 : Résultats des mesures du rapport B/C réalisées sur des souris sauvages (WT) et sur des souris MMP-9^{-/-} (KO). Cette étude nous montre une diminution de l'ordre de 20% chez les souris déficientes ($p < 0,001$).

6.1.4 Discussion

Les MMPs sont capables de dégrader les composants de la matrice extra-cellulaire, d'autres protéines péri-cellulaires, et de promouvoir l'angiogenèse et l'invasion tumorale. La MMP-2 et la MMP-9 sont d'un grand intérêt dans la recherche sur l'angiogenèse, car parmi leurs substrats spécifiques figure le collagène de type IV, un composant de la membrane basale et de la membrane de Bruch. Les MMPs peuvent aussi bien avoir une action pro- que anti-

angiogénique. En effet, la MMP-9 régule la bio disponibilité du VEGF [Bergers et al., 2000], et stimule l'angiogénèse. Les MMPs génèrent aussi des facteurs anti-angiogéniques et dégradent la membrane basale, ce qui peut déstabiliser les vaisseaux sanguins nouvellement formés et donc juguler la progression de l'angiogénèse [Yamada et al., 2001;Egeblad and Werb, 2002].

Etant donné que l'expression de la MMP-9 a été démontrée dans la chorioïdopathie proliférative humaine [Salzmann et al., 2000] et dans un modèle oculaire expérimental [Majka et al., 2001], le but de cette étude a été de déterminer le rôle joué par la MMP-9 dans la néovascularisation choroïdienne induite par laser, un modèle proche de la DMLA humaine.

L'expression de la MMP-9 a été mise en évidence au niveau spatial par l'utilisation de souris transgéniques exprimant la β -galactosidase sous l'influence du promoteur de la MMP-9, et grâce à l'utilisation de la RT-PCR réalisée sur des échantillons de structures néovasculaires choroïdiennes microdisséquées au laser. Ces deux approches utilisées conjointement démontrent que l'expression locale de l'ARN messager de la MMP-9 est localisée exclusivement au jour 5 au sein de l'impact laser. Bien que les cellules présentes sur le lieu du traumatisme puissent exprimer la MMP-9, la détection de cet ARN coïncide parfaitement avec l'arrivée des macrophages sur le site de réaction néovasculaire. Ceci suggère que les cellules inflammatoires sont des pourvoyeurs importants de MMP-9, comme précédemment observé dans les modèles tumoraux [Coussens et al., 2000]. Un rôle angiogénique pour les macrophages infiltrant les néovaisseaux choroïdiens a déjà été reporté [Oh et al., 1999]. Une autre étude utilisant un laser au krypton afin d'induire une néovascularisation choroïdienne chez le rat n'a pas montré de différence dans l'expression de la MMP-9 par hybridation *in situ* [Kvanta et al., 2000]. Les différences dans les méthodes de travail, les modèles animaux et la sensibilité des techniques utilisées, ainsi que la courte fenêtre d'expression peuvent expliquer ses divergences apparentes.

Il est à noter que les cellules inflammatoires contenant de la MMP-9 pré-formée au sein de granules intra-cellulaires peuvent également contribuer au développement des lésions. Puisque la contribution de cette source de MMP-9 ne peut pas être mise en évidence par l'étude de l'expression de l'ARN messager de la MMP-9, il convient de comparer la présence des protéines avec l'expression de l'ARN messager. Au niveau protéique, l'activité de la MMP-9 a été observée par zymographie et a été localisée par immunofluorescence au sein des lésions induites au laser dès le jour 3, avant que l'expression de l'ARN messager ne soit

détectée. Il est donc probable que la MMP-9 soit présente suite au recrutement précoce et à la dégranulation des neutrophiles avant l'induction de la transcription de son expression au niveau local. Ces protéines pré-formées, présentes dans les cellules plurinucléées, pourraient représenter la principale source de MMP-9 active.

Le profil d'expression de la MMP-9 obtenu par RT-PCR réalisée sur les échantillons micro disséqués, est différent de celui de la MMP-2. La MMP-2 semble exprimée de façon constitutive au cours des temps étudiés aussi bien au sein des membranes néovasculaires que dans les zones intactes avoisinantes, avec un léger pic d'expression au jour 10. Ces données illustrent clairement les différences dans la régulation de la MMP-2 et de la MMP-9.

L'angiogenèse, déterminée par immunofluorescence et par quantification histologique est réduite de façon significative chez les souris déficientes pour la MMP-9 comparées aux souris sauvages. Le profil d'expression de la MMP-2 démontre que la MMP-2 ne peut pas compenser la déficience en MMP-9. Nos résultats fournissent pour la première fois des éléments montrant que la MMP-9 contribue à la néovascularisation induite par laser. Nous ne pouvons cependant pas distinguer par quel mécanisme direct, ou par le relargage et/ou l'activation de facteur angiogénique tel que le VEGF [Bergers et al., 2000; Engsig et al., 2000], la MMP-9 joue ce rôle. Malgré tout, l'importance de l'inhibition est moins grande que celle observée dans ce même modèle en l'absence du PAI-1 dans la publication 1 [Lambert et al., 2001]. La MMP-9 ne semble pas être la seule voie par laquelle des facteurs angiogéniques seraient rendus disponibles, ce qui se passe clairement dans le cadre de l'angiogenèse tardive dépendante du VEGF dans la progression tumorale [Bergers et al., 2000]. Malgré tout, l'induction précoce de la MMP-9 contribue probablement à la gravité de la néovascularisation choroïdienne pathologique.

6.2 Article 5: MMP-2 and MMP-9 synergize in promoting choroidal neovascularization

V. Lambert, B. Wielockx, C. Munaut, C. Galopin, M. Jost, T. Itoh, Z. Werb, A. Baker, C. Libert, H. W. Krell, J. M. Foidart, A. Noel, and J. M. Rakic..

FASEB J. 17 (15):2290-2292, 2003.

6.2.1 Introduction

Nous avons montré dans la publication 4 que, dans un modèle murin expérimental de néovascularisation choroïdienne induite par laser, la MMP-9 sécrétée par les cellules inflammatoires contribue au développement pathologique de l'angiogenèse choroïdienne [Lambert et al., 2002]. Toutefois, aussi bien la MMP-9 que la MMP-2 sont exprimées dans les membranes néovasculaires humaines récoltées chirurgicalement sur des patients atteints de DMLA de stade avancé [Steen et al., 1998]. De plus, il semble que la MMP-2 soit la MMP exprimée de façon prépondérante durant la formation de néovascularisation choroïdienne chez le rat [Kvanta et al., 2000]. Cependant, d'autres études ont montré que, en fonction du contexte, ces gélatinases pouvaient œuvrer de concert ou bien, de façon antagoniste [Longo et al., 2002; Itoh et al., 2002].

Afin d'élucider une partie des questions posées sur le rôle de la MMP-2 et de la MMP-9, nous avons étudié l'expression et l'activité de certains membres de la famille des MMPs à différents stades d'évolution de la néovascularisation choroïdienne murine induite par laser, et comparé la formation de l'angiogenèse chez des souris simples (MMP-2 KO, MMP-9 KO) ou doublement (MMP-2,9 KO) déficientes à des souris sauvages.

6.2.2 Résultats

6.2.2.1 Induction de la néovascularisation choroïdienne chez des souris sauvages, MMP-2 KO, MMP-9 KO et MMP-2,9 KO

L'angiographie réalisée avant le sacrifice (fig. 38 F) montre une réduction significative du nombre de hot spots ($p < 0,001$) chez les souris double-déficientes pour la MMP-2 et MMP-9 (MMP-2,9 KO) comparées aux souris simple-déficientes MMP-2 KO et MMP-9 KO et aux souris sauvages contrôles. Ceci correspond à une forte inhibition de la progression

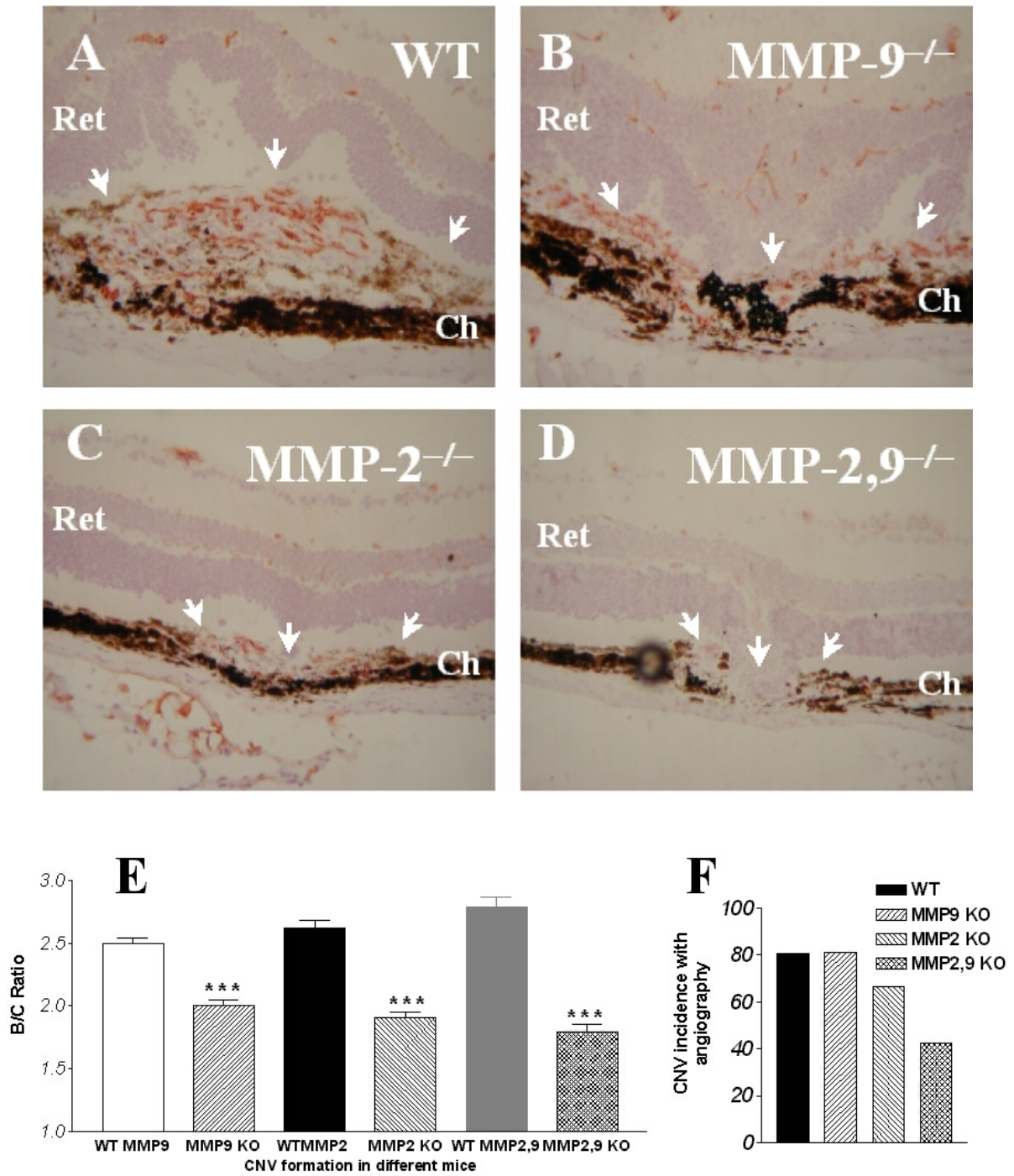


Figure 38 : Immunohistochimie anti-PECAM (rouge) contre-colorée à l'éosine (bleu) de la zone de trauma induit par laser chez des souris sauvages contrôles (WT) (A), MMP-9 KO (B), MMP-2 KO (C) et MMP-2,9 (D). ret : rétine ; ch : choroïde. Grossissement de travail 200X. Quantification par le rapport B/C de l'angiogenèse sous-rétinienne chez les souris déficientes et contrôles correspondantes (E). Evaluation du nombre de hot-spots retrouvés par angiographie par fluorescence 14 jours après l'induction laser (F).

néovasculaire, mise en évidence par immunohistochimie à l'aide d'anticorps anti-PECAM, chez les souris MMP-2,9 KO (fig. 38 D), comparées aux souris MMP-2 KO (fig. 38 C), MMP-9 KO (Fig 38 B) et aux souris sauvages contrôles (fig. 38 A). Après quantification sur coupes histologiques froides sériées par le rapport B/C, une forte diminution significative ($p < 0,001$) est observée chez les souris MMP-9 KO (33%), MMP-2 KO (44%) et MMP-2,9 KO (56%) comparées aux souris sauvages (fig. 38 E).

6.2.2.2 *Présence de la MMP-2 et de la MMP-9 dans les segments postérieurs oculaires de souris sauvages et déficientes pour ces MMPs au jour 5, et profil d'expression temporel durant le développement de la néovascularisation choroïdienne*

Les protéines des segments postérieurs oculaires de souris MMP-2 KO, MMP-9 KO, MMP-2,9 KO et sauvages, prélevés 5 jours après induction d'une néovascularisation au laser, ont été analysées par zymographie sur gel de gélatine (fig. 39 A). Comme attendu, aucune activité MMP-2 et MMP-9 n'a été décelée respectivement chez les souris MMP-2 KO et MMP-9 KO et MMP-2,9 KO (non illustré). Les souris sauvages expriment de la pro-MMP-2, de la pro-MMP-9, ainsi que de la MMP-2 active. Bien que l'expression de la MMP-9 semble être augmentée chez les souris MMP-2 KO, celles-ci sont néanmoins protégées contre une néovascularisation choroïdienne excessive. Les pro-MMP-2 et pro-MMP-9 s'accumulent l'une et l'autre progressivement dès les stades précoces du développement néovasculaire chez les souris sauvages, suivie par l'apparition de la forme active de la MMP-2 (fig. 39 B).

La zymographie *in situ* révèle une activation de l'activité gélatinolytique dans le pôle postérieur oculaire, de façon prédominante dans l'aire de néovascularisation choroïdienne (fig. 39 C). Bien que l'activité gélatinolytique soit fortement diminuée chez les souris doublement déficientes, une activité résiduelle persiste au front de migration de la zone de réaction néovasculaire sous-rétinienne (fig. 39 D).

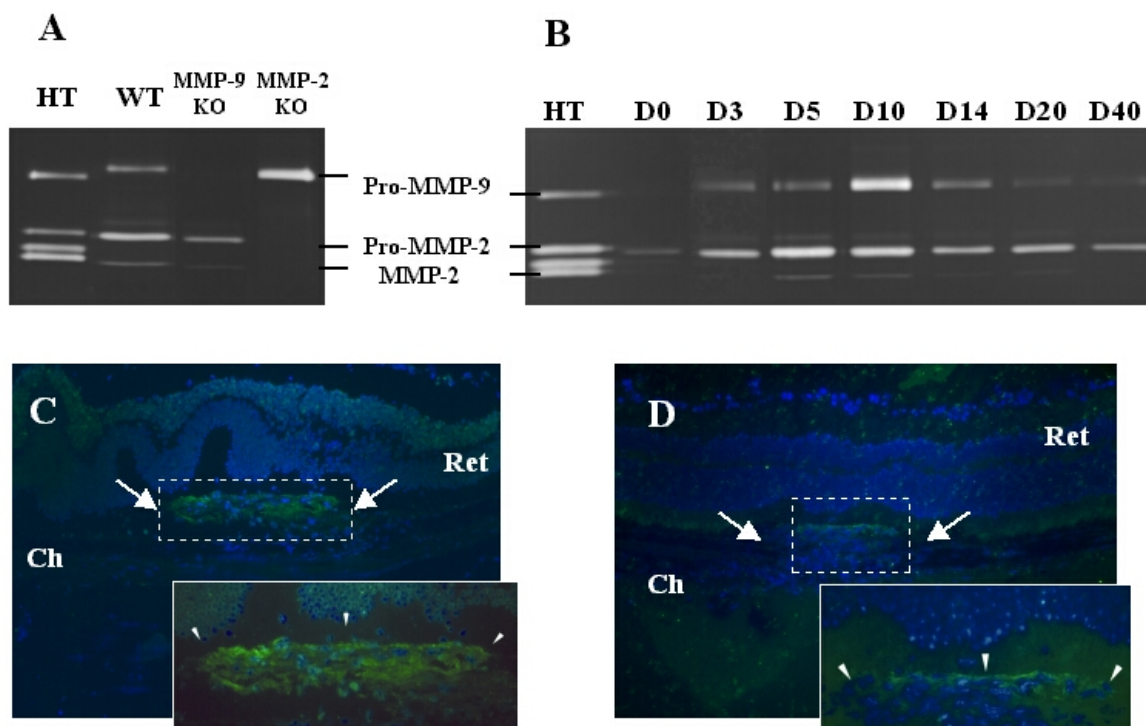


Figure 39 : (A) Analyse de l'activité des gélatinases par zymographie sur gel de gélatine d'extraits de segments postérieurs oculaires (5ng/puits) de souris sauvages (WT), MMP-9 KO et MMP-2 KO (A), avec comme contrôle positif du milieu conditionné de cellules humaines HT1080 (HT). Une zymographie sur gel de gélatine a été réalisée chez les souris sauvages aux jour 0 (D0), jour 3 (D3), jour 5 (D5), jour 10 (D10), jour 14 (D14), jour 20 (D20) et au jour 40 (D40) après induction laser de l'angiogenèse sous-rétinienne (B). Des zymographies *in situ* à l'aide de gélatine conjuguée à la fluorescéine nous montrent l'activité gélatinolytique au jour 14 chez des souris sauvages (C) et chez des souris MMP-2,9 KO (D). Grossissement de travail 200X et 400X. Ch : choroïde ; ret : rétine.

6.2.2.3 Cinétique d'expression des MMPs

Afin d'étudier la régulation de ces gènes, le profil d'expression temporel de la MMP-2 et de la MMP-9 a été analysé par RT-PCR semi-quantitative. L'expression de la MMP-9 est augmentée durant les stades précoces de la néovascularisation, alors que l'expression de la MMP-2 (exprimée constitutivement) ne montre pas de modulation (fig. 40 A et B). Nous avons vu dans la publication 2 que les activateurs du système du plasminogène sont induits aux stades précoces de la néovascularisation, ce qui pourrait être important pour l'activation de la pro-MMP-9 par la plasmine. La présence de la forme active de la MMP-2 pourrait correspondre théoriquement soit à une diminution de l'expression de TIMP-2, soit à une augmentation de l'expression de son activateur, la MT1-MMP. L'analyse par RT-PCR démontre une expression constante du TIMP-2, mais une augmentation de l'expression de la MT1-MMP (fig. 40 C-D)

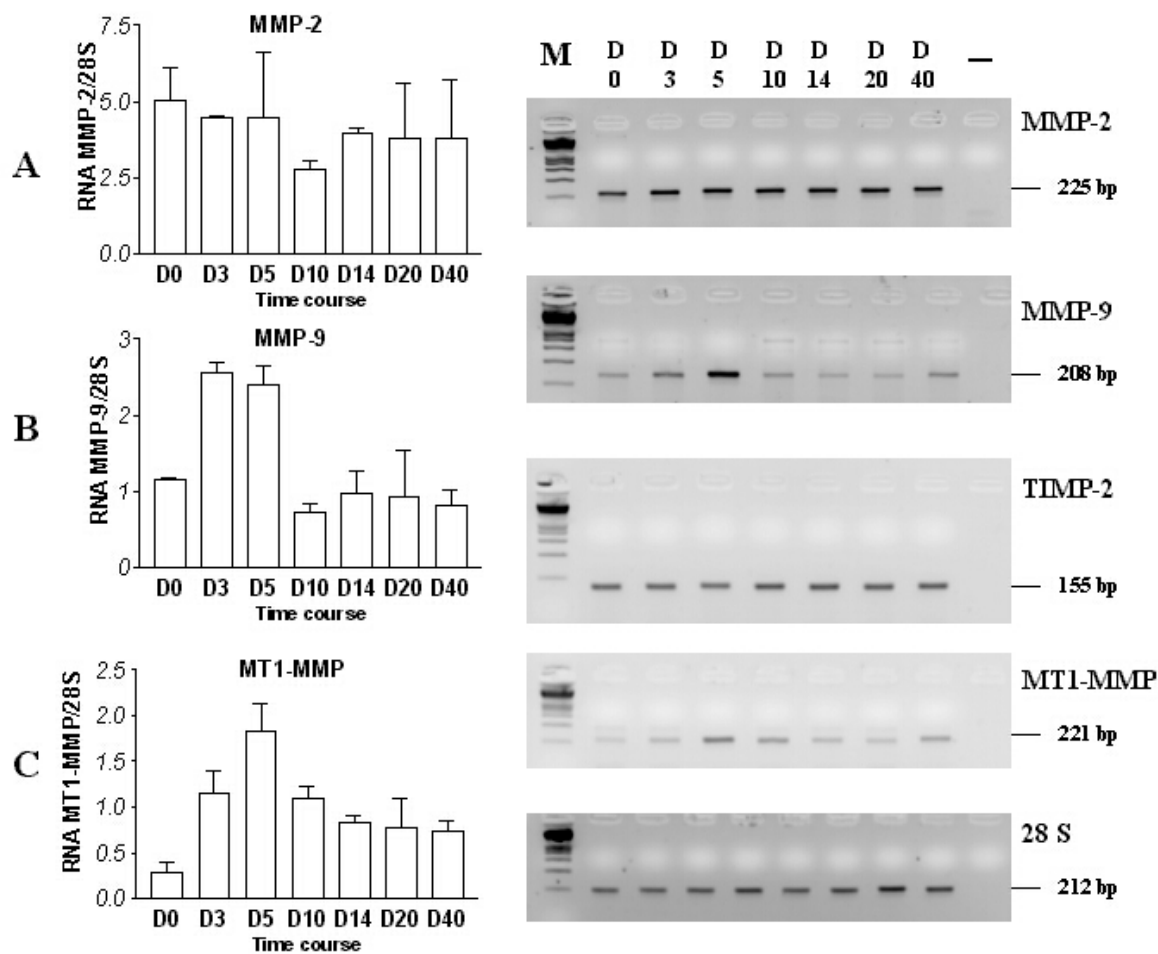


Figure 40 : Evaluation cinétique de l'expression de la MMP-2 (A), de MMP-9 (B) et de la MT1-MMP (C) par RT-PCR semi-quantitative normalisée par rapport au signal du 28S. Un exemple représentatif de gel d'agarose des produits de RT-PCR est montré dans la colonne de droite. L'histogramme de quantification du TIMP-2 n'est pas montré ici car il est exprimé de façon constante comme la MMP-2.

6.2.2.4 Effet de la déficience en MMPs sur l'activité fibrinolytique

Comme nous l'avons vu dans les publications 1 à 3, le système des activateurs du plasminogène/plasmine joue un rôle très important dans la néovascularisation choroïdienne. Les MMPs peuvent également moduler la fibrinolyse par des mécanismes dépendant ou non du plasminogène [Lijnen, 2002;Pepper, 2001;Hiraoka et al., 1998]. L'activité fibrinolytique, mise en évidence par coloration immunohistochimique du fibrinogène/fibrine, nous montre une présence similaire des dépôts de fibrinogène/fibrine chez les souris sauvages, MMP-2 KO et MMP-9 KO (fig. 41 A-C). La grande quantité de fibrinogène/fibrine accumulée par contre chez les souris MMP-2,9 KO suggère qu'en l'absence des deux gélatinases l'activité fibrinolytique est perturbée dans les membranes néovasculaires (fig. 41 D)

6.2.2.5 Les inhibiteurs de MMPs diminuent le développement de la néovascularisation choroïdienne

Une seconde approche afin de mettre en évidence la contribution des MMPs dans le développement néovasculaire choroïdien, a été de surexprimer de façon endogène le TIMP-1 et le TIMP-2 chez les souris sauvages par le biais d'adénovirus vecteurs. L'analyse par RT-PCR du pôle postérieur oculaire révèle que l'injection intra-veineuse systémique des adénovirus conduit effectivement à une augmentation locale de l'expression du TIMP-1 et du TIMP-2 (fig. 42 A-B). L'évaluation par zymographie *in situ* montre une inhibition complète de l'activité gélatinolytique après l'injection de l'AdTIMP-1, alors qu'une activité résiduelle persiste après une injection de l'AdTIMP-2 (fig. 42 C-D). Une quantification de la néovascularisation par le rapport B/C a été réalisée, 14 jours après induction laser, sur des souris sauvages injectées par l'AdTIMP-1, l'AdTIMP-2 et injectées par le virus contrôles (AdRR5). La sur-expression de TIMP-1 et de TIMP-2 réduit significativement ($p < 0,001$) l'angiogenèse comparée à celle observée chez les souris contrôles injectées avec AdRR5 seul (fig. 42 E).

Nous avons comparé l'efficacité de deux inhibiteurs synthétiques sur le développement de la néovascularisation choroïdienne induite au laser, par injection quotidienne de ceux-ci à des souris sauvages contrôles. Nous avons testé d'une part un inhibiteur synthétique de MMPs à large spectre, le BB-94, et d'autre part, un inhibiteur de gélatinase synthétique plus spécifique agissant de manière préférentielle sur la MMP-2, la MMP-9 et la MT-1-MMP, le Ro 28-2653 [Lein et al., 2002]. Les deux inhibiteurs réduisent la formation de l'angiogenèse oculaire (fig.

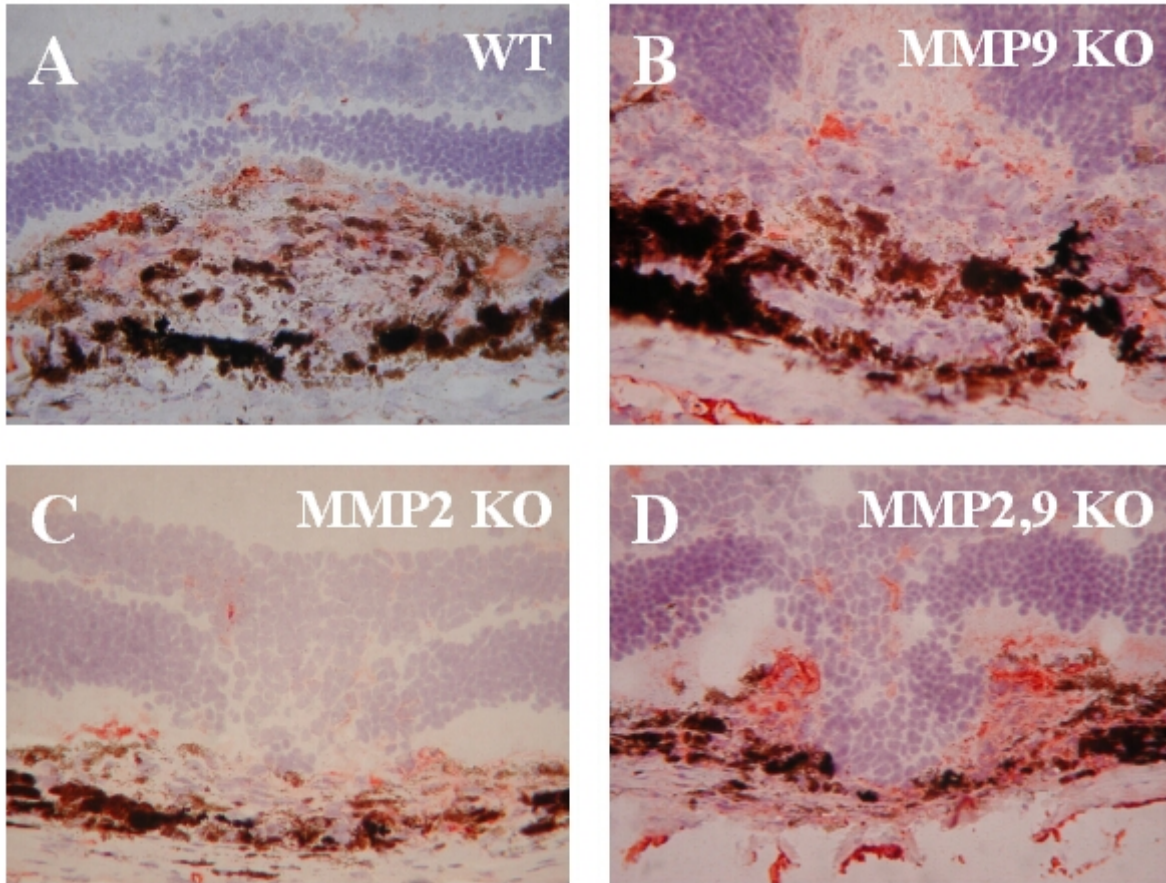


Figure 41 : Immunolocalisation des dépôts de fibrine/fibrinogène (en rouge), au jour 14, chez des souris sauvages (A), MMP-9 KO (B), MMP-2 KO (C) et MMP-2,9 KO (D). grossissement de travail 400X.

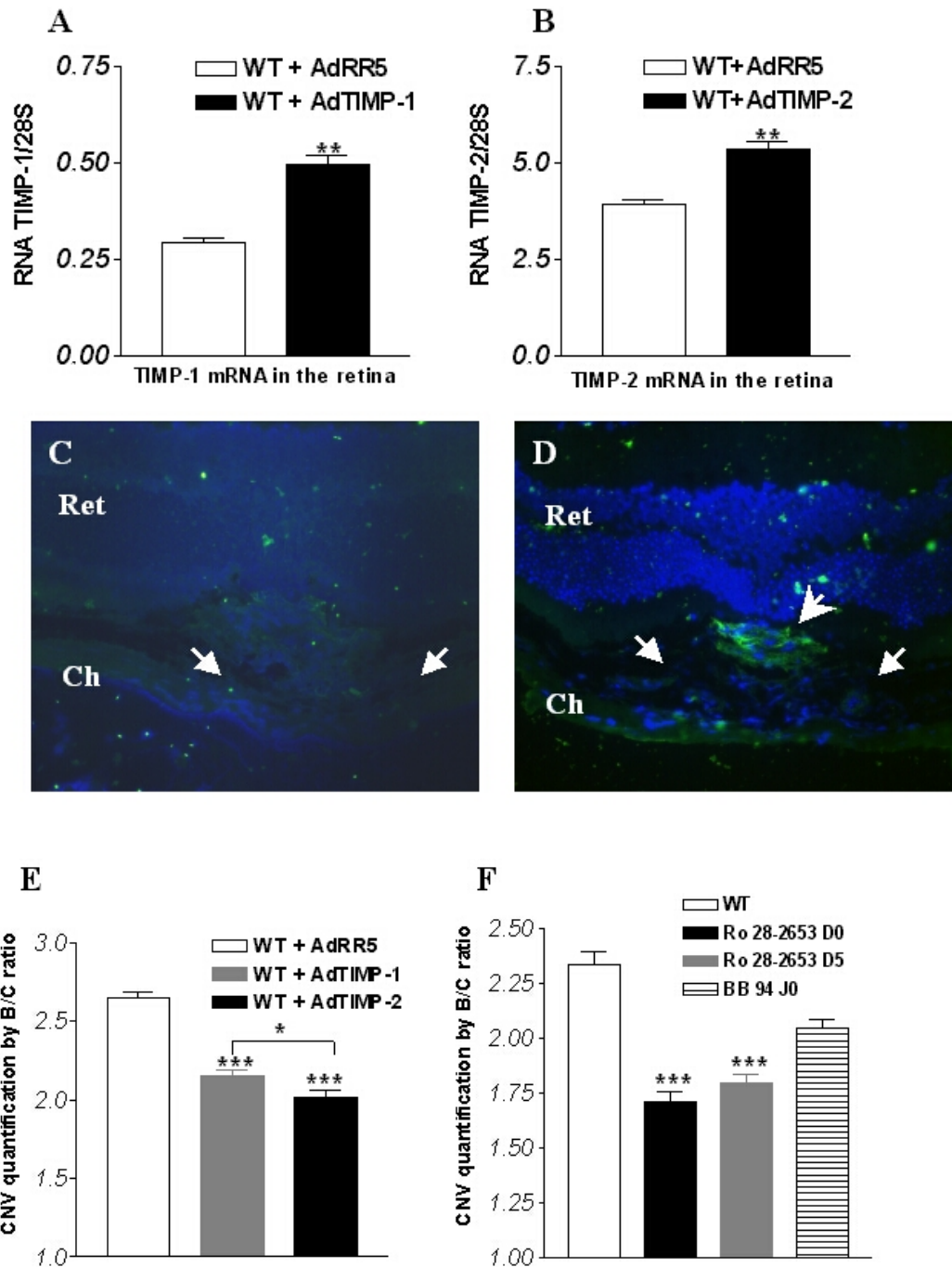


Figure 42 : Quantification de l'expression locale du TIMP-1 (A) et du TIMP-2 (B) par RT-PCR semi-quantitative normalisée par rapport au signal 28S chez des souris sauvages contrôles injectées par de l'AdRR5 ou par des souris sur-exprimant leTIMP-1 par injection de l'AdTIMP-1 (A) ou le TIMP-2 par injection de l'AdTIMP-2 (B). Une analyse par zymographie *in situ* réalisée au jour 5 nous montre une inhibition complète de l'activité gélatinolytique chez les souris sur-exprimants TIMP-1 (C), tandis qu'une activité résiduelle subsiste chez les souris sur-exprimant TIMP-2 (D). Une évaluation de la réaction néovasculaire par le rapport B/C montre que la sur-expression de TIMP-1 et de TIMP-2 réduit significativement ($p < 0,001$) l'angiogenèse sous-rétinienne et que l'adénovirus vecteur de TIMP-2 semble plus efficace ($p < 0,05$) que celui vecteur du TIMP-1 (E). L'inhibition pharmacologique des MMPs a été évaluée par le rapport B/C (F). L'inhibiteur spécifique pour les gélatinases et pour MT1-MMP (Ro 28-2653) injecté en intra-péritonéal au jour 0 (D0) et au jour 5 (D5) après induction laser semble plus efficace ($p < 0,001$) que l'inhibiteur synthétique à large spectre (BB-94) (F). ret : rétine ; Ch :choroïde. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Grossissement de travail 200X.

42 F), bien que le Ro-28-2653 paraît plus efficace que le BB-94 ($p < 0,001$). De façon très intéressante, le traitement commencé 5 jours après induction laser par l'inhibiteur spécifique, inhibe de façon significative l'angiogenèse choroïdienne (40% d'inhibition), se révélant dès lors un inhibiteur potentiel pour le traitement de la DMLA exsudative (fig. 42 F).

6.2.3 Discussion

Les résultats de cette étude montrent que la MMP-2 et la MMP-9 coopèrent au cours du développement néovasculaire choroïdien expérimental. En effet, l'angiogenèse sous-rétinienne est fortement inhibée chez les souris doublement déficientes MMP-2,9, alors qu'elle n'est que partiellement réduite chez les souris uniquement déficientes en MMP-2 ou en MMP-9. Ces résultats sont soutenus par la forte réduction de la néovascularisation choroïdienne obtenue suite au traitement par un inhibiteur spécifique des gélatinases et de la MT1-MMP, le Ro 28-2653 [Maquoi et al., 2004].

Des études précédentes suggéraient un rôle pour différentes MMPs dans le cadre de la DMLA exsudative [Kadonosono et al., 1999; Weber et al., 1994; Qi et al., 2002; Berglin et al., 2003]. En utilisant différentes souris déficientes (MMP-2 KO, MMP-9 KO, MMP-2,9 KO) et différentes méthodes d'inhibition des MMPs (AdTIMP-1, AdTIMP-2, BB-94, Ro 28-2653), nos observations ont amélioré la compréhension du rôle de certaines MMPs dans la néovascularisation choroïdienne. L'ARN messager de la MMP-9 est sur-exprimé alors que celui de la MMP-2 ne subit que de faibles variations durant le développement néovasculaire. La MT1-MMP, l'activateur principal de la MMP-2, est lui aussi fortement induit [Egeblad and Werb, 2002; Overall and Lopez-Otin, 2002; Brew et al., 2000]. Il est intéressant de noter que dans notre modèle, la déficience en MMP-2 est accompagnée d'une augmentation de l'activité de la MMP-9 détectée par zymographie sur gel de gélatine, alors que l'inverse n'est pas vrai. Malgré cela, cette augmentation de la MMP-9 n'est pas suffisante pour arrêter l'effet inhibiteur de la déficience en MMP-2 lors du développement néovasculaire.

La fibrine, ainsi que d'autres molécules d'adhésion, comme la vitronectine, la laminine et la fibronectine constituent la matrice provisoire, nécessaire au développement angiogénique [Dvorak et al., 1995]. Nous avons montré dans les publications 1 à 3, l'importance d'une fibrinolyse finement régulée dans le développement de l'angiogenèse sous-rétinienne pathologique. Aussi bien un excès de fibrinolyse, comme chez les souris PAI-1 KO, qu'une

déficience de fibrinolyse, comme chez les souris déficientes pour le plasminogène, empêchent la formation de membranes néovasculaires induites par laser. Le système activateur du plasminogène/plasmine n'est pas la seule voie par laquelle la fibrinolyse est régulée. En effet, un rôle similaire a été attribué aux membres du système MMPs. Dans les membranes basales glomérulaires néphritiques, la MMP-9 est requise pour la fibrinolyse, et son absence engendre une accumulation de fibrine au sein des glomérules [Lelongt et al., 2001]. Nous avons observé que l'absence combinée des deux gélatinases engendrait une accumulation de fibrine au sein des lésions induites par laser. Cette accumulation pourrait agir telle une barrière physique pour les composants cellulaires infiltrant la néovascularisation choroïdienne, tels que les cellules endothéliales, les fibroblastes ou les cellules mononucléaires. Nous n'avons d'ailleurs pas détecté de cellules mononucléaires chez les souris MMP-2,9 KO alors qu'elles sont toujours présentes sur le front de migration des membranes néovasculaires des souris sauvages (données non illustrées).

L'inhibition des MMPs pourrait-elle être un traitement efficace contre la néovascularisation choroïdienne ? Bien que le TIMP-3 possède une efficacité inhibitrice du processus angiogénique pathologique [Takahashi et al., 2000], il possède aussi des propriétés pro-apoptotiques, qui malheureusement limitent son potentiel thérapeutique dans le cadre de la sénescence oculaire [Majid et al., 2002]. C'est pour ces raisons que nous avons évalué l'effet du TIMP-1 et du TIMP-2 délivrés par le biais d'un adénovirus. Bien que la sur-expression du TIMP-2 semble moins efficace que celle du TIMP-1 dans l'inhibition de l'activité gélatinolytique *in situ*, elle semble malgré tout plus efficace pour empêcher la réaction néovasculaire choroïdienne. Ceci est peut-être dû à la capacité du TIMP-2, et pas du TIMP-1, d'inhiber la MT1-MMP [Brew et al., 2000], qui est induite aux stades précoces de la réaction angiogénique. Mais ceci reste bien sûr à déterminer. La MT1-MMP pourrait agir soit par la voie de son activité fibrinolytique, soit par sa capacité à activer la MMP-2 et favoriser ainsi la néovascularisation. Malheureusement, notre modèle expérimental ne peut être appliqué sur des souris déficientes pour la MT1-MMP, car celles-ci meurent peu de temps après la naissance [Holmbeck et al., 1999]. Un inhibiteur synthétique des MMPs, le Ro 28-2653, agissant de façon préférentielle avec la MMP-2, la MMP-9 et la MT1-MMP [Maquoi et al., 2004], inhibe la néovascularisation choroïdienne de façon plus efficace qu'un inhibiteur non spécifique à large spectre. Il est bon de noter que des observations similaires ont été réalisées dans le cadre de modèles tumoraux [Arlt et al., 2002; Maquoi et al., 2004]. Ceci laisse à penser que l'inhibition à large spectre des MMPs pourrait aussi réprimer des MMPs dont les effets

seraient thérapeutiquement bénéfiques [Jiang et al., 2002]. Dans ce contexte, le fait qu'une déficience en MMP-8 augmente l'incidence des tumeurs de la peau chez les souris mâles, démontre l'effet protecteur de certaines MMPs contre le développement tumoral [Balbin et al., 2003]. L'analyse par RT-PCR montre que d'autres MMPs, telles que la MMP-8 et la MMP-12, sont exprimées durant la formation néovasculaire choroïdienne, mais leur rôle reste inconnu dans cette maladie. Les MMPs peuvent stimuler l'angiogenèse ou alors générer des facteurs anti-angiogéniques, tels que l'angiostatine ou l'endostatine [Overall and Lopez-Otin, 2002; Egeblad and Werb, 2002; Yamada et al., 2001]. Il s'avèrerait donc qu'une inhibition sélective de quelques MMPs pourrait se montrer plus efficace pour contrôler l'angiogenèse qu'une inhibition indistincte du répertoire complet des MMPs.

7 Discussion générale et perspectives

L'angiogenèse pathologique résulte d'un déséquilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogènes dans un contexte inflammatoire. Du fait de sa grande importance dans certaines maladies comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge ou dans le développement des tumeurs, l'angiogenèse est apparue comme une cible thérapeutique de choix dans le traitement de ces maladies. Dans ce travail, nous développons les bases expérimentales visant à étudier de multiples agents impliqués dans la genèse de la néovascularisation choroïdienne. Le but final de notre approche basée sur la dissection des étapes moléculaires du processus néovasculaire est évidemment d'ordre thérapeutique.

7.1 Applications cliniques dirigées contre l'angiogenèse choroïdienne

De nombreuses applications cliniques sont actuellement développées afin de lutter contre l'angiogenèse choroïdienne associée à la dégénérescence liée à l'âge. De plus en plus d'inhibiteurs de l'angiogenèse sont identifiés et évalués, qu'il s'agisse d'agents pharmacologiques ou d'inhibiteurs endogènes. Parmi les agents en cours d'évaluation, citons entre autres le rhuFab V2, les aptamères anti-VEGF ou l'anécortave acétate.

Le rhuFab V2 est un fragment d'anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF, qui peut pénétrer l'espace sous-rétinien lorsqu'il est injectée dans le vitré. Cette molécule se fixe aux quatre isoformes du VEGF et inhibe ainsi la perméabilité vasculaire et l'angiogenèse [Krzystolik et al., 2002]. En association avec la thérapie photo-dynamique (PDT) utilisant la vertéporfine, le rhuFab provoque une plus grande diminution visible par angiographie que la PDT seule au point de vue expérimental [Husain et al., 2002]. Des études cliniques en phase I et II ont montré que ce traitement permet parfois une amélioration de l'acuité visuelle des malades [Heier et al., 2003].

Les aptamères sont des oligonucléotides dessinés afin de se lier sur des molécules spécifiques en fonction de leur structure tridimensionnelle. Cette technique a été utilisée avec un aptamère

anti-VEGF 165 humain, chez des patients présentant une néovascularisation choroïdienne secondaire à une DMLA [Gragoudas et al., 2004]. L'avantage de ses aptamères est qu'ils provoquent moins de réactions immunes indésirables à l'opposé des anticorps recombinants dirigés contre le VEGF qui contiennent toujours des séquences résiduelles murines [EyeTech Study Group, 2002; Carrasquillo et al., 2003; EyeTech Study Group, 2003]. On peut de façon générale souligner que ces traitements s'effectuent par injections intra-vitréennes engendrant un risque d'endophtalmie infectieuse, et que leur efficacité n'a pas été comparée à celle du standard actuel, la photothérapie dynamique. De plus, ces agents thérapeutiques dirigés contre le VEGF ont surtout une action dirigée contre les oedèmes maculaires, mais ne semblent pas diminuer la progression de la néovascularisation [Gragoudas et al., 2004]. N'oublions pas que le VEGF joue un rôle de maintien de la neuro-rétine et fonctionnel sur les vaisseaux rétiens. Une plus grande précision thérapeutique pourrait cibler les effecteurs en aval de la chaîne signalétique du VEGF qui serait spécifique de l'angiogenèse [van Wijngaarden et al., 2005]. Il est probable que le concept attribuant un rôle prédominant au VEGF dans la formation de néovaisseaux choroïdiens soit un peu simpliste, car nous avons montré, avec d'autres, que l'angiogenèse est multi factorielle. Nous avons dans ce contexte démontré l'implication du PlGF au cours de l'angiogenèse choroïdienne [Rakic et al., 2003]. L'inhibition d'une combinaison de facteurs serait dès lors plus efficace, afin de faire régresser cette néovascularisation.

Des essais cliniques de phase I concernant l'utilisation d'adénovirus vecteur du gène codant pour le PEDF (pigment epithelium-derived factor) sont en cours chez des patients atteints de DMLA avec une néovascularisation sévère et ne pouvant être traitée par la thérapie photodynamique ou par photocoagulation laser. Le PEDF est une glycoprotéine qui appartient à la superfamille des inhibiteurs de protéinases à sérine. Il est l'une des plus puissantes protéines anti-angiogènes humaines connue [Rasmussen et al., 2001]. Les résultats de ces tests ne sont pas encore disponibles. Néanmoins, comme cela semble être le cas pour le PAI-1, le PEDF pourrait aussi présenter des effets paradoxaux à la fois pro- et anti-angiogènes en fonction de la dose [Apte et al., 2004]. Certains variants du gène du PEDF pourraient également s'avérer comme étant des candidats attractifs de prédisposition à la dégénérescence maculaire liée à l'âge [Yamagishi et al., 2005].

L'anécortave acétate est un angiostatique stéroïdien (fig. 43), sans activité corticostéroïde *in vivo*, utilisé pour le traitement de patients atteints de DMLA avec des néovaisseaux.

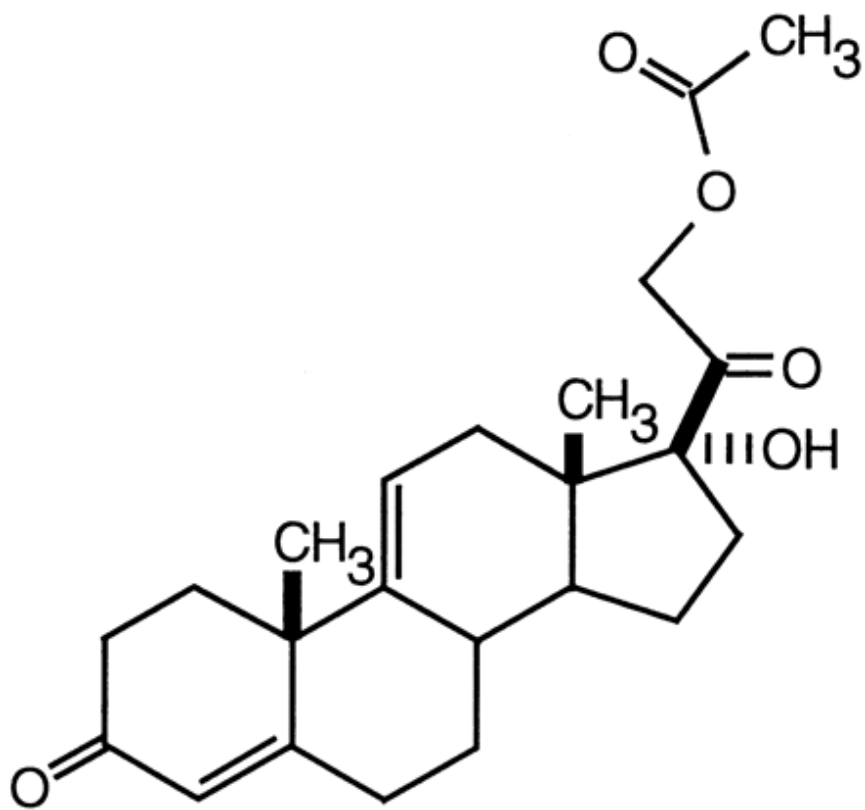


Figure 43 : Formule de l'anécortave acétate ou 4,9(11)-Pregnadien-17 α ,21-diol-3,20-dione-21-acétate.

L'anécortave acétate est capable d'augmenter l'expression de PAI-1 et de diminuer celle de l'uPA [The Anecortave Acetate Clinical Study Group, 2003].

Des données obtenues en laboratoire sur des modèles de néovascularisation cornéenne, rétinienne ou choroïdienne tendent à prouver l'efficacité de cet agent comme inhibiteur de la croissance des vaisseaux [Penn et al., 2001; Clark, 1997; McNatt et al., 1999; BenEzra et al., 1997]. Des essais pour le traitement en phase clinique II, en juxtascéral par des doses de 15 mg augmenteraient l'acuité visuelle après 6 mois [D'Amico et al., 2003b; D'Amico et al., 2003a; Augustin et al., 2005] et même après un an de traitement [Slakter, 2003]. Il est à noter qu'une augmentation de la dose à 30 mg diminue l'efficacité du composé par rapport au placebo [Soubrane et al., 2002; The Anecortave Acetate Clinical Study Group, 2003]. L'avantage de l'injection juxtascérale est qu'elle ne s'accompagne pas d'un risque infectieux par rapport aux antagonistes du VEGF injectés en intravitréen et qu'elle permet la constitution d'un « dépôt », diminuant la fréquence des injections à réaliser.

Si ces traitements utilisant de l'anécortave acétate ou des antagonistes du VEGF permettent un ralentissement de la perte de l'acuité visuelle des patients atteints de DMLA, leur efficacité reste malgré tout partielle. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques s'avère dès lors essentiel. De notre côté, en parallèle avec l'évolution des connaissances cliniques, nous avons essayé d'aborder par une approche expérimentale les mécanismes impliqués dans le développement et la progression du phénomène néovasculaire sous-rétinienne. Pour ce faire, nous avons développé et étudié un modèle de néovascularisation choroïdienne murine induite au laser. Le choix de l'espèce murine est un thème de controverses classique en médecine, et en particulier en ophtalmologie puisque cette espèce n'a pas de spécialisation maculaire. Ceci explique notre souci constant de corréliser les profils d'expression génique obtenus chez l'animal avec ceux obtenus sur les membranes néovasculaires humaines obtenues chirurgicalement. Il est à cet égard significatif de constater que tous les gènes dont nous avons mis en évidence l'activation dans le modèle expérimental, tels que par exemple le PAI-1, la MMP-2 ou la MMP-9, sont aussi exprimés dans la forme humaine de la maladie.

Bien que le modèle choisi dans le but d'étudier la forme exsudative de la DMLA ne contienne pas la composante liée à l'accumulation de matériel anormal sous l'épithélium pigmentaire, il reproduit, en plus du profil d'expression génique, les éléments constitutifs de la membrane néovasculaire humaine. Faut-il enfin rappeler qu'il constitue, à ce jour, le seul modèle animal disponible.

Dans le premier chapitre du travail consacré à l'étude de l'intervention des protéases à sérine dans la néovascularisation choroïdienne, nous avons montré que :

- PAI-1, uPA, tPA et uPAR sont exprimés à la fois dans les membranes néovasculaires humaines et expérimentales;
- une protéolyse excessive (par absence de PAI-1) ou déficiente (par excès de PAI-1, ou par inactivation de uPA, tPA ou Plg) empêchent toutes deux le développement de la réaction néovasculaire dans la choroïde;
- l'effet de PAI-1 sur le processus néovasculaire est pro-angiogène ou anti-angiogène en fonction de la dose étudiée, et s'exerce par le contrôle de l'activité fibrinolytique d'avantage qu'au travers des interactions avec la vitronectine;
- l'absence d'uPA, tPA ou Plg entraîne une accumulation de fibrinogène/fibrine dans les lésions induites par le laser.

Le rôle essentiel joué par PAI-1 dans l'angiogenèse pathologique choroïdienne peut s'expliquer par le caractère multifonctionnel de cette molécule. Bien que les mécanismes d'action de PAI-1 restent à préciser, au moins deux théories peuvent être proposées. La première suggère qu'en protégeant la MEC d'une dégradation excessive, PAI-1 permettrait de stabiliser la matrice, qui agit tel un échafaudage nécessaire à la migration des cellules endothéliales et à l'assemblage de ces cellules endothéliales en capillaires [Pepper and Montesano, 1990]. Le retard d'angiogenèse, observé en absence de plasminogène, conforte également l'importance d'un contrôle précis de la protéolyse médiée par la plasmine [Bajou et al., 2001]. De plus, la séquestration de PAI-1 au sein de la MEC est compatible avec un tel rôle. Donc, un équilibre précis entre les enzymes protéolytiques et leurs inhibiteurs semble être essentiel à la migration des cellules endothéliales et à leur différenciation en vaisseaux fonctionnels. Dans un modèle d'anneaux d'aortes, aucun vaisseau n'a été formé à partir d'animaux déficients pour le PAI-1. L'ajout de PAI-1 recombinant exogène, à des concentrations physiologiques, permet de nouveaux le bourgeonnement des micro-vasseaux, tandis que l'usage de concentrations dites thérapeutiques inhibe l'angiogenèse [Devy et al., 2002]. De façon similaire, le PAI-1 inhibe l'angiogenèse induite par le bFGF, lorsqu'il est employé à fortes concentrations [Stefansson et al., 2001]. PAI-1 inhibe également l'angiogenèse pathologique dans un modèle de rétinopathie du prématuré chez le rat [Penn and Rajaratnam, 2003]. Le PAI-1 semble donc avoir une dualité de fonction arborant une

activité pro-angiogénique à des concentrations physiologiques, et des effets anti-angiogéniques à de hautes concentrations dites pharmacologiques [Bajou et al., 2004].

Le second mécanisme d'action de PAI-1 durant l'angiogenèse peut être mis en relation avec sa capacité à interagir avec l'uPAR, les intégrines, et la vitronectine, et, par conséquent, de contrôler la migration cellulaire (fig. 44). Lorsque le PAI-1 est lié à la vitronectine [Zhou et al., 2003;Czekay et al., 2003], le site d'adhésion des intégrines devient cryptique et l'adhésion cellulaire est bloquée. Toutefois, l'expression de l'uPA compense l'effet d'anti-adhésion du PAI-1, en déstabilisant l'interaction entre la vitronectine et le PAI-1. La liaison de l'uPAR et de la vitronectine pourra, dès lors, avoir cours à nouveau et permettra l'accès des intégrines cellulaires sur les sites d'adhésion RGD. En tenant compte du concept selon lequel la migration cellulaire est considérée comme une succession d'attachements et de détachements, l'effet du PAI-1 pourrait donc être vu comme de type migratoire [Stefansson and Lawrence, 2003;Czekay and Loskutoff, 2004;Degryse et al., 2004].

Afin d'élucider le mécanisme d'action de PAI-1, des adénovirus ont été utilisés dans le but de délivrer deux formes mutantes de PAI-1 à des souris déficientes pour le PAI-1, dans le modèle de transplantation cité plus haut [Bajou et al., 2001] et, dans un modèle d'anneaux aortiques [Devy et al., 2002]. Les PAI-1 mutants, soit ont gardé une liaison normale à la vitronectine, mais ne peuvent plus inhiber l'uPA ou le tPA, soit inhibent normalement les activateurs du plasminogène, mais ont une liaison sur la vitronectine négligeable. Dans les deux modèles, aussi bien *in vivo*, qu'*in vitro*, l'angiogenèse est restaurée uniquement par le PAI-1 mutant ayant conservé son activité inhibitrice des activateurs du plasminogène intacte, démontrant que le besoin de PAI-1 est lié à sa capacité d'inhiber une protéolyse excessive plutôt que d'interagir avec la vitronectine. En accord avec ces données, l'angiogenèse et l'invasion tumorale ont été aussi bien observées chez des souris déficientes pour la vitronectine que dans le groupe témoin [Bajou et al., 2001]. Dans une étude séparée utilisant les PAI-1 mutants, l'inhibition de l'angiogenèse induite par le bFGF dans un modèle de membrane chorio-allantoïde d'embryon de poulet requiert aussi bien l'activité anti-protéinasique que la capacité de liaison à la vitronectine du PAI-1 [Stefansson et al., 2001]. Toutes ces données suggèrent que, suivant la situation, PAI-1 peut contrôler l'angiogenèse en régulant les événements protéolytiques et/ou non-protéolytiques dans la migration des cellules endothéliales [Stefansson et al., 2003].

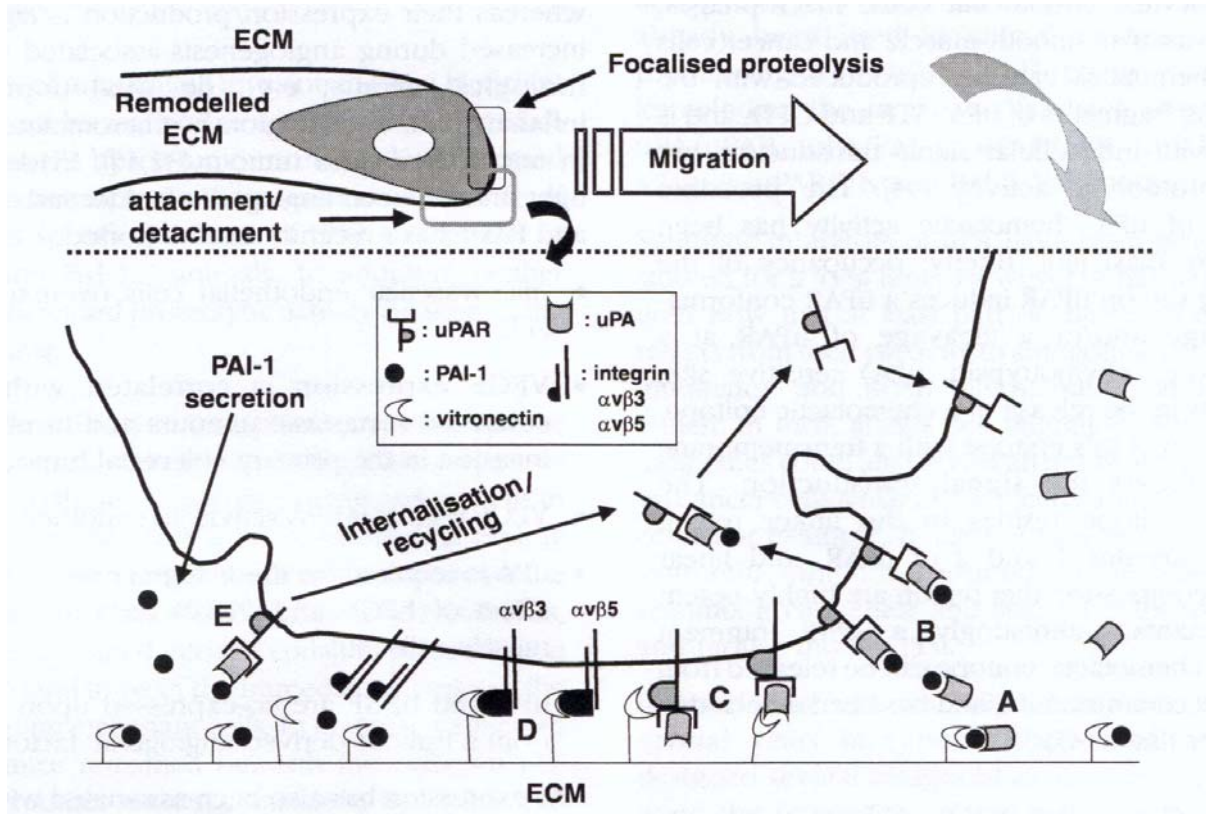


Figure 44: Modèle de migration cellulaire sur la vitronectine (VN) sous la dépendance de l'uPA, de l'uPAR et du PAI-1. A) Le complexe PAI-1-VN est présent au sein de la matrice extracellulaire avec une distribution en tapis. Dans la zone de front d'invasion l'uPA va interagir avec la VN et en détacher le PAI-1. B) le complexe uPA-PAI-1 se lie sur l'uPAR et le complexe est internalisé. L'uPAR libre sera recyclé plus tard à la surface cellulaire C) L'uPAR libre ou le complexe uPA/uPAR peuvent se lier à la VN libre. D) Les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ peuvent aussi interagir avec la VN libre. D) A l'arrière du front d'invasion, le PAI-1 sécrété déstabilise aussi bien les interactions uPAR/VN que les interactions intégrines/VN. Cela a pour conséquence, un détachement de la membrane cellulaire de la matrice extracellulaire. Le PAI-1 de l'hôte est ici essentiel pour l'angiogenèse et favorise la migration des cellules endothéliales. [Frankenne et al., 1999]

Le corollaire de ces recherches est que l'utilisation de PAI-1 en tant que cible thérapeutique peut s'avérer hasardeuse et dangereuse. Nos résultats (article 3) peuvent en partie expliquer l'efficacité dose-dépendante de médicaments, tel que l'anécortave acétate, et mettre en garde contre des stratégies pharmacologiques incontrôlées dans lesquelles les agonistes et antagonistes de PAI-1 sont utilisés pour l'inhibition de la néovascularisation choroïdienne et pour lesquelles existe une courbe biphasique dose-réponse.

7.1.1 Développement d'un inhibiteur spécifique des gélatinases/MT1-MMP

Dans le chapitre consacré à l'étude de l'influence des métalloprotéinases, nous montrons que :

- le profil d'apparition et d'expression de la MMP-9 dans la lésion ressemble au profil observé au cours de la cicatrisation et coïncide avec l'arrivée des monocytes dans la lésion;
- l'absence de MMP-9 réduit l'importance de la réaction néovasculaire;
- l'inactivation combinée de la MMP-2 et de la MMP-9 prévient le développement de la néovascularisation choroïdienne plus efficacement que la déficience isolée d'un des gènes;
- l'activation du zymogène pro-MMP-2 est la conséquence d'une surexpression de MT1-MMP;
- un inhibiteur naturel ou synthétique de métalloprotéinases peut prévenir ou entraîner une régression partielle des néovaisseaux choroïdiens.

Nous avons ainsi montré qu'une modulation contrôlée de l'activité protéolytique pouvait mener à l'inhibition de l'angiogenèse. Un traitement expérimental utilisant un dérivé innovant, inhibiteur sélectif de l'activité de certaines MMPs [Maquoi et al., 2004], s'est montré particulièrement efficace dans notre modèle. Ces observations ouvrent donc la voie à une stratégie combinant des molécules intervenant à différentes étapes de la néovascularisation choroïdienne.

Nos recherches suggèrent que la néovascularisation choroïdienne possède une composante inflammatoire importante qui implique de façon étroite les MMP-2, MMP-9 et MT1-MMP (articles 4 et 5). D'autres auteurs ont démontré récemment qu'une déplétion en macrophage

induite chimiquement chez la souris pouvait inhiber la néovascularisation choroïdienne par diminution de l'expression du VEGF [Sakurai et al., 2003]. Des études récentes indiquent que des souris déficientes en MCP-1 (Ccl-2), un chémo-attractant monocytaire, ou pour le Ccr-2, un récepteur aux chémokines, développent les caractères de bases de la DMLA : une accumulation de lipofuscine et de drusen sous l'épithélium pigmentaire, une atrophie des photorécepteurs et une néovascularisation choroïdienne [Ambati et al., 2003]. Chez les souris contrôles, l'épithélium pigmentaire et les cellules endothéliales choroïdiennes produisent du MCP-1 sous l'influence des compléments C5a et IgG. Ce MCP-1 peut alors faciliter l'infiltration des macrophages choroïdiens dans les choroïdes âgées. Ces macrophages contrôles sont également capables de dégrader le C5 et les IgG. Un mauvais recrutement des macrophages peut dès lors conduire à une accumulation de C5a et d'IgG avec de multiples conséquences délétères [Ambati et al., 2003]. Parmi celles-ci, le C5a pourrait agir comme un agoniste du relargage de la MMP-9 [Takafuji et al., 2003] et son accumulation pourrait dès lors augmenter la présence de celui-ci au voisinage de l'épithélium pigmentaire, et de ce fait faciliter la néovascularisation choroïdienne. Il est à noter que la MMP-9 pourrait exercer des effets divers pro- ou anti- angiogènes. En effet, une déficience pour la MMP-9 chez la souris augmenterait la vitesse de croissance tumorale suite à une diminution de la production de tumstatine, un fragment angiostatique de la chaîne $\alpha 3$ du collagène de type IV. Nos résultats (article 5) montrent qu'une inhibition spécifique de la MMP-2, de la MMP-9 et de la MT1-MMP diminue fortement la néovascularisation sous-rétinienne induite.

Les résultats anatomiques décevants observés avec une thérapie dirigée exclusivement contre le VEGF165 impliquent la recherche de nouvelles voies afin de mieux appréhender l'étude de l'angiogenèse survenant dans le cadre de la lutte contre la dégénérescence maculaire liée à l'âge [Gragoudas et al., 2004].

Premièrement, dans le domaine des protéases, la compartimentalisation sub-cellulaire et le trafic de la MT1-MMP sont importants afin que cette MMP puisse jouer son rôle de protéinase. Celle-ci a d'ailleurs été récemment mise en évidence dans les cavéoles au sein de tumeurs et au sein de lignées cellulaires endothéliales [Sato et al., 1994; Nabeshima et al., 2000; Galvez et al., 2002; Galvez et al., 2001; Seiki, 2002]. Les cavéoles sont des micro-domaines riches en cholestérol impliqués dans l'internalisation de récepteurs, du recyclage de molécules vers l'appareil de Golgi et, dans la transduction de signaux [Parton et al., 1994; Conrad et al., 1995; Stahlhut and van Deurs, 2000]. Les cavéoles sont abondantes dans

les cellules endothéliales, et leur endocytose peut être régulée par l'actine du cytosquelette et par la phosphorylation [Parton et al., 1994; Smart et al., 1999; Stahlhut and van Deurs, 2000; Schlegel et al., 2001]. Ces cavéoles sont caractérisées par la présence de la cavéoline-1. Celle-ci interagit avec une variété de molécules de signalisation et des récepteurs de surface, régulant ainsi leur localisation et leur fonction [Okamoto et al., 1998; Kurzchalia and Parton, 1999]. La cavéoline-1 peut s'associer avec les intégrines $\beta 1$ et réguler ainsi la croissance cellulaire ou les fonctions cellulaires dépendantes de l'uPAR [Wary et al., 1998; Wei et al., 1999]. La MT1-MMP est présente au sein des cavéoles endothéliales. Ces cavéoles constituent une nouvelle voie d'internalisation de la MT1-MMP dans les cellules endothéliales humaines. De plus, le trafic de la MT1-MMP médié par les cavéoles régule la localisation, l'activité et la fonction de cette protéase dans les cellules endothéliales durant l'angiogenèse [Galvez et al., 2004]. L'étude des cavéoles est en mesure de nous apporter des éléments précieux dans la compréhension de l'angiogenèse et par conséquent d'ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Pour appréhender la problématique de l'angiogenèse dans sa globalité, de nouvelles approches méthodologiques sont à envisager. Dans ce contexte, la génomique devient de plus en plus le centre d'intérêt de la recherche médicale et pharmaceutique. Le microarray pourra jouer un rôle majeur pour l'avenir de l'analyse du génome à haut débit. Une seule analyse en microarray donne la capacité de mesurer avec précision les niveaux d'expression des gènes dans de nombreux échantillons. Cette technique pourra dès lors mettre en lumière les différences d'expression des gènes dans une situation physiologique comparée à une configuration pathologique, telle que la dégénérescence maculaire liée à l'âge, afin de nous procurer une vision globale du dégradome (<http://www.cancerdegradome.org>). En effet l'activité protéolytique des métalloprotéinases et des protéases à sérine n'est pas la seule impliquée dans l'angiogenèse. Il est donc extrêmement intéressant d'entamer l'étude du dégradome, qui comprend le répertoire complet des protéinases qui régulent de façon coordonnée les cellules et les tissus en vue de moduler leur environnement local [Puente et al., 2003]. Nous savons actuellement que la protéolyse péri-cellulaire est importante pour la régulation de l'activation, de la biodisponibilité et de la signalisation des récepteurs des facteurs de croissance, de l'adhésion et de la mobilité cellulaire, des mécanismes d'apoptose et de survie cellulaire, de l'angiogenèse et, est importante pour la réponse inflammatoire, ainsi que pour la surveillance immune. L'idée initiale selon laquelle les protéinases n'étaient exclusivement que des médiateurs de la destruction de tissus pathologiques est aujourd'hui

considérée comme fort simpliste. En effet, certaines protéinases possèdent des fonctions d'inhibition du développement et de progression tumorale et angiogénique. Du reste, certains inhibiteurs tels que les TIMPs ou PAI-1 peuvent agir, comme nous l'avons vu, tels des agents promoteurs de l'angiogenèse. Dans ce contexte, le dégradome est important pour trois aspects principaux. Premièrement, les protéinases cellulaires et leurs inhibiteurs sont des composants de la machinerie moléculaire des cellules malignes et de l'angiogenèse. Elles représentent donc des cibles thérapeutiques attractives. Deuxièmement, les gènes du dégradome sont des marqueurs pronostics et diagnostics de choix. Ils peuvent donc permettre d'affiner la précision des évaluations cliniques et histopathologiques conventionnelles. Troisièmement, les protéinases cellulaires sont des molécules cibles qui pourront augmenter la sensibilité de détection des tumeurs, de l'angiogenèse, et d'améliorer leur imagerie. C'est pourquoi l'approche globale du dégradome est extrêmement importante car il existe une redondance fonctionnelle entre les protéinases. Ce dédoublement fonctionnel pourrait faire échouer une stratégie thérapeutique axée sur une protéinase unique, car son rôle sera alors palier et pris en charge par une autre enzyme aux fonctions similaires.

Une fois les cibles moléculaires définies, une thérapie ciblée et précise pourra être mise en œuvre. Dans ce contexte, l'étude des cellules souches peut être très prometteuse dans le cadre de la lutte contre la dégénérescence maculaire liée à l'âge. En effet, les cellules souches hématopoïétiques dérivées de la moelle osseuse ont la capacité de se différencier et de former de multiples types tissulaires à partir d'une cellule unique. Ces cellules précurseurs de cellules endothéliales issues de la moelle osseuse ont d'ailleurs été mises en évidence dans la circulation [Asahara et al., 1997]. Il a été démontré que le recrutement de cellules précurseurs endothéliales et leur différenciation qui s'ensuit, sur des sites de lésions mécaniques rétiniennes, contribuent à la néovascularisation rétinienne dans un modèle murin [Grant et al., 2002; Jost et al., 2005]. Les cellules souches hématopoïétiques contribuent également à la néovascularisation choroïdienne dans un modèle murin induit par laser [Sengupta et al., 2003; Espinosa-Heidmann et al., 2003; Jost et al., 2005]. Ces données montrant le recrutement de ces cellules sur les sites spécifiques de néovascularisation oculaire ouvrent de nouvelles voies dans l'utilisation des cellules souches hématopoïétiques en tant que vecteurs pour la thérapie génique, ou en inhibant leur recrutement au sein de la zone néovasculaire afin de diminuer le développement de celle-ci [Sengupta et al., 2005].

En conclusion, nos travaux pourront ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques, en association avec d'autres traitements et de nouvelles technologies, dans le cadre de la lutte contre la dégénérescence maculaire liée à l'âge aussi bien sur le plan curatif que préventif.

8 Bibliographie

Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Makinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stacker SA (1998) 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* 95: 548-553

Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE, . (1994) Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 331: 1480-1487

Ambati J, Anand A, Fernandez S, Sakurai E, Lynn BC, Kuziel WA, Rollins BJ, Ambati BK (2003) An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med* 9: 1390-1397

Amemiya T, Sasamura H, Mifune M, Kitamura Y, Hirahashi J, Hayashi M, Saruta T (1999) Vascular endothelial growth factor activates MAP kinase and enhances collagen synthesis in human mesangial cells. *Kidney Int* 56: 2055-2063

Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ (1997) The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 72: 1-22

Antonetti DA, Barber AJ, Hollinger LA, Wolpert EB, Gardner TW (1999) Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. *J Biol Chem* 274: 23463-23467

Apte RS, Barreiro RA, Duh E, Volpert O, Ferguson TA (2004) Stimulation of neovascularization by the anti-angiogenic factor PEDF. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 4491-4497

Arlt M, Kopitz C, Pennington C, Watson KL, Krell HW, Bode W, Gansbacher B, Khokha R, Edwards DR, Kruger A (2002) Increase in gelatinase-specificity of matrix metalloproteinase inhibitors correlates with antimetastatic efficacy in a T-cell lymphoma model. *Cancer Res* 62: 5543-5550

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der ZR, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964-967

Augustin AJ, D'Amico DJ, Mieler WF, Schneebaum C, Beasley C (2005) Safety of posterior juxtasclear depot administration of the angiostatic cortisone anecortave acetate for treatment of subfoveal choroidal neovascularization in patients with age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 243: 9-12

Autiero M, Luttun A, Tjwa M, Carmeliet P (2003) Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *J Thromb Haemost* 1: 1356-1370

- Bacharach E, Itin A, Keshet E (1992) In vivo patterns of expression of urokinase and its inhibitor PAI-1 suggest a concerted role in regulating physiological angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10686-10690
- Bacharach E, Itin A, Keshet E (1998) Apposition-dependent induction of plasminogen activator inhibitor type 1 expression: a mechanism for balancing pericellular proteolysis during angiogenesis. *Blood* 92: 939-945
- Bajou K, Maillard C, Jost M, Lijnen HR, Gils A, Declerck PJ, Carmeliet P, Foidart JM, Noel A (2004) Host-derived Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) concentration is critical for in vivo tumoral angiogenesis and growth. *Oncogene* in press:
- Bajou K, Masson V, Gerard RD, Schmitt PM, Albert V, Praus M, Lund LR, Frandsen TL, Brunner N, Dano K, Fusenig NE, Weidle U, Carmeliet G, Loskutoff D, Collen D, Carmeliet P, Foidart JM, Noel A (2001) The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin. Implications for antiangiogenic strategies. *J Cell Biol* 152: 777-784
- Bajou K, Noel A, Gerard RD, Masson V, Brunner N, Holst-Hansen C, Skobe M, Fusenig NE, Carmeliet P, Collen D, Foidart JM (1998) Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med* 4: 923-928
- Balbin M, Fueyo A, Tester AM, Pendas AM, Pitiot AS, Astudillo A, Overall CM, Shapiro SD, Lopez-Otin C (2003) Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. *Nat Genet* 35: 252-257
- Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D (1996) Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 87: 3336-3343
- Behringer RR, Crotty DA, Tennyson VM, Brinster RL, Palmiter RD, Wolgemuth DJ (1993) Sequences 5' of the homeobox of the Hox-1.4 gene direct tissue-specific expression of lacZ during mouse development. *Development* 117: 823-833
- Bein K, Simons M (2000) Thrombospondin type 1 repeats interact with matrix metalloproteinase 2. Regulation of metalloproteinase activity. *J Biol Chem* 275: 32167-32173
- Bellomo D, Headrick JP, Silins GU, Paterson CA, Thomas PS, Gartside M, Mould A, Cahill MM, Tonks ID, Grimmond SM, Townson S, Wells C, Little M, Cummings MC, Hayward NK, Kay GF (2000) Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (Vegfb) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res* 86: E29-E35
- BenEzra D, Griffin BW, Maftzir G, Sharif NA, Clark AF (1997) Topical formulations of novel angiostatic steroids inhibit rabbit corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 1954-1962
- Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E (1999) Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 103: 159-165

Bergers G, Benjamin LE (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3: 401-410

Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D (2000) Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2: 737-744

Berglin L, Sarman S, van dP, I, Steen B, Ming Y, Itohara S, Seregard S, Kvanta A (2003) Reduced choroidal neovascular membrane formation in matrix metalloproteinase-2-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 403-408

Berman M, Winthrop S, Ausprunk D, Rose J, Langer R, Gage J (1982) Plasminogen activator (urokinase) causes vascularization of the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 22: 191-199

Binnema DJ, Dooijewaard G, Turion PN (1991) An analysis of the activators of single-chain urokinase-type plasminogen activator (scu-PA) in the dextran sulphate euglobulin fraction of normal plasma and of plasmas deficient in factor XII and prekallikrein. *Thromb Haemost* 65: 144-148

Blaauwgeers HG, Holtkamp GM, Rutten H, Witmer AN, Koolwijk P, Partanen TA, Alitalo K, Kroon ME, Kijlstra A, van Hinsbergh VW, Schlingemann RO (1999) Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *Am J Pathol* 155: 421-428

Blasi F (1997) uPA, uPAR, PAI-1: key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways? *Immunol Today* 18: 415-417

Blasi F (1999a) Proteolysis, cell adhesion, chemotaxis, and invasiveness are regulated by the u-PA-u-PAR-PAI-1 system. *Thromb Haemost* 82: 298-304

Blasi F (1999b) The urokinase receptor. A cell surface, regulated chemokine. *APMIS* 107: 96-101

Blasi F, Carmeliet P (2002) uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 932-943

Blei F, Wilson EL, Mignatti P, Rifkin DB (1993) Mechanism of action of angiostatic steroids: suppression of plasminogen activator activity via stimulation of plasminogen activator inhibitor synthesis. *J Cell Physiol* 155: 568-578

Bohm M, Wieland I, Schutze K, Rubben H (1997) Microbeam MOMENT: non-contact laser microdissection of membrane-mounted native tissue. *Am J Pathol* 151: 63-67

Brew K, Dinakarandian D, Nagase H (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477: 267-283

Brooks PC (1996) Role of integrins in angiogenesis. *Eur J Cancer* 32A: 2423-2429

Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA (1994a) Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* 264: 569-571

- Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresh DA (1994b) Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79: 1157-1164
- Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresh DA (1996) Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* 85: 683-693
- Bugge TH, Kombrinck KW, Flick MJ, Daugherty CC, Danton MJ, Degen JL (1996) Loss of fibrinogen rescues mice from the pleiotropic effects of plasminogen deficiency. *Cell* 87: 709-719
- Calabrese EJ (2001) Estrogen and related compounds: biphasic dose responses. *Crit Rev Toxicol* 31: 503-515
- Cao R, Brakenhielm E, Pawliuk R, Wariaro D, Post MJ, Wahlberg E, Leboulch P, Cao Y (2003) Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat Med* 9: 604-613
- Cao Y, Linden P, Shima D, Browne F, Folkman J (1996) In vivo angiogenic activity and hypoxia induction of heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. *J Clin Invest* 98: 2507-2511
- Carmeliet P (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6: 389-395
- Carmeliet P (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9: 653-660
- Carmeliet P, Collen D (1998) Development and disease in proteinase-deficient mice: role of the plasminogen, matrix metalloproteinase and coagulation system. *Thromb Res* 91: 255-285
- Carmeliet P, Collen D (2000) Transgenic mouse models in angiogenesis and cardiovascular disease. *J Pathol* 190: 387-405
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380: 435-439
- Carmeliet P, Jain RK (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407: 249-257
- Carmeliet P, Kieckens L, Schoonjans L, Ream B, van Nuffelen A, Prendergast G, Cole M, Bronson R, Collen D, Mulligan RC (1993a) Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. I. Generation by homologous recombination and characterization. *J Clin Invest* 92: 2746-2755
- Carmeliet P, Moons L, Dewerchin M, Rosenberg S, Herbert JM, Lupu F, Collen D (1998) Receptor-independent role of urokinase-type plasminogen activator in pericellular plasmin and matrix metalloproteinase proteolysis during vascular wound healing in mice. *J Cell Biol* 140: 233-245
- Carmeliet P, Moons L, Lutun A, Vincenti V, Compennolle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T, DiPalma T, Dewerchin M, Noel A, Stalmans I, Barra A,

- Blacher S, Vandendriessche T, Ponten A, Eriksson U, Plate KH, Foidart JM, Schaper W, Charnock-Jones DS, Hicklin DJ, Herbert JM, Collen D, Persico MG (2001) Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 7: 575-583
- Carmeliet P, Ng YS, Nuyens D, Theilmeier G, Brusselmans K, Cornelissen I, Ehler E, Kakkar VV, Stalmans I, Mattot V, Perriard JC, Dewerchin M, Flameng W, Nagy A, Lupu F, Moons L, Collen D, D'Amore PA, Shima DT (1999) Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med* 5: 495-502
- Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, De Vos R, van den Oord JJ, Collen D, Mulligan RC (1994) Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* 368: 419-424
- Carmeliet P, Stassen JM, Schoonjans L, Ream B, van den Oord JJ, De Mol M, Mulligan RC, Collen D (1993b) Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. II. Effects on hemostasis, thrombosis, and thrombolysis. *J Clin Invest* 92: 2756-2760
- Carrasquillo KG, Ricker JA, Rigas IK, Miller JW, Gragoudas ES, Adamis AP (2003) Controlled delivery of the anti-VEGF aptamer EYE001 with poly(lactic-co-glycolic)acid microspheres. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 290-299
- Chang C, Werb Z (2001) The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 11: S37-S43
- Chapman HA (1997) Plasminogen activators, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. *Curr Opin Cell Biol* 9: 714-724
- Cheresh DA, Stupack DG (2002) Integrin-mediated death: an explanation of the integrin-knockout phenotype? *Nat Med* 8: 193-194
- Clark AF (1997) AL-3789: a novel ophthalmic angiostatic steroid. *Exp Opin Invest Drugs* 6: 1867-1877
- Clauss M, Sunderkotter C, Sveinbjornsson B, Hippenstiel S, Willuweit A, Marino M, Haas E, Seljelid R, Scheurich P, Suttorp N, Grell M, Risau W (2001) A permissive role for tumor necrosis factor in vascular endothelial growth factor-induced vascular permeability. *Blood* 97: 1321-1329
- Collen D, Lijnen HR (1991) Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 78: 3114-3124
- Colman RW, Jameson BA, Lin Y, Johnson D, Mousa SA (2000) Domain 5 of high molecular weight kininogen (kininostatin) down-regulates endothelial cell proliferation and migration and inhibits angiogenesis. *Blood* 95: 543-550
- Colorado PC, Torre A, Kamphaus G, Maeshima Y, Hopfer H, Takahashi K, Volk R, Zamborsky ED, Herman S, Sarkar PK, Ericksen MB, Dhanabal M, Simons M, Post M, Kufe DW, Weichselbaum RR, Sukhatme VP, Kalluri R (2000) Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen. *Cancer Res* 60: 2520-2526

- Comi P, Chiaramonte R, Maier JA (1995) Senescence-dependent regulation of type 1 plasminogen activator inhibitor in human vascular endothelial cells. *Exp Cell Res* 219: 304-308
- Conrad PA, Smart EJ, Ying YS, Anderson RG, Bloom GS (1995) Caveolin cycles between plasma membrane caveolae and the Golgi complex by microtubule-dependent and microtubule-independent steps. *J Cell Biol* 131: 1421-1433
- Cornelius LA, Nehring LC, Harding E, Bolanowski M, Welgus HG, Kobayashi DK, Pierce RA, Shapiro SD (1998) Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J Immunol* 161: 6845-6852
- Couffinhal T, Dufourcq P, Daret D, Duplaa C (2001) [The mechanisms of angiogenesis. Medical and therapeutic applications]. *Rev Med Interne* 22: 1064-1082
- Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z (2000) MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 103: 481-490
- Czekay RP, Aertgeerts K, Curriden SA, Loskutoff DJ (2003) Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins. *J Cell Biol* 160: 781-791
- Czekay RP, Loskutoff DJ (2004) Unexpected role of plasminogen activator inhibitor 1 in cell adhesion and detachment. *Exp Biol Med (Maywood)* 229: 1090-1096
- D'Amico DJ, Goldberg MF, Hudson H, Jerdan JA, Krueger DS, Luna SP, Robertson SM, Russell S, Singerman L, Slakter JS, Yannuzzi L, Zilliox P (2003a) Anecortave acetate as monotherapy for treatment of subfoveal neovascularization in age-related macular degeneration: twelve-month clinical outcomes. *Ophthalmology* 110: 2372-2383
- D'Amico DJ, Goldberg MF, Hudson H, Jerdan JA, Krueger S, Luna S, Robertson SM, Russell S, Singerman L, Slakter JS, Sullivan EK, Yannuzzi L, Zilliox P (2003b) Anecortave acetate as monotherapy for the treatment of subfoveal lesions in patients with exudative age-related macular degeneration (AMD): interim (month 6) analysis of clinical safety and efficacy. *Retina* 23: 14-23
- Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N (1994) The p53 tumor suppressor gene inhibits angiogenesis by stimulating the production of thrombospondin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59: 483-489
- Das A, McGuire PG, Eriqat C, Ober RR, DeJuan E Jr, Williams GA, McLamore A, Biswas J, Johnson DW (1999a) Human diabetic neovascular membranes contain high levels of urokinase and metalloproteinase enzymes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 809-813
- Das A, McLamore A, Song W, McGuire PG (1999b) Retinal neovascularization is suppressed with a matrix metalloproteinase inhibitor. *Arch Ophthalmol* 117: 498-503
- Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W, Bouck NP (1999) Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 285: 245-248
- DeFaller JM, Clark AF (2000) A new pharmacological treatment for angiogenesis. Taylor HR (ed) pp 159-181. Kugler Publication: The Hague

- Degryse B, Neels JG, Czekay RP, Aertgeerts K, Kamikubo Y, Loskutoff DJ (2004) The low density lipoprotein receptor-related protein is a motogenic receptor for plasminogen activator inhibitor-1. *J Biol Chem* 279: 22595-22604
- Deng G, Curriden SA, Wang S, Rosenberg S, Loskutoff DJ (1996) Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release? *J Cell Biol* 134: 1563-1571
- Deryugina EI, Ratnikov B, Monosov E, Postnova TI, DiScipio R, Smith JW, Strongin AY (2001) MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin α v β 3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp Cell Res* 263: 209-223
- Deryugina EI, Soroceanu L, Strongin AY (2002) Up-regulation of vascular endothelial growth factor by membrane-type 1 matrix metalloproteinase stimulates human glioma xenograft growth and angiogenesis. *Cancer Res* 62: 580-588
- Devy L, Blacher S, Grignet-Debrus C, Bajou K, Masson V, Gerard RD, Gils A, Carmeliet G, Carmeliet P, Declerck PJ, Noel A, Foidart JM (2002) The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. *FASEB J* 16: 147-154
- Dewerchin M, Nuffelen AV, Wallays G, Bouche A, Moons L, Carmeliet P, Mulligan RC, Collen D (1996) Generation and characterization of urokinase receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 97: 870-878
- Diaz VM, Planaguma J, Thomson TM, Reventos J, Paciucci R (2002) Tissue plasminogen activator is required for the growth, invasion, and angiogenesis of pancreatic tumor cells. *Gastroenterology* 122: 806-819
- Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, Kulkarni AB, Karlsson S, Akhurst RJ (1995) Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor- β 1 knock out mice. *Development* 121: 1845-1854
- DiSalvo J, Bayne ML, Conn G, Kwok PW, Trivedi PG, Soderman DD, Palisi TM, Sullivan KA, Thomas KA (1995) Purification and characterization of a naturally occurring vascular endothelial growth factor.placenta growth factor heterodimer. *J Biol Chem* 270: 7717-7723
- Dong Z, Kumar R, Yang X, Fidler IJ (1997) Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell* 88: 801-810
- Duffy MJ (2004) The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. *Curr Pharm Des* 10: 39-49
- Dvorak HF (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315: 1650-1659
- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 146: 1029-1039
- Edwards DR (2001) In *Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy*, Clendeninn NJ&AK (ed) pp 67-84.

- Egeblad M, Werb Z (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2: 161-174
- Eliceiri BP, Cheresh DA (1999) The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest* 103: 1227-1230
- Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA (1996) Laser capture microdissection. *Science* 274: 998-1001
- Engsig MT, Chen QJ, Vu TH, Pedersen AC, Therkidsen B, Lund LR, Henriksen K, Lenhard T, Foged NT, Werb Z, Delaisse JM (2000) Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *J Cell Biol* 151: 879-889
- Espinosa-Heidmann DG, Caicedo A, Hernandez EP, Csaky KG, Cousins SW (2003) Bone marrow-derived progenitor cells contribute to experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 4914-4919
- Espinosa-Heidmann DG, Suner I, Hernandez EP, Frazier WD, Csaky KG, Cousins SW (2002) Age as an independent risk factor for severity of experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 1567-1573
- EyeTech Study Group (2002) Preclinical and phase 1A clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age-related macular degeneration. *Retina* 22: 143-152
- EyeTech Study Group (2003) Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: phase II study results. *Ophthalmology* 110: 979-986
- Ezekowitz RA, Mulliken JB, Folkman J (1992) Interferon alfa-2a therapy for life-threatening hemangiomas of infancy. *N Engl J Med* 326: 1456-1463
- Farnebo F, Piehl F, Lagercrantz J (1999) Restricted expression pattern of vegf-d in the adult and fetal mouse: high expression in the embryonic lung. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 891-894
- Ferrara N (1999) Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int* 56: 794-814
- Ferreras M, Felbor U, Lenhard T, Olsen BR, Delaisse J (2000) Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Lett* 486: 247-251
- Fett JW, Strydom DJ, Lobb RR, Alderman EM, Bethune JL, Riordan JF, Vallee BL (1985) Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry* 24: 5480-5486
- Fini ME, Cook JR, Mohan R, Brinckerhoff CE (1998) Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. In *Matrix metalloproteinases*, Parks WC, Mechan RP (eds) pp 300-339. San Diego

- Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ (2000) Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 156: 361-381
- Folkman J (1996) Tumor angiogenesis and tissue factor. *Nat Med* 2: 167-168
- Folkman J, D'Amore PA (1996) Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell* 87: 1153-1155
- Folkman J, Klagsbrun M, Sasse J, Wadzinski M, Ingber D, Vlodavsky I (1988) A heparin-binding angiogenic protein--basic fibroblast growth factor--is stored within basement membrane. *Am J Pathol* 130: 393-400
- Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML (1995) Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376: 66-70
- Friedlander M, Theesfeld CL, Sugita M, Fruttiger M, Thomas MA, Chang S, Cheresh DA (1996) Involvement of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 in ocular neovascular diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9764-9769
- Gale NW, Thurston G, Davis S, Wiegand SJ, Holash J, Rudge JS, Yancopoulos GD (2002) Complementary and coordinated roles of the VEGFs and angiopoietins during normal and pathologic vascular formation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 67: 267-273
- Galvez BG, Matias-Roman S, Albar JP, Sanchez-Madrid F, Arroyo AG (2001) Membrane type 1-matrix metalloproteinase is activated during migration of human endothelial cells and modulates endothelial motility and matrix remodeling. *J Biol Chem* 276: 37491-37500
- Galvez BG, Matias-Roman S, Yanez-Mo M, Sanchez-Madrid F, Arroyo AG (2002) ECM regulates MT1-MMP localization with beta1 or alphavbeta3 integrins at distinct cell compartments modulating its internalization and activity on human endothelial cells. *J Cell Biol* 159: 509-521
- Galvez BG, Matias-Roman S, Yanez-Mo M, Vicente-Manzanares M, Sanchez-Madrid F, Arroyo AG (2004) Caveolae are a novel pathway for membrane-type 1 matrix metalloproteinase traffic in human endothelial cells. *Mol Biol Cell* 15: 678-687
- Gately S, Twardowski P, Stack MS, Cundiff DL, Grella D, Castellino FJ, Enghild J, Kwaan HC, Lee F, Kramer RA, Volpert O, Bouck N, Soff GA (1997) The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10868-10872
- Gatto C, Rieppi M, Borsotti P, Innocenti S, Ceruti R, Drudis T, Scanziani E, Casazza AM, Tarabozzi G, Giavazzi R (1999) BAY 12-9566, a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with antiangiogenic activity. *Clin Cancer Res* 5: 3603-3607
- Gerard RD, Meidell RS (1995) Adenovirus vectors. In *In DNA cloning: A Practical Approach: Mammalian Systems*, Hames BD, Glover D (eds) pp 285-307. Oxford University Press: Oxford
- Gilbert RE, Vranes D, Berka JL, Kelly DJ, Cox A, Wu LL, Stacker SA, Cooper ME (1998) Vascular endothelial growth factor and its receptors in control and diabetic rat eyes. *Lab Invest* 78: 1017-1027

- Gille J, Reisinger K, Westphal-Varghese B, Kaufmann R (2001) Decreased mRNA stability as a mechanism of glucocorticoid-mediated inhibition of vascular endothelial growth factor gene expression by cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 117: 1581-1587
- Gils A, Knockaert I, Declerck PJ (1996) Substrate behavior of plasminogen activator inhibitor-1 is not associated with a lack of insertion of the reactive site loop. *Biochemistry* 35: 7474-7481
- Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74: 111-122
- Gorrin-Rivas MJ, Arai S, Furutani M, Mizumoto M, Mori A, Hanaki K, Maeda M, Furuyama H, Kondo Y, Imamura M (2000) Mouse macrophage metalloelastase gene transfer into a murine melanoma suppresses primary tumor growth by halting angiogenesis. *Clin Cancer Res* 6: 1647-1654
- Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET, Jr., Feinsod M, Guyer DR (2004) Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 351: 2805-2816
- Grant MB, Ellis EA, Caballero S, Mames RN (1996) Plasminogen activator inhibitor-1 overexpression in nonproliferative diabetic retinopathy. *Exp Eye Res* 63: 233-244
- Grant MB, Guay C (1991) Plasminogen activator production by human retinal endothelial cells of nondiabetic and diabetic origin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 53-64
- Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GA, Guthrie SM, Mames RN, Byrne BJ, Vaught T, Spoerri PE, Peck AB, Scott EW (2002) Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 8: 607-612
- Gross J, Lapiere CM (1962) Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48: 1014-1022
- Grossniklaus HE, Cingle KA, Yoon YD, Ketkar N, L'Hernault N, Brown S (2000) Correlation of histologic 2-dimensional reconstruction and confocal scanning laser microscopic imaging of choroidal neovascularization in eyes with age-related maculopathy. *Arch Ophthalmol* 118: 625-629
- Gutierrez LS, Schulman A, Brito-Robinson T, Noria F, Ploplis VA, Castellino FJ (2000) Tumor development is retarded in mice lacking the gene for urokinase-type plasminogen activator or its inhibitor, plasminogen activator inhibitor-1. *Cancer Res* 60: 5839-5847
- Hackett SF, Campochiaro PA (1993) Modulation of plasminogen activator inhibitor-1 and urokinase in retinal pigmented epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 2055-2061
- Hall SW, Humphries JE, Gonias SL (1991) Inhibition of cell surface receptor-bound plasmin by alpha 2-antiplasmin and alpha 2-macroglobulin. *J Biol Chem* 266: 12329-12336
- Hamano Y, Zeisberg M, Sugimoto H, Lively JC, Maeshima Y, Yang C, Hynes RO, Werb Z, Sudhakar A, Kalluri R (2003) Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaVbeta3 integrin. *Cancer Cell* 3: 589-601

- Hammes HP, Brownlee M, Jonczyk A, Sutter A, Preissner KT (1996) Subcutaneous injection of a cyclic peptide antagonist of vitronectin receptor-type integrins inhibits retinal neovascularization. *Nat Med* 2: 529-533
- Hanahan D, Folkman J (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-364
- Hattenbach LO, Allers A, Gumbel HO, Scharrer I, Koch FH (1999) Vitreous concentrations of TPA and plasminogen activator inhibitor are associated with VEGF in proliferative diabetic vitreoretinopathy. *Retina* 19: 383-389
- Hawighorst T, Skobe M, Streit M, Hong YK, Velasco P, Brown LF, Riccardi L, Lange-Asschenfeldt B, Detmar M (2002) Activation of the tie2 receptor by angiopoietin-1 enhances tumor vessel maturation and impairs squamous cell carcinoma growth. *Am J Pathol* 160: 1381-1392
- Heier, J. S., Sy, J. P., McCluskey, E. R., and the rhuFAb V2 Study Group. RhuFAb V2 in Wet ARMD- 6 months continued improvement following multiple intravitreal injections. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003.
Ref Type: Abstract
- Hekman CM, Loskutoff DJ (1985) Endothelial cells produce a latent inhibitor of plasminogen activators that can be activated by denaturants. *J Biol Chem* 260: 11581-11587
- Heldin CH, Westermark B (1999) Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 79: 1283-1316
- Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE (2003) Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* 3: 411-421
- Heymans S, Luttun A, Nuyens D, Theilmeier G, Creemers E, Moons L, Dyspersin GD, Cleutjens JP, Shipley M, Angellilo A, Levi M, Nube O, Baker A, Keshet E, Lupu F, Herbert JM, Smits JF, Shapiro SD, Baes M, Borgers M, Collen D, Daemen MJ, Carmeliet P (1999) Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med* 5: 1135-1142
- Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR, Weiss SJ (1998) Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell* 95: 365-377
- Hiratsuka S, Maru Y, Okada A, Seiki M, Noda T, Shibuya M (2001) Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis. *Cancer Res* 61: 1207-1213
- Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M (1998) Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 9349-9354
- Hirschi KK, Rohovsky SA, Beck LH, Smith SR, D'Amore PA (1999) Endothelial cells modulate the proliferation of mural cell precursors via platelet-derived growth factor-BB and heterotypic cell contact. *Circ Res* 84: 298-305

Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA, Mankani M, Robey PG, Poole AR, Pidoux I, Ward JM, Birkedal-Hansen H (1999) MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* 99: 81-92

Husain, D, Kim, I, Gauthier, D, Ezra, E, Tsilimbaris, M. K., Conolly, E., Lane, A. M., Michaud, N, Gragoudas, E. S., O'Neill, C. A., and Miller, J. W. Safety and efficacy of intravitreal injection of rhuFab VEGF V2 in combination with verteporfin PDT experimental choroidal neovascularization. Retina Congress, San Francisco , 244. 2002.
Ref Type: Abstract

Hyman L, Neborsky R (2002) Risk factors for age-related macular degeneration: an update. *Curr Opin Ophthalmol* 13: 171-175

Itoh T, Matsuda H, Tanioka M, Kuwabara K, Itohara S, Suzuki R (2002) The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis. *J Immunol* 169: 2643-2647

Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, Itohara S (1998) Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* 58: 1048-1051

Iyer S, Acharya KR (2002) Role of placenta growth factor in cardiovascular health. *Trends Cardiovasc Med* 12: 128-134

Jackson C, Nguyen M, Arkell J, Sambrook P (2001) Selective matrix metalloproteinase (MMP) inhibition in rheumatoid arthritis--targetting gelatinase A activation. *Inflamm Res* 50: 183-186

Janzer RC, Raff MC (1987) Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325: 253-257

Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE (2002) Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene* 21: 2245-2252

Jin M, Kashiwagi K, Iizuka Y, Tanaka Y, Imai M, Tsukahara S (2001) Matrix metalloproteinases in human diabetic and nondiabetic vitreous. *Retina* 21: 28-33

Johnson MD, Kim HR, Chesler L, Tsao-Wu G, Bouck N, Polverini PJ (1994) Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase. *J Cell Physiol* 160: 194-202

Josko J, Mazurek M (2004) Transcription factors having impact on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in angiogenesis. *Med Sci Monit* 10: RA89-RA98

Jost M, Maillard C, Lambert V, Tjwa M, Blaise P, Bajou K, Blacher S, Motte P, Humblet C, Defresne MP, Thiry M, Frankenne F, Gothot A, Carmeliet P, Rakic JM, Foidart JM, Noel A (2005) Plasminogen activator inhibitor type I (PAI-1) controls bone marrow-dependent an independent vascularization. *J Cell Biol* submitted

Kadonosono K, Yazama F, Itoh N, Sawada H, Ohno S (1999) Expression of matrix metalloproteinase-7 in choroidal neovascular membranes in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 128: 382-384

- Kalluri R (2003) Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 3: 422-433
- Kamei M, Hollyfield JG (1999) TIMP-3 in Bruch's membrane: changes during aging and in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 2367-2375
- Kamphaus GD, Colorado PC, Panka DJ, Hopfer H, Ramchandran R, Torre A, Maeshima Y, Mier JW, Sukhatme VP, Kalluri R (2000) Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Biol Chem* 275: 1209-1215
- Kao RY, Jenkins JL, Olson KA, Key ME, Fett JW, Shapiro R (2002) A small-molecule inhibitor of the ribonucleolytic activity of human angiogenin that possesses antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 10066-10071
- Kaplan HJ, Leibole MA, Tezel T, Ferguson TA (1999) Fas ligand (CD95 ligand) controls angiogenesis beneath the retina. *Nat Med* 5: 292-297
- Kearney JB, Ambler CA, Monaco KA, Johnson N, Rapoport RG, Bautch VL (2002) Vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 negatively regulates developmental blood vessel formation by modulating endothelial cell division. *Blood* 99: 2397-2407
- Kim YM, Jang JW, Lee OH, Yeon J, Choi EY, Kim KW, Lee ST, Kwon YG (2000) Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase. *Cancer Res* 60: 5410-5413
- Kjoller L, Kanse SM, Kirkegaard T, Rodenburg KW, Ronne E, Goodman SL, Preissner KT, Ossowski L, Andreasen PA (1997) Plasminogen activator inhibitor-1 represses integrin- and vitronectin-mediated cell migration independently of its function as an inhibitor of plasminogen activation. *Exp Cell Res* 232: 420-429
- Koolwijk P, Sidenius N, Peters E, Sier CF, Hanemaaijer R, Blasi F, van Hinsbergh VW (2001) Proteolysis of the urokinase-type plasminogen activator receptor by metalloproteinase-12: implication for angiogenesis in fibrin matrices. *Blood* 97: 3123-3131
- Korhonen J, Polvi A, Partanen J, Alitalo K (1994) The mouse tie receptor tyrosine kinase gene: expression during embryonic angiogenesis. *Oncogene* 9: 395-403
- Kosano H, Okano T, Katsura Y, Noritake M, Kado S, Matsuoka T, Nishigori H (1999) ProMMP-9 (92 kDa gelatinase) in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Life Sci* 64: 2307-2315
- Krzystolik MG, Afshari MA, Adamis AP, Gaudreault J, Gragoudas ES, Michaud NA, Li W, Connolly E, O'Neill CA, Miller JW (2002) Prevention of experimental choroidal neovascularization with intravitreal anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment. *Arch Ophthalmol* 120: 338-346
- Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, Kaipainen A, Jeltsch M, Joukov V, Alitalo K (1996) VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* 122: 3829-3837
- Kurzchalia TV, Parton RG (1999) Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol* 11: 424-431

- Kvanta A, Algvere PV, Berglin L, Seregard S (1996) Subfoveal fibrovascular membranes in age-related macular degeneration express vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 1929-1934
- Kvanta A, Shen WY, Sarman S, Seregard S, Steen B, Rakoczy E (2000) Matrix metalloproteinase (MMP) expression in experimental choroidal neovascularization. *Curr Eye Res* 21: 684-690
- Lambert V, Munaut C, Jost M, Noel A, Werb Z, Foidart JM, Rakic JM (2002) Matrix metalloproteinase-9 contributes to choroidal neovascularization. *Am J Pathol* 161: 1247-1253
- Lambert V, Munaut C, Noel A, Frankenne F, Bajou K, Gerard R, Carmeliet P, Defresne MP, Foidart JM, Rakic JM (2001) Influence of plasminogen activator inhibitor type 1 on choroidal neovascularization. *FASEB J* 15: 1021-1027
- Lawrence DA, Pircher R, Jullien P (1985) Conversion of a high molecular weight latent beta-TGF from chicken embryo fibroblasts into a low molecular weight active beta-TGF under acidic conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 133: 1026-1034
- Lee J, Gray A, Yuan J, Luoh SM, Avraham H, Wood WI (1996) Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 1988-1992
- Lee SL, Dickson RB, Lin CY (2000) Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease. *J Biol Chem* 275: 36720-36725
- Lein M, Jung K, Ortel B, Stephan C, Rothaug W, Juchem R, Johannsen M, Deger S, Schnorr D, Loening S, Krell HW (2002) The new synthetic matrix metalloproteinase inhibitor (Roche 28-2653) reduces tumor growth and prolongs survival in a prostate cancer standard rat model. *Oncogene* 21: 2089-2096
- Lelongt B, Bengatta S, Delauche M, Lund LR, Werb Z, Ronco PM (2001) Matrix metalloproteinase 9 protects mice from anti-glomerular basement membrane nephritis through its fibrinolytic activity. *J Exp Med* 193: 793-802
- Leontovich AA, Zhang J, Shimokawa K, Nagase H, Sarras MP, Jr. (2000) A novel hydra matrix metalloproteinase (HMMP) functions in extracellular matrix degradation, morphogenesis and the maintenance of differentiated cells in the foot process. *Development* 127: 907-920
- Lepage T, Gache C (1990) Early expression of a collagenase-like hatching enzyme gene in the sea urchin embryo. *EMBO J* 9: 3003-3012
- Li H, Lindenmeyer F, Grenet C, Opolon P, Menashi S, Soria C, Yeh P, Perricaudet M, Lu H (2001) AdTIMP-2 inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis, and prolongs survival in mice. *Hum Gene Ther* 12: 515-526
- Liekens S, De Clercq E, Neyts J (2001) Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 61: 253-270

- Lijnen HR (2001) Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost* 86: 324-333
- Lijnen HR (2002) Matrix metalloproteinases and cellular fibrinolytic activity. *Biochemistry (Mosc)* 67: 92-98
- Lijnen HR, Okada K, Matsuo O, Collen D, Dewerchin M (1999) Alpha2-antiplasmin gene deficiency in mice is associated with enhanced fibrinolytic potential without overt bleeding. *Blood* 93: 2274-2281
- Lindahl P, Johansson BR, Leveen P, Betsholtz C (1997) Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 277: 242-245
- Liu G, Shuman MA, Cohen RL (1995) Co-expression of urokinase, urokinase receptor and PAI-1 is necessary for optimum invasiveness of cultured lung cancer cells. *Int J Cancer* 60: 501-506
- Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT (2002) Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest* 110: 625-632
- Lopez PF, Grossniklaus HE, Lambert HM, Aaberg TM, Capone A, Jr., Sternberg P, Jr., L'Hernault N (1991) Pathologic features of surgically excised subretinal neovascular membranes in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 112: 647-656
- Lopez PF, Lambert HM, Grossniklaus HE, Sternberg P, Jr. (1993) Well-defined subfoveal choroidal neovascular membranes in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 100: 415-422
- Loskutoff DJ, Curriden SA, Hu G, Deng G (1999) Regulation of cell adhesion by PAI-1. *APMIS* 107: 54-61
- Luna J, Tobe T, Mousa SA, Reilly TM, Campochiaro PA (1996) Antagonists of integrin alpha v beta 3 inhibit retinal neovascularization in a murine model. *Lab Invest* 75: 563-573
- Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajjar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S (2001) Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 7: 1194-1201
- Lyons RM, Keski-Oja J, Moses HL (1988) Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol* 106: 1659-1665
- Lyttle DJ, Fraser KM, Fleming SB, Mercer AA, Robinson AJ (1994) Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol* 68: 84-92
- Maeshima Y, Colorado PC, Kalluri R (2000) Two RGD-independent alpha v beta 3 integrin binding sites on tumstatin regulate distinct anti-tumor properties. *J Biol Chem* 275: 23745-23750

- Maeshima Y, Manfredi M, Reimer C, Holthaus KA, Hopfer H, Chandamuri BR, Kharbanda S, Kalluri R (2001a) Identification of the anti-angiogenic site within vascular basement membrane-derived tumstatin. *J Biol Chem* 276: 15240-15248
- Maeshima Y, Yerramalla UL, Dhanabal M, Holthaus KA, Barbashov S, Kharbanda S, Reimer C, Manfredi M, Dickerson WM, Kalluri R (2001b) Extracellular matrix-derived peptide binds to $\alpha(v)\beta(3)$ integrin and inhibits angiogenesis. *J Biol Chem* 276: 31959-31968
- Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG (1991) Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 9267-9271
- Maidment JM, Moore D, Murphy GP, Murphy G, Clark IM (1999) Matrix metalloproteinase homologues from *Arabidopsis thaliana*. Expression and activity. *J Biol Chem* 274: 34706-34710
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD (1997) Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277: 55-60
- Majid MA, Smith VA, Easty DL, Baker AH, Newby AC (2002) Sorsby's fundus dystrophy mutant tissue inhibitors of metalloproteinase-3 induce apoptosis of retinal pigment epithelial and MCF-7 cells. *FEBS Lett* 529: 281-285
- Majka S, McGuire P, Colombo S, Das A (2001) The balance between proteinases and inhibitors in a murine model of proliferative retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 210-215
- Manes S, Llorente M, Lacalle RA, Gomez-Mouton C, Kremer L, Mira E, Martinez A (1999) The matrix metalloproteinase-9 regulates the insulin-like growth factor-triggered autocrine response in DU-145 carcinoma cells. *J Biol Chem* 274: 6935-6945
- Maquoi E, Sounni NE, Devy L, Olivier F, Frankenne F, Krell HW, Grams F, Foidart JM, Noel A (2004) Anti-invasive, antitumoral, and antiangiogenic efficacy of a pyrimidine-2,4,6-trione derivative, an orally active and selective matrix metalloproteinases inhibitor. *Clin Cancer Res* 10: 4038-4047
- Marino MW, Dunn A, Grail D, Inglese M, Noguchi Y, Richards E, Jungbluth A, Wada H, Moore M, Williamson B, Basu S, Old LJ (1997) Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 8093-8098
- Martin DC, Sanchez-Sweatman OH, Ho AT, Inderdeo DS, Tsao MS, Khokha R (1999) Transgenic TIMP-1 inhibits simian virus 40 T antigen-induced hepatocarcinogenesis by impairment of hepatocellular proliferation and tumor angiogenesis. *Lab Invest* 79: 225-234
- Masos T, Dan JA, Miskin R (2000) Plasminogen activator inhibitor-1 mRNA is localized in the ciliary epithelium of the rodent eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 1006-1011
- Matsuzaki H, Tamatani M, Yamaguchi A, Namikawa K, Kiyama H, Vitek MP, Mitsuda N, Tohyama M (2001) Vascular endothelial growth factor rescues hippocampal neurons from glutamate-induced toxicity: signal transduction cascades. *FASEB J* 15: 1218-1220

McDonald DM, Munn L, Jain RK (2000) Vasculogenic mimicry: how convincing, how novel, and how significant? *Am J Pathol* 156: 383-388

McMahon GA, Petitclerc E, Stefansson S, Smith E, Wong MK, Westrick RJ, Ginsburg D, Brooks PC, Lawrence DA (2001) Plasminogen activator inhibitor-1 regulates tumor growth and angiogenesis. *J Biol Chem* 276: 33964-33968

McNatt LG, Weimer L, Yanni J, Clark AF (1999) Angiostatic activity of steroids in the chick embryo CAM and rabbit cornea models of neovascularization. *J Ocul Pharmacol Ther* 15: 413-423

Merwin JR, Newman W, Beall LD, Tucker A, Madri J (1991) Vascular cells respond differentially to transforming growth factors beta 1 and beta 2 in vitro. *Am J Pathol* 138: 37-51

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

Miller DL, Ortega S, Bashayan O, Basch R, Basilico C (2000) Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice. *Mol Cell Biol* 20: 2260-2268

Miller JW, Stinson WG, Folkman J (1993) Regression of experimental iris neovascularization with systemic alpha-interferon. *Ophthalmology* 100: 9-14

Mohan R, Rinehart WB, Bargagna-Mohan P, Fini ME (1998) Gelatinase B/lacZ transgenic mice, a model for mapping gelatinase B expression during developmental and injury-related tissue remodeling. *J Biol Chem* 273: 25903-25914

Montesano R, Pepper MS, Mohle-Steinlein U, Risau W, Wagner EF, Orci L (1990) Increased proteolytic activity is responsible for the aberrant morphogenetic behavior of endothelial cells expressing the middle T oncogene. *Cell* 62: 435-445

Morikawa S, Baluk P, Kaidoh T, Haskell A, Jain RK, McDonald DM (2002) Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol* 160: 985-1000

Morrison CJ, Butler GS, Bigg HF, Roberts CR, Soloway PD, Overall CM (2001) Cellular activation of MMP-2 (gelatinase A) by MT2-MMP occurs via a TIMP-2-independent pathway. *J Biol Chem* 276: 47402-47410

Mu XC, Higgins PJ (1995) Differential growth state-dependent regulation of plasminogen activator inhibitor type-1 expression in senescent IMR-90 human diploid fibroblasts. *J Cell Physiol* 165: 647-657

Munaut C, Noel A, Weidle UH, Krell HW, Foidart JM (1995) Modulation of the expression of interstitial and type-IV collagenases in coculture of HT1080 fibrosarcoma cells and fibroblasts. *Invasion Metastasis* 15: 169-178

Munaut C, Salonurmi T, Kontusaari S, Reponen P, Morita T, Foidart JM, Tryggvason K (1999) Murine matrix metalloproteinase 9 gene. 5'-upstream region contains cis-acting

elements for expression in osteoclasts and migrating keratinocytes in transgenic mice. *J Biol Chem* 274: 5588-5596

Murphy G, Stanton H, Cowell S, Butler G, Knauper V, Atkinson S, Gavrilovic J (1999) Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS* 107: 38-44

Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Okada Y, Itoh Y, Seiki M, Koono M (2000) Front-cell-specific expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and gelatinase A during cohort migration of colon carcinoma cells induced by hepatocyte growth factor/scatter factor. *Cancer Res* 60: 3364-3369

Nagai Y, Lapiere CM, Gross J (1966) Tadpole collagenase. Preparation and purification. *Biochemistry* 5: 3123-3130

Nagase H, Woessner JF, Jr. (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274: 21491-21494

Nar H, Bauer M, Stassen JM, Lang D, Gils A, Declerck PJ (2000) Plasminogen activator inhibitor 1. Structure of the native serpin, comparison to its other conformers and implications for serpin inactivation. *J Mol Biol* 297: 683-695

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13: 9-22

Niida S, Kaku M, Amano H, Yoshida H, Kataoka H, Nishikawa S, Tanne K, Maeda N, Nishikawa S, Kodama H (1999) Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *J Exp Med* 190: 293-298

Noel A, Bajou K, Masson V, Devy L, Frankenne F, Rakic JM, Lambert V, Carmeliet P, Foidart JM (1999) Regulation of cancer invasion and vascularization by plasminogen activator inhibitor-1. *Fibrinolysis Proteolysis* 13: 220-225

Noel A, Gilles C, Bajou K, Devy L, Kebers F, Lewalle JM, et al. (1997) Emerging roles for proteinases in cancer. *Invasion Metastasis* 17: 221-239

Noel A, Maillard C, Rocks N, Jost M, Chabottaux V, Sounni NE, Maquoi E, Cataldo D, Foidart JM (2004) Membrane associated proteases and their inhibitors in tumour angiogenesis. *J Clin Pathol* 57: 577-584

O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J (1997) Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88: 277-285

O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J (1994) Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79: 315-328

O'Reilly MS, Pirie-Shepherd S, Lane WS, Folkman J (1999) Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin. *Science* 285: 1926-1928

- Oh H, Takagi H, Takagi C, Suzuma K, Otani A, Ishida K, Matsumura M, Ogura Y, Honda Y (1999) The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 1891-1898
- Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, Nishimura S, Imamura Y, Kitayama H, Alexander DB, Ide C, Horan TP, Arakawa T, Yoshida H, Nishikawa S, Itoh Y, Seiki M, Itohara S, Takahashi C, Noda M (2001) The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell* 107: 789-800
- Okamoto N, Tobe T, Hackett SF, Ozaki H, Viores MA, LaRochelle W, Zack DJ, Campochiaro PA (1997) Transgenic mice with increased expression of vascular endothelial growth factor in the retina: a new model of intraretinal and subretinal neovascularization. *Am J Pathol* 151: 281-291
- Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP (1998) Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem* 273: 5419-5422
- Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, Orpana A, Pettersson RF, Alitalo K, Eriksson U (1996a) Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2576-2581
- Olofsson B, Pajusola K, von Euler G, Chilov D, Alitalo K, Eriksson U (1996b) Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform. *J Biol Chem* 271: 19310-19317
- Oosthuysen B, Moons L, Storkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brusselmans K, Van Dorpe J, Hellings P, Gorselink M, Heymans S, Theilmeyer G, Dewerchin M, Laudénbach V, Vermynen P, Raat H, Acker T, Vleminckx V, Van Den BL, Cashman N, Fujisawa H, Drost MR, Sciot R, Bruyninckx F, Hicklin DJ, Ince C, Gressens P, Lupu F, Plate KH, Robberecht W, Herbert JM, Collen D, Carmeliet P (2001) Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet* 28: 131-138
- Oshima M, Oshima H, Taketo MM (1996) TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol* 179: 297-302
- Overall CM, Lopez-Otin C (2002) Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* 2: 657-672
- Papetti M, Herman IM (2002) Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C947-C970
- Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N (1994) 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* 269: 25646-25654
- Parton RG, Joggerst B, Simons K (1994) Regulated internalization of caveolae. *J Cell Biol* 127: 1199-1215
- Patan S (1998) TIE1 and TIE2 receptor tyrosine kinases inversely regulate embryonic angiogenesis by the mechanism of intussusceptive microvascular growth. *Microvasc Res* 56: 1-21

- Pavlov N, Badet J (2001) [Angiogenin: involvement in angiogenesis and tumour growth]. *Bull Cancer* 88: 725-732
- Penn JS, Rajaratnam VS (2003) Inhibition of retinal neovascularization by intravitreal injection of human rPAI-1 in a rat model of retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 5423-5429
- Penn JS, Rajaratnam VS, Collier RJ, Clark AF (2001) The effect of an angiostatic steroid on neovascularization in a rat model of retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 283-290
- Pepper MS (2001) Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1104-1117
- Pepper MS, Belin D, Montesano R, Orci L, Vassalli JD (1990) Transforming growth factor-beta 1 modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells in vitro. *J Cell Biol* 111: 743-755
- Pepper MS, Montesano R (1990) Proteolytic balance and capillary morphogenesis. *Cell Differ Dev* 32: 319-327
- Pepper MS, Sappino AP, Montesano R, Orci L, Vassalli JD (1992) Plasminogen activator inhibitor-1 is induced in migrating endothelial cells. *J Cell Physiol* 153: 129-139
- Pepper MS, Sappino AP, Stocklin R, Montesano R, Orci L, Vassalli JD (1993a) Upregulation of urokinase receptor expression on migrating endothelial cells. *J Cell Biol* 122: 673-684
- Pepper MS, Vassalli JD, Montesano R, Orci L (1987) Urokinase-type plasminogen activator is induced in migrating capillary endothelial cells. *J Cell Biol* 105: 2535-2541
- Pepper MS, Vassalli JD, Orci L, Montesano R (1993b) Biphasic effect of transforming growth factor-beta 1 on in vitro angiogenesis. *Exp Cell Res* 204: 356-363
- Pharmacological Therapy for Macular Degeneration Study Group (1997) Interferon alfa-2a is ineffective for patients with choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. Results of a prospective randomized placebo-controlled clinical trial. *Arch Ophthalmol* 115: 865-872
- Pierce EA, Avery RL, Foley ED, Aiello LP, Smith LE (1995) Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 905-909
- Pike SE, Yao L, Jones KD, Cherney B, Appella E, Sakaguchi K, Nakhasi H, Teruya-Feldstein J, Wirth P, Gupta G, Tosato G (1998) Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *J Exp Med* 188: 2349-2356
- Ploplis VA, Carmeliet P, Vazirzadeh S, Van V, I, Moons L, Plow EF, Collen D (1995) Effects of disruption of the plasminogen gene on thrombosis, growth, and health in mice. *Circulation* 92: 2585-2593

- Ploplis VA, French EL, Carmeliet P, Collen D, Plow EF (1998) Plasminogen deficiency differentially affects recruitment of inflammatory cell populations in mice. *Blood* 91: 2005-2009
- Ploplis VA, Wilberding J, McLennan L, Liang Z, Cornelissen I, DeFord ME, Rosen ED, Castellino FJ (2000) A total fibrinogen deficiency is compatible with the development of pulmonary fibrosis in mice. *Am J Pathol* 157: 703-708
- Plow EF, Herren T, Redlitz A, Miles LA, Hoover-Plow JL (1995) The cell biology of the plasminogen system. *FASEB J* 9: 939-945
- Providence KM, Higgins PJ (2004) PAI-1 expression is required for epithelial cell migration in two distinct phases of in vitro wound repair. *J Cell Physiol* 200: 297-308
- Providence KM, Kutz SM, Staiano-Coico L, Higgins PJ (2000) PAI-1 gene expression is regionally induced in wounded epithelial cell monolayers and required for injury repair. *J Cell Physiol* 182: 269-280
- Puente XS, Sanchez LM, Overall CM, Lopez-Otin C (2003) Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet* 4: 544-558
- Puri MC, Rossant J, Alitalo K, Bernstein A, Partanen J (1995) The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. *EMBO J* 14: 5884-5891
- Qi JH, Ebrahem Q, Yeow K, Edwards DR, Fox PL, Anand-Apte B (2002) Expression of Sorsby's fundus dystrophy mutations in human retinal pigment epithelial cells reduces matrix metalloproteinase inhibition and may promote angiogenesis. *J Biol Chem* 277: 13394-13400
- Rafii S (2000) Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J Clin Invest* 105: 17-19
- Rakic JM, Lambert V, Devy L, Luttun A, Carmeliet P, Claes C, Nguyen L, Foidart JM, Noel A, Munaut C (2003) Placental growth factor, a member of the VEGF family, contributes to the development of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 3186-3193
- Ramchandran R, Dhanabal M, Volk R, Waterman MJ, Segal M, Lu H, Knebelmann B, Sukhatme VP (1999) Antiangiogenic activity of restin, NC10 domain of human collagen XV: comparison to endostatin. *Biochem Biophys Res Commun* 255: 735-739
- Rasmussen H, Chu KW, Campochiaro P, Gehlbach PL, Haller JA, Handa JT, Nguyen QD, Sung JU (2001) Clinical protocol. An open-label, phase I, single administration, dose-escalation study of ADGVPEDF.11D (ADPEDF) in neovascular age-related macular degeneration (AMD). *Hum Gene Ther* 12: 2029-2032
- Reynolds LE, Wyder L, Lively JC, Taverna D, Robinson SD, Huang X, Sheppard D, Hynes RO, Hodivala-Dilke KM (2002) Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins. *Nat Med* 8: 27-34
- Richard DE, Berra E, Pouyssegur J (1999) Angiogenesis: how a tumor adapts to hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 266: 718-722

- Rifkin DB, Mazziere R, Munger JS, Noguera I, Sung J (1999) Proteolytic control of growth factor availability. *APMIS* 107: 80-85
- Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674
- Rodriguez-Manzaneque JC, Lane TF, Ortega MA, Hynes RO, Lawler J, Iruela-Arispe ML (2001) Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 12485-12490
- Romer J, Bugge TH, Pyke C, Lund LR, Flick MJ, Degen JL, Dano K (1996) Plasminogen and wound healing. *Nat Med* 2: 725
- Ruiz A, Brett P, Bok D (1996) TIMP-3 is expressed in the human retinal pigment epithelium. *Biochem Biophys Res Commun* 226: 467-474
- Sakurai E, Anand A, Ambati BK, van Rooijen N, Ambati J (2003) Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 3578-3585
- Salonen EM, Vaheri A, Pollanen J, Stephens R, Andreasen P, Mayer M, Dano K, Gailit J, Ruoslahti E (1989) Interaction of plasminogen activator inhibitor (PAI-1) with vitronectin. *J Biol Chem* 264: 6339-6343
- Salzmann J, Limb GA, Khaw PT, Gregor ZJ, Webster L, Chignell AH, Charteris DG (2000) Matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fibrovascular membranes of proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 84: 1091-1096
- Santoni G, Spreghini E, Lucciarini R, Amantini C, Piccoli M (2001) Involvement of alpha(v)beta3 integrin-like receptor and glycosaminoglycans in *Candida albicans* germ tube adhesion to vitronectin and to a human endothelial cell line. *Microb Pathog* 31: 159-172
- Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M (1994) A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370: 61-65
- Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W, Qin Y (1995) Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 376: 70-74
- Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, Ito M, Shitara K, Nakahata T, Shibuya M (2001) Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood* 97: 785-791
- Scatena M, Giachelli C (2002) The alpha(v)beta3 integrin, NF-kappaB, osteoprotegerin endothelial cell survival pathway. Potential role in angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 12: 83-88
- Schlegel A, Arvan P, Lisanti MP (2001) Caveolin-1 binding to endoplasmic reticulum membranes and entry into the regulated secretory pathway are regulated by serine phosphorylation. Protein sorting at the level of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 276: 4398-4408

- Schmaier AH (2000) Plasma kallikrein/kinin system: a revised hypothesis for its activation and its physiologic contributions. *Curr Opin Hematol* 7: 261-265
- Schmitt M, Wilhelm O, Reuning U, Kruger A, Harbec N, et al. (2000) The urokinase plasminogen activator system as a novel target for tumor therapy. *Fibrinolysis Proteolysis* 14: 114-132
- Seandel M, Noack-Kunmann K, Zhu D, Aimes RT, Quigley JP (2001) Growth factor-induced angiogenesis in vivo requires specific cleavage of fibrillar type I collagen. *Blood* 97: 2323-2332
- Seiki M (2002) The cell surface: the stage for matrix metalloproteinase regulation of migration. *Curr Opin Cell Biol* 14: 624-632
- Semenza GL (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3: 721-732
- Sengupta N, Caballero S, Mames RN, Butler JM, Scott EW, Grant MB (2003) The role of adult bone marrow-derived stem cells in choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 4908-4913
- Sengupta N, Caballero S, Mames RN, Timmers AM, Saban D, Grant MB (2005) Preventing stem cell incorporation into choroidal neovascularization by targeting homing and attachment factors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 343-348
- Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC (1995) Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376: 62-66
- Shirakawa K, Kobayashi H, Sobajima J, Hashimoto D, Shimizu A, Wakasugi H (2003) Inflammatory breast cancer: vasculogenic mimicry and its hemodynamics of an inflammatory breast cancer xenograft model. *Breast Cancer Res* 5: 136-139
- Shirakawa K, Wakasugi H, Heike Y, Watanabe I, Yamada S, Saito K, Konishi F (2002) Vasculogenic mimicry and pseudo-comedo formation in breast cancer. *Int J Cancer* 99: 821-828
- Shubeita HE, Cottey TL, Franke AE, Gerard RD (1990) Mutational and immunochemical analysis of plasminogen activator inhibitor 1. *J Biol Chem* 265: 18379-18385
- Simpson AJ, Booth NA, Moore NR, Bennett B (1991) Distribution of plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in tissues. *J Clin Pathol* 44: 139-143
- Simpson-Haidaris PJ, Rybarczyk B (2001) Tumors and fibrinogen. The role of fibrinogen as an extracellular matrix protein. *Ann N Y Acad Sci* 936: 406-425
- Sivak JM, Fini ME (2002) MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. *Prog Retin Eye Res* 21: 1-14
- Slakter JS (2003) Anecortave acetate as monotherapy for treatment of subfoveal neovascularization in age-related macular degeneration: twelve-month clinical outcomes. *Ophthalmology* 110: 2372-2383

Smalley DM, Fitzgerald JE, Taylor DM, Cone RE, O'Rourke J (1994) Tissue plasminogen activator activity in human aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 48-53

Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP (1999) Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* 19: 7289-7304

Soff GA, Sanderowitz J, Gately S, Verrusio E, Weiss I, Brem S, Kwaan HC (1995) Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model. *J Clin Invest* 96: 2593-2600

Sottrup-Jensen L, Birkedal-Hansen H (1989) Human fibroblast collagenase-alpha-macroglobulin interactions. Localization of cleavage sites in the bait regions of five mammalian alpha-macroglobulins. *J Biol Chem* 264: 393-401

Soubrane, G., De Smet, M. D., and Schmidt-Erfurth, U. Anecortave acetate for the treatment of AMD patients with subfoveal choroidal neovascularisation (CNV). *Ophthalmic Res.* 34, 3312. 2002.

Ref Type: Abstract

Soubrane G, Jerdan J, Karpouzias I, Fayein NA, Glaser B, Coscas G, Courtois Y, Jeanny JC (1990) Binding of basic fibroblast growth factor to normal and neovascularized rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 323-333

Sounni NE, Devy L, Hajitou A, Frankenne F, Munaut C, Gilles C, Deroanne C, Thompson EW, Foidart JM, Noel A (2002) MT1-MMP expression promotes tumor growth and angiogenesis through an up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *FASEB J* 16: 555-564

Sounni NE, Janssen M, Foidart JM, Noel A (2003) Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis. *Matrix Biol* 22: 55-61

Sounni NE, Roghi C, Chabottaux V, Janssen M, Munaut C, Maquoi E, Galvez BG, Gilles C, Frankenne F, Murphy G, Foidart JM, Noel A (2004) Up-regulation of vascular endothelial growth factor-A by active membrane-type 1 matrix metalloproteinase through activation of Src-tyrosine kinases. *J Biol Chem* 279: 13564-13574

Spraul CW, Lang GE, Grossniklaus HE, Lang GK (1999) Histologic and morphometric analysis of the choroid, Bruch's membrane, and retinal pigment epithelium in postmortem eyes with age-related macular degeneration and histologic examination of surgically excised choroidal neovascular membranes. *Surv Ophthalmol* 44 Suppl 1: S10-S32

Stack MS, Gately S, Bafetti LM, Enghild JJ, Soff GA (1999) Angiostatin inhibits endothelial and melanoma cellular invasion by blocking matrix-enhanced plasminogen activation. *Biochem J* 340 (Pt 1): 77-84

Stahlhut M, van Deurs B (2000) Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 11: 325-337

Steen B, Sejersen S, Berglin L, Seregard S, Kvanta A (1998) Matrix metalloproteinases and metalloproteinase inhibitors in choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 2194-2200

Stefansson S, Lawrence DA (1996) The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin. *Nature* 383: 441-443

Stefansson S, Lawrence DA (2003) Old dogs and new tricks: proteases, inhibitors, and cell migration. *Sci STKE* 2003: e24

Stefansson S, McMahon GA, Petitclerc E, Lawrence DA (2003) Plasminogen activator inhibitor-1 in tumor growth, angiogenesis and vascular remodeling. *Curr Pharm Des* 9: 1545-1564

Stefansson S, Petitclerc E, Wong MK, McMahon GA, Brooks PC, Lawrence DA (2001) Inhibition of angiogenesis in vivo by plasminogen activator inhibitor-1. *J Biol Chem* 276: 8135-8141

Steinkamp GW, Hattenbach LO, Heider HW, Scharrer I (1993) [Plasminogen activator and PAI. Detection in aqueous humor of the human eye]. *Ophthalmologie* 90: 73-75

Sternlicht MD, Werb Z (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 463-516

Stetler-Stevenson WG (1999) Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* 103: 1237-1241

Stromblad S, Fotadar A, Brickner H, Theesfeld C, Aguilar dD, Friedlander M, Cheresch DA (2002) Loss of p53 compensates for alpha v-integrin function in retinal neovascularization. *J Biol Chem* 277: 13371-13374

Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI (1995) Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 270: 5331-5338

Sugiura Y, Ma L, Sun B, Shimada H, Laug WE, Seeger RC, DeClerck YA (1999) The plasminogen-plasminogen activator (PA) system in neuroblastoma: role of PA inhibitor-1 in metastasis. *Cancer Res* 59: 1327-1336

Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD (1996) Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87: 1171-1180

Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, Oldmixon EH, Sato TN, Yancopoulos GD (1998) Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science* 282: 468-471

Takafuji S, Ishida A, Miyakuni Y, Nakagawa T (2003) Matrix metalloproteinase-9 release from human leukocytes. *J Investig Allergol Clin Immunol* 13: 50-55

Takahashi T, Nakamura T, Hayashi A, Kamei M, Nakabayashi M, Okada AA, Tomita N, Kaneda Y, Tano Y (2000) Inhibition of experimental choroidal neovascularization by

overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in retinal pigment epithelium cells. *Am J Ophthalmol* 130: 774-781

Taraboletti G, Morbidelli L, Donnini S, Parenti A, Granger HJ, Giavazzi R, Ziche M (2000) The heparin binding 25 kDa fragment of thrombospondin-1 promotes angiogenesis and modulates gelatinase and TIMP-2 production in endothelial cells. *FASEB J* 14: 1674-1676

The Anecortave Acetate Clinical Study Group (2003) Anecortave acetate as monotherapy for the treatment of subfoveal lesions in patients with exudative age-related macular degeneration (AMD). Interim (Month 6) analysis of clinical safety and efficacy. *Retina* 23: 14-23

Thomas KA (1987) Fibroblast growth factors. *FASEB J* 1: 434-440

Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, Glazer N, Holash J, McDonald DM, Yancopoulos GD (2000) Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med* 6: 460-463

Tobe T, Ortega S, Luna JD, Ozaki H, Okamoto N, Derevjani NL, Vinore SA, Basilico C, Campochiaro PA (1998) Targeted disruption of the FGF2 gene does not prevent choroidal neovascularization in a murine model. *Am J Pathol* 153: 1641-1646

Tombran-Tink J, Shivaram SM, Chader GJ, Johnson LV, Bok D (1995) Expression, secretion, and age-related downregulation of pigment epithelium-derived factor, a serpin with neurotrophic activity. *J Neurosci* 15: 4992-5003

Tsuojiya H, Katsuo E, Sunayama C, Tomita K, Ueda Y, Binnema DJ (1995) The antibody of plasminogen activator inhibitor-1 suppresses pulmonary metastasis of human fibrosarcoma in athymic mice. *Gen Diagn Pathol* 141: 41-48

Twining SS (1994) Regulation of proteolytic activity in tissues. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 29: 315-383

Uchiyama T, Kurabayashi M, Ohyama Y, Utsugi T, Akuzawa N, Sato M, Tomono S, Kawazu S, Nagai R (2000) Hypoxia induces transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene through genistein-sensitive tyrosine kinase pathways in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1155-1161

Ugwu F, Van Hoef B, Bini A, Collen D, Lijnen HR (1998) Proteolytic cleavage of urokinase-type plasminogen activator by stromelysin-1 (MMP-3). *Biochemistry* 37: 7231-7236

van Wijngaarden P, Coster DJ, Williams KA (2005) Inhibitors of ocular neovascularization: promises and potential problems. *JAMA* 293: 1509-1513

Visse R, Nagase H (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92: 827-839

Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM, Werb Z (1998) MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 93: 411-422

- Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH (1994) Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 269: 26988-26995
- Waltz DA, Natkin LR, Fujita RM, Wei Y, Chapman HA (1997) Plasmin and plasminogen activator inhibitor type 1 promote cellular motility by regulating the interaction between the urokinase receptor and vitronectin. *J Clin Invest* 100: 58-67
- Wang Y, Gillies C, Cone RE, O'Rourke J (1995) Extravascular secretion of t-PA by the intact superfused choroid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 1625-1632
- Wang Z, Juttermann R, Soloway PD (2000) TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. *J Biol Chem* 275: 26411-26415
- Wary KK, Mariotti A, Zurzolo C, Giancotti FG (1998) A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* 94: 625-634
- Weber BH, Vogt G, Pruetz RC, Stohr H, Felbor U (1994) Mutations in the tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3) in patients with Sorsby's fundus dystrophy. *Nat Genet* 8: 352-356
- Wei Y, Yang X, Liu Q, Wilkins JA, Chapman HA (1999) A role for caveolin and the urokinase receptor in integrin-mediated adhesion and signaling. *J Cell Biol* 144: 1285-1294
- Werb Z (1997) ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 91: 439-442
- Wiman B, Almquist A, Sigurdardottir O, Lindahl T (1988) Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI) is bound to vitronectin in plasma. *FEBS Lett* 242: 125-128
- Woessner JF, Jr. (1998) The matrix metalloproteinase family. In *Matrix Metalloproteinases*, Parks WC, Mecham RP (eds) pp 1-13.
- Xue W, Mizukami I, Todd RF, III, Petty HR (1997) Urokinase-type plasminogen activator receptors associate with beta1 and beta3 integrins of fibrosarcoma cells: dependence on extracellular matrix components. *Cancer Res* 57: 1682-1689
- Yamada E, Tobe T, Yamada H, Okamoto N, Zack DJ, Werb Z, Soloway PD, Campochiaro PA (2001) TIMP-1 promotes VEGF-induced neovascularization in the retina. *Histol Histopathol* 16: 87-97
- Yamagishi S, Nakamura K, Inoue H, Takeuchi M (2005) Met72Thr polymorphism of pigment epithelium-derived factor gene and susceptibility to age-related macular degeneration. *Med Hypotheses* 64: 1202-1204
- Yamakawa M, Liu LX, Belanger AJ, Date T, Kuriyama T, Goldberg MA, Cheng SH, Gregory RJ, Jiang C (2004) Expression of Angiopoietins in Renal Epithelial and Clear Cell Carcinoma Cells: Regulation by Hypoxia and Participation in Angiogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol*
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J (2000) Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407: 242-248

- Yang Z, Strickland DK, Bornstein P (2001) Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2. *J Biol Chem* 276: 8403-8408
- Yu Q, Stamenkovic I (1999) Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev* 13: 35-48
- Yu WH, Woessner JF, Jr., McNeish JD, Stamenkovic I (2002) CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling. *Genes Dev* 16: 307-323
- Zhou A, Huntington JA, Pannu NS, Carrell RW, Read RJ (2003) How vitronectin binds PAI-1 to modulate fibrinolysis and cell migration. *Nat Struct Biol* 10: 541-544
- Zhou Y, McMaster M, Woo K, Janatpour M, Perry J, Karpanen T, Alitalo K, Damsky C, Fisher SJ (2002) Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am J Pathol* 160: 1405-1423
- Zhou Z, Apte SS, Soininen R, Cao R, Baaklini GY, Rauser RW, Wang J, Cao Y, Tryggvason K (2000) Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4052-4057
- Zucker S, Pei D, Cao J, Lopez-Otin C (2003) Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP). *Curr Top Dev Biol* 54: 1-74

9 Annexes

9.1 Article 1 : Influence of plasminogen activator inhibitor type 1 on choroidal neovascularization

V. Lambert, C. Munaut, A. Noel, F. Franckenne, K. Bajou, R. Gerard, P. Carmeliet, M. P. Defresne, J. M. Foidart, and J. M. Rakic.

FASEB J. 15 (6):1021-1027, 2001.

Influence of plasminogen activator inhibitor type 1 on choroidal neovascularization

VINCENT LAMBERT,^{*,1} CARINE MUNAUT,^{*} AGNÈS NOËL,^{*} FRANCIS FRANKENNE,^{*} KHALID BAJOU,^{*} ROBERT GERARD,[†] PETER CARMELIET,[†] MARIE PAULE DEFRESNE,[‡] JEAN-MICHEL FOIDART,^{*} AND JEAN-MARIE RAKIC[§]

^{*}Laboratory of Tumor and Development Biology, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium;

[†]Center for Transgene Technology and Gene Therapy, Flanders Interuniversity Institute for

Biotechnology, Campus Gasthuisberg, University of Leuven, Belgium; [‡]Laboratory of Cytology and

Histology, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium; and [§]Department of Ophthalmology, University Hospital, Sart-Tilman, B-4000 Liège, Belgium

ABSTRACT High levels of the plasminogen activators, but also their inhibitor, plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1), have been documented in neovascularization of severe ocular pathologies such as diabetic retinopathy or age-related macular degeneration (AMD). AMD is the primary cause of irreversible photoreceptors loss, and current therapies are limited. PAI-1 has recently been shown to be essential for tumoral angiogenesis. We report here that deficient PAI-1 expression in mice prevented the development of subretinal choroidal angiogenesis induced by laser photocoagulation. When systemic and local PAI-1 expression was achieved by intravenous injection of a replication-defective adenoviral vector expressing human PAI-1 cDNA, the wild-type pattern of choroidal angiogenesis was restored. These observations demonstrate the proangiogenic activity of PAI-1 not only in tumoral models, but also in choroidal experimental neovascularization sharing similarities with human AMD. They identify therefore PAI-1 as a potential target for therapeutic ocular anti-angiogenic strategies.—Lambert, V., Munaut, C., Noël, A., Frankenne, F., Bajou, K., Gerard, R., Carmeliet, P., Defresne, M. P., Foidart, J.-M., Rakic, J.-M. Influence of plasminogen activator inhibitor type 1 on choroidal neovascularization. *FASEB J.* 15, 1021–1027 (2001)

Key Words: angiogenesis • retinal disease • proteases • viral vector • macular degeneration

CHOROIDAL NEOVASCULARIZATION GROWING under the retina in severe forms of age-related macular degeneration (AMD) causes irreversible photoreceptors loss and the primary source of blindness in the Western world. Insight into the molecular mechanisms associated with subretinal neovascularization is important since current therapeutic modalities are limited and concern only a small percentage of affected individuals.

Molecular signals involved in the development of choroidal neovascularization are not well defined. Alpha-v integrins show a specific expression pattern during retinal angiogenesis (1) and antibodies to this

integrin or its ligands such as vitronectin inhibit neovascularization in different retinal models (2–4). Among growth factors, several lines of evidence suggest that vascular endothelial growth factor (VEGF) could be implicated in the pathogenesis of AMD since this cytokine is present in pathological specimens (5, 6) and is expressed in several models of hypoxia-related retinal neovascularization (7). However, VEGF retinal overexpression alone was not able to induce choroidal neovascularization in a transgenic mouse model (8), suggesting either a retinal specificity in the mechanisms controlling angiogenesis or a requirement for additional angiogenic molecules in AMD. In the intact choroid, polarized secretion of VEGF by retinal pigment epithelium could play an important role in the maintenance of a normal choriocapillaris (9). Recent studies suggest also a role for Fas ligand in the control of choroidal neovascularization (10).

Angiogenesis is an invasive process that requires proteolysis of the extracellular matrix, proliferation, and migration of endothelial cells with simultaneous synthesis of new matrix components. Such migratory and tissue remodeling events are regulated by different proteolytic systems including matrix metalloproteases (MMPs) and serine proteases of the plasminogen/plasminogen activator system. The specific roles of MMPs, plasminogen activators, and their inhibitors in neovascular chorioretinopathies remain largely unexplored. In retinal pathology, a mutation in a tissue inhibitor of MMPs (TIMP3) is associated with a rare form of macular dystrophy (11), and the expression of several MMPs has been demonstrated in human choroidal neovascular membranes (12). Urokinase-type (uPA) and tissue-type (tPA) plasminogen activators are serine proteases, both able to activate the zymogen plasminogen into plasmin. Plasmin is a broadly acting enzyme that degrades extracellular matrix proteins and activates pro-MMPs and growth factors (13). Plasmino-

¹ Correspondence: Laboratory of Tumor and Development Biology, University of Liège, Pathology Tower (B23), Sart-Tilman, B-4000 Liège, Belgium. E-mail: vincent.lambert@ulg.ac.be

gen activator inhibitor type-1 (PAI-1) is the main physiological inhibitor of uPA and tPA. It not only regulates the proteolytic activity of uPA, but also determines the level of uPA bound to its cell surface receptor (uPAR) by promoting the rapid endocytosis of the trimolecular uPA-PAI-1-uPAR complex (14). The importance of PAI-1 for tumoral angiogenesis has recently been demonstrated *in vivo* in experimental squamous cell carcinomas (15). Elevated PAI-1 levels have been correlated clinically not only with a poor prognosis in patients suffering from a variety of cancers (16), but also with various chorioretinal pathologies (17, 18).

To evaluate the biological relevance of PAI-1 in subretinal angiogenesis, we induced choroidal neovascularization *in vivo* with argon laser burns (19) into PAI-1^{-/-} and wild-type (WT) mice. A choroidal neovascular membrane with leakage on fluorescein angiograms was produced at laser impacts in WT mice but not in PAI-1-deficient mice. In these PAI-1^{-/-} mice, choroidal neovascularization similar to that occurring in WT mice was restored when PAI-1 expression was achieved by injecting a recombinant adenoviral vector bearing PAI-1 cDNA. These observations highlight the proangiogenic activity of PAI-1 in choroidal neovascularization and identify PAI-1 as a potential therapeutic target against AMD.

MATERIALS AND METHODS

Genetically modified mice

Animal experiments were performed in compliance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. Homozygous PAI-1-deficient mice (PAI-1^{-/-}) and the corresponding WT mice (PAI-1^{+/+}) of either sex, with a mixed genetic background of 87% C57BL/6 and 13% 129 strain, were used throughout this study (20). There were five or more mice in each group. The animals were maintained with a 12 h light/12 h dark cycle and had free access to food and water.

Laser photocoagulation and fluorescein angiograms

Choroidal neovascularization was induced in mice by laser burns as described previously (19). Briefly, mice were anesthetized with intraperitoneal (i.p.) injection of Avertin. Both pupils were dilated with 1% topical tropicamide; three burns were delivered (usually at the 9, 12, and 3 o'clock positions around the optic disc) using a green argon laser (532 nm; 50 μm diameter spot size; 0.05 s duration; 400 mW) and a cover slide as a contact lens. Fluorescein angiograms were performed 14 days later by taking serial fundus photographs (Canon) after i.p. injection of 0.3 ml of 1% fluorescein sodium (Ciba, Summit, N.J.). The percentage of burns developing late-phase hyperfluorescent spots (evaluated in comparison with the retinal normal vasculature) corresponding to the leakage of fluorescein from newly formed hyperpermeable vessels was evaluated. Animals were then killed, eyes were enucleated and either fixed in buffered 3.5% formalin solution for routine histology or embedded in Tissue Tek (Miles Laboratories, Naperville, Ill.), and frozen in liquid nitrogen for cryostat sectioning.

Quantitation of choroidal neovascularization

A quantitative morphometric assessment of thickness of choroidal new vessels was carried out using a computer-assisted image analysis system (Olympus Micro Image version 3.0 for Windows 95/NT, Olympus Optical Co. Europe GmbH). Microscopic images (working magnification of ×200) of hematoxylin-stained eye section were acquired via a video camera, digitalized, and analyzed. Frozen serial sections were cut throughout the entire extent of each burn and the thickest lesions (at least 5 sections per lesion) was used for the quantitation studies (96 sections studied). Neovascularization was estimated by the ratio (B/C) of the thickness from the bottom of the pigmented choroidal layer to the top of the neovascular membrane (B) to the thickness of the intact pigmented choroid adjacent to the lesion (C). The advantage of this method of quantification (over surface estimation) was its independence in relation to oblique sections (see example in Fig. 2c).

Immunofluorescence

Cryostat sections (5 μm in thickness) were fixed first in acetone at -20°C and then in methanol at 4°C before incubation with the primary antibodies. Antibodies raised against mouse PECAM (rat monoclonal antibody; Pharmingen, San Diego, Calif.; diluted 1/20) or mouse type IV collagen (guinea pig polyclonal antibody produced in our laboratory; diluted 1/100) were incubated for 1 h at room temperature. Antibodies to mouse PAI-1 (rabbit polyclonal antibody produced in our laboratory, 10 μg/ml) were incubated overnight at 4°C. The sections were washed three times for 10 min in phosphate buffered saline (PBS) before the appropriate secondary antibodies conjugated to fluorescein-isothiocyanate (FITC) or Texas red were added. Swine anti-rabbit (Dakoplat, Glostrup, Denmark; diluted 1/40) or rabbit anti-rat (Sigma, St. Louis, Mo.; diluted 1/40) were applied for 30 min. For double immunofluorescence-labeling studies, sections were first incubated with the two primary antibodies and then with FITC- and Texas red-conjugated secondary antibodies. After three washes in PBS for 10 min each and a final rinse in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.8, coverslips were mounted and labeling was analyzed under an inverted microscope equipped with epifluorescence optics. Staining for β-galactosidase activity was performed with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactopyronoside (X-gal) as described (21). In some assays, primary anti-PAI-1 antibodies were preabsorbed for 15 min with recombinant PAI-1 (1 μg/ml, a generous gift from P. Declerck, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium).

Adenovirus-mediated PAI-1 gene transfer

Recombinant adenovirus bearing human PAI-1 (AdCM-VPAl1), *Escherichia coli* β-galactosidase (AdCMVlacZ) and control adenovirus (AdRR5) were generated as described (22). Twenty-four hours after laser spot production, mice were intravenously (i.v.) injected with 200 μl of control or recombinant adenovirus (7×10⁸ PFU). After 5 days, blood was sampled from the right retro-orbital sinus and PAI-1 antigen was measured by ELISA as reported (22). On day 14, mice were killed and eyes were excised and processed as described above. According to regulatory constraints, the virally infected animals were permanently housed under BL3 containment and, consequently, fluorescein angiograms could not be performed.

RT-PCR for PAI-1 expression

Total RNA from eyes were extracted using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Chatsworth, Calif.) as described by the manufac-

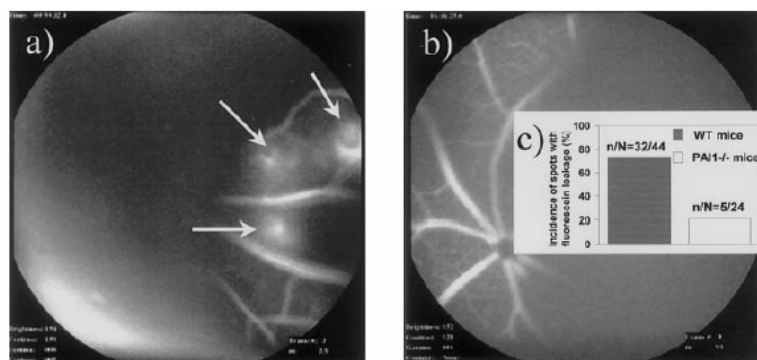


Figure 1. Fluorescein angiograms carried out 14 days after laser-induced rupture of Bruch's membrane. Fluorescein leakage (arrows) is observed from choroidal new vessels in WT (*a*) but not in PAI-1^{-/-} mice showing only normal vasculature (*b*). A threefold reduction in the percentage of leaking spots was obtained in PAI-1^{-/-} mice (*c*); n/N = number of leaking spots/total number of laser burns ($X^2=16.8$, $P<0.0001$).

turer. PAI-1 mRNA and 28S rRNA were measured in 10 ng aliquots of total RNA using the GeneAmp ThermoStable rTth reverse transcriptase RNA PCR kit (Perkin Elmer, Norwalk, Conn.) and two pairs of primers (Gibco BRL-Life Technologies, Grand Island, N.Y.): 5'-AGGGCTTCATGCCACCTTCTCA-3' (sense primer) and 5'-AGTAGAGGGC-ATTCACCAGCACCA-3' (antisense primer) for PAI-1 and 5'-GTTCACCCCTAATAGGGAACGTGA-3' (sense primer) and 5'-GGATTCTGACTTAGAGCGTTCAGT-3' (antisense primer) for 28S. Reverse transcription was performed at 70°C for 15 min, followed by 2 min incubation at 95°C for denaturation of RNA-DNA heteroduplexes. Amplification started by 15 s at 94°C, 20 s at 68°C, and 10 s at 72°C (35 cycles for PAI-1 and 19 cycles for 28S) and terminated by 2 min at 72°C. RT-PCR products were resolved on 10% acrylamide gels and analyzed using a Fluor-S MultiImager (Bio-Rad, Hercules, Calif.) after staining with Gelstar (FMC BioProducts, Rockland, Maine) dye. The expected size is 191 bp for PAI-1 and 212 bp for 28S.

Statistical analysis

Data were analyzed with GraphPad Prism 3.0 (San Diego, Calif.). The χ^2 test, Student's *t* test, one-way ANOVA, and Newman-Keuls post tests were used to determine whether there were significant ($P<0.01$) differences between WT and PAI-1^{-/-} mice.

RESULTS

Choroidal neovascularization *in vivo* in PAI-1^{-/-} and WT mice

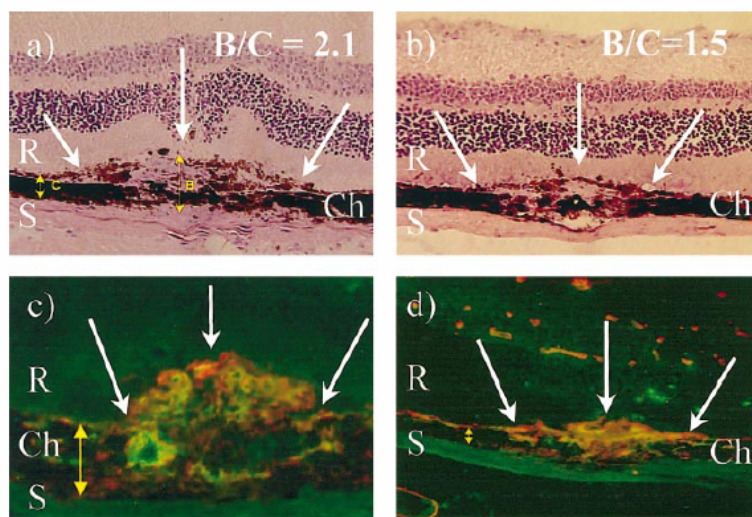
To determine whether the absence of PAI-1 influences choroidal neovascularization *in vivo*, we used a murine model of retinal photocoagulation with an argon laser. The photocoagulation induced trauma at the level of outer retina, retinal pigment epithelium, and Bruch's membrane, giving rise to choroidal neovascularization under the retina similar to that observed in AMD. The damage of the Bruch's membrane was immediately identified by the ophthalmoscopic appearance of a traumatic retinal bubble at the sites of laser burns. Fluorescein angiograms performed on day 14 (Fig. 1*a*, *b*) showed the appearance of newly formed microvessels with significant leakage of fluorescein in 72% (32/44) of the laser-induced lesions. The incidence of

leaking spots was reduced to 21% (5/24) in PAI-1^{-/-} mice (Fig. 1*c*, $P<0.001$). Histological analysis and immunostaining with anti-PECAM and anti-collagen type IV antibodies confirmed the presence of newly formed capillaries in lesions identified by fluorescein angiography (Fig. 2). WT mice showed typically large 'mushroom-like' areas of choroidal neovascularization at the site of laser-induced trauma, with migration of retinal pigmented epithelial cells along newly formed microvessels (Fig. 2*a*). The wound was usually not covered by a continuous layer of retinal pigmented epithelial cells. In PAI-1^{-/-} mice, the choroidal neovascular reaction was much more restricted and consisted of only a diffuse and moderate thickening covered by confluent retinal pigment epithelium (Fig. 2*b*). In most instances, these lesions were only indirectly identified by examination of the retinal photoreceptor damage. Immunostaining with anti-type IV collagen or anti-PECAM antibodies failed to show any significant angiogenesis above the scarring tissue (Fig. 2*d*). Neovascularization was estimated by measuring, on serial sections, the maximal height of the lesion above the choroidal layer observed in neighboring intact zones. This was performed by determining the B/C ratio between total thickness of lesions ('B' from the bottom of the choroid to the top of the neovascular area) to the thickness of adjacent normal choroid ('C'). A 45% reduction of the B/C ratio was observed in PAI-deficient mice ($P<0.001$) as compared to WT mice.

PAI-1 is present in the neovascular area

Immunohistochemical staining demonstrated the presence of PAI-1 exclusively within choroidal neovascular membrane, but not in normal intact zones of WT mice (Fig. 3*a*). Controls in which the primary antibody had been preabsorbed with recombinant PAI-1 were negative (Fig. 3*b*). No staining was observed at any location in PAI-1^{-/-} mice (Fig. 3*c*). RT-PCR applied on the eyes (Fig. 3*d*) demonstrated, 14 days after injection with adenoviral vector carrying AdCMVPAI1, a weak human PAI-1 mRNA expression in PAI-1-deficient mice.

Figure 2. Histological analysis after laser treatment. Hematoxylin-eosin staining of a representative large area of choroidal neovascularization at the site of laser-induced trauma in WT mice (*a*) and more restricted reaction in PAI-1^{-/-} mice (*b*). Immunofluorescence labeling of new vessels in WT mice (*c*) or in PAI-1^{-/-} mice (*d*) analyzed 14 days after laser photocoagulation. New vessels were detected with anti-mouse anti-collagen type IV antibody (red) and anti-mouse anti-PECAM antibody (green). R: neural retina; Ch: choroid defined by yellow arrows which could contain normal large vessels not involved in the neo angiogenic process; S: sclera; B: total thickness from the choroid to the top of the neovascular area; C: thickness of the choroid-RPE (retinal pigmented epithelium) complex. B/C: ratio of the thickness from the choroid to the top of the neovascular area, to the thickness of the choroid-RPE complex measured on this section. White arrows localize the laser impact. Original magnification 200 \times .

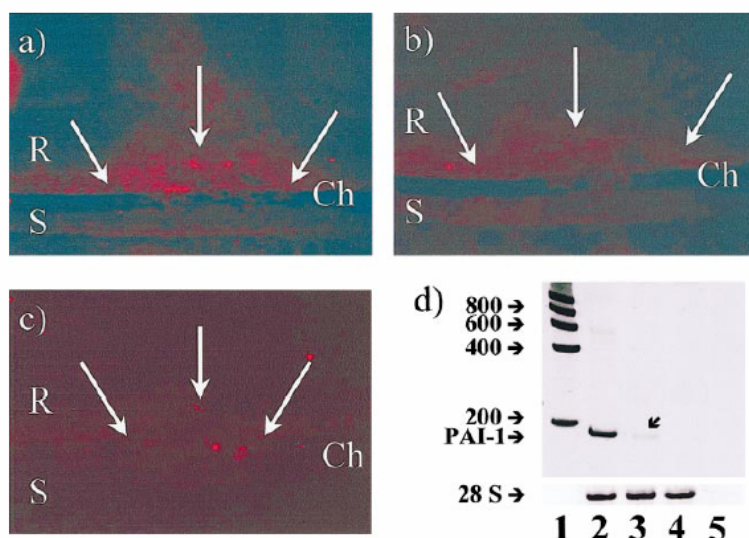


PAI-1 adenovirus injection restores choroidal angiogenesis

To further confirm the role of PAI-1 in choroidal angiogenesis *in vivo*, WT and PAI-1^{-/-} mice were i.v. injected 1 day after laser burns with either a recombinant adenovirus (AdCMVP $PAI1$) carrying human PAI-1 cDNA, a control virus (AdRR5), or a vector carrying LacZ cDNA (AdCMVLacZ). Immunostaining with anti-type IV collagen and anti-PECAM antibodies demonstrated a significant angiogenesis in PAI-1^{-/-} mice injected with AdCMVP $PAI1$ (Fig. 4*a*) but not in PAI-1^{-/-} mice injected with a control virus (Fig. 4*b*). The injection of the virus carrying the LacZ cDNA resulted in the expression of β -galactosidase in the retinal pigmented epithelium (Fig. 4*c*).

This demonstrates that the recombinant adenoviruses were able to transduce the PAI-1 cDNA into cells in close proximity to the burn. Four days after the injection of AdCMVP $PAI1$, the measured plasma levels of human PAI-1 were higher in PAI-1^{-/-} mice (mean 7340 ng/ml, range 1850–12600) than the normal murine PAI-1 value in WT mice (2 ng/ml). PAI-1 was undetectable after 2 wk. Quantitation of the neovascularization on frozen sections (Fig. 4*d*) showed that the human gene expression in PAI-1-deficient mice resulted in a neovascular thickness ratio (B/C) 90% of that observed in WT animals. In contrast, neovascularization estimated by the B/C ratio in PAI-1-deficient mice injected with AdRR5 was similar to that observed in PAI-1-deficient animals.

Figure 3. Immunofluorescence labeling and RT-PCR for PAI-1. 14 days after laser treatment, PAI-1 was detected only in the neovascular area of WT mice (*a*) and not in PAI-1-deficient mice (*c*). Immunostaining disappeared in WT animals when the primary antibody was preabsorbed with recombinant PAI-1 (1 μ g/ml) (*b*). White arrows localize the laser burn sites. Original magnification 200 \times . RT-PCR analysis (*d*) identifying the PAI-1 mRNA expressed in the eyes of WT mice (lane 2) and of PAI-1-deficient mice injected with AdCMVP $PAI1$ (lane 3). Lane 1 represents molecular weights, lane 4 eyes of PAI-1^{-/-} mice and lane 5 negative control.



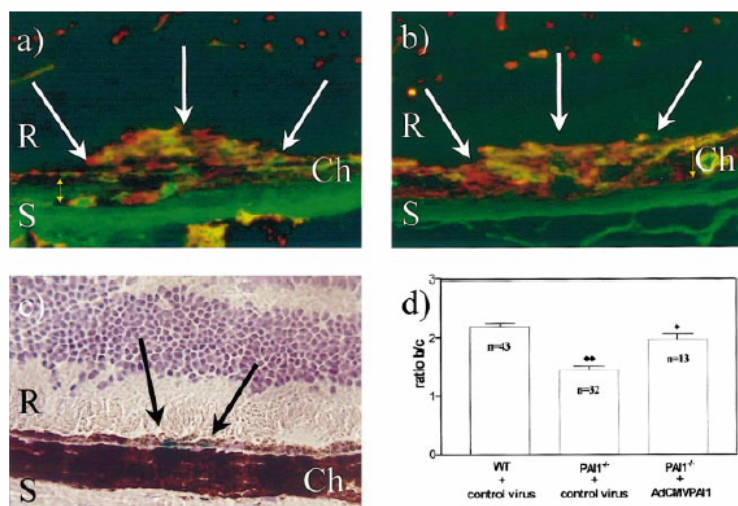


Figure 4. Injection of adenoviral vectors after laser photocoagulation. In PAI-1^{-/-} mice injected with adenovirus bearing human PAI-1 cDNA (a), immunostaining of new vessels showed the same behavior as that found in WT mice injected with a control virus (not shown), whereas PAI-1^{-/-} injected with a control virus failed to demonstrate significant neovascularization (b). LacZ expression (in blue) was detected in the retinal pigment epithelium (arrows) in mice injected with adenovirus bearing β-galactosidase cDNA (c). Quantitation of the neovascularization by the B/C ratio demonstrated a significant reduction in PAI-1^{-/-} mice injected with a control virus (*t* test, $P < 0.001$) while PAI-1^{-/-} mice injected with AdCMVPAI1 had a B/C ratio (*t* test, $P = 0.06$) similar to that calculated in WT mice (d). *n* represents the number of different lesions analyzed. R: neural retina; Ch: choroid defined by yellow arrows that could contain normal large vessels not involved in the neo-angiogenic process; S: sclera.

DISCUSSION

Angiogenesis represents an invasive cellular process requiring the functional activity of a variety of molecules such as growth factors, extracellular matrix proteins, adhesion receptors, and proteolytic enzymes (23). MMPs and serine proteases have been implicated in the extracellular matrix remodeling associated with neo-angiogenesis. Since most MMPs are secreted as zymogens, their activation requires a limited proteolysis by plasmin. Neovascularization requires therefore a delicate balance between the activation of the serine and metalloproteases and their inhibition by specific inhibitors. The specific roles of MMPs, plasminogen activators, and inhibitors in neovascular chorioretinopathies remain largely unexplored.

Previous clinical studies detected measurable concentrations of tPA and PAI in the aqueous humor of normal eyes (24, 25). An increase in Bruch's membrane TIMP-3 (26) and interphotoreceptor matrix MMP-2 (27) has been associated with age-related macular degeneration. In the vitreous fluid of diabetic patients suffering from proliferative retinopathy, elevated concentrations of ProMMP-9 (28), tPA, and PAI-1 (29) were recently reported to be associated with high VEGF levels. As PAI-1 and TIMP-3 inhibit MMPs activation, it might have been anticipated that they reduce choroidal angiogenesis. The apparent paradox of increased tissue levels of PAI and TIMP-3 in choroidal pathology associated with neovascularization suggests that their contribution to the angiogenic ocular disorders could be different from that anticipated. We reported recently that PAI-1 is a key proangiogenic molecule during tumorigenesis and that PAI-1 deletion results in the absence of tumor formation in an animal model of squamous cells carcinoma (15).

We demonstrate here that PAI-1 plays an important role in choroidal neovascularization. In a model of

laser-induced choroidal neovascularization, angiogenesis detected by fluorescein angiography and neovascular volume appreciated by immunohistochemistry and quantitative histology were reduced in PAI-1-deficient animals. Furthermore, restoration of PAI-1 expression in these mice by injection with recombinant adenoviruses bearing human PAI-1 cDNA led to a choroidal neovascularization identical to that observed in WT animals. It could be argued that the inflammatory reaction may play a role in the results involving adenoviral delivery. This is unlikely, as control and lacZ viruses were inefficient. Quantification of inflammatory cells in the lesions failed to demonstrate any significant difference (data not shown).

Although it has been suggested in a model of retinopathy of prematurity that up-regulation of endogenous PAI-1 could protect from retinal and choroidal neovascularization (30), in accordance with clinical observations our results suggest, paradoxically, the opposite effect and show that PAI-1 expression is necessary for choroidal angiogenesis.

Taken together with results observed previously in tumoral models, our observations confirm the role of PAI-1 in the development of pathological angiogenesis. The effect of PAI-1 is indeed restricted to tumoral and ocular pathological neovascularization but is not observed in placentation, embryo-development, and wound-healing reaction (T. Frandsen, unpublished observations), which are essentially normal in PAI-1-deficient mice.

Although the exact mechanism of action of PAI-1 remains to be elucidated, at least three different hypothesis can be formulated. PAI-1 could prevent excessive matrix degradation against uPA-mediated degradation, thereby providing a cell adhesion substrate for endothelial cell migration. It has been shown *in vitro* that excessive proteolysis prevents the coordinated assembly of endothelial cells into capillary shoots (31).

PAI-1 could also be considered as the molecular switch that governs uPAR- and/or integrin-mediated cell adhesion and release (32). Finally, through the inhibition of plasmin, uPA, and tPA, PAI-1 could promote angiogenesis by reducing the angiostatin generation from plasminogen (33). The use of adenovirus with mutated PAI-1 forms modulating these different pathways is one of the strategies that could give new insight into the mechanisms of PAI-1 action in angiogenesis.

Laser-induced choroidal neovascularization in mice is useful for basic investigation of choroidal angiogenesis, although it probably differs from that occurring naturally in human AMD. Our observations nevertheless emphasize the essential role of PAI-1 in the development of subretinal neovascularization and identify PAI-1 as a potential target for therapeutic retinal anti-angiogenic strategies. **[F]**

We thank F. Olivier and C. Stegen for their collaboration and P. Gavitelli for technical assistance. This study was supported by grants from Les Amis des Aveugles, Ghlin, the Fondation Léon Frédéricq, University of Liège, the Fonds d'Investissements de Recherche Scientifique, CHU, Liège, the CGER-Assurances, Belgium. A.N. is a senior research associate from the National Fund for Scientific Research (FNRS), Belgium, and K.B. is the recipient of a grant from FNRS-Televie. The work made in the BL3 was partially supported by the Anti-Cancer Research Fund from the University of Liège, Belgium.

REFERENCES

- Brooks, P. C., Clark, R. A., and Cheresh, D. A. (1994) Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* **264**, 569–571
- Friedlander, M., Theesfeld, C. L., Sugita, M., Fruttiger, M., Thomas, M. A., Chang, S., and Cheresh, D. A. (1996) Involvement of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 in ocular neovascular diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9764–9769
- Luna, J., Tobe, T., Mousa, S. A., Reilly, T. M., and Campochiaro, P. A. (1996) Antagonists of integrin alpha v beta 3 inhibit retinal neovascularization in a murine model. *Lab. Invest.* **75**, 563–573
- Hammes, H. P., Brownlee, M., Jonczyk, A., Sutter, A., and Preissner, K. T. (1996) Subcutaneous injection of a cyclic peptide antagonist of vitronectin receptor-type integrins inhibits retinal neovascularization. *Nat. Med.* **2**, 529–533
- Kvanta, A., Alveré, P. V., Berglin, L., and Seregård, S. (1996) Subfoveal fibrovascular membranes in age-related macular degeneration express vascular endothelial growth factor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **37**, 1929–1934
- Aiello, L. P., Avery, R. L., Arrigg, P. G., Keyt, B. A., Jampel, H. D., Shah, S. T., Pasquale, L. R., Thieme, H., Iwamoto, M. A., and Park, J. E. (1994) Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N. Engl. J. Med.* **331**, 1480–1487
- Pierce, E. A., Avery, R. L., Foley, E. D., Aiello, L. P., and Smith, L. E. (1995) Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 905–909
- Okamoto, N., Tobe, T., Hackett, S. F., Ozaki, H., Viores, M. A., LaRochelle, W., Zack, D. J., and Campochiaro, P. A. (1997) Transgenic mice with increased expression of vascular endothelial growth factor in the retina: a new model of intraretinal and subretinal neovascularization. *Am. J. Pathol.* **151**, 281–291
- Blaauwgeers, H. G., Holtkamp, G. M., Rutten, H., Witmer, A. N., Koolwijk, P., Partanen, T. A., Alitalo, K., Kroon, M. E., Kijlstra, A., van Hinsbergh, V. W., et al. (1999) Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *Am. J. Pathol.* **155**, 421–428
- Kaplan, H. J., Leibole, M. A., Tezel, T., and Ferguson, T. A. (1999) Fas ligand (CD95 ligand) controls angiogenesis beneath the retina. *Nat. Med.* **5**, 292–297
- Weber, B. H., Vogt, G., Pruetz, R. C., Stohr, H., and Felber, U. (1994) Mutations in the tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3) in patients with Sorsby's fundus dystrophy. *Nat. Genet.* **8**, 352–356
- Steen, B., Sejersen, S., Berglin, L., Seregård, S., and Kvanta, A. (1998) Matrix metalloproteinases and metalloproteinase inhibitors in choroidal neovascular membranes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **39**, 2194–2200
- Andreasen, P. A., Kjoller, L., Christensen, L., and Duffy, M. J. (1997) The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int. J. Cancer* **72**, 1–22
- Blasi, F. (1999) Proteolysis, cell adhesion, chemotaxis, and invasiveness are regulated by the u-PA-u-PAR-PAI-1 system. *Thromb. Haemost.* **82**, 298–304
- Bajou, K., Noel, A., Gerard, R. D., Masson, V., Brunner, N., Holst-Hansen, C., Skobe, M., Fusenig, N. E., Carmeliet, P., Collen, D., et al. (1998) Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat. Med.* **4**, 923–928
- Pedersen, H., Brunner, N., Francis, D., Osterlind, K., Ronne, E., Hansen, H. H., Dano, K., and Grondahl-Hansen, J. (1994) Prognostic impact of urokinase, urokinase receptor, and type 1 plasminogen activator inhibitor in squamous and large cell lung cancer tissue. *Cancer Res.* **54**, 4671–4675
- Grant, M. B., Ellis, E. A., Caballero, S., and Mames, R. N. (1996) Plasminogen activator inhibitor-1 overexpression in nonproliferative diabetic retinopathy. *Exp. Eye Res.* **63**, 233–244
- Iijima, H., Iida, T., Murayama, K., Imai, M., and Gohdo, T. (1999) Plasminogen activator inhibitor 1 in central serous chorioretinopathy. *Am. J. Ophthalmol.* **127**, 477–478
- Tobe, T., Ortega, S., Luna, J. D., Ozaki, H., Okamoto, N., Derevanik, N. L., Viores, S. A., Basilico, C., and Campochiaro, P. A. (1998) Targeted disruption of the FGF2 gene does not prevent choroidal neovascularization in a murine model. *Am. J. Pathol.* **153**, 1641–1646
- Carmeliet, P., Kieckens, L., Schoonjans, L., Ream, B., van Nuffelen, A., Prendergast, G., Cole, M., Bronson, R., Collen, D., and Mulligan, R. C. (1993) Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. I. Generation by homologous recombination and characterization. *J. Clin. Invest.* **92**, 2746–2755
- Behringer, R. R., Crotty, D. A., Tennyson, V. M., Brinster, R. L., Palmiter, R. D., and Wolgemuth, D. J. (1993) Sequences 5' of the homeobox of the Hox-1.4 gene direct tissue-specific expression of lacZ during mouse development. *Development* **117**, 823–833
- Carmeliet, P., Moons, L., Lijnen, R., Janssens, S., Lupu, F., Collen, D., and Gerard, R. D. (1997) Inhibitory role of plasminogen activator inhibitor-1 in arterial wound healing and neointima formation: a gene targeting and gene transfer study in mice. *Circulation* **96**, 3180–3191
- Folkman, J., and D'Amore, P. A. (1996) Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell* **87**, 1153–1155
- Smalley, D. M., Fitzgerald, J. E., Taylor, D. M., Cone, R. E., and O'Rourke, J. (1994) Tissue plasminogen activator activity in human aqueous humor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **35**, 48–53
- Steinkamp, G. W., Hattenbach, L. O., Heider, H. W., and Scharrer, I. (1993) Plasminogen activator and PAI. Detection in aqueous humor of the human eye. *Ophthalmologie* **90**, 73–75
- Kamei, M., and Hollyfield, J. G. (1999) TIMP-3 in Bruch's membrane: changes during aging and in age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 2367–2375
- Plantner, J. J., Jiang, C., and Smine, A. (1998) Increase in interphotoreceptor matrix gelatinase A (MMP-2) associated with age-related macular degeneration. *Exp. Eye Res.* **67**, 637–645
- Kosano, H., Okano, T., Katsura, Y., Noritake, M., Kado, S., Matsuo, T., and Nishigori, H. (1999) ProMMP-9 (92 kDa gelatinase) in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Life Sci.* **64**, 2307–2315
- Hattenbach, L. O., Allers, A., Gumbel, H. O., Scharrer, I., and Koch, F. H. (1999) Vitreous concentrations of TPA

- and plasminogen activator inhibitor are associated with VEGF in proliferative diabetic vitreoretinopathy. *Retina* **19**, 383–389
30. Bullard, L. E., Rajaratnam, V. S., and Collier, R. J. (1999) Evidence that AL-3789 inhibits retinal neovascularization in an animal model of ROP by inducing retinal PAI-1. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 3255 (Abstr.)
 31. Montesano, R., Pepper, M. S., Mohle-Steinlein, U., Risau, W., Wagner, E. F., and Orci, L. (1990) Increased proteolytic activity is responsible for the aberrant morphogenetic behavior of endothelial cells expressing the middle T oncogene. *Cell* **62**, 435–445
 32. Noel, A., Bajou, K., Masson, V., Devy, L., Frankenke, F., Rakic, J. M., Lambert, V., Carmeliet, P., and Foidart, J. M. (1999) Regulation of cancer invasion and vascularization by plasminogen activator inhibitor-1. *Fibrinolysis Proteolysis* **13**, 220–225
 33. Gately, S., Twardowski, P., Stack, M. S., Cundiff, D. L., Grella, D., Castellino, F. J., Enghild, J., Kwaan, H. C., Lee, F., Kramer, R. A., et al. (1997) The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10868–10872

*Received for publication June 22, 2000.
Revised for publication September 21, 2000.*

9.2 Article 2 : Mice without uPA, tPA, or plasminogen genes are resistant to experimental choroidal neovascularization

J. M. Rakic, V. Lambert, C. Munaut, K. Bajou, K. Peyrollier, M. L. Alvarez-Gonzalez, P. Carmeliet, J. M. Foidart, and A. Noel..

Invest Ophthalmol.Vis.Sci. 44 (4):1732-1739, 2003.

Mice without uPA, tPA, or Plasminogen Genes Are Resistant to Experimental Choroidal Neovascularization

Jean-Marie Rakic,¹ Vincent Lambert,² Carine Munaut,² Khalid Bajou,² Karine Peyrollier,² Marie-Luz Alvarez-Gonzalez,² Peter Carmeliet,³ Jean-Michel Foidart,² and Agnès Noël²

PURPOSE. To evaluate the presence and potential involvement of members of the plasminogen/plasminogen activator (Plg/PA) system in the exudative form of age-related macular degeneration (AMD).

METHODS. The expression of PA members mRNA was evaluated in human and experimental choroidal neovascularization (CNV) by RT-PCR. The presence and activity of PA was studied by immunofluorescence and in situ zymography. The influence of endogenous plasminogen (Plg), urokinase (uPA), tissue type plasminogen activator (tPA), and uPA receptor (uPAR) was explored in single-gene-deficient mice in a model of laser-induced CNV.

RESULTS. Members of the Plg/PA system were present both in human and murine CNV. The absence of Plg, uPA, or tPA significantly decreased the development of experimental CNV compared with wild-type or uPAR-deficient mice. This effect could be attributable, partly to a modulation of matrix metalloproteinase activity, but also to an accumulation of fibrinogen-fibrin in the laser-induced wounds.

CONCLUSIONS. Together with previous work done by the authors, this study indicates that choroidal neovascularization is extremely sensitive to the modulation of Plg/PA system activity. This may provide a new strategy for the treatment of exudative AMD. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:1732-1739) DOI:10.1167/iov.02-0809

Pathologic angiogenesis is the underlying cause of the exudative form of age-related macular degeneration (AMD). Unlike retinal neovascularization, choroidal neovascularization (CNV) is not primarily induced by hypoxia and the molecular signals involved in its initiation and progression are only partly defined.¹ Angiogenesis is an invasive process that requires proteolysis of the extracellular matrix, proliferation, and mi-

gration of endothelial cells with simultaneous synthesis of new matrix components. Such migratory and tissue remodeling events are regulated by different proteolytic systems including matrix metalloproteinases (MMPs) and serine proteinases of the plasminogen/plasminogen activator (Plg/PA) system.^{2,3} That MMPs are required for angiogenesis has been firmly established.⁴⁻⁶

Urokinase-type (uPA), which binds to a cellular receptor (uPAR), and tissue-type (tPA) plasminogen activators, are serine proteases both able to activate the zymogen plasminogen (Plg) into plasmin. Plasmin is a broadly acting enzyme that degrades fibrin and extracellular matrix proteins and activates pro-MMPs and growth factors.⁷ Plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) is the main physiological inhibitor of PA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces uPA and tPA in endothelial cells derived from the microvasculature,⁸ and when endothelial cells migrate, they significantly upregulate uPA, tPA, uPAR, and PAI-1 at the leading edge of migration.⁹ The importance of PAI-1 in the "proteolytic balance" has been demonstrated in vitro¹⁰ and in tumoral angiogenesis.^{11,12} The specific roles of the Plg/PA system, however remain more controversial. Although developmental and wound-healing-associated angiogenesis was apparently unaffected in uPA-, uPAR-, tPA-, and Plg-deficient mice, several in vivo studies have demonstrated a requirement for this system in other settings.² This may indicate that the repertoire of active fibrinolytic proteins is likely to vary from one context to another.

The initial observation of a proangiogenic effect of uPA was reported in a model of corneal neovascularization.¹³ Several studies have later investigated the involvement of the fibrinolytic system in retinal neovascularization associated with diabetes.¹⁴⁻¹⁶ However, data concerning pathologic angiogenesis growing under the retina from the choroid are not available. We have previously reported the importance of PAI-1 expression in CNV.¹⁷ Because neovascularization has been reported to occur on fibrin degradation in exudative AMD,^{18,19} we investigated here the expression and activity of members of the fibrinolytic system in human and laser-induced murine CNV. The influence of endogenous uPA, uPAR, tPA, and Plg on the formation of CNV was further evaluated in single-gene-deficient mice compared with wild-type (WT) control animals.

METHODS

RT-PCR Analysis of Neovascular Membranes

Eight consecutive submacular CNV specimens were completely removed during surgery for 360° macular translocation performed on patients with exudative AMD (three men, five women; mean age, 77 years; range, 72-83), either not amenable to conventional laser/photodynamic therapy (presence of occult new vessels or submacular bleeding) or in one patient, due to a severe recurrence a few months after a successful medical treatment (patients' demographics are given in Table 1). The neovascular membranes were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Intact human donor posterior segments (Cornea Bank, Liège, Belgium) were used as a control. The methods conformed to the Declaration of Helsinki for research involving human subjects.

From the ¹Department of Ophthalmology, University Hospital, Sart-Tilman, Liège, Belgium; the ²Laboratory of Tumor and Development Biology, University of Liège, Liège, Belgium; and the ³Center for Transgene Technology and Gene Therapy, Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology, University of Leuven, Belgium.

Supported by grants from the European Commission (FP4 and FP5 Programs), the Fund for Medical Scientific Research, the National Fund for Scientific Research (FNRS, Belgium), the Belgian Federation against Cancer, the FB Assurances, the Léon Frédéricq Foundation (University of Liège), the Fund for Investment in Scientific Research (Liège, Belgium), and the Interuniversity Attraction Poles (IUAP) from the Federal Office for Scientific, Technical, and Cultural Affairs, Brussels, Belgium.

Submitted for publication August 9, 2002; accepted September 12, 2002.

Disclosure: J.-M. Rakic, None; V. Lambert, None; C. Munaut, None; K. Bajou, None; K. Peyrollier, None; M.-L. Alvarez-Gonzalez, None; P. Carmeliet, None; J.-M. Foidart, None; A. Noël, None

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Corresponding author: Jean-Marie Rakic, Department of Ophthalmology, University Hospital, Sart-Tilman, B-4000 Liège, Belgium; jmrakic@chu.ulg.ac.be.

TABLE 1. Patients Demographics

	M 71 (1)*	F 76 (2)	M 79 (3)	F 75 (4)
Preoperative visual acuity	20/200	20/400	20/1250	20/200
Subretinal hemorrhage	—	++	++	+
Lesion size (DD)	1.5	2	4	3
CNV type (angiography)	Occult	ND	ND	Occult + PED
Previous therapy	—	—	PDT (2X)	—
Status of the other eye	Fibrotic CNV	Fibrotic CNV	Disciform scar	Dry AMD

DD, disc diameter; ND, not done; PED, pigment epithelium detachment; PDT, photodynamic therapy; ++, refers to large amounts of blood preventing angiography.

* Gender and age are given with the number in brackets corresponding to the CNV membrane in Figure 1.

CNV was induced in mice by multiple argon laser burns, as previously described.²⁰ As a control, multiple subliminal laser burns (without the formation of the bubble sign) were also performed. Animals were killed at days 3, 5, 10, 14, 20, and 40, and the eyes were enucleated. The posterior segments (neural retina and RPE-choroid complex) were dissected and immediately frozen in liquid nitrogen.

The frozen tissues were pulverized in a dismembrator (B. Braun Biotech International, GmbH, Melsungen, Germany), and total RNA was isolated with an extraction kit (RNeasy; Qiagen, Paris, France) according to the manufacturer's protocol. 28S rRNA was amplified with an aliquot of 10 ng total RNA with an RNA PCR kit (GeneAmp ThermoStable rTth reverse transcriptase; Applied Biosystems, Foster City, CA) and two pairs of primers (Eurogentec, Liège, Belgium; oligonucleotide sequences are shown in Table 2). Reverse transcription was performed at 70°C for 15 minutes, followed by a 2-minute incubation at 95°C for denaturation of RNA-DNA heteroduplexes. Amplification started at 15 seconds at 94°C, 20 seconds at 60°C, and 10 seconds at 72°C. RT-PCR products were resolved on 2% agarose gels and analyzed with a fluorescence imager (Fluor-S Multimager; Bio-Rad, Richmond, CA) after staining with ethidium bromide (FMC BioProducts, Philadelphia, PA).

Murine Model of Laser-Induced CNV

CNV was induced in mice by four burns (at the 6, 9, 12, and 3 o'clock positions around the optic disc) using a green argon laser (532 nm; 50- μ m diameter spot size; 0.05-second duration; 400-mW intensity).¹⁷ Eyes in which no bubble developed at the site of laser treatment or in which there was subretinal bleeding were not included in the analysis. The eyes were enucleated at day 14, embedded in mounting medium (Tissue Tek; Miles Laboratories, Naperville, IL), and frozen in liquid nitrogen for cryostat sectioning. CNV was quantified as previously

described.^{17,20} Briefly, frozen serial sections were cut throughout the entire extent of each burn, and the thickest region (minimum of four per lesion) was used for the quantification. Using a computer-assisted image analysis system (Olympus Micro Image version 3.0 for Windows 95/NT, Olympus Optical Co., London, UK), neovascularization was estimated by the ratio B/C: thickness from the bottom of the pigmented choroidal layer to the top of the neovascular membrane (B)/thickness of the intact pigmented choroid adjacent to the lesion (C).

Genetically Modified Mice

Brother-sister mating generated all knockout mice in a C57BL6/129 background and their corresponding WT littermates. Homozygous mice deficient of uPA (uPA^{-/-}), tPA (tPA^{-/-}), uPAR (uPAR^{-/-}), and Plg (Plg^{-/-}) and their corresponding WT littermates with a mixed genetic background of 75% C57BL6 and 25% 129 SV/SL strain were generated as described previously.²¹⁻²³ Mice of either sex aged between 8 and 12 weeks were used. There were five or more mice in each group. The animals were maintained in a 12-hour light-dark cycle and had free access to food and water. All the animal experiments were performed in compliance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research.

Immunohistochemistry

Cryostat sections (5- μ m thick) were fixed in paraformaldehyde 1% in 0.07 M phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.0) for 5 minutes or in acetone for 10 minutes at room temperature and then incubated with the primary antibody. Antibodies raised against type IV collagen (guinea pig polyclonal, produced in our laboratory; diluted 1:100), mouse platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM; rat mono-

TABLE 2. RT-PCR Parameters

Gene (Accession No.)	Position	Oligonucleotide Sequence (5'-3')	Size of PCR Product (bp)	Cycles (n)
28S (U13369)	12403F	GTTCACCCACTAATAGGGAACGTGA	212b	19
	12614R	GGATTCTGACTTAGAGGCCGTTCACT		
h uPA (X02419)	5020F	ACTACTACGGCTCTGAAGTCACCA	199b	33
	6209R	GAAGTGTGAGACTCTCGTGTAGAC		
m uPA (M17922)	6527F	TATGCAGCCCCACTACTATGGCTC	210b	35
	8016R	GAAGTGTGAGACTCTCGTGTAGAC		
h tPA (M15518)	146F	CAGGAAATCCATGCCCGATT	192b	33
	337R	GCTGCAACTTTTGACAGGCAC		
m tPA (J03520)	192F	CTACAGAGCGACCTGCAGAGAT	200b	35
	391R	AATACAGGGCCTGCTGACACGT		
h uPAR (U08839)	901F	CTGGAGCTTAAAACTGCGG	157b	33
	1057R	GGTTTTTCGGTTCGTGAGTGC		
m uPAR (X62700)	156F	ACTACCGTGCITCGGGAATG	134b	35
	289R	ACGGTCTCTGCAGGCTGATG		

m and h, mouse and human, respectively.

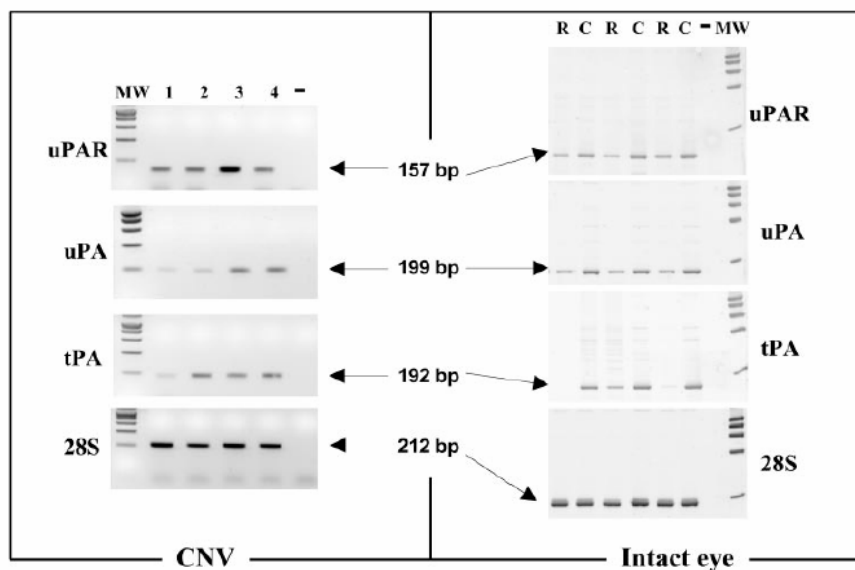


FIGURE 1. PA expression in exudative AMD. Representative example of uPAR, uPA, and tPA mRNA expression in surgically extracted choroidal neovascular membranes of patients 1 to 4 (left, lanes 1–4, respectively), who had exudative AMD (Table 1) or in posterior segments of intact donors. Total RNA (approximately 10 ng) was analyzed by RT-PCR. The 28S rRNA was used to assess the total amount of RNA loaded. Lane M: molecular markers. Product size (bp) are shown at right. Right: lane R: neural retina; lane C: choroid-RPE complex.

clonal, PharMingen, San Diego, CA; diluted 1:20), murine uPA (rabbit polyclonal, a generous gift of Peter Carmeliet, Catholic University, Leuven, Belgium; diluted 1:500), murine tPA (rabbit polyclonal, a generous gift of Peter Carmeliet; diluted 1:500), murine uPAR (rabbit polyclonal, a generous gift of Steve Rosenberg, Chiron Corp., Emeryville, CA; diluted 1:500) and murine fibrinogen-fibrin (goat polyclonal; Nordic Immunologic, Tilburg, The Netherlands; diluted 1:400) were incubated for 1 hour at room temperature. The sections were washed in PBS (3×10 minutes) and the appropriate secondary antibody was added, conjugated to horse radish peroxidase (HRP), tetramethyl-rhodamine isothiocyanate (TRITC), or fluorescein-isothiocyanate (FITC): rabbit anti-goat IgG (Dako, Glostrup, Denmark, diluted 1:100), rabbit anti-rat IgG (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium; diluted 1:40), swine anti-rabbit IgG (Dako; diluted 1:200), monoclonal anti-guinea pig IgG (Sigma-Aldrich, Belgium; diluted 1:200) were applied for 30 minutes. For staining of fibrinogen-fibrin, a drop of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC⁺; Dako) was added, and sections were counterstained for 1 minute with hematoxylin. For immunofluorescence staining, after three washes in PBS for 10 minutes each and a final rinse in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.8), labeling was analyzed under an inverted microscope equipped with epifluorescence optics. Specificity of staining was assessed either by substitution of nonimmune serum for primary antibody or by testing in the deficient animal.

In Situ Casein Zymography

Cryostat sections were coated with a mixture containing 2% skim milk, 0.9% agar, and 600 μ L Plg (Sigma-Aldrich), as previously described.^{11,12} An 8% milk stock solution was prepared in PBS, heated at 95°C for 30 minutes, and centrifuged at 3000 rpm to remove insoluble material. Slides were incubated at 37°C in a humidified chamber for 4 hours for assessment of total PA activity and for 24 hours in the presence of uPA-specific inhibitor amiloride (2 mM; Sigma-Aldrich) for assessment of tPA activity. Caseinolysis was monitored by examination under a dark-field microscope.

Gelatin Zymography Assay

CNV was induced in mice by multiple laser burns, as described earlier. Animals were killed at day 3, and the eyes were enucleated. The posterior segments were dissected and snap frozen in liquid nitrogen. Frozen tissues were then pulverized in liquid nitrogen, homogenized in buffer (0.1 M Tris-HCl [pH 8.1] and 0.4% Triton X-100) and centrifuged

for 20 minutes at 5000g. The pellets were discarded. Aliquots of supernatants were mixed with SDS sample buffer and electrophoresed directly as previously described.²⁴ All lanes were loaded with equal amounts of material (5 ng).

Statistical Analysis

Data were analyzed on computer (Prism 3.0; GraphPad, San Diego, CA). The Mann-Whitney test was used to determine whether there were significant ($P < 0.05$) differences between control and genetically modified mice.

RESULTS

RT-PCR Analysis of Neovascular Membranes

uPA, tPA, and uPAR mRNAs were detected in all CNV specimens obtained during surgery. However, basal expression of these mRNAs was also documented in intact donors, as previously described^{26,27} (Fig. 1). Patients with these aggressive neovascular membranes had a documented (Table 1) different natural history (size of the lesion, amount of blood, previous treatment). Expression of PA mRNA seemed to be relatively increased in patients with larger lesions or with significant amounts of blood in the subretinal space. To evaluate more precisely the temporal pattern of gene expression, semiquantitative RT-PCR analysis (normalized to 28S signal) was then applied on laser-induced murine neovascular choroidal membranes at different end points (days 3–40 after laser treatment). As shown on densitometry histograms (Figs. 2A–C), uPA and uPAR mRNAs displayed the largest induction during the course of experimental murine CNV, with a decrease in expression after day 10 (coinciding with the period of CNV stabilization). A similar induction was not observed when low-power laser treatment (not disrupting Bruch's membrane) was applied (Fig. 2E).

Presence of uPA, tPA, and uPAR in Experimental CNV

Immunohistochemical staining demonstrated the presence of uPA, tPA, and uPAR proteins at the site of laser-induced injury (RPE and choroidal layer, Figs. 3A–C). No staining was ob-

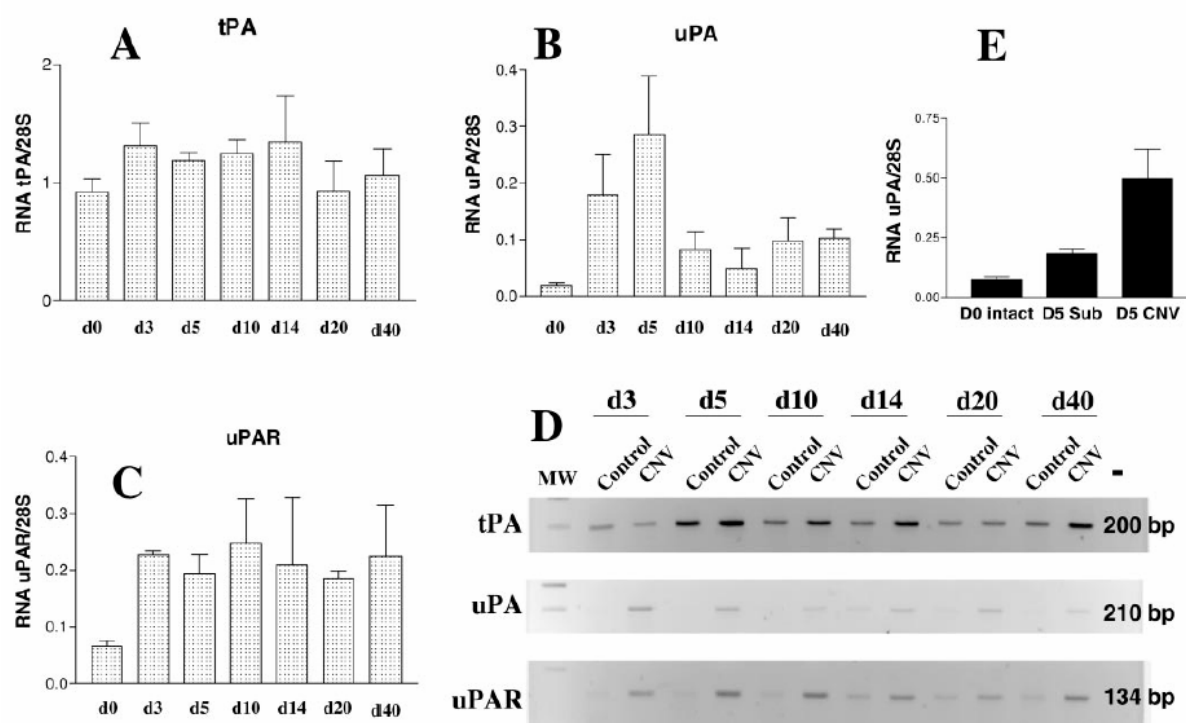


FIGURE 2. RT-PCR analysis of PA mRNA expression during the development of murine laser-induced CNV. The histograms correspond to the densitometric quantification of tPA (A), uPA (B), and uPAR (C) mRNA normalized to the 28S signal at different end points. The evaluation was performed on the entire posterior segment after the induction of multiple wounds to Bruch's membrane. As a control, a similar evaluation was performed for uPA at day 5 with multiple subliminal laser impacts (E). D5sub, subliminal laser treatment; D5 CNV, laser treatment with rupture of the Bruch's membrane. Unlike tPA which remained relatively constant, expression of uPA and uPAR mRNA appeared to be induced during the early phases of development of CNV. Representative gels are displayed with molecular size markers (bp) at right (D).

served at any location in $uPA^{-/-}$, $tPA^{-/-}$, or $uPAR^{-/-}$ mice (not shown). uPAR protein was detected both in CNV and in adjacent intact areas (Fig. 3B). In situ zymography in WT mice revealed that PA activity was mainly localized in and around the laser-induced CNV (Fig. 3E), but was also present (after a longer incubation) at the RPE layer (Fig. 3F). Caseolytic activity was also detected (at a weaker level) when uPA was inhibited with amiloride, suggesting that tPA mediates a part of the observed proteolytic effect (Fig. 3G).

CNV Development In Vivo in $uPA^{-/-}$, $tPA^{-/-}$, $uPAR^{-/-}$ and $Plg^{-/-}$ Mice

To determine whether the absence of members of the PA/Plg system influences CNV in vivo, we evaluated the severity of the neovascular reactions by immunostaining with anti-PECAM antibodies and, histologically, by measuring, on serial sections, the maximum height of the lesion above the choroidal layer observed in neighboring intact zones.^{17,20} CNV at the site of laser-induced trauma was very restricted in $uPA^{-/-}$, $tPA^{-/-}$ (not shown), and $Plg^{-/-}$ mice, but robust CNV was observed in $uPAR^{-/-}$ and WT (not shown) mice (Figs. 4A-C). This was quantified by determining the B/C ratio between total thickness of lesions to the thickness of adjacent normal choroid, and an approximately 50% reduction of the B/C ratio was consistently observed in $uPA^{-/-}$, $tPA^{-/-}$, and $Plg^{-/-}$ mice ($P < 0.001$) compared with WT mice (Fig. 4D).

Gelatin Zymography Assay

To investigate an influence on matrix metalloproteinase (MMP) activity due to the absence of PA or Plg, the activities of MMP-2

and -9 in control and deficient mice were analyzed by gelatin zymography performed on the posterior segment after multiple laser-induced trauma. The latent form of MMP-2 (known to be constitutively expressed) was detected in all tissue extracts (Fig. 5). MMP-9 activity was not detected in intact eyes, whereas higher levels were found in laser-treated eyes. However, MMP-9 activity appeared to be decreased and that of MMP-2 increased in $Plg/PA^{-/-}$ mice compared with WT control animals.

Fibrinogen/Fibrin Deposition in $uPA^{-/-}$, $tPA^{-/-}$, and $Plg^{-/-}$ Mice

Mice with a single deficiency of tPA or uPA are susceptible to thrombosis after traumatic or inflammatory challenge,²¹ and it has been demonstrated that fibrinogen is responsible for the phenotype observed in $Plg^{-/-}$ mice.²⁵ Therefore, to explore the possibility that excessive fibrinogen-fibrin deposition could be responsible for the decreased choroidal angiogenesis observed in $Plg/PA^{-/-}$ mice, fibrinogen-fibrin was immunostained at day 3 after laser treatment (Figs. 6A-D). Although WT control animals showed a modest fibrinogen-fibrin presence on the CNV's forward edge, $uPA^{-/-}$, $tPA^{-/-}$, and $Plg^{-/-}$ mice demonstrated massive accumulation of fibrinogen-fibrin both in the retinal vessels, and in the bottom of the laser-induced trauma, which had a "sealed" appearance.

DISCUSSION

Our data report for the first time the expression of tPA, uPA, and uPAR mRNAs, both in choroidal neovascular membranes

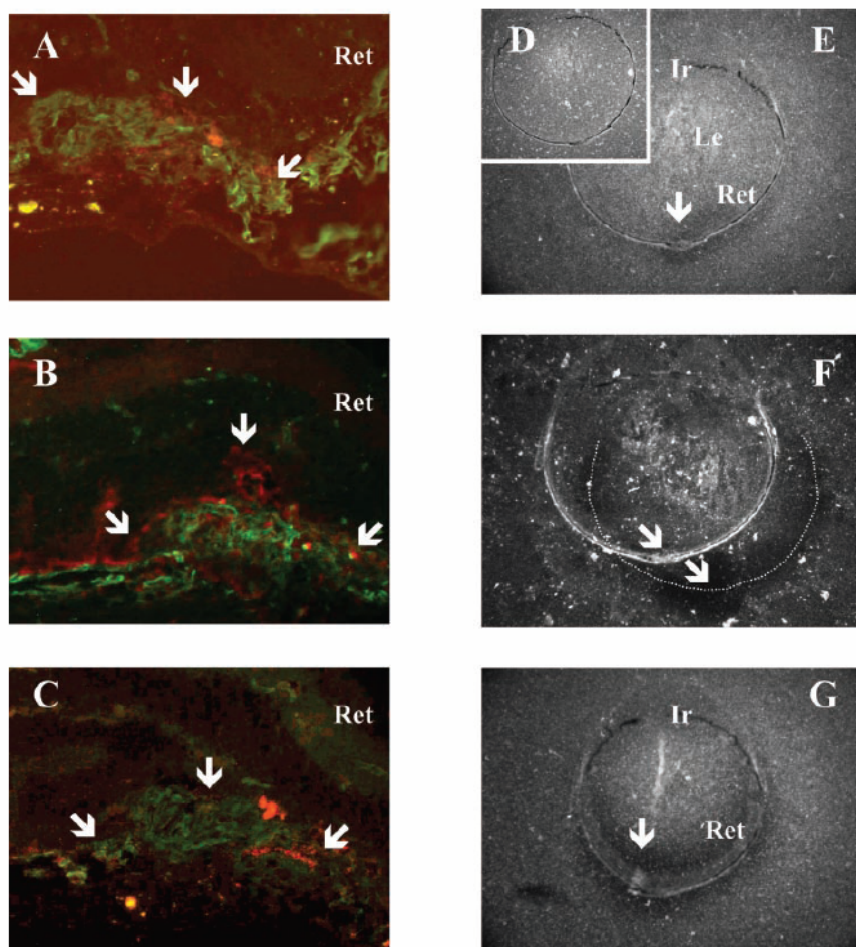


FIGURE 3. Presence and activity of PA in murine CNV. Immunolocalization (red) of uPA (A), uPAR (B), and tPA (C) in ocular frozen sections counterstained with collagen type IV antibody (green) at day 14 after laser injury of Bruch's membrane in WT mice. In situ zymography of ocular sections in WT mice at day 3 after laser treatment. Total PA activity was visualized as a dark zone of lysis (dark-field images) after incubation for 4 (E) and 12 (F) hours. After 12 hours, the localization of PA extended in the intact RPE (the retracted casein gel has moved to the right side of the slide). In the presence of 2 mM amiloride for 24 hours, only tPA activity was detected (G). Negative control (D). Ret, neural retina; Le, lens; and Ir, iris; arrows: neovascular area. Original magnification: (A-C) $\times 400$; (E-G) $\times 25$.

surgically extracted from patients with exudative AMD and during murine experimental CNV. This suggests (but does not definitively show) that these molecules may be involved in the CNV process in humans, because basal expression of these molecules was also present (primarily in the choroid-RPE complex) in intact eyes (Fig. 1). These observations were extended in mice by immunostaining and in situ zymography showing PA activity at the site of laser-induced trauma. We investigated therefore the influence of a deficiency in the Plg/PA system on the development of experimental CNV.

WT control mice and uPAR^{-/-} mice exhibited a robust angiogenic response. However, significant experimental CNV did not develop in uPA^{-/-}, tPA^{-/-}, or Plg^{-/-} animals, suggesting a contribution of these proteinases in chorioretinal disease. Indeed, it has been demonstrated that the intact choroid is a source of continuous tPA secretion²⁶ and the RPE a source of uPA.²⁷ Urokinase activity was increased in experimental retinal neovascularization and in diabetic neovascular membranes.^{15,28} Intraocular elevated tPA levels have been associated with proliferative diabetic retinopathy,¹⁶ and preliminary observations have suggested that uPA inhibition could prevent the retinal neovascularization induced by hypoxia (Mcguire PG, Jones TR, Talaric N, Warren E, Das A, ARVO Abstract 1261, 2002). The apparent absence of effect secondary to uPAR deficiency may be explained by the observation that binding of uPA to uPAR is not required to provide sufficient pericellular uPA-mediated plasmin proteolysis.²⁹

The phenotype observed in uPA^{-/-}, tPA^{-/-}, and Plg^{-/-} mice could not be directly ascribed to a defect at the endothelial level. Indeed, first, CNV is not a disease exclusively caused by isolated endothelial cell pathologic proliferation. Clinical and experimental data^{20,30} have shown the presence of an important inflammatory component in the disease, suggesting that CNV is a nonspecific wound-healing response.³¹ Second, previous studies have showed that endothelial cell migration in fibrin gels is not severely impaired by isolated deficiency of Plg/PA system components, but is an essential active membrane-type 1 MMP.³² That deficiencies in endogenous uPA or tPA does not impair endothelial cell migration has been confirmed in the aortic ring model¹⁰ and in a model of tumoral angiogenesis induced by implantation of malignant keratinocytes.¹² Nevertheless, angiogenesis in these two models was still dependent on the presence of Plg, indicating that plasmin-mediated proteolysis may be a key event in particular experimental settings. In addition, while defective pathologic angiogenesis in uPA^{-/-} and tPA^{-/-} mice has not been reported for a while, recent data challenge this observation.

Recently, a critical role for tPA during invasion and angiogenesis of pancreatic tumor cells has been suggested.³³ Furthermore, the presence of uPA or Plg is essential for capillary angiogenesis during infarct revascularization.³⁴ This particular phenotype is partly explained by defective MMP-9 activation in the infarcted heart secondary to the absence of uPA and plasmin. In our model, MMP-9 appeared to be decreased, whereas

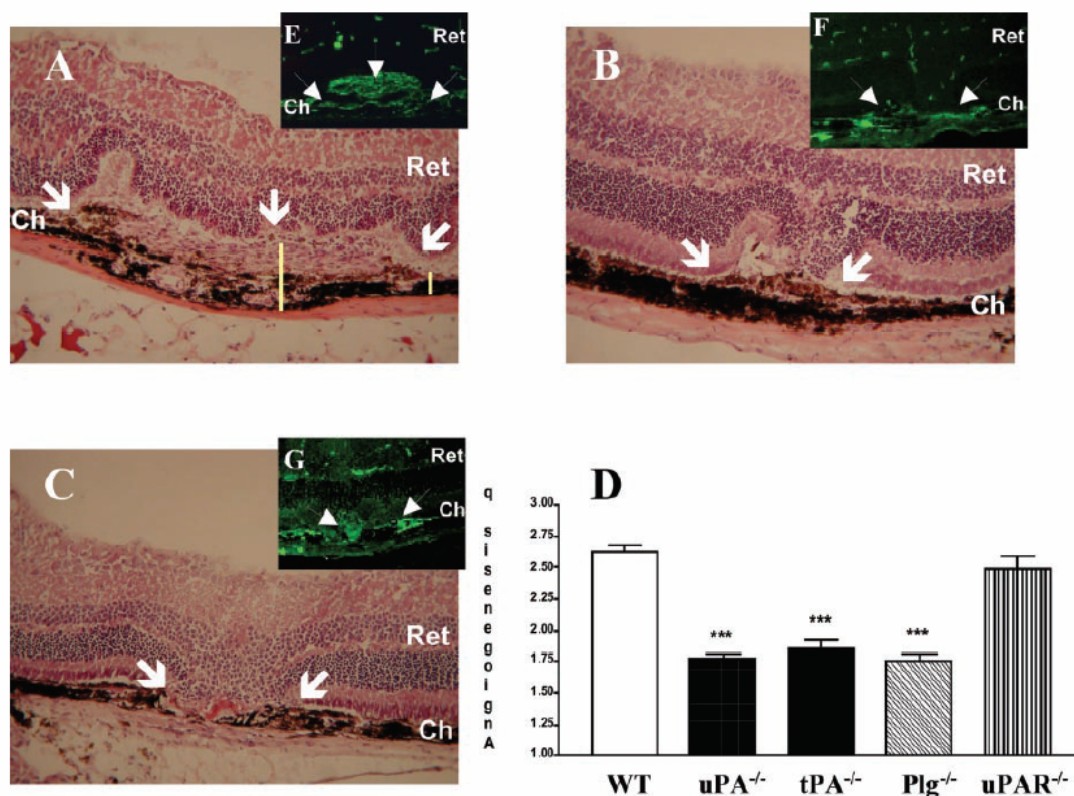


FIGURE 4. Absence of Plg, uPA, or tPA prevents the development of CNV. Hematoxylin-eosin staining of a representative area of CNV at the site of laser-induced trauma in mice deficient of uPAR (A), uPA (B), and Plg (C). Neovascularization was almost completely absent in uPA^{-/-} (F) and Plg^{-/-} (G) mice when vessels were immunostained with anti-mouse PECAM antibody (green) compared with WT (not shown) or uPAR^{-/-} (E) mice. Ret, neural retina; Ch, choroid; arrows: neovascular area. (D) The neovascular reaction was determined with computer-assisted image analysis by evaluating the B/C ratio, as described previously,^{17,20} at day 14 after laser injury of Bruch's membrane in WT and gene-deficient mice. ****P* < 0.001; error bars = SE. Original magnification: (A–C) ×200; (E, F, G) ×400.

MMP-2 activity seemed to be increased when Plg/PA was deficient (Fig. 5). All together, these data support the idea that the need for PA during angiogenesis may be related to the composition of the extracellular matrix or to the expression pattern of proteinases during different conditions.

PAI-1 is the main physiological inhibitor of uPA and tPA. It not only regulates the proteolytic activity of uPA but also determines the level of uPA bound to its cell surface receptor (uPAR) by promoting the rapid endocytosis of the trimolecular uPA–uPAR–PAI-1 complex.³⁵ We have reported previously that deficient expression of PAI-1 in mice prevents the development of experimental CNV, which is restored when sys-

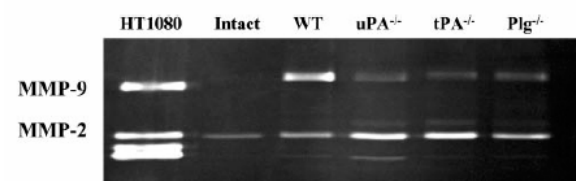


FIGURE 5. Zymographic analysis of MMP-2 and -9 in Plg/PA^{-/-} and WT mice. Tissues were extracted either from posterior eyes segments with laser-induced neovascularization or intact eyes of three different mice. As a positive control, medium conditioned by human HT1080 cells was included. All lanes were loaded with the same amount of material (5 ng).

temic and local PAI-1 expression is achieved by intravenous injection of a replication-defective adenoviral vector expressing PAI-1 cDNA.¹⁷ However, high doses of PAI-1 were equally efficient in inhibiting development of CNV (Lambert V, Munaut C, Bajou K, et al., manuscript submitted) indicating that in this murine model of exudative AMD, finely tuned fibrinolysis was a key element. In the current study, immunohistochemically that in the absence of uPA, tPA, or Plg, excessive accumulation of fibrinogen-fibrin took place at the level of the laser-induced trauma, even in the presence of MMP activity. These fibrin deposits may impose a physical barrier to several components of normal CNV (endothelial cells, fibroblasts, and monocytes) that cannot be resolved without plasmin-mediated fibrinolysis. Taken together, these results suggest that in the choroid, the angiogenic program is more dependent on the PA/Plg axis than on MMP-driven fibrinolysis. This is in line with our recent observations in MMP-9-deficient mice showing that, although MMP-9 is expressed and active during development of CNV, its absence induces only a modest reduction in neovascularization.²⁰

Choroidal capillaries forming pathologic neovascular membranes appear to be exquisitely sensitive to variations in the proteolytic PA-driven balance. Both excessive fibrinolysis (such as occurred in PAI-1 deficiency) and defective fibrinolysis (the result of either isolated Plg/PA deficiency, or excessive PAI-1 levels) prevents the development of neovascularization and

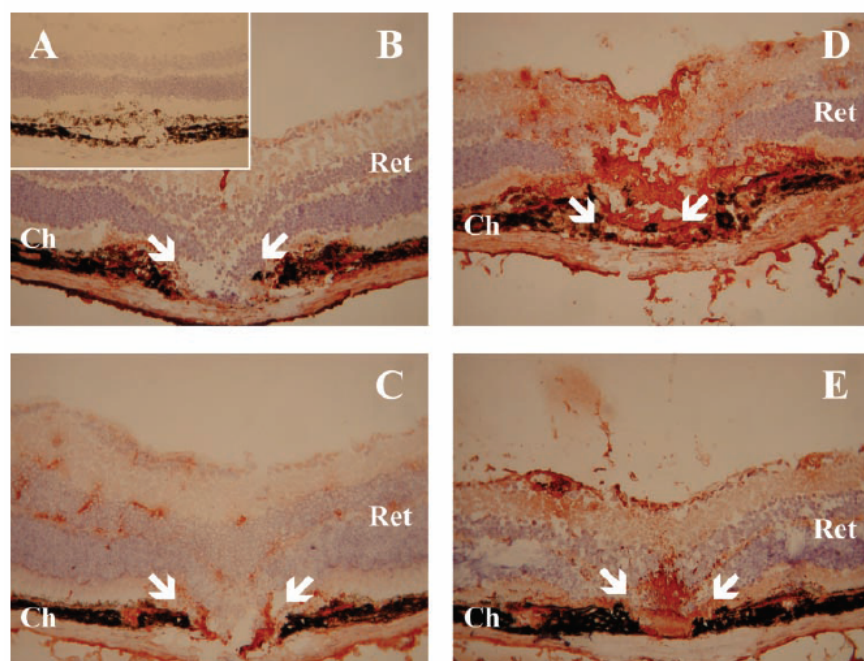


FIGURE 6. Immunohistochemical staining for fibrinogen-fibrin at the site of a laser-induced wound. Frozen ocular sections from wild-type (B), uPA^{-/-} (C), tPA^{-/-} (D), and Plg^{-/-} (E) mice reveal the presence of limited amount of fibrin in WT mice, contrasting with the accumulation of fibrin in Plg/PA-system-deficient mice both at the site of choroidal trauma and in retinal vessels. Negative control (A). Original magnification, $\times 200$.

could be proposed, if appropriately controlled, as an antiangiogenic pharmacologic strategy.

Acknowledgments

The authors thank Laurent Naa and Fabrice Olivier for collaboration in the study and Patricia Gavitelli for technical assistance.

References

- Campochiaro PA. Retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol.* 2000;184:301-310.
- Pepper MS. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1104-1117.
- Blasi F. Proteolysis, cell adhesion, chemotaxis, and invasiveness are regulated by the u-PA-u-PAR-PAI-1 system. *Thromb Haemost.* 1999;82:298-304.
- Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest.* 1999;103:1237-1241.
- Bergers G, Brekken R, McMahon G, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol.* 2000;2:737-744.
- Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;3:161-174.
- Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer.* 1997;72:1-22.
- Cavallaro U, Tenan M, Castelli V, et al. Response of bovine endothelial cells to FGF-2 and VEGF is dependent on their site of origin: relevance to the regulation of angiogenesis. *J Cell Biochem.* 2001;82:619-633.
- Carmeliet P, Collen D. Genetic analysis of blood vessel formation: role of endothelial versus smooth muscle cells. *Trend Cardiovasc Med.* 1997;7:271-281.
- Devy L, Blacher S, Grignat-Debrus C, et al. The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. *FASEB J.* 2002;16:147-154.
- Bajou K, Noel A, Gerard RD, et al. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med.* 1998;4:923-928.
- Bajou K, Masson V, Gerard RD, et al. The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin: implications for antiangiogenic strategies. *J Cell Biol.* 2001;152:777-784.
- Berman M, Winthrop S, Ausprunk D, Rose J, Langer R, Gage J. Plasminogen activator (urokinase) causes vascularization of the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1982;22:191-199.
- Grant MB, Guay C. Plasminogen activator production by human retinal endothelial cells of nondiabetic and diabetic origin. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991;32:53-64.
- Das A, McGuire PG, Eriqat C, et al. Human diabetic neovascular membranes contain high levels of urokinase and metalloproteinase enzymes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:809-813.
- Hattenbach LO, Allers A, Gumbel HO, Scharrer I, Koch FH. Vitreous concentrations of TPA and plasminogen activator inhibitor are associated with VEGF in proliferative diabetic vitreoretinopathy. *Retina.* 1999;19:383-389.
- Lambert V, Munaut C, Noel A, et al. Influence of plasminogen activator inhibitor type I on choroidal neovascularization. *FASEB J.* 2001;15:1021-1027.
- Lopez PF, Grossniklaus HE, Lambert HM, et al. Pathologic features of surgically excised subretinal neovascular membranes in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol.* 1991;112:647-656.
- Lopez PF, Lambert HM, Grossniklaus HE, Sternberg P Jr. Well-defined subfoveal choroidal neovascular membranes in age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 1993;100:415-422.
- Lambert V, Munaut C, Noël A, Werb Z, Foidart J-M, Rakic J-M. MMP-9 contributes to choroidal neovascularization. *Am J Pathol.* 2002;161:1247-1253.
- Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, et al. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature.* 1994;368:419-424.
- Carmeliet P, Collen D. Development and disease in proteinase-deficient mice: role of the plasminogen, matrix metalloproteinase and coagulation system. *Thromb Res.* 1998;91:255-285.

23. Ploplis VA, French EL, Carmeliet P, Collen D, Plow EF. Plasminogen deficiency differentially affects recruitment of inflammatory cell populations in mice. *Blood*. 1998;91:2005-2009.
24. Munaut C, Noel A, Weidle UH, Krell HW, Foidart JM. Modulation of the expression of interstitial and type-IV collagenases in coculture of HT1080 fibrosarcoma cells and fibroblasts. *Invasive Metastasis*. 1995;15:169-178.
25. Bugge TH, Kombrinck KW, Flick MJ, Daugherty CC, Danton MJ, Degen JL. Loss of fibrinogen rescues mice from the pleiotropic effects of plasminogen deficiency. *Cell*. 1996;87:709-719.
26. Wang Y, Gillies C, Cone RE, O'Rourke J. Extravascular secretion of t-PA by the intact superfused choroid. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36:1625-1632.
27. Hackett SF, Campochiaro PA. Modulation of plasminogen activator inhibitor-1 and urokinase in retinal pigmented epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993;34:2055-2061.
28. Das A, McLamore A, Song W, McGuire PG. Retinal neovascularization is suppressed with a matrix metalloproteinase inhibitor. *Arch Ophthalmol*. 1999;117:498-503.
29. Carmeliet P, Moons L, Dewerchin M, et al. Receptor-independent role of urokinase-type plasminogen activator in pericellular plasmin and matrix metalloproteinase proteolysis during vascular wound healing in mice. *J Cell Biol*. 1998;140:233-245.
30. Grossniklaus HE, Cingle KA, Yoon YD, Ketkar N, L'Hernault N, Brown S. Correlation of histologic 2-dimensional reconstruction and confocal scanning laser microscopic imaging of choroidal neovascularization in eyes with age-related maculopathy. *Arch Ophthalmol*. 2000;118:625-629.
31. Spraul CW, Lang GE, Grossniklaus HE, Lang GK. Histologic and morphometric analysis of the choroid, Bruch's membrane, and retinal pigment epithelium in postmortem eyes with age-related macular degeneration and histologic examination of surgically excised choroidal neovascular membranes. *Surv Ophthalmol*. 1999;44:10-32.
32. Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR, Weiss SJ. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell*. 1998;95:365-377.
33. Diaz VM, Planaguma J, Thomson TM, Reventos J, Paciucci R. Tissue plasminogen activator is required for the growth, invasion, and angiogenesis of pancreatic tumor cells. *Gastroenterology*. 2002;122:806-819.
34. Heymans S, Lutun A, Nuyens D, et al. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med*. 1999;5:1135-1142.
35. Rifkin DB, Mazzieri R, Munger JS, Noguera I, Sung J. Proteolytic control of growth factor availability. *APMIS*. 1999;107:80-85.

9.3 Article 3: Dose-dependent modulation of choroidal neovascularization by plasminogen activator inhibitor type I: implications for clinical trials

V. Lambert, C. Munaut, P. Carmeliet, R. D. Gerard, P. J. Declerck, A. Gils, C. Claes, J. M. Foidart, A. Noel, and J. M. Rakic.

Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 44 (6):2791-2797, 2003.

Dose-Dependent Modulation of Choroidal Neovascularization by Plasminogen Activator Inhibitor Type I: Implications for Clinical Trials

Vincent Lambert,¹ Carine Munaut,¹ Peter Carmeliet,² Robert D. Gerard,³ Paul J. Declerck,⁴ Ann Gils,⁴ Carel Claes,⁵ Jean-Michel Foidart,¹ Agnès Noël,¹ and Jean-Marie Rakic⁶

PURPOSE. To explain the conflicting reports about the influence of plasminogen activator inhibitor type (PAI-1) on pathologic angiogenesis, such as occurs during the exudative form of age-related macular degeneration.

METHODS. The expression of PAI-1 mRNA was analyzed in human and murine choroidal neovascularization (CNV) by RT-PCR. The influences of increasing doses of recombinant PAI-1 were evaluated by daily intraperitoneal injections in PAI-1^{-/-} and wild-type animals with a model of laser-induced CNV. The double mechanism of action of PAI-1 (proteolytic activity inhibition versus vitronectin binding) was explored by immunohistochemical localization of fibrinogen/fibrin and by injection of recombinant PAI-1 protein defective for vitronectin binding or with adenoviral vectors bearing a mutated binding-deficient PAI-1 gene.

RESULTS. PAI-1 expression was present in human CNV and strongly induced in the course of experimental subretinal neovascularization. Daily injections of recombinant PAI-1 proteins in control and PAI-1^{-/-} animals demonstrated that PAI-1 could exhibit both pro- and antiangiogenic effects, dependent on the dose. PAI-1 mutants defective for vitronectin binding were used to show that PAI-1 promotes choroidal pathologic angiogenesis merely through its antiproteolytic activity.

CONCLUSIONS. These observations may help to reconcile reports with opposite results regarding the effects of PAI-1 on angiogenesis and certainly warn against uncontrolled use of PAI-1-modulating drugs in clinical trials. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:2791-2797) DOI:10.1167/iovs.02-1179

Several studies have demonstrated that the absence of plasminogen activator inhibitor type I (PAI-1) in genetically modified (knockout) mice prevents the development of tumoral angiogenesis.^{1,2} PAI-1, through its inhibition of uPA (urokinase-type plasminogen activator) and tPA (tissue-type plasminogen activator) is a key regulator of the plasminogen system, a proteolytic cascade implicated in various physiological and pathologic processes including vascular thrombolysis, inflammation, wound healing, tumor invasion, and neovascularization.³⁻⁶ Also, through its capacity to interact with uPAR (uPA cellular receptor), vitronectin, and integrins, PAI-1 may also control cell migration.^{7,8}

That PAI-1 presence was a necessary condition for angiogenesis was also observed in a model of laser-induced murine choroidal neovascularization (CNV). This model, while not associated with abnormal deposit component (drusen), encompasses several features of the exudative form of age-related macular degeneration (AMD), such as the trauma at the level of the Bruch's membrane, the involvement of mononuclear cells, the choroidal origin of new vessels and similar angiographic aspects.^{9,10} Analysis of corneal angiogenesis models induced by basic fibroblast growth factor corroborated the resistance of PAI-1^{-/-} mice to neovascularization.²

By contrast, others groups have in different experimental settings paradoxically suggested an inhibitory effect of high levels of PAI-1 on angiogenesis. Tumor cells transduced with PAI-1 cDNA showed a reduction in primary tumor growth and tumor-associated angiogenesis.¹¹ The inhibitory effect of angiostatic steroids on neovascularization was attributed to a decrease in the expression of uPA (urokinase-type plasminogen activator) and an increase in the expression of PAI-1.¹²⁻¹⁴ The efficiency of one of these compounds (anecortave acetate) in inhibiting human CNV is currently the subject of phase II and phase III clinical trials involving hundreds of patients (Slakter JS, Singerman LJ, Yannuzzi LA, Russell SR, Hudson HL, Jerdan J, Zilliox P, Robertson S, ARVO Abstract 2909, 2002). Curiously, initial data suggest that whereas the smaller dosage of anecortave (15-mg periocular injection) seems much more efficient than placebo, the higher dose (30-mg injection) is ineffective.¹⁵ A biphasic dose-response curve was indeed observed in different *in vitro* (aortic rings) and *in vivo* (synthetic basement membrane [Matrigel; BD Labware, Bedford, MA] and chick chorioallantoic membrane [CAM] assays) models.¹⁶⁻¹⁸ One explanation that reconciles these apparently conflicting results suggests that PAI-1 may have both pro- and antiangiogenic activities, depending on its concentration.

To test that hypothesis *in vivo* in a model of pathologic angiogenesis more relevant to ocular disease, we first evaluated the presence or absence of PAI-1 mRNA in human CNV mem-

From the ¹Laboratory of Tumor and Development Biology, University of Liège, Liège, Belgium; the ²Center for Transgene Technology and Gene Therapy, and ³Pharmaceutical Biology and Phytopharmacology, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgium; the ⁴Departments of Internal Medicine and Molecular Biology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas; the ⁵Department of Ophthalmology, Middelheim Hospital, Antwerp, Belgium; and the ⁶Department of Ophthalmology, University Hospital, Liège, Belgium.

Supported by grants from Les Amis des Aveugles, Ghlin, Belgium; the Commission of European Communities; the Fonds de la Recherche Scientifique Médicale; the National Fund for Scientific Research (FNRS, Belgium); the Fédération Belge Contre le Cancer, the FB Assurances; the Fondation Léon Frédéricq (University of Liège); the Fonds d'Investissements de la Recherche Scientifique (CHU, Liège, Belgium); and the Interuniversity Attraction Poles (IUAP) from the Federal Office for Scientific, Technical and Cultural Affairs (OSTC, Brussels, Belgium). CM is a research associate and AN is a senior research associate from the National Fund for Scientific Research (FNRS), Belgium. AG is a postdoctoral fellow of the Fund for Scientific Research (FWO, Vlaanderen, Belgium).

Submitted for publication November 18, 2002; revised January 13, 2003; accepted January 30, 2003.

Disclosure: V. Lambert, None; C. Munaut, None; P. Carmeliet, None; R.D. Gerard, None; P.J. Declerck, None; A. Gils, None; C. Claes, None; J.-M. Foidart, None; A. Noël, None; J.-M. Rakic, None

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Corresponding author: Jean-Marie Rakic, Department of Ophthalmology, University Hospital, Sart-Tilman, 4000 Liège, Belgium; jmrakic@chu.ulg.ac.be.

branes, and then assessed the spatial and temporal expression profiles in murine laser-induced CNV. In the second phase, the influence of experimentally manipulated PAI-1 levels on murine CNV was explored, using daily intraperitoneal injections of recombinant PAI-1. Finally, we used an adenoviral delivery system to deliver mutated PAI-1 with defective vitronectin binding and normal proteolytic function, to dissect the mechanism of PAI-1 activity.

MATERIALS AND METHODS

RT-PCR Analysis of Human and Murine Neovascular Membranes

The methods conformed to the tenets of the Declaration of Helsinki for research involving human subjects. Submacular CNV specimens were completely removed during surgery for 360° macular translocation in patients with exudative AMD that was not amenable to conventional laser or photodynamic therapy. The specimens were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RT-PCR analysis.

At selected intervals (days 3–40) after laser induction in mice (described later), choroidal neovascular membranes and adjacent neural retina intact regions were separately extracted from frozen sections by laser capture microdissection (laser pressure catapulting [LPC] technique) as previously described.¹⁰ The specimens were covered with 100 µL lysis buffer, and total RNA isolation was performed with a kit (PUREscript RNA Isolation Kit; BIOzym, Landgraaf, The Netherlands), according to the manufacturer's protocol.

The frozen murine and human tissues were first pulverized using a dismembrator (B. Braun Biotech International, GmBH, Melsungen, Germany) and total RNA was extracted with a kit (RNeasy; Quiagen, Paris, France) according to the manufacturer's protocol. 28S rRNA was amplified with an aliquot of 10 ng of total RNA, with a reverse transcriptase RNA PCR kit (GeneAmp Thermostable rTth; Applied Biosystems, Foster City, CA) and two pairs of primers (identical for human and murine; sense: 5'-GTTACCCACTAATAGGGAACGTGA-3' and reverse: 5'-GGATTCTGACTTAGAGGCGTTCAGT-3' for 28S mRNA; and sense: 5'-AGGGCTTCATGCCCCACTTCTCA-3' and reverse: 5'-AGTAGAGGGCATTACCAGCACCA-3' for PAI-1 (Eurogentec, Liège, Belgium). Reverse transcription was performed at 70°C for 15 minutes followed by a 2-minute incubation at 95°C for denaturation of RNA-DNA heteroduplexes. Amplification (33 cycles for PAI-1 and 19 cycles for 28S, or 45 cycles for PAI-1 and 35 cycles for 28S in the case of LPC material) started by a cycle of 15 seconds at 94°C, 20 seconds at 60°C and 10 seconds at 72°C. RT-PCR products were resolved on 2% agarose gels and analyzed with a fluorescence imager (Fluor-S MultiImager; Bio-Rad, Richmond, CA) after staining with ethidium bromide (FMC BioProducts, Philadelphia, PA). The expected size for RT-PCR products was 212 bp for 28S and 197 bp for PAI-1.

Murine Model of Laser-Induced Choroidal Neovascularization

Homozygous PAI-1-deficient mice (PAI-1^{-/-}) and the corresponding wild-type mice (WT or PAI-1^{+/+}) of either sex, 2 to 4 months old, with a mixed genetic background of 87% C57BL/6 and 13% 129 strain, were used throughout the study.¹⁹ The animals were maintained with a 12-hour light-dark cycle and had free access to food and water. Animal experiments were performed in compliance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research.

CNV was induced in mice by four burns (usually at the 6, 9, 12, and 3 o'clock positions around the optic disc) with a green argon laser (532 nm, 50-µm diameter spot size; 0.05-second duration, 400 mW) as previously described.²⁰ Mice with hemorrhaging or that did not exhibit an evident bubble at the site of every laser impact (the sign of a ruptured Bruch's membrane) were excluded from further analysis. Included animals (five or more in each condition) were killed at day 14 (except for spatial and temporal mRNA profiles). Before death, fluo-

rescein angiograms (intraperitoneal injection of 0.3 mL of 1% fluorescein sodium; Ciba, Mechelen, Belgium) were performed to confirm that laser burns were showing late-phase increasing hyperfluorescent spots (corresponding to the leakage of fluorescein from newly formed permeable capillaries). The eyes were then enucleated and either fixed in buffered 3.5% formalin solution for routine histology or embedded in optimal cutting temperature compound (Tissue Tek; Miles Laboratories, Naperville, IL) and frozen in liquid nitrogen for cryostat sectioning. CNV was quantified as previously described.^{9,10} Briefly, frozen serial sections were cut throughout the entire extent of each burn, and the thickest region (minimum of five per lesion) selected for the quantification. Using a computer-assisted image-analysis system (Micro Image version 3.0 for Windows 95/NT; Olympus Optical Co. Europe GmbH, Birkerød, Denmark), we estimated neovascularization by the ratio (B/C) of the thickness from the bottom of the pigmented choroidal layer to the top of the neovascular membrane (B) to the thickness of the intact-pigmented choroid adjacent to the lesion (C). A mean B/C ratio was determined for each laser impact.

Immunohistochemistry

Cryostat sections (5 µm thick) were fixed in paraformaldehyde 1% in 0.07 M phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.0) for 5 minutes or in acetone for 10 minutes at room temperature and then incubated with the primary antibody. Antibodies raised against mouse platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM; rat monoclonal, diluted 1:20; PharMingen, San Diego, CA), and murine fibrinogen/fibrin (diluted 1:400, goat polyclonal antibody; Nordic Immunologic, Tilburg, The Netherlands) were incubated for 1 hour at room temperature. The sections were washed in PBS (three times, 10 minutes each) and appropriate secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP), or tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC) were added: rabbit anti-goat IgG (diluted 1/100; Dako, Glostrup, Denmark) and rabbit anti-rat IgG (diluted 1/40; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were applied for 30 minutes. For immunostaining of fibrinogen/fibrin, a drop of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC⁺; Dako) was added, and sections were counterstained for 1 minute in hematoxylin. For immunofluorescence staining, after three washes in PBS for 10 minutes each and a final rinse in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.8), labeling was analyzed under an inverted microscope equipped with epifluorescence optics. Specificity of staining was assessed by substitution of nonimmune serum for primary antibody (not shown).

Characterization of Active Recombinant PAI-1 and Mutants

A stable PAI-1 variant referred to as PAI-1-stab, harboring the mutations Asn150His, Lys154Thr, Gln301Pro, Gln319Leu, and Met354Ile and demonstrating a functional half-life of approximately 150 hours, was produced as described²¹ and used in all experiments in which active recombinant PAI-1 was indicated. The mutant PAI-1-stab-Q123K (with impaired vitronectin binding properties), was created by a method based on a mutagenesis kit (Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit; Stratagene, La Jolla, CA) using pIGE20-PAI-stab as template and the appropriate synthetic oligonucleotide (i.e., 5'-CGGTCAAGAAAGTG-GACTTTTCAGAGG-3', and its complementary oligonucleotide) for introduction of the Q123K mutation. PAI-1-stab and its variant were expressed and purified as described.²² Binding of PAI-1-stab-Q123K to murine vitronectin was 40 times lower than that observed with PAI-1-stab. WT and PAI-1^{-/-} mice were injected intraperitoneally daily with 10 or 100 µg rPAI-1 or 100 µg PAI-1-stab-Q123k.

Adenovirus-Mediated PAI-1 cDNA Transfer

E1-deleted recombinant adenovirus vectors expressing wild-type human PAI-1 (AdCMVPAI-1) or no transgene (AdRR5) were propagated as described previously.^{23,24} Recombinant viruses expressing mutant PAI-1 proteins AdCMVPAI-1^{Q123K} were generated after substitution of a restriction fragment containing the desired mutation into the pACM-VPAl-1 (wild type; WT) shuttle plasmid. PAI-1 with the Q123K muta-

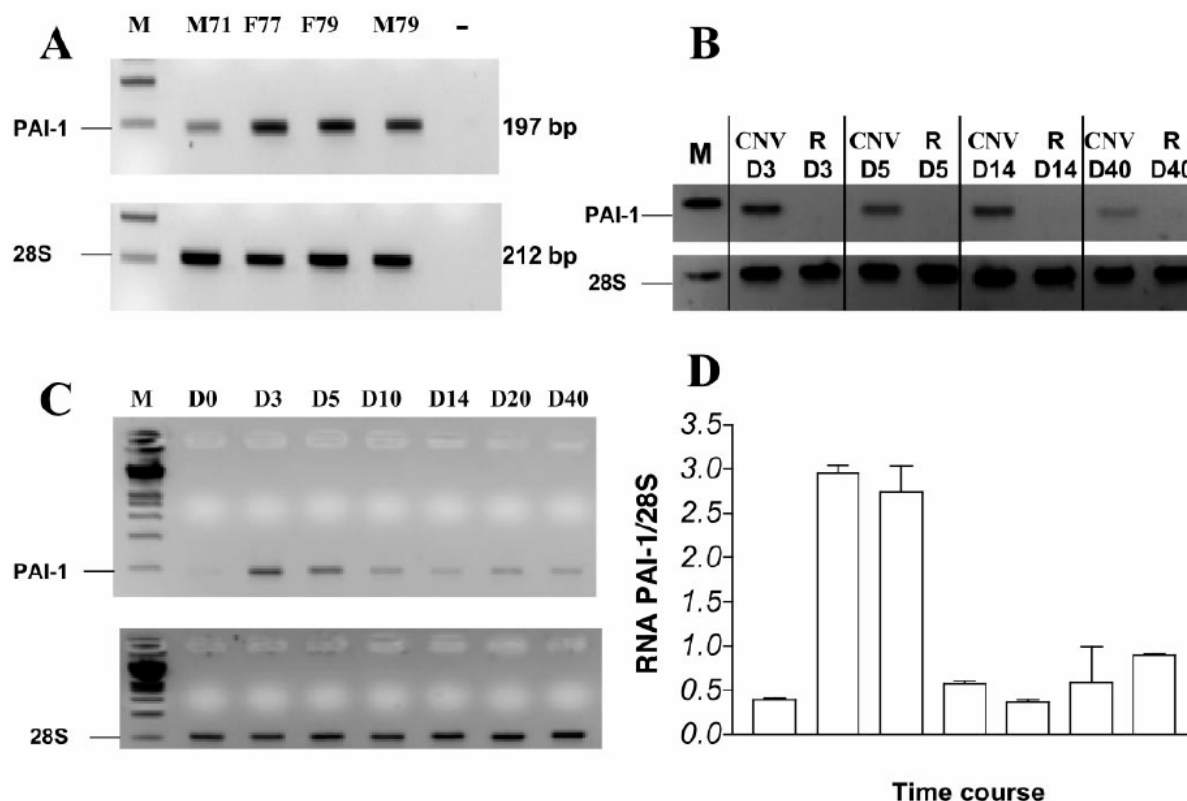


FIGURE 1. RT-PCR analysis of PAI-1 mRNA expression. (A) Representative example of PAI-1 mRNA expression in fresh surgically extracted choroidal neovascular membranes of four patients with exudative AMD (age in years is shown with gender). (B) Spatial profile of PAI-1 expression evaluated by RT-PCR on LPC-extracted murine experimental CNV at different intervals compared with the expression in intact adjacent neural retina (R). Histogram corresponding to the densitometric quantification of PAI-1 mRNA normalized to the 28S signal at different end points (D) with a representative gel (C). The evaluation was performed on the entire posterior segment after the induction of multiple wounds in Bruch's membrane. 28S rRNA was used to assess the total amount of RNA loaded. M, molecular marker. The expected size of RT-PCR products is 197 bp for PAI-1 and 212 bp for 28S.

tion had a specific 40-fold decrease in affinity for vitronectin, but retained full plasminogen inhibitory activity.

One day after CNV induction by laser, mice were intravenously injected with 200 μ L of control or recombinant adenovirus (7×10^8 plaque-forming units; PFU) encoding human PAI-1 (WT or mutant Q123K). The efficiency of transduction was evaluated with ELISA measurement of circulating PAI-1 levels and injection of adenoviruses encoding *Escherichia coli* β -galactosidase, as previously described (not shown).^{9,25} On day 14, mice were killed, and eyes were excised and processed, as described earlier. According to regulatory constraints, the virally infected animals were permanently housed under BL3 (biohazard level 3) containment, and consequently fluorescein angiograms could not be performed.

Statistical Analysis

Data were analyzed on computer (Prism 3.0; GraphPad, San Diego, CA). The Mann-Whitney test was used to determine whether there were significant ($P < 0.05$) differences between different experimental conditions.

RESULTS

PAI-1 Expression Profile in Neovascular Membranes

PAI-1 mRNA was detected in all human CNV specimens obtained during surgery (representative examples in Fig. 1A). Because these specimens can be mixed with RPE and/or neural

retina elements, we evaluated the spatial distribution of PAI-1 mRNA within choroidal neovascular membranes, distinct from the adjacent retina, by using laser capture microdissection. We were unable to perform laser capture dissection on human specimens. Therefore, the procedure was used on laser-induced murine CNV membranes microdissected by LPC on frozen sections at different time end points (days 3–40 after laser). Evidence of PAI-1 mRNA expression was observed in WT mice at all time points studied (Fig. 1B), with an apparent decrease during the late stage (day 40 after laser treatment). The retinal specimens microdissected from neighboring intact areas remained negative for PAI-1 mRNA throughout the study period. To define more precisely the temporal pattern of gene expression, semiquantitative RT-PCR analysis (normalized to 28S signal) was then applied on laser-induced murine neovascular choroidal membranes at different end points (days 3–40 after laser treatment). As shown in a densitometry histogram and on a representative gel (Figs. 1C, 1D), PAI-1 mRNA induction was substantial during the course of experimental murine CNV, with a regression to basal level after day 10 (coinciding with the period of CNV stabilization).

Dose-Dependent Effect of Recombinant PAI-1 on CNV

CNV was evaluated in WT and PAI-1^{-/-} mice by immunostaining with anti-PECAM antibodies and, histologically, by measur-

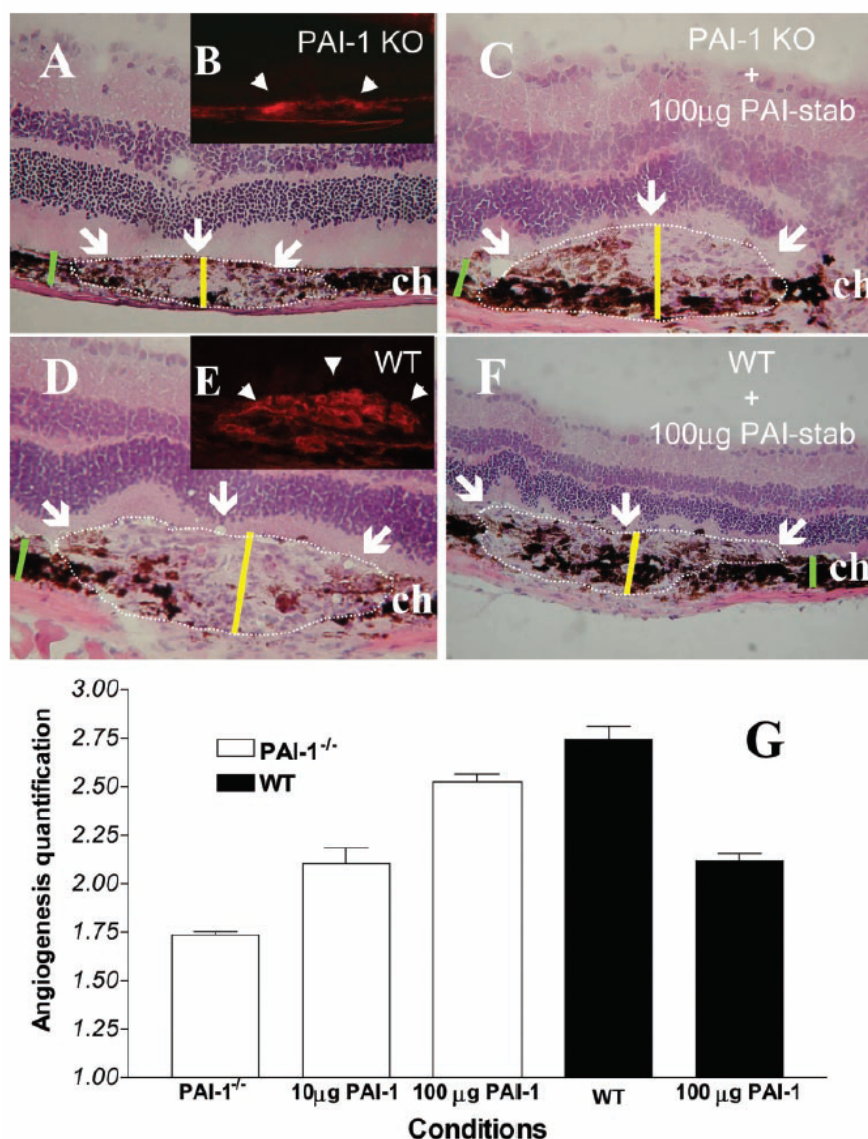


FIGURE 2. Dose-dependent effects of PAI-1 on choroidal neovascular reaction. Histologic analysis and immunofluorescence of new vessels (detected in red with anti-PECAM antibodies) in PAI-1^{-/-} and WT mice treated with high doses of recombinant PAI-1 or vehicle only (A–F). Hematoxylin-eosin staining of a representative area showing, restricted choroidal reaction at the site of laser-induced trauma in PAI-1^{-/-} mice treated with vehicle only (A) and increasing restoration of CNV in PAI-1^{-/-} animals treated with 100 µg/d active PAI-1 (C). On the contrary, reduced angiogenesis in WT control mice treated with high doses of active PAI-1 (100 µg/d, F) compared with WT mice treated with vehicle injection only (D). The neovascular reaction was determined by evaluating the B/C ratio as described previously^{9,10} (G). A dose-response effect was observed with daily injection of active PAI-1 in PAI-1^{-/-} mice, with the higher dose (100 µg) nearly restoring the WT pattern. In contrast, a significant inhibitory effect on CNV development was observed when WT mice were treated with a high dose of active PAI-1 ($P < 0.001$). Error bars, SE; the choroidal layer (ch) is indicated, and the neovascular area is delineated. Arrows: area of laser impact. Yellow bars refer to B and green bars to C, used for the calculation of mean B/C ratio for each laser impact. Original magnification, $\times 400$.

ing, on serial sections, the maximum height of the lesion above the choroidal layer observed in neighboring intact zones (Figs. 2A–F). CNV at the site of laser-induced trauma was very restricted or absent in PAI-1^{-/-} mice (Fig. 2A), but increased with daily injections of 10 (not shown) or 100 µg recombinant PAI-1 protein (Fig. 2C). The opposite effect was observed with daily treatment of WT mice (Fig. 2D) with high doses of recombinant PAI-1 (Fig. 2F). A dose-response effect was measured with increasing concentrations of active recombinant PAI-1 (PAI-1-stab, 10 or 100 µg/d) in PAI-1^{-/-} mice (Fig. 2G). In WT animals, an approximate 35% reduction of the B/C ratio was consistently observed when the mice were treated with high doses of rPAI-1 ($P < 0.001$) compared with placebo (vehicle alone).

Mechanisms by which PAI-1 Promotes Choroidal Angiogenesis

Complete absence of fibrinogen/fibrin was evident in PAI-1^{-/-} mice, compatible with excessive fibrinolytic activity owing to the lack of inhibition of uPA and tPA (Fig. 3A). Fibrinogen/

fibrin staining was normally present in the WT control (Fig. 3B), whereas massive accumulation of fibrinogen/fibrin occurred both in WT and PAI-1^{-/-} mice injected with high doses of recombinant PAI-1, demonstrating a severe inhibition of the plasminogen activator system (Figs. 3C, 3D).

To evaluate the relative influence of the other mechanism of action of PAI-1 (the effect on cellular migration through binding on vitronectin), PAI-1^{-/-} mice were either injected with 100 µg PAI-1-stab-Q123K (IP daily injection), or with AdCMVPAI-1^{Q123K} (intravenous injection on day 1 after laser treatment). The negative and positive controls in each experimental group were the extreme conditions (deficient PAI-1 mice treated with vehicle/AdRR5 and restored WT phenotype with 100 µg PAI-1-stab/AdCMVPAI-1). Daily injection of PAI-1-stab-Q123K completely restored the CNV pattern observed with PAI-1-stab ($P = 0.73$, Fig. 4A). The adenoviral construct that exhibited a reduced affinity for vitronectin, restored the phenotype observed in PAI-1^{-/-} animals infected with AdCMVPAI-1 ($P = 0.03$, Fig. 4B).

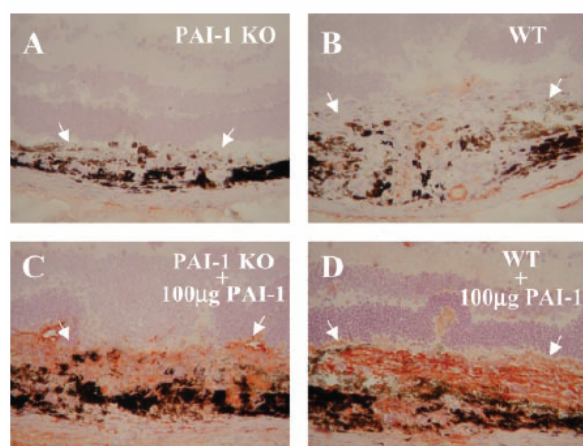


FIGURE 3. Immunolocalization of fibrinogen/fibrin at the site of laser-induced CNV. Frozen ocular sections from control PAI-1^{-/-} (A) or WT mice (B) compared with animals treated with 100 µg recombinant PAI-1 (C, D) reveal the absence of fibrin (stained with AEC) in PAI-1^{-/-} and limited amounts in WT mice contrasting with the accumulation of fibrin in animals treated with a high dose of recombinant PAI-1. Original magnification, $\times 400$.

DISCUSSION

The spatial and temporal profiles of PAI-1 mRNA expression reported in this study are in line with previous observations

demonstrating the induction of PAI-1 expression in migrating endothelial cells, an expression limited to the ciliary epithelium in the rodent intact eye, and our own previous results immunolocalizing PAI-1 protein to CNV.^{9,26,27}

The consistent expression of PAI-1 in human neovascular membranes suggests a role for PAI-1 during the progression of the exudative form of AMD. Clinically, elevated PAI-1 levels are observed in human diabetic retinopathy, with minimal levels in normal retinas.²⁸ Another potential correlation comes from the role of age as an independent risk factor not only for human AMD²⁹ but also for experimental CNV.³⁰ A senescence-dependent upregulation of PAI-1 expression has been reported in human vascular endothelial cells³¹ or fibroblasts,³² whereas another serpin, pigment-epithelium derived factor, which is a strong inhibitor of angiogenesis,³³ was downregulated in older RPE.³⁴

To our knowledge, this is the first report of a dose-dependent PAI-1 effect on angiogenesis in a model related to pathologic conditions of the retina. By testing different concentrations of IP-injected active rPAI-1, we provide clear evidence for dose-dependent opposite effects of PAI-1 during CNV development. The proangiogenic effect of PAI-1 at low concentrations and its antiangiogenic action at high concentrations are supported by the facts that (1) CNV formation was inhibited in PAI-1^{-/-} mice (Lambert et al.⁹ and the present study); (2) CNV formation was restored in PAI-1^{-/-} mice by injecting rPAI-1, and the level of restoration was proportional to the injected dose; (3) injection of high dose of rPAI-1 (100 µg/day) into WT mice significantly inhibited development of CNV.

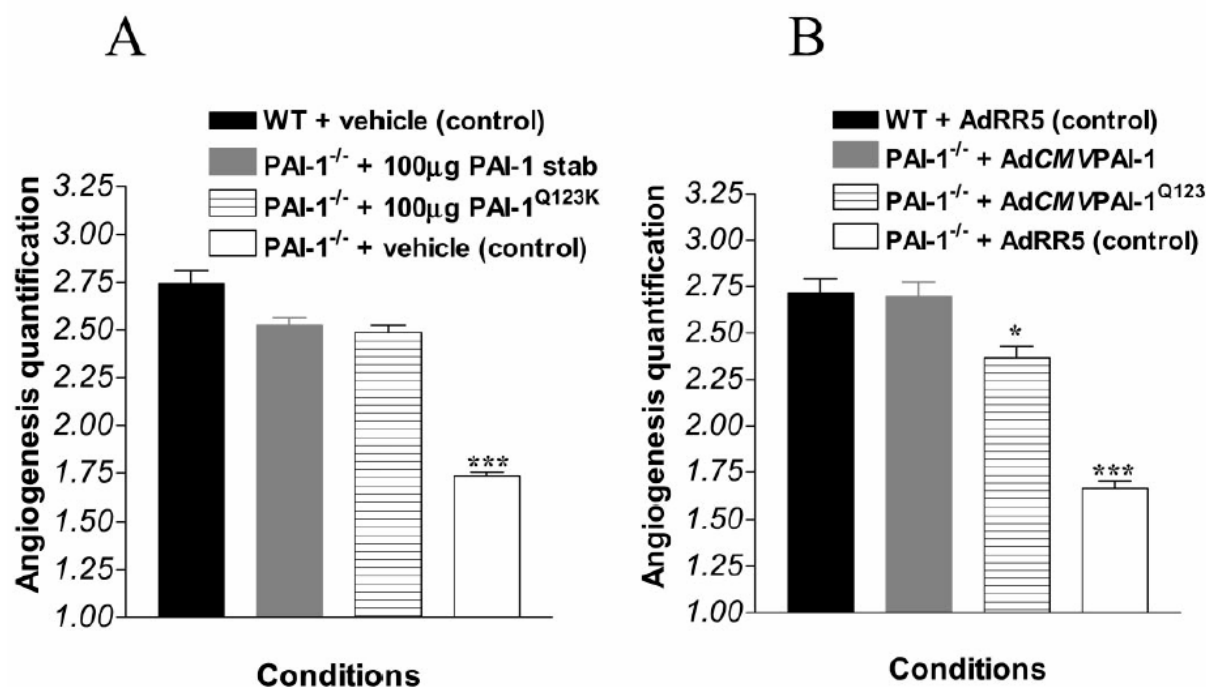


FIGURE 4. Injection of rPAI-1, defective in vitronectin binding, restored the angiogenic phenotype. PAI-1^{-/-} mice were injected either with (A) mutated PAI-1 protein (daily injection of 100 µg PAI-1-stab-Q123K) or with (B) recombinant adenoviruses bearing the mutated human PAI-1 gene (single intravenous injection of AdCMVPAI-1^{Q123K} on day 1 after laser treatment). For each condition, appropriate positive (injection of the same dose of PAI-1-stab/injection of AdCMVPAI-1) and negative controls (injection of vehicle only or injection of AdRR5) were performed. Quantification of CNV based on image analysis with calculation of the B/C ratio for each laser wound revealed that the mutant proteins defective for vitronectin binding restored a B/C ratio equal ($P = 0.73$ in A) or very similar ($P = 0.03$ in B) to that with intact PAI-1 proteins. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; error bars, SE.

The colocalization of uPA and PAI-1 on migrating endothelial²⁶ and tumoral cells³⁵ points out the importance of simultaneous production of both proteases and inhibitors and leads to the concept of "proteolytic balance." By protecting the extracellular matrix (ECM) against excessive degradation, PAI-1 may serve to stabilize the matrix scaffold required for endothelial cell migration and the coordinated assembly of endothelial cells into capillaries.³⁶ Along with other adhesive glycoproteins, the deposition of fibrinogen/fibrin serves as a scaffold to support binding of growth factors and to promote the cellular responses of adhesion, proliferation, and migration during angiogenesis.³⁷ The intense modulation of fibrinogen/fibrin deposition induced with variations of the levels of PAI-1 was demonstrated in our model of experimental CNV by immunohistochemical localization (Fig. 3).

To separate the contribution of PAI-1 protease inhibitory activity from its vitronectin-binding properties involved in the control of cell migration,^{7,8} we injected PAI-1^{-/-} mice with recombinant mutated PAI-1 protein defective in vitronectin binding or with adenoviruses expressing the mutant. The injected or endogenously expressed mutated forms both significantly restored the choroidal pathologic reaction, indicating that plasminogen activator inhibition by PAI-1 is probably the major mechanism of action involved in the promotion of angiogenesis. A complementary approach to demonstrate a minimal influence of vitronectin binding properties of PAI-1 would necessitate the induction of our experimental model in vitronectin-deficient mice. Together with our previous work demonstrating the influence of uPA, tPA, and plasminogen deficiency,³⁸ these new observations nevertheless point out the importance of fibrinolysis during the development of choroidal neovascularization.

Most important, our data explain, at least in part, the dose-dependent efficiency of a drug such as anecortave acetate, already in use in clinical trials for the exudative form of AMD. The inhibition of uPA expression is likely to be beneficial.³⁸ However, increased dosage of the agent may increase local expression of PAI-1 without reaching the high levels necessary for the inhibition of angiogenesis. This discrepancy was indeed observed with the higher dosage of anecortave (30 mg) that was ineffective compared with placebo.²⁵

The existence of biphasic dose/response curves warns against uncontrolled pharmacological strategies in which PAI-1 agonists/antagonists are used for inhibition of CNV.³⁹

Acknowledgments

The authors thank Laurent Naa and Fabrice Olivier for their collaboration and Patricia Gavittelli for technical assistance.

References

- Bajou K, Noël A, Gerard RD, et al. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med.* 1998;4:923-928.
- Gutierrez LS, Schulman A, Brito-Robinson T, Noria F, Ploplis VA, Castellino FJ. Tumor development is retarded in mice lacking the gene for urokinase-type plasminogen activator or its inhibitor, plasminogen activator inhibitor-1. *Cancer Res.* 2000;60:5839-5847.
- Ploplis VA, Carmeliet P, Vazirzadeh S, Van Vlaenderen I, Moons L, Plow EF. Effects of disruption of the plasminogen gene on thrombosis, growth, and health in mice. *Circulation.* 1995;92:2585-2593.
- Andreassen PA, Egelund R, Petersen HH. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57:25-40.
- Ploplis VA, French EL, Carmeliet P, Collen D, Plow EF. Plasminogen deficiency differentially affects recruitment of inflammatory cell populations in mice. *Blood.* 1998;91:2005-2009.
- Rakic JM, Maillard C, Jost M, et al. Role of plasminogen activator plasmin system in tumor angiogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60:463-473.
- Waltz DA, Natkin LR, Fujita RM, Wei Y, Chapman HA. Plasmin and plasminogen activator inhibitor type 1 promote cellular motility by regulating the interaction between the urokinase receptor and vitronectin. *J Clin Invest.* 1997;100:58-67.
- Stefansson S, Lawrence DA. The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin. *Nature.* 1996;383:441-443.
- Lambert V, Munaut C, Noel A, et al. Influence of plasminogen activator inhibitor type I on choroidal neovascularization. *FASEB J.* 2001;15:1021-1027.
- Lambert V, Munaut C, Jost M, et al. Matrix metalloproteinase-9 contributes to choroidal neovascularization. *Am J Pathol.* 2002;161:1247-1253.
- Soff GA, Sanderowitz J, Gately S, et al. Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model. *J Clin Invest.* 1995;96:2593-2600.
- Penn JS, Rajaratnam VS, Collier RJ, Clark AF. The effect of an angiostatic steroid on neovascularization in a rat model of retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:283-290.
- Blei F, Wilson EL, Mignatti P, Rifkin, DB. Mechanism of action of angiostatic steroids: suppression of plasminogen activator activity via stimulation of plasminogen activator inhibitor synthesis. *J Cell Physiol.* 1993;155:568-578.
- DeFaller JM, Clark AF. A new pharmacological treatment for angiogenesis. In: Taylor HR, ed. *Pterygium*. The Hague: Kugler Publications; 2000:159-181.
- Soubrane G, De Smet MD, Schmidt-Erfurth U, et al. Anecortave acetate for the treatment of AMD patients with subfoveal choroidal neovascularization (CNV). *Ophthalmic Res.* 2002;34:3312.
- Devy L, Blacher S, Grignet-Debrus C, et al. The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor is dose dependent. *FASEB J.* 2002;16:147-154.
- Stefansson S, Petitclerc E, Wong MK, McMahon GA, Brooks PC, Lawrence DA. Inhibition of angiogenesis in vivo by plasminogen activator inhibitor-1. *J Biol Chem.* 2001;276:8135-8141.
- McMahon GA, Petitclerc E, Stefansson S, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 regulates tumor growth and angiogenesis. *J Biol Chem.* 2001;276:33964-33968.
- Carmeliet P, Kieckens L, Schoonjans L, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. I. Generation by homologous recombination and characterization. *J Clin Invest.* 1993;92:2746-2755.
- Tobe T, Ortega S, Luna JD, et al. Targeted disruption of the FGF2 gene does not prevent choroidal neovascularization in a murine model. *Am J Pathol.* 1998;153:1641-1646.
- Nar H, Bauer M, Stassen JM, Lang D, Gils A, Declercq PJ. Plasminogen activator inhibitor 1: structure of the native serpin, comparison to its other conformers and implications for serpin inactivation. *J Mol Biol.* 2000;297:683-695.
- Gils A, Knockaert I, Declercq PJ. Substrate behavior of plasminogen activator inhibitor-1 is not associated with a lack of insertion of the reactive site loop. *Biochemistry.* 1996;35:7474-7481.
- Gerard RD, Meidell RS. Adenovirus vectors. In: Hames BD, Glover D, eds. *DNA Cloning: A Practical Approach: Mammalian Systems*. Oxford, UK: Oxford University Press; 1995:285-307.
- Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, et al. Inhibitory role of plasminogen activator inhibitor-1 in arterial wound healing and neointima formation: a gene targeting and gene transfer study in mice. *Circulation.* 1997;96:3180-3191.
- Behringer RR, Crotty DA, Tennyson VM, Brinster RL, Palmiter RD, Wolgemuth DJ. Sequences 5' of the homeobox of the Hox-1.4 gene direct tissue-specific expression of lacZ during mouse development. *Development.* 1993;117:823-833.
- Pepper MS, Sappino AP, Montesano R, Orcin L, Vassalli JD. Plasminogen activator inhibitor-1 is induced in migrating endothelial cells. *J Cell Physiol.* 1992;153:129-139.

27. Masos T, Dan JA, Miskin R. Plasminogen activator inhibitor-1 mRNA is localized in the ciliary epithelium of the rodent eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:1006-1011.
28. Grant MB, Ellis EA, Caballero S, Mames RN. Plasminogen activator inhibitor-1 overexpression in nonproliferative diabetic retinopathy. *Exp Eye Res.* 1996;63:233-244.
29. Hyman L, Neborsky R. Risk factors for age-related macular degeneration: an update. *Curr Opin Ophthalmol.* 2002;13:171-175.
30. Espinosa-Heidmann DG, Suner I, Hernandez EP, Frazier WD, Csaky KG, Cousins SW. Age as an independent risk factor for severity of experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:1567-1573.
31. Comi P, Chiaramonte R, Maier JA. Senescence-dependent regulation of type 1 plasminogen activator inhibitor in human vascular endothelial cells. *Exp Cell Res.* 1995;219:304-308.
32. Mu XC, Higgins PJ. Differential growth state-dependent regulation of plasminogen activator inhibitor type-1 expression in senescent IMR-90 human diploid fibroblasts. *J Cell Physiol.* 1995;165:647-657.
33. Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science.* 1999;285:245-248.
34. Tombran-Tink J, Shivaram SM, Chader GJ, Johnson LV, Bok D. Expression, secretion, and age-related downregulation of pigment epithelium-derived factor, a serpin with neurotrophic activity. *J Neurosci.* 1995;15:4992-5003.
35. Liu G, Shuman MA, Cohen RL. Co-expression of urokinase, urokinase receptor and PAI-1 is necessary for optimum invasiveness of cultured lung cancer cells. *Int J Cancer.* 1995;60:501-506.
36. Pepper MS, Montesano R. Proteolytic balance and capillary morphogenesis. *Cell Differ Dev.* 1990;32:319-327.
37. Simpson-Haidaris PJ, Rybarczyk B. Tumors and fibrinogen: the role of fibrinogen as an extracellular matrix protein. *Ann NY Acad Sci.* 2001;936:406-425.
38. Rakic JM, Lambert V, Munaut C, et al. Mice lacking the uPA, tPA or plasminogen genes are resistant to experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:1732-1739.
39. Calabrese EJ. Estrogen and related compounds: biphasic dose responses. *Crit Rev Toxicol.* 2001;31:503-515.

9.4 Article 4 : *Matrix metalloproteinase-9 contributes to choroidal neovascularization*

V. Lambert, C. Munaut, M. Jost, A. Noel, Z. Werb, J. M. Foidart, and J. M. Rakic.

Am.J.Pathol. 161 (4):1247-1253, 2002.

Matrix Metalloproteinase-9 Contributes to Choroidal Neovascularization

Vincent Lambert,* Carine Munaut,* Maud Jost,*
 Agnès Noël,* Zena Werb,[†] Jean-Michel Foidart,*
 and Jean-Marie Rakic[‡]

From the Laboratory of Tumor and Development Biology,
 University of Liège, Liège, Belgium; the Department of Anatomy,[†]
 University of California at San Francisco, San Francisco,
 California; and the Department of Ophthalmology,[‡] University
 Hospital, Sart-Tilman, Liège, Belgium*

Age-related macular degeneration (AMD) is the primary cause of irreversible photoreceptors loss in adult patients and current therapies are limited. Increased levels of matrix metalloproteinases (MMPs) have been documented in neovascularization of severe ocular pathologies such as AMD and proliferative diabetic retinopathy. We report here that MMP-9 (gelatinase B) expression is induced and temporally regulated in the course of experimental choroidal neovascularization. We used transgenic mice expressing β -galactosidase reporter gene under the dependence of MMP-9 promoter and RT-PCR analysis on choroidal neovascular structures microdissected from serial sections by laser pressure catapulting to show that MMP-9 expression is up-regulated concomitantly with the appearance of inflammatory cells in the subretinal lesion. In mice deficient in MMP-9 expression the development of choroidal neovascularization induced by laser photocoagulation still occurred, but at a reduced level. (*Am J Pathol* 2002, 161:1247-1253)

Pathological angiogenesis is characteristic of several disease processes affecting the retina, such as retinopathy of prematurity, diabetic retinopathy and the exudative form of age-related macular degeneration (AMD). While the primary stimulus for the development of retinal neovascularization is hypoxia, molecular signals involved in the appearance and growth of pathological choroidal neovascularization are not well defined.¹ While vascular endothelial growth factor (VEGF) overexpression is necessary, alone it is not able to induce growth of choroidal vessels in the subretinal space through the anatomical barrier represented by the intact Bruch's membrane.²

Neovascularization is the result of altered balance between positive and negative regulators of endothelial activation, which leads in turn to basement membrane degradation, endothelial cell migration and proliferation followed by capillary tube formation.³ Such migratory and

tissue remodeling events are regulated by proteolysis mediated by matrix metalloproteinases (MMPs) and serine proteases of the plasminogen/plasminogen activator system. The activities of the secreted MMPs are tightly regulated at multiple levels. These include regulation of gene expression at the level of transcription, secretion of inactive proenzymes, capacity of the active enzyme to be either inhibited by members of the TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) family, or activated by membrane-type MMPs (MT-MMPs). As a rule, basal levels of MMPs are absent or weakly positive in normal tissues, but increase in response to angiogenic cytokines as do the components of the plasminogen/plasminogen activator system.^{4,9}

The precise roles of specific MMPs, plasminogen activators, and their inhibitors in ocular pathology are still being elucidated. Mutations in the TIMP-3 gene give rise to a rare familial form of macular dystrophy associated with subretinal neovascularization.⁵ TIMP-3 is expressed in human retinal pigment epithelium (RPE), and its accumulation is associated with age-related changes in the retina in macular degeneration.^{6,7} The expression of plasminogen activator inhibitor type I (PAI-1) is necessary for the development of choroidal neovascularization in a laser-induced model.⁸

MMP-2 and MMP-9 (gelatinases A and B) are of particular interest because their substrate specificity includes type IV collagen, which must be degraded to facilitate the migration of vascular endothelial cells. These two MMPs show increased expression in a variety of tumors or pathological settings.⁹ Genetic studies in mice indicate that they are required during angiogenesis. MMP-2 is implicated in angiogenic switching in subcutaneous transplants models of tumor progression,¹⁰ whereas MMP-9 is specifically required in a murine model of pancreatic β -cell carcinogenesis.¹¹ MMPs effects are far from being restricted to extracellular matrix (ECM) degradation (reviewed in ref. 12). Peptide growth

Supported by grants from Les Amis des Aveugles, Ghlin, the Fondation Léon Frédéricq, University of Liège, the Fonds d'Investissements de Recherche Scientifique, CHU, Liège, the CGER-Assurances, Belgium, and the Steinbach Fund, New York. C.M. is a research associate and A.N. is a senior research associate from the National Fund for Scientific Research, Belgium.

V.L. and C.M. contributed equally to this work.

Accepted for publication June 21, 2002.

Address reprint requests to Vincent Lambert, Laboratory of Tumor and Development Biology, Pathology Tower (B23), Sart-Tilman, B-4000 Liège, Belgium. E-mail: vincent.lambert@ulg.ac.be.

factors that are sequestered by ECM proteins become available once degraded by MMP-9.¹³ MMPs can increase the bioavailability of VEGF¹¹ but also generate angiogenesis inhibitors such as angiostatin by cleavage of plasminogen.¹⁴ In the eye, high levels of MMP-9 and MMP-2 have been measured in human diabetic vitreous fluids or in epiretinal membranes surgically removed in case of proliferative diabetic retinopathy.^{15–17} Choroidal neovascular membranes surgically removed from patients suffering from AMD also show strong expression of these MMPs, suggesting that they could cooperate in the progression of choroidal angiogenesis.¹⁸

In this study we have characterized the temporal and spatial pattern of MMP-9 expression in a mouse laser-induced model of choroidal neovascularization using three different approaches: immunohistochemistry, transgenic mice expressing β -galactosidase reporter gene under the dependence of MMP-9 promoter, and RT-PCR analysis on choroidal neovascular structures microdissected by laser pressure catapulting. To characterize the relative contribution of MMP-9 to the development of choroidal angiogenesis, we compared subretinal neovascularization in MMP-9-deficient mice and in wild-type (WT) controls.

Materials and Methods

Genetically Modified Mice (*LacZ* Transgene and MMP-9-Deficient)

Construction of mouse line 7700ExIn-LacZ, which contains 7.7 kb of the 5'-flanking region and the first exon and intron of the MMP-9 gene linked to a β -galactosidase gene, was previously described.¹⁹ Promoter activity in this transgenic line closely parallels the activity of the endogenous MMP-9 gene during embryonic development. Homozygous 7700ExIn-LacZ mice for the transgene were mated together to generate new progeny. Expression of the transgene was determined in 2% paraformaldehyde –0.2% glutaraldehyde fixed tissues (15 to 30 minutes), washed three times in PBS, and stained with buffered 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactopyranoside (X-Gal) solution as described.²⁰ As a positive control for MMP-9 expression, a thermal injury was applied to a few mice corneas.²¹ We used the progeny of heterozygous breeding pairs of mice with targeted disruption of MMP-9, as described by Vu et al.²² Brothers and sisters from the same litter were used and genotyped by RT-PCR.²³ Homozygous MMP-9-deficient mice (MMP-9^{-/-}) and the corresponding WT mice (MMP-9^{+/+}) of either sex²² were used in experiments in which neovascular membranes were quantified. All of the animals used in this study were maintained with a 12-hour light/12-hour dark cycle and had free access to food and water.

Murine Model of Laser-Induced Choroidal Neovascularization

Animal experiments were performed in compliance with the Association for Research in Vision and Ophthalmol-

ogy (ARVO) statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. Choroidal neovascularization was induced in mice by four burns (usually at the 6, 9, 12, and 3 o'clock positions around the optic disk) using a green argon laser (532 nm; 50 μ m diameter spot size; 0.05 seconds duration; 400 mW) as previously described.²⁴ Animals (five or more in each group) were sacrificed at day 2, 3, 5, 10, 14, and 28 for the evaluation of the kinetic of MMP-9 expression, and at day 14 in the experiment involving MMP-9^{-/-} and WT mice comparison. In the latter group, before sacrifice, fluorescein angiograms (intraperitoneal injection of 0.3 ml of 1% fluorescein sodium; Ciba) were performed to evaluate the percentage of laser burns developing late phase hyperfluorescent spots (corresponding to the leakage of fluorescein from newly formed permeable capillaries). The eyes were then enucleated and either fixed in buffered 3.5% formalin solution for routine histology or embedded in TissueTeK (Miles Laboratories, Naperville, IL) and frozen in liquid nitrogen for cryostat sectioning. Choroidal neovascularization was quantified as previously described.⁸ Briefly, frozen serial sections were cut throughout the entire extent of each burn, and the thickest lesions (minimum of 3/lesion) used for the quantification. Using a computer-assisted image analysis system (Olympus Micro Image version 3.0 for Windows 95/NT, Olympus Optical Co. Europe GmbH), neovascularization was estimated by the ratio (B/C) of the thickness from the bottom of the pigmented choroidal layer to the top of the neovascular membrane (B) to the thickness of the intact pigmented choroid adjacent to the lesion (C). Due to the small size of most lesions, that method was preferred to surface estimation for its independence in relation to oblique sections, its reproducibility and correlation with fluorescein angiograms results.

Immunohistochemistry

Cryostat sections (5 μ m thick) were fixed in paraformaldehyde 1% in 0.07 mol/L phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.0 for 5 minutes or in acetone for 10 minutes at room temperature and then incubated with the primary antibody. Antibodies raised against type IV collagen (guinea pig polyclonal antibody produced in our laboratory; diluted 1/100), mouse MAC-1 (monoclonal antibody anti CD-11b R-phycoerythrin labeled, PharMingen, San Diego, CA; diluted 50 μ g/ml), mouse neutrophils (rat polyclonal antibody, Serotec, Oxford, UK; diluted 1/200) and mouse PECAM (rat monoclonal antibody, PharMingen, San Diego, CA; diluted 1/20) were incubated for 1 hour at room temperature, whereas antibodies to MMP-9 (rabbit anti-mouse antibody, diluted 1/200, a generous gift from P. Carmeliet, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium) were incubated overnight. The sections were washed in PBS (3 \times 10 minutes) and appropriate secondary antibodies conjugated to fluorescein-isothiocyanate (FITC) or Texas red were added: swine anti-rabbit IgG (Dako, Glostrup, Denmark; diluted 1/40), monoclonal anti-guinea pig IgG (Sigma; diluted 1/40) or rabbit anti-rat IgG (Sigma; diluted 1/40) were applied for 30 minutes.

For double immunofluorescence-labeling studies, sections were first incubated with the two primary antibodies, and then with FITC- and Texas red-conjugated secondary antibodies. After three washes in PBS for 10 minutes each and a final rinse in 10 mmol/L Tris-HCl buffer, pH 8.8, labeling was analyzed under an inverted microscope equipped with epifluorescence optics. MAC-1 and neutrophils sections were counterstained with bis-benzimide (20 mg/100 ml) for 15 minutes. Specificity of staining was assessed by substitution of nonimmune serum for primary antibody (in the case of MMP-9 protein, MMP-9^{-/-} tissues were used as a negative control).

Laser Pressure Catapulting (LPC) and RT-PCR

Eight to 10 serial frozen sections were mounted directly onto a 1.35- μ m thin polyethylene foil (PALM, Wolfrahtshausen, Germany). The supporting membrane was mounted onto the glass slide using the Microbeam-MO-MeNT technique.²⁵ The membrane-covered slides can be stored at room temperature until needed. The Robot-Microbeam (PALM) focused the laser (337 nm) on the specimen with appropriate energy settings enabling the catapulting of the entire selected area into the Microfuge cap. The entire subretinal choroidal neovascularization area and an adjacent intact chorioretinal zone (control) were microdissected separately on frozen sections (10 μ m thick) at selected intervals after laser burn (days 3, 5, 10, 14, and 40). The specimens were covered with 100 μ l of lysis buffer and total RNA isolation was performed with the PUREscript RNA-isolation Kit (BIOzym, Landgraaf, The Netherlands) according to the manufacturer's protocol. Total RNA was dissolved in a 10- μ l RNA hydration solution supplied by the manufacturer. 28S rRNA were amplified with an aliquot of 1 μ l of total RNA using the GeneAmp Thermo-stable rTth reverse transcriptase RNA PCR kit (Perkin Elmer) and three pairs of primers (Gibco BRL-Life Technologies): sense: 5'-GTTACCCACTAATAGGGAACGTGA-3' and reverse: 5'-GGATTCTGACTTAGAGGCGTTCAGT-3' for 28S mRNA; sense: 5'-AGACCTGAAAACCTCCAACCTCAC-3' and reverse: 5'-TGTTATGATGGTCCCCTTGAGGC-3' for MMP-9; and sense: 5'-AGATCTTCTTCTCAAGGACCG-GTT-3' and reverse: 5'-GGCTGGTCACTGGCTT-GGGGTA-3' for MMP-2. Reverse transcription was performed at 70°C for 15 minutes followed by 2 minutes of incubation at 95°C for denaturation of RNA-DNA heteroduplexes. Amplification started by 15 seconds at 94°C, 20 seconds at 68°C and 10 seconds at 72°C for MMP-2 and 28S (45 cycles for MMP-2 and 30 cycles for 28S) or by 15 seconds at 94°C, 20 seconds at 60°C, and 15 seconds at 72°C for MMP-9 (45 cycles) and terminated by 2 minutes at 72°C. RT-PCR products were resolved on 2% agarose gels and analyzed using a Fluor-S Multimager (BioRad) after staining with Gelstar (FMC BioProducts) dye. The expected size for RT-PCR products were 212 bp for 28S, 225 bp for MMP-2, and 262 bp for MMP-9, respectively.

Gelatin Zymography Assay

Choroidal neovascularization was induced in mice by 30 burns as described above. Animals were sacrificed at

day 3 and the eyes were enucleated. The posterior segments were cut out and immediately snap frozen in liquid nitrogen. Frozen tissues were then pulverized in liquid nitrogen, homogenized in buffer (0.1 mol/L Tris-HCl pH 8.1, 0.4% Triton X-100) and centrifuged for 20 minutes at 5000 \times *g*. The pellets were discarded. Aliquots of supernatants were mixed with SDS sample buffer and electrophoresed directly as previously described.²⁶

Statistical Analysis

Data were analyzed with GraphPad Prism 3.0 (San Diego, CA). The Mann-Whitney test was used to determine whether there were significant ($P < 0.05$) differences between WT and MMP-9^{-/-} mice.

Results

MMP-9 Induction and Evolution

The argon laser induced trauma at the level of outer retina, retinal pigment epithelium and Bruch's membrane, giving rise to choroidal neovascularization under the retina, similar to that observed in exudative form of AMD. Histological analysis and immunostaining with anti-PECAM and anti-collagen type IV antibodies confirmed the presence of newly formed capillaries taking typically the form of "mushroom-like" areas (identifiable already at day 5) over the normal choroid layer.

Immunohistochemical staining demonstrated the presence of MMP-9 protein exclusively at the site of laser-induced injury (retinal pigment epithelium and choroidal layer) and not in intact adjacent areas (Figure 1A). The intensity of staining was maximal at day 3 (before any visible outgrowth of newly formed microvessels), weak at day 5 (Figure 1B) and completely absent thereafter. No staining was observed at any location in MMP-9^{-/-} mice (not shown). The staining in the positive control (thermal injury of the cornea) was also maximal at day 3 and present selectively in the corneal stroma adjacent to the burned area (Figure 1C) as previously described.²⁷

MMP-9 promoter activity, mapped with β -galactosidase reporter gene, was undetectable in the retina or in the cornea of intact eyes. In treated eyes, it did not strictly colocalize either spatially or temporally with MMP-9 protein. The product of the β -galactosidase reaction could not be detected before day 5 (Figure 1D) both in the chorioretinal neovascular membrane (Figure 1E) and in the corneal epithelium (positive control, Figure 1F). It was only occasionally detected after day 5. The product of the β -galactosidase reporter gene was localized at the growing edge of the neovascular reaction over the plane of the pigment epithelium. The activity of MMP-9 promoter in the lesions at day 5 coincided with the first appearance of macrophages detected by immunohistochemistry (Figure 2, A-D). Polymorphonuclear cells were absent at day 5 but infiltrated the lesions at an earlier stage (Figure 2, E and F).

RT-PCR analysis applied on microdissected neovascular choroidal membranes extracted by laser pressure

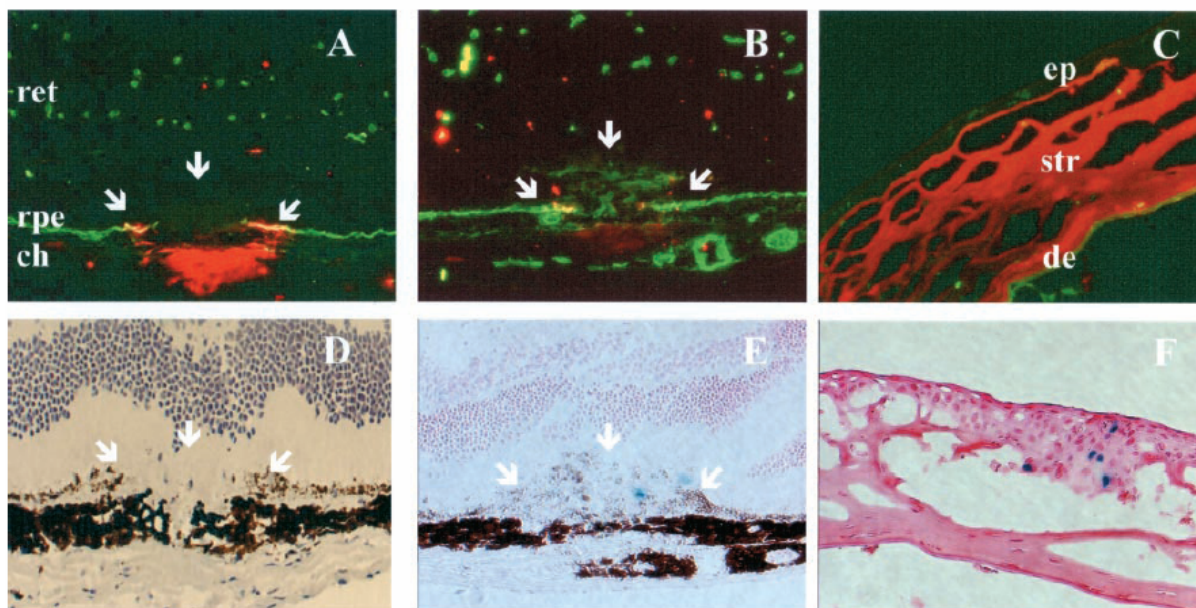


Figure 1. Temporal pattern of protein and MMP-9 mRNA presence after laser-induced choroidal neovascularization. **A–C:** Immunolocalization of MMP-9 (red) in ocular frozen sections counterstained with collagen type IV antibody (green) at day 3 (**A**), day 5 (**B**) after laser injury of the Bruch's membrane, and in corneas subjected to thermal injury (**C**) (positive control). **D–F:** Mapping of MMP-9 expression using transgene mice expressing β -galactosidase (blue) under the dependence of MMP-9 promoter at day 3 (**D**) and day 5 (**E**) in the retina and at day 5 in the cornea (**F**). **White arrows** localize the laser impact. The neural retina (ret), retinal pigment epithelium (rpe), choroidal layer (ch), corneal epithelium (ep), corneal stroma (str) and descemet membrane (de) are indicated. Original magnification, $\times 100$.

catapulting at different time endpoints confirmed MMP-9 mRNA expression only at day 5 after photocoagulation, similarly to the results obtained with the β -galactosidase transgene (Figure 3). The retinal specimens microdissected from neighboring intact chorioretinal areas were negative for MMP-9 mRNA throughout the study period. This contrasted with the expression of MMP-2, which was relatively constant from day 3 to day 14 with a small peak at day 10 (Figure 3, center line). Unlike MMP-9, MMP-2 expression was not restricted to the choroidal neovascular area and was also detected, at a lower level, outside the impact zone in intact chorioretinal tissue.

The activities of MMP-2 and MMP-9 posterior eyes segments of normal mice and in neovascular choroidal membranes induced by laser were analyzed by gelatin zymography. The latent form of MMP-2 was detected in all tissue extracts (Figure 4). Its level was however more

important in laser induced membranes which additionally contained active MMP-2. MMP-9 activity was weakly detected in intact eyes, whereas higher levels were found in laser treated eyes.

Choroidal Neovascularization in Vivo in $MMP-9^{-/-}$ and WT Mice

To determine whether the absence of MMP-9 influences choroidal neovascularization *in vivo*, we first evaluated the incidence of leaking spots on fluorescein angiograms performed on day 14. Newly formed microvessels with significant leakage of fluorescein were observed in 75% of the laser-induced lesions. The incidence of detected leaking spots was not significantly different in $MMP-9^{-/-}$ mice compared to their WT controls (not shown). Neo-

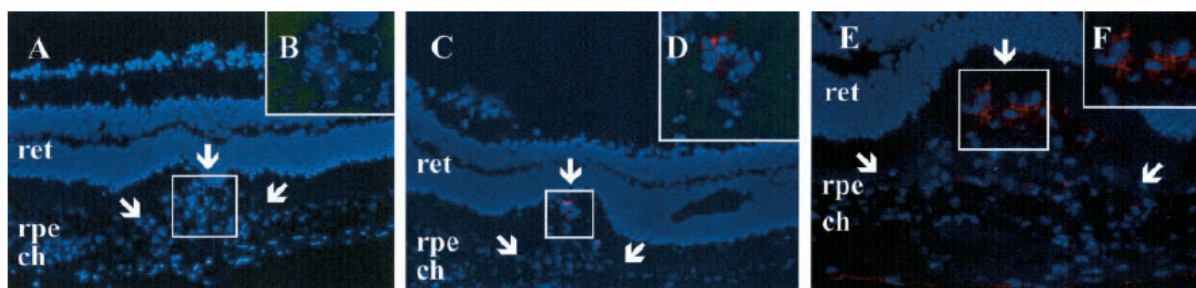


Figure 2. Immunolocalization of mononuclear and polymorphonuclear inflammatory cells during the course of choroidal neovascular membrane development after laser injury of the choroid. Mac-1 immunostaining (red) on frozen sections counterstained with bis-benzimide (blue) is absent in the choroid at day 3 (**A**, **B**), and appears in the impact at day 5 (**C**, **D**). Neutrophils (red) are present at day 3 (**E**, **F**), but not at day 5 (data not shown). **White arrows** localize the laser impact. Original magnifications: **A**, **C**, $\times 100$; **B**, **D**, **E**, $\times 400$; **F**, $\times 630$.

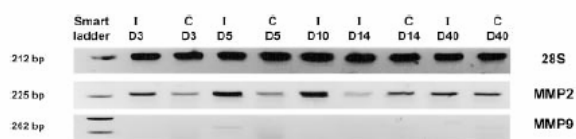


Figure 3. MMP-2 and MMP-9 expression are differentially modulated during the progression of choroidal neovascular reaction in a murine laser-induced model. Laser pressure catapulting followed by RT-PCR analysis on microdissected choroidal new vessels (I) and on adjacent (control) intact chorioretinal tissue (C) from day 3 to day 40. Molecular weight numbers (bp) are shown at left. The control at day 10 is missing due to limited amount of extracted RNA.

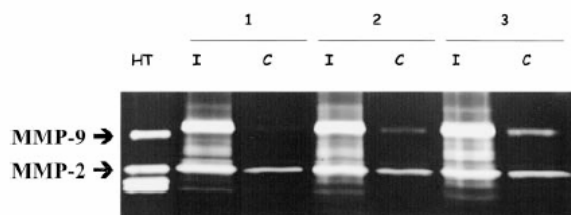


Figure 4. Zymographic analysis of MMP-2 and MMP-9 in tissues extracted either from posterior eyes segments with laser-induced neovascularization (I, day 3) or intact eyes (C) of three different mice. As positive control, medium conditioned by human HT1080 cells was included. Positions of MMP-2 and MMP-9 are indicated by arrows.

vascularization was then estimated by immunostaining with anti-type IV collagen and anti-PECAM antibodies and, histologically, by measuring, on serial sections, the maximal height of the lesion above the choroidal layer observed in neighboring intact zones (Figure 5). Choroidal neovascularization at the site of laser-induced trauma was more restricted reaction in MMP-9^{-/-} mice than in WT mice. This was quantified by determining the B/C ratio between total thickness of lesions (B, from the bottom of the choroid to the top of the neovascular area) to the thickness of adjacent normal choroid (C), and a 20% reduction of the B/C ratio was consistently observed in MMP-9-deficient mice ($P < 0.001$) as compared to WT mice (Figure 6).

Discussion

The matrix metalloproteinases (MMPs) are able to degrade components of the extracellular matrix, inhibitors, and other pericellular proteins and promote angiogenesis and tumor invasion. MMP-2 and MMP-9 have been of particular interest in angiogenesis research because

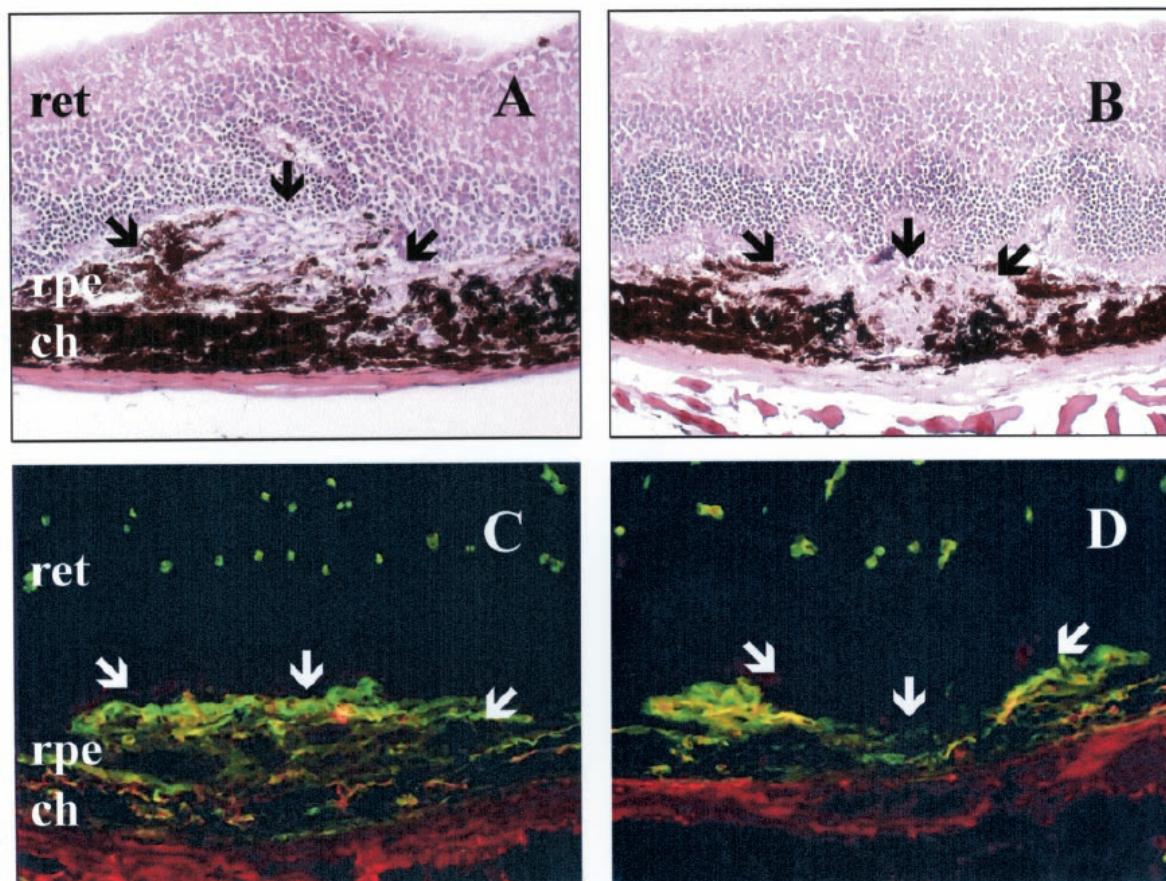


Figure 5. Histological analysis after laser treatment. Hematoxylin-eosin staining of a representative area of choroidal neovascularization at the site of laser-induced trauma in WT mice (A), and a more restricted reaction in MMP-9^{-/-} mice (B). Immunofluorescence labeling of new vessels in WT (C) or in MMP-9^{-/-} mice (D) analyzed 14 days after laser photocoagulation. New vessels were detected with anti-mouse anti-collagen type IV antibody (green) and anti-mouse anti-PECAM antibody (red). The neural retina (ret), retinal pigment epithelium (rpe), and choroidal layer (ch) are indicated and the neovascular area is arrowed. White arrows localize the laser impact. Original magnification, $\times 200$.

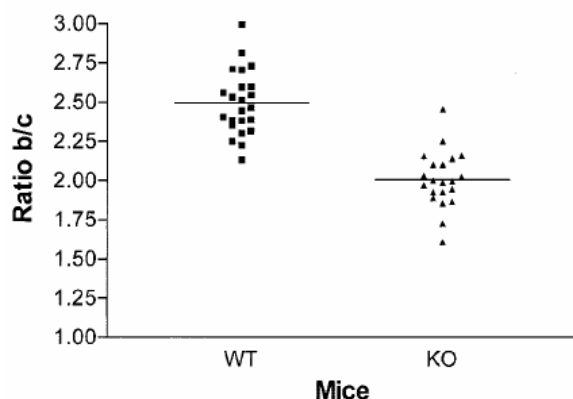


Figure 6. Reduced neovascularization in MMP-9^{-/-} mice. Angiogenesis was quantified by evaluating the B/C ratio as described previously⁸ at day 14 after laser injury of the Bruch's membrane. Results are shown as column scatter; $P < 0.001$ (unpaired, non-parametric Mann-Whitney).

their substrate specificity includes type IV collagen, a major component of basement membranes and of the subretinal Bruch's membrane. However, MMP action can be both proangiogenic and antiangiogenic. While MMP-9 regulates the bioavailability of VEGF,¹¹ stimulating angiogenesis, MMPs also generates antiangiogenic factors and degrades basement membranes, which may destabilize the newly formed blood vessels, thus trimming back and limiting the extent of angiogenesis.²⁸

Since MMP-9 expression has been demonstrated in human proliferative ischemic chorioretinopathies²⁹ and in experimental ocular models,³⁰ the aim of our investigation was to determine whether MMP-9 plays a role in laser-induced choroidal neovascularization, a model similar to the exudative AMD, the most sight-devastating form of human AMD.

MMP-9 mRNA expression was mapped using transgenic mice expressing β -galactosidase reporter gene under the dependence of MMP-9 promoter. RT-PCR analysis was performed on choroidal neovascular structures microdissected from serial sections by laser pressure catapulting. To our knowledge, this is the first report applying microdissection techniques to study gene expression in experimental subretinal neovascularization. These two approaches cooperatively demonstrated that the local expression of MMP-9 mRNA is restricted to day 5 after laser burn. Although resident cells might also produce MMP-9, mRNA detection coincides perfectly with the appearance of macrophages within the neovascular reaction. This suggests that inflammatory cells are a predominant provider of MMP-9, as found previously in tumor models.³¹ Indeed, an angiogenic role for macrophages infiltrating choroidal new vessels has already been reported.³² A previous study using krypton laser in rats to induce choroidal neovascularization did not find a change in the expression of MMP-9 using *in situ* hybridization.³³ Differences in methodology, animal model and sensitivity of the techniques and the very narrow time window of expression probably explain these apparent discrepancies.

It is worth noting that inflammatory cells containing preformed MMP-9 in intracellular granules could also contribute to the development of the lesions. Since the contribution of these providers of MMP-9 protein would not be detected by the MMP-9 evaluation at the mRNA levels, it was therefore important to compare protein and mRNA expressions. At the protein level, MMP-9 activity was observed with zymography and was immunohistochemically localized in the laser-induced lesion already at day 3, before local mRNA expression was detected. Thus MMP-9 probably first arose from early recruitment and degranulation of neutrophils before a transcriptional induction of its local expression and that preformed protein might represent the major source of active MMP-9.

The pattern of MMP-2 expression obtained by RT-PCR on microdissected samples is different from that of MMP-9. MMP-2 was constantly expressed throughout the study period both in the choroidal neovascular membrane and in control adjacent intact areas, with a relative peak of expression at day 10 whose significance is at present unclear. These data confirm the clear different regulation pattern of MMP-2 and MMP-9.

MMP-9 Contributes to Choroidal Neovascularization in the Murine Laser-Induced Model

Angiogenesis determined by immunohistochemistry and quantitative histology was significantly reduced in MMP-9-deficient animals compared to WT controls. The pattern of MMP-2 expression demonstrated that MMP-2 did not compensate for the deficiency of MMP-9. Our results provide for the first time evidence that MMP-9 contributes to choroidal neovascularization induced by laser although they do not distinguish whether MMP-9 exerts its role directly or through the release and/or activation of other angiogenic factors such as VEGF.^{11,34} However, the magnitude of angiogenesis inhibition was much less important than that observed previously in the same model applied on mice deficient for plasminogen activator type I.⁸ This in turn suggests that MMP-9 is not the only pathway for rendering angiogenic factors bioavailable, which clearly occurs for VEGF-dependent angiogenesis later in tumor progression.¹¹ Nevertheless the MMP-9 induction restricted to day 5 after laser-induced rupture of the Bruch's membrane contributed to the severity of pathological choroidal neovascularization. Taken together with the previous work on PAI-1, these data indicate that a balance of both positive and negative regulation of proteolysis by more than one enzyme system are critical to overall neoangiogenesis. One implication of our observations is that combination of MMP-9 inhibitors with other anti-angiogenic agents may be a promising strategy.

References

1. Campochiaro PA: Retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol* 2000, 184:301-310

2. Schwesinger C, Yee C, Rohan RM, Jousseaume AM, Fernandez A, Meyer TN, Poulaki V, Ma JJK, Redmond TM, Liu S, Adamis AP, D'Amato RJ: Intrachoroidal neovascularization in transgenic mice overexpressing vascular endothelial growth factor in the retinal pigment epithelium. *Am J Pathol* 2001, 158:1161-1172
3. Hanahan D, Folkman J: Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996, 86:353-364
4. Mandriota SJ, Pepper MS: Vascular endothelial growth factor-induced in vitro angiogenesis and plasminogen activator expression are dependent on endogenous basic fibroblast growth factor. *J Cell Sci* 1997, 110:2293-2302
5. Weber B, Vogt G, Pruetz RC, Stohr H, Felber U: Mutations in the tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3) in patients with Sorsby's fundus dystrophy. *Nat Genet* 1994, 8:352-356
6. Ruiz A, Brett P, Bok D: TIMP-3 is expressed in the human retinal pigment epithelium. *Biochem Biophys Res Commun* 1996, 226:467-74
7. Kamei M, Hollyfield JG: TIMP-3 in Bruch's membrane: changes during aging and in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999, 40:2367-2375
8. Lambert V, Munaut C, Noel A, Franckne F, Bajou K, Gerard B, Carmeliet P, Defresne MP, Foidart J-M, Rakic J-M: Influence of plasminogen activator inhibitor type 1 on choroidal neovascularization. *FASEB J* 2001, 15:1021-1027
9. Pepper MS: Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001, 21:1104-1117
10. 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, 58:1048-1051
11. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D: Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000, 2:737-744
12. Chang C, Werb D: The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis, and metastasis. *Trends Cell Biol* 2001, 11: S37-S43
13. Manes S, Llorente M, Lacalle RA, Gomez-Mouton C, Kremer L, Mira E, Martinez-AC: The matrix metalloproteinase-9 regulates the insulin-like growth factor-triggered autocrine response in DU-145 carcinoma cells. *J Biol Chem* 1999, 274:6935-6945
14. Dong Z, Kumar R, Yang X, Fidler IJ: Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell* 1997, 88:801-810
15. Das A, McGuire PG, Eriqat C, Ober RR, DeJuan Jr E, Williams GA, McLamore A, Biswas J, Johnson DW: Human diabetic neovascular membranes contain high levels of urokinase and metalloproteinase enzymes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999, 40:809-813
16. Kosano H, Okano T, Katsura Y, Noritake M, Kado S, Matsuoka T, Nishigori H: ProMMP-9 (92 kDa gelatinase) in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Life Sci* 1999, 64:2307-2315
17. Jin M, Kashiwagi K, Iizuka Y, Tanaka Y, Imai M, Tsukahara S: Matrix metalloproteinases in human diabetic and nondiabetic vitreous. *Retina* 2001, 21:28-33
18. Steen B, Sejersens S, Berglin L, Seregard S, Kvant A: Matrix metalloproteinases and metalloproteinase inhibitors in choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998, 39:2194-2200
19. Munaut C, Salonurmi T, Kontusaari S, Reponen P, Morita T, Foidart JM, Tryggvason K: Murine matrix metalloproteinase 9 gene 5'-upstream region contains cis-acting elements for expression in osteoclasts and migrating keratinocytes in transgenic mice. *J Biol Chem* 1999, 274:5588-5596
20. Behringer RR, Crotty DA, Tennyson VM, Brinster RL, Palmiter RD, Wolgemuth DJ: Sequences 5' of the homeobox of the Hox-1.4 gene direct tissue-specific expression of lacZ during mouse development. *Development* 1993, 117:823-833
21. Mohan R, Rinehart WB, Bargagna-Mohan P, Fini E: Gelatinase B/lacZ transgenic mice, a model for mapping gelatinase B expression during developmental and injury-related tissue remodeling. *J Biol Chem* 1998, 273:25903-25914
22. Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM, Werb Z: MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 1998, 93:411-422
23. Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, Rabkin E, Lindsey M, Rohde LE, Schoen FJ, Kelly RA, Werb Z, Libby P, Lee RT: Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest* 2000, 106:55-62
24. Tobe T, Ortega S, Luna JD, Ozaki H, Okamoto N, Derevanjik NL, Vineros SA, Basilico C, Campochiaro PA: Targeted disruption of the FGF2 gene does not prevent choroidal neovascularization in a murine model. *Am J Pathol* 1998, 153:1641-1646
25. Bohm M, Wieland I, Schutze K, Rubben H: Microbeam MOMENT: non-contact laser microdissection of membrane-mounted native tissue. *Am J Pathol* 1997, 151:63-67
26. Munaut C, Noel A, Weidle UH, Kreil HW, Foidart JM: Modulation of the expression of interstitial and type-IV collagenases in coculture of HT1080 fibrosarcoma cells and fibroblasts. *Invasion Metastasis* 1995, 15:169-178
27. Fini ME, Parks WC, Rinehart WB, Girard MT, Matsubara M, Cook JR, West-Mays JA, Sadow PM, Burgeson RE, Jeffrey JJ, Raizman MB, Krueger RR, Zieske JD: Role of matrix metalloproteinases in failure to re-epithelialize after corneal injury. *Am J Pathol* 1996, 149:1287-1302
28. Yamada E, Tobe T, Yamada H, Okamoto N, Zack DJ, Werb Z, Soloway PD, Campochiaro PA: TIMP-1 promotes VEGF-induced neovascularization in the retina. *Histol Histopathol* 2001, 16:87-97
29. Salzmann J, Limb GA, Khaw PT, Gregor ZJ, Webster L, Chignell AH, Charteris DG: Matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fibrovascular membranes of proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 2000, 84:1091-1096
30. Majka S, McGuire P, Colombo S, Das A: The balance between proteinases and inhibitors in a murine model of proliferative retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001, 42:210-215
31. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z: MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 2000, 103:481-490
32. Oh H, Takagi H, Suzuma K, Otani A, Ishida K, Matsumura M, Ogura Y, Honda Y: The potential angiogenic roles of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999, 40:1891-1898
33. Kvant A, Shen W-Y, Sarman S, Seregard S, Steen B, Rakoczy E: Matrix metalloproteinase (MMP) expression in experimental choroidal neovascularization. *Curr Eye Res* 2000, 21:684-690
34. Engsig MT, Chen Q-J, Vu TH, Pedersen A-C, Therkidsen B, Lund LR, Henriksen K, Lenhard T, Foged NT, Werb Z, Delaissé J-M: Matrix Metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *J Cell Biol* 2000, 151:879-889

9.5 Article 5 : MMP-2 and MMP-9 synergize in promoting choroidal neovascularization

V. Lambert, B. Wielockx, C. Munaut, C. Galopin, M. Jost, T. Itoh, Z. Werb, A. Baker, C. Libert, H. W. Krell, J. M. Foidart, A. Noel, and J. M. Rakic..

FASEB J. 17 (15):2290-2292, 2003.

MMP-2 and MMP-9 synergize in promoting choroidal neovascularization¹

VINCENT LAMBERT, BEN WIELOCKX,* CARINE MUNAUT, CATHERINE GALOPIN, MAUD JOST, TAKESHI ITOH,[†] ZENA WERB,[‡] ANDREW BAKER,[§] CLAUDE LIBERT,* HANS-WILLI KRELL,^{††} JEAN-MICHEL FOIDART,² AGNÈS NOËL, AND JEAN-MARIE RAKIC^{‡‡}

Laboratory of Tumor and Development Biology, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium; *Department of Molecular Biology, Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology and University of Ghent, Ghent, Belgium; [†]Shionogi Institute for Medical Science, Shionogi & Co., Osaka, Japan; [‡]Department of Anatomy, University of California at San Francisco, San Francisco, California, USA; [§]Bristol Heart Institute, University of Bristol, Bristol Royal Infirmary, Bristol BS2 8HW, UK; ^{††}Roche-Diagnostics GmbH, Pharma-Research Penzberg, 82372 Penzberg, Germany; and ^{‡‡}Department of Ophthalmology, University Hospital, Sart-Tilman, B-4000 Liège, Belgium

SPECIFIC AIMS

Previous studies have shown that the production of gelatinase (MMP-2 and MMP-9) belonging to the matrix metalloproteinase family is increased in human choroidal neovascularization (CNV) occurring during the exudative most aggressive form of age-related macular degeneration (AMD). To more precisely delineate the respective roles of MMP-2 and MMP-9 in choroidal neo-angiogenesis, we investigated their expression and activities in the course of laser-induced murine choroidal neovascularization. This model was applied to single (MMP-9 KO, MMP-2 KO) or double (MMP-2,9 KO) -deficient mice and to their corresponding wild-type (WT) controls.

PRINCIPAL FINDINGS

1. MMP-2 and MMP-9 are produced in lesions associated with choroidal neovascularization

Gelatin zymography analysis of ocular posterior segments demonstrated that both MMP-2 and MMP-9 were increasingly produced during the early stages of CNV formation, with the appearance of active forms of MMP-2. In situ zymography revealed a predominant gelatinase activity in the CNV area.

2. Different regulation of MMP-2 and MMP-9 expression

RT-PCR evaluation showed that MMP-9 expression was up-regulated during early phases of CNV formation whereas MMP-2 was constitutively expressed without any transcriptional modulation. MT1-MMP mRNA was concomitantly up-regulated, suggesting that the presence of active MMP2 forms was due to the expression and activity of its activator.

3. Severe inhibition of choroidal neovascularization in MMP-2,9 double-deficient mice

Fluorescein angiography performed before death (Fig. 1F) showed a significant reduction ($P < 0.001$) in the number of leaking spots (corresponding to newly formed immature microvessels with leakage of fluorescein) in MMP-2,9 double KO mice compared with MMP-2- or MMP-9-deficient mice. This was associated with a strong inhibition of neovascular progression estimated on day 14 after induction by immunostaining with anti-PECAM antibodies in combined KO mice (Fig. 1D) as compared with each single-deficient mouse (Fig. 1B, C) or WT (Fig. 1A). Choroidal lesion associated with neovascularization was then quantified by determining the B/C ratio between total lesion thickness (B, maximal height lesion measured from the bottom of the choroid to the top of the neovascular area) to the thickness of adjacent normal choroid (C). A significant reduction of the B/C ratio was observed in MMP-9 (33%), MMP-2 (44%), and MMP-2,9 (56%) -deficient mice vs. their corresponding WT ($P < 0.001$, Fig. 1E).

4. Fibrinogen/fibrin accumulation in double MMP-2,9-deficient animals

Consistent with the modulation of fibrinolysis by matrix metalloproteinase system, we observed by immunohistochemical staining that fibrinogen/fibrin accumulated in double MMP-2,9-deficient animals. In contrast, similar fibrinogen/fibrin deposits were found in WT and single gene-deficient mice. These findings suggest that the absence of both gelatinases impaired fibrinolytic activity in choroidal neovascular membrane.

¹ To read the full text of this article, go to <http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.03-0113fje>; doi: 10.1096/fj.03-0113fje

² Correspondence: Laboratory of Tumor and Development Biology, University of Liège, Pathology Tower (B23), Sart-Tilman, B-4000 Liège, Belgium. E-mail: jmfoidard@ulg.ac.be

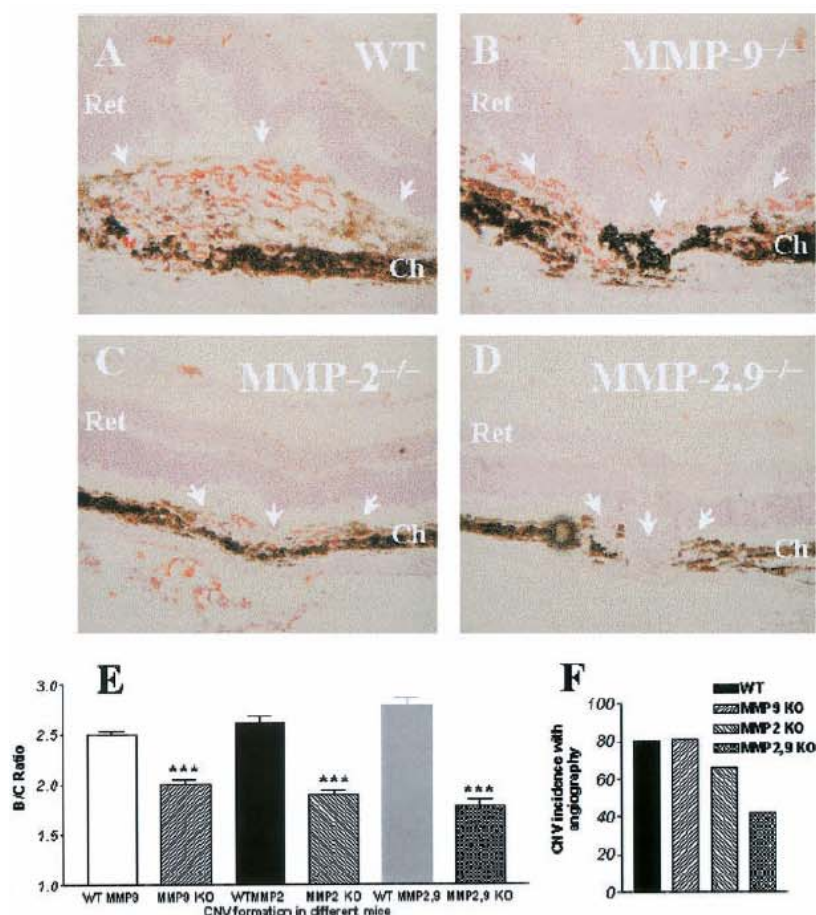


Figure 1. Absence of MMP-2 and MMP-9 prevents the development of experimental choroidal neovascularization. Hematoxylin-eosin staining of a representative area of choroidal neovascularization at the site of laser-induced trauma in control (A) or in mice deficient for MMP-9 (B), MMP-2 (C), and both MMP-2,9 (D). An almost complete absence of neovascularization is visible in mice deficient for both MMP-2 and MMP-9 when vessels were immunostained with anti-mouse PECAM antibody (immunostained in orange with AEC) compared with other conditions, thereby confirming the reduced incidence of neovascularization calculated before death by fluorescein angiography evaluation of the number of leaking laser spots (F). The neovascular reaction was determined with computer-assisted image analysis by evaluating the B/C ratio on day 14 after laser injury of the Bruch's membrane in single/double-deficient mice and in the corresponding WT controls (E). The neural retina (ret) and choroidal layer (ch) are indicated; neovascular area (arrows). *** $P < 0.001$; error bars = SE. Original magnification, 200 \times .

5. MMP inhibitors decrease the development of CNV

In a second approach to assess whether MMPs contribute to CNV development, we first induced endogenous overexpression of TIMP-1 or TIMP-2 by adenoviral-mediated delivery in WT mice. Both TIMP-1 and TIMP-2 overexpression significantly reduced choroidal angiogenesis ($P < 0.001$) compared with WT controls injected with control viruses (AdRR5). We then evaluated the effects of broad spectrum (BB-94) or more selective MMP inhibitors (Ro 28-2653 inhibiting preferentially MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP) on CNV development by treating WT mice with daily systemic injections. Both inhibitors significantly reduced CNV formation. However, Ro-28-2653 was significantly more efficient ($P < 0.001$) than BB-94. Selective MMP inhibition treatment begun 5 days after laser induction also significantly inhibited the development of choroidal angiogenesis (40% inhibition).

CONCLUSIONS AND SIGNIFICANCE

Several lines of evidence support cooperation between MMP-2 and MMP-9 in the course of experimental

choroidal neovascularization. First, both gelatinases are increasingly processed and concentrated in the region of CNV development. Second, choroidal pathological angiogenesis is almost fully prevented in MMP-2/MMP-9 double-deficient mice but only partly impaired in the single MMP-deficient mice. Third, choroidal angiogenesis was strongly inhibited in mice treated with a selective gelatinase/MT1-MMP synthetic inhibitor. In addition, we provide evidence that MMP-9 expression in the course of CNV development was transcriptionally regulated while MMP-2 could be regulated by zymogen activation as the result of an overexpression of its main activator, MT1-MMP.

Although these results support the concept that MMPs play a key role during the early phases of choroidal neovascularization, our understanding of their function in CNV is far from complete and more knowledge is needed before potential clinical applications for AMD treatment. Of interest is the finding that a synthetic inhibitor interacting preferentially with MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP inhibited more efficiently choroidal neovascularization than a broad-spectrum synthetic inhibitor. This suggests that a broad-spectrum inhibitor might repress some beneficial MMP effects. Indeed, it appears that MMPs might have dual

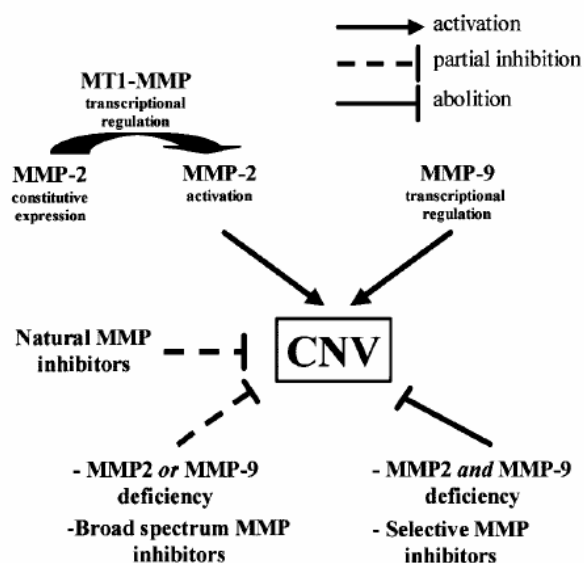


Figure 2. Schematic representation of putative functions of gelatinase, MT1-MMP, and MMP inhibitors in CNV formation. CNV development is associated with an up-regulation of MMP-9 at a transcriptional level and an activation of pro-MMP-2 by MT1-MMP. This process can be inhibited by physiological (TIMP-1 and TIMP-2) and synthetic inhibitors, impaired in single MMP-deficient mice and abolished in double gelatinase KO mice.

functions and that other members of the complex MMP family could limit the spatial extension of the neovascular disease (Fig. 2). Finally, our observation that selective MMP inhibition was efficient even when treatment started 5 days after laser burn suggests that MMP inhibitors might have a potential interest for neovascular regression. This is a crucial question in the clinic, since most patients affected by the exudative form of AMD present at a late stage when the neovascular membrane is already developed.

In addition, the observation of a synergy between MMP-2 and MMP-9 might be of interest for other pathological conditions associated with angiogenesis such as tumoral development. F

MMP-2 and MMP-9 synergize in promoting choroidal neovascularization

Vincent Lambert,* Ben Wielockx,[†] Carine Munaut,* Catherine Galopin,* Maud Jost,* Takeshi Itoh,[†] Zena Werb,[§] Andrew Baker,^{||} Claude Libert,[†] Hans-Willi Krell,[¶] Jean-Michel Foidart,* Agnès Noël,* and Jean-Marie Rakic[#]

*Laboratory of Tumor and Development Biology, University of Liège, Pathology Tower (B23), Sart-Tilman, B-4000 Liège; [†]Department of Molecular Biology, Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology and University of Ghent, Ghent, Belgium; [‡]Shionogi Institute for Medical Science, Shionogi & Co., Osaka, Japan; [§]Department of Anatomy, University of California at San Francisco, San Francisco, California 94143; ^{||}Bristol Heart Institute, University of Bristol, Bristol Royal Infirmary, Bristol BS2 8HW, United Kingdom; [¶]Roche-Diagnostics GmbH, Pharma-Research Penzberg, 82372 Penzberg, Germany; and [#]Department of Ophthalmology, University Hospital, Sart-Tilman, B-4000 Liège, Belgium

Corresponding author: Jean-Michel Foidart, Laboratory of Tumor and Development Biology, University of Liège, Pathology Tower (B23), Sart-Tilman, B-4000 Liège, Belgium. E-mail: jmfoidart@ulg.ac.be

ABSTRACT

Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and MMP-9 are increased in human choroidal neovascularization (CNV) occurring during the exudative most aggressive form of age-related macular degeneration (AMD), but their precise role and potential interactions remain unclear. To address the question of MMP-2 and MMP-9 functions, mice deficient in the expression of MMP-2 (MMP-2 KO), MMP-9 (MMP-9 KO), and both MMP-2 and MMP-9 (MMP-2,9 KO) with their corresponding wild-type mice (WT) underwent CNV induction by laser-induced rupture of the Bruch's membrane. Both the incidence and the severity of CNV were strongly attenuated in double deficient compared with single gene deficient mice or corresponding WT controls. The reduced neovascularization was accompanied by fibrinogen/fibrin accumulation. Furthermore, overexpression of the endogenous MMP inhibitors TIMP-1 or TIMP-2 (delivered by adenoviral vectors) in WT mice or daily injection of a synthetic and gelatinase selective MMP inhibitor (Ro 26-2853) significantly decreased the pathological reaction. These findings suggest that MMP-2 and MMP-9 may cooperate in the development of AMD and that their selective inhibition represents an alternative strategy for the treatment of choroidal neovascularization.

Key words: matrix metalloproteinase • CNV • age-related macular degeneration

The abrupt and often definitive loss of visual function resulting from choroidal neovascularization, which occurs in the exudative form of age-related macular degeneration (AMD), is a worldwide health problem with the aging population (1). It is estimated that by their 90s, one in four people will have lost vision from AMD (2).

Although the primary stimulus for the development of retinal neovascularization is hypoxia, the exact molecular signals involved in the appearance and growth of pathological choroidal neovascularization are not well defined (3). The net balance between positive and negative regulatory molecules controls angiogenesis (4). Vascular endothelial factor (VEGF) and pigment-epithelium derived factor (PEDF) are expressed in AMD and play an important role in choroidal neovascular membrane formation (5–7). Their contribution is further supported by the previous demonstration that either inhibition of the VEGF system or overexpression of PEDF efficiently inhibited choroidal neovascularization (8, 9). However, angiogenesis is also associated with an important extracellular remodeling involving different proteolytic systems, among which the matrix metalloproteinases (MMPs) play an essential role (10, 11).

The MMPs are a family of zinc- and calcium-dependent proteases that are capable of degrading the extracellular matrix (ECM) and basement membrane (10, 11). They are believed to play pivotal roles in embryonic development and growth (12, 13), as well as in tissue remodeling and repair (14, 15). Excessive or inappropriate expression of MMPs may therefore contribute to the pathogenesis of many tissue-destructive processes, including tumor progression (10, 11) and aneurysm formation (16). MMP effects are not restricted to ECM degradation (17). For example, peptide growth factors that are sequestered by ECM proteins become available once degraded by MMP-9 (18). MMPs can increase the bioavailability of VEGF (19) but also generate angiogenesis inhibitors such as angiostatin by cleavage of plasminogen (20).

A possible involvement of MMPs has been suggested in the progression of both retinal and choroidal neovascularization, and mutations in the TIMP-3 gene (tissue inhibitor of metalloproteinases-3) are the cause of a rare familial form of macular dystrophy associated with subretinal neovascularization (21–23). Using an experimental murine model of laser-induced choroidal neovascularization, we have recently demonstrated that MMP-9 secretion from inflammatory cells contributes to the development of pathological choroidal angiogenesis (24). The magnitude of angiogenesis inhibition produced by MMP-9 deficiency was, however, minor compared with that observed previously in the same model in mice deficient for plasminogen activator inhibitor type I (PAI-1; ref 25). This suggests that MMP-9 is not the only pathway for rendering angiogenic factors bioavailable, which clearly occurs in other experimental settings (19). Indeed, both MMP-9 and MMP-2 are expressed in human choroidal neovascular membranes removed during surgery for late stage AMD (26), while MMP-2 is the predominant MMP expressed during rat choroidal neovascularization formation (27). Furthermore, other investigators have pointed out that, depending on the specific context, these gelatinases could either work in concert or antagonistically (28, 29).

To address the question of MMP-2 and MMP-9 functions, we investigated the expression and activity of members of the MMP system in different stages of laser-induced murine choroidal neovascularization, comparing choroidal neovascularization formation in single (MMP-9 KO, MMP-2 KO) or double (MMP-2,9 KO) deficient mice compared with wild-type (WT) controls.

METHODS

Genetically modified mice

MMP-2^{-/-} mice (30) and MMP-9^{-/-} mice (13) were crossed with each other to obtain MMP-2^{+/-}MMP-9^{+/-} mice. These mice were intercrossed to obtain MMP-2^{-/-}MMP-9^{-/-} (double knockout, also designed as MMP-2,9 KO) and control wild-type (WT) MMP-2^{+/+}MMP-9^{+/+} mice. All mice were genotyped using PCR. Animal experiments were performed in compliance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. The animals were maintained with a 12:12-h light/dark cycle and had free access to food and water.

Experimental choroidal neovascularization

Choroidal neovascularization was induced in mice by four burns (usually at the 6, 9, 12, and 3 o'clock positions around the optic disc) using a green argon laser (532 nm; 50 μ m diameter spot size; 0.05 sec duration; 400 mW) as previously described (24, 25). Mice with haemorrhage or not developing an evident bubble at the site of every laser impact (the sign of ruptured Bruch's membrane) were excluded from further analysis. Included animals (5 or more in each condition) were killed 14 days after laser (except for kinetic mRNA profiles). Before death, fluorescein angiograms (intraperitoneal injection of 0.3 ml of 1% fluorescein sodium, Ciba) were performed to confirm that laser burns were developing late phase increasing hyperfluorescent spots (corresponding to the leakage of fluorescein from newly formed permeable capillaries). The eyes were then enucleated and either fixed in buffered 3.5% formalin solution for routine histology or embedded in Tissue TeK (Miles Laboratories, Naperville, IL) and frozen in liquid nitrogen for cryostat sectioning. Choroidal neovascularization was quantified as previously described (24, 25). Briefly, frozen serial sections were cut throughout the entire extent of each burn, and the thickest region (minimum of 5/lesion) was selected for the quantification. With the use of a computer-assisted image analysis system (Olympus Micro Image version 3.0 for Windows 95/NT, Olympus Optical CO. Europe GmbH), neovascularization was estimated by the ratio (B/C) of the thickness from the bottom of the pigmented choroidal layer to the top of the neovascular membrane (B) to the thickness of the intact-pigmented choroid adjacent to the lesion (C). A mean B/C ratio value was attributed to each laser impact.

Gelatin zymography

Choroidal neovascularization was induced in mice by multiple burns ($n=30$) as described above. Animals were killed at different endpoints, and the eyes were enucleated. The posterior segments were cut out and immediately snap frozen in liquid nitrogen. Frozen tissues were then pulverized in liquid nitrogen, homogenized in buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 8.1, 0.4% Triton X-100), and centrifuged for 20 min at 5000 g. The pellets were discarded. Aliquots of supernatants were mixed with SDS sample buffer and electrophoresed directly as described previously (31).

In situ zymography was performed by incubating cryosections (7 μ m) with 40 μ g/ml fluorescein-conjugated gelatin (Molecular Probes, Eugene, OR) in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, and 0.05% Brij-35 (Calbiochem) for 12 h at 37°C; sections were washed three

times with water and mounted with Vectashield. Gelatinase activity was visualized using fluorescent microscopy (32).

Immunohistochemistry

Cryostat sections (5 μm thick) were fixed in paraformaldehyde 1% in 0.07 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.0, for 5 min or in acetone for 10 min at room temperature and then incubated with the primary antibody. Antibodies raised against mouse PECAM (rat monoclonal, PharMingen, San Diego, CA; diluted 1/20), mouse MAC-3 (BD Pharming, San Diego, CA), and murine fibrinogen/fibrin (goat polyclonal, Nordic Immunological, Tilburg, The Netherlands; diluted 1/400) were incubated for 1 h at room temperature. The sections were washed in PBS (3x10 min) and appropriate secondary antibody conjugated to peroxidase (HRP) was added: rabbit anti-goat IgG (Dako, Glostrup, Denmark, diluted 1/100) and rabbit anti-rat IgG (Sigma-Aldrich; diluted 1/40) were applied for 30 min. For staining, a drop of AEC+ (Dako, 3-amino-9-ethylcarbazole) was added and sections were counterstained for 1 min in hematoxylin. Specificity of staining was assessed by substitution of nonimmune serum for primary antibody (not shown).

Adenovirus-mediated TIMP-1 and TIMP-2 gene transfer and synthetic MMP inhibitor treatment

Recombinant adenovirus bearing the gene coding for human TIMP-1 or TIMP-2 (AdTIMP-1, AdTIMP-2), or an empty control adenovirus (AdRR5) were generated as described previously (33–34). Twenty-four hours after laser spot production, mice were intravenously injected with 200 μl of adenovirus (7×10^8 PFU). On day 14, mice were killed and eyes were excised and processed as described above.

As an alternative way of MMP inhibition, WT mice were intraperitoneally injected with a broad spectrum MMP inhibitor (BB-94, British Biotech Pharmaceuticals Ltd., Oxford, UK) or a more selective inhibitor (Ro 28-2653, Roche-Diagnostics, Penzberg, Germany) interacting primarily with MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP (35). The daily injections started either the same day as choroidal neovascularization induction (day 0) or at day 5.

RT-PCR analysis

To evaluate the kinetic of MMPs mRNA expression by semiquantitative RT-PCR, choroidal neovascularization was induced in mice by multiple argon laser burns and animals were killed at days 3, 5, 10, 14, 20, and 40. The posterior segments (RPE-choroid complex without neural retina) were cut out and immediately frozen in liquid nitrogen. rTth reverse transcriptase RNA PCR kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) was used, and pairs of primers (Eurogentec, Liège, Belgium), oligonucleotides sequences, number of cycles, and expected PCR product size are shown in [Table 1](#). The frozen murine tissues were first pulverized using a Dismembrator (B. Braun Biotech international, Gmbh Melsungen, Germany), and total RNA was extracted with the RNeasy extraction kit (Quiagen, Paris, France) according to the protocol of the manufacturer. 28S RNA was amplified with an aliquot of 10 ng of total RNA using the GeneAmp ThermoStable mRNA. Reverse transcription was performed at 70°C for 15 min followed by 2 min incubation at 95°C for denaturation of RNA-DNA heteroduplexes. Amplification started by

15 s at 94°C, 20 s at 60°C, and 10 s at 72°C. RT-PCR products were resolved on 2% agarose gels and analyzed using a Fluor-S MultiImager (Bio-Rad) after being stained with ethidium bromide (FMC BioProducts).

Statistical analysis

Data were analyzed with GraphPad Prism 3.0 (San Diego, CA). The chi-square and Mann-Whitney tests were used to determine significant ($P<0.01$) differences between WT and deficient mice.

RESULTS

Induction of experimental choroidal neovascularization in WT, MMP-2KO, MMP-9KO, and MMP-2,9KO mice

Fluorescein angiography performed before death ([Fig. 1F](#)) showed a significant reduction ($P<0.001$) in the number of leaking spots (corresponding to newly formed immature microvessels with leakage of fluorescein) in MMP-2,9 double KO mice compared with MMP-2 or MMP-9 deficient mice. This corresponded to a strong inhibition of neovascular progression estimated at day 14 after induction by immunostaining with anti-PECAM antibodies in MMP-2,9 double KO mice ([Fig. 1D](#)), compared with MMP-2 or MMP-9 deficient ([Fig. 1B-C](#)) or WT ([Fig. 1A](#)) animals. We then quantified choroidal pathological reaction in sites developing a neovascular membrane by measuring, on serial sections, the maximal height of the lesion above the choroidal layer observed in neighboring intact zones. This was performed by determining the B/C ratio between total thicknesses of lesions (B, from the bottom of the choroid to the top of the neovascular area) to the thickness of adjacent normal choroid (C) according to Lambert et al. (24, 25). A significant reduction of the B/C ratio was observed in MMP-9 (33%), MMP-2 (44%), and MMP-2,9 (56%) deficient mice compared with their corresponding WT ($P<0.001$, [Fig. 1E](#)).

Presence of MMP-2 and MMP-9 in the posterior segments of WT and MMP deficient mice at day 5 and temporal profile during the formation of choroidal neovascularization

Ocular posterior segment proteins prepared from WT, MMP-9 KO, MMP-2 KO, and MMP-2,9 KO mice were analyzed by gelatin zymography ([Fig. 2A](#)). As expected, no MMP-2 and MMP-9 activity was detected in MMP-2 KO, MMP-9 KO, and MMP-2,9 KO mice (not shown), respectively. WT mice expressed pro-MMP-2 and -MMP-9 as well as processed MMP-2. Although the ocular expression of MMP-9 increased in the MMP-2 KO mice, MMP-2 KO mice were significantly protected from the development of severe choroidal neovascularization. Both pro-MMP-2 and pro-MMP-9 progressively accumulated during the early stages of choroidal neovascularization formation, with the appearance of active forms of MMP-2 ([Fig. 2B](#)).

In situ zymography revealed that gelatinase activation in the posterior ocular segments was predominantly present in the area developing choroidal neovascularization ([Fig. 2C](#)). Although gelatinolytic activity was strongly decreased in double MMP-2,9 deficient mice, residual activity was still detectable at the top of the choroidal pathological reaction ([Fig. 2D](#)).

Kinetics of MMP expression

To evaluate the level of regulation, we first analyzed the temporal profiles of MMP-2 and MMP-9 expression by semiquantitative RT-PCR. MMP-9 expression was upregulated during early phases of choroidal neovascularization formation, whereas MMP-2 (constitutively expressed) showed no significant modulation (Fig. 3A-B). We knew from previous work (36) that members of the plasminogen system are induced early during the process (important for plasmin-mediated activation of pro-MMP-9). The presence of active forms of MMP-2 theoretically could correspond either to a decrease of TIMP expression or to an increase in the expression of activators (MT1-MMP). RT-PCR analysis demonstrated a constant expression of TIMP-2 but a significant upregulation of MT1-MMP mRNA (Fig. 3, B and C).

Effect of MMP deficiency on fibrinolytic activity

Plasminogen activators/plasmin play an important role in choroidal neovascularization (24, 36). However, MMPs may modulate fibrinolysis through plasminogen-dependent or independent mechanisms (37–39). We evaluated the immunohistochemical staining of fibrinogen/fibrin, as an endpoint of fibrinolytic activity. This demonstrated the presence of similar fibrinogen/fibrin deposits in WT and MMP-2 or MMP-9 deficient mice (Fig. 4A-C). However, fibrinogen/fibrin accumulated in double MMP-2,9 deficient animals, suggesting that the absence of both gelatinases impaired fibrinolytic activity in the choroidal neovascular membrane (Fig. 4D).

MMP inhibitors decrease the development of choroidal neovascularization

In a second approach to show that MMPs contribute to the development of choroidal neovascularization, we induced endogenous overexpression of TIMP-1 or TIMP-2 with adenoviral-mediated delivery in WT mice. RT-PCR analysis of murine posterior segments revealed that systemic intravenous injections also led to increased local expressions of TIMP-1 and TIMP-2 (Fig. 5A-B). Evaluation by in situ zymography demonstrated a complete inhibition of gelatinolytic activity after AdTIMP-1 injections, whereas residual activity was still present in case of AdTIMP-2 (Fig. 5C-D). The evaluation of choroidal neovascularization formation by B/C ratio calculation was compared on serial frozen sections in WT mice 14 days after injection with either AdTIMP-1 or AdTIMP-2. Both TIMP-1 and TIMP-2 overexpression significantly reduced angiogenesis ($P < 0.001$) compared with WT controls injected with AdRR5 (Fig. 5E).

We then evaluated the consequences of broad spectrum (BB-94) or more selective MMP inhibitor (Ro 28-2653, a more selective synthetic gelatinase inhibitor acting preferentially on MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP, ref. 35) inhibition on choroidal neovascularization development by treating WT mice with daily systemic injections. Both inhibitors significantly reduced the choroidal neovascularization formation. (Fig. 5F). However, Ro 28-2653 was more efficient ($P < 0.001$) than BB-94. Interestingly, selective MMP inhibition treatment started 5 days after laser induction also significantly inhibited the development of choroidal angiogenesis (40% inhibition) indicating thereby a potential for drug-induced regression (Fig. 5F).

DISCUSSION

This study shows that both MMP-2 and MMP-9 cooperate in the course of experimental choroidal neovascularization. Indeed, choroidal pathological angiogenesis was nearly fully

prevented in MMP-2/MMP-9 double deficient mice, whereas it was only partly impaired in the single MMP deficient mice (Fig. 1D-F). These results were supported by the strong inhibition of choroidal angiogenesis in mice treated with a selective gelatinase/MT1-MMP synthetic inhibitor (Fig. 5F).

Previous studies suggested a role for different MMPs in the exudative form of AMD (22–24, 26, 40–41). With the use of MMP deficient mice (MMP-2 KO, MMP-9 KO, and MMP-2,9 KO) and different methods of MMP inhibition (AdTIMP-1, AdTIMP-2, BB-94, and Ro 28-2653), our observations provide a more complete understanding of the role of the MMP system in choroidal neovascularization. MMP-9 mRNA was upregulated, whereas MMP-2 mRNA showed little variation during choroidal neovascularization formation. However, MT1-MMP, which is a major MMP-2 activator, was strongly induced (10, 11, 42). It is of interest to note that in our model, MMP-2 deficiency was accompanied by increased MMP-9 activity detected by gelatin zymography, while the opposite was not observed. However, this increase in MMP-9 did not prevent the inhibitory consequences of MMP-2 deficiency on choroidal neovascularization development (Fig. 1).

Fibrin and other adhesive proteins such as vitronectin, laminin, and fibronectin form a provisional matrix, which supports angiogenesis (43). We have recently demonstrated the importance of finely tuned fibrinolysis for the development of subretinal pathological angiogenesis (25, 36). However, both excessive (in PAI-1 deficient mice) and deficient fibrinolysis (in plasminogen deficient mice) prevent the formation of laser-induced choroidal neovascular membranes. The plasminogen/plasminogen activator system is not the only way of regulating fibrinolysis. Indeed, a similar role has been demonstrated for members of the MMP system. In antiglomerular basement membrane nephritis, MMP-9 is required for fibrinolysis, and in its absence, fibrin accumulates in glomeruli (44). We observed that the combined absence of both gelatinases resulted in an accumulation of fibrin in laser-induced lesions, which could present a physical barrier to the infiltrating cellular components of choroidal neovascularization (endothelial cells, fibroblasts, and mononuclear cells). We did not detect mononuclear cells in MMP-2,9 deficient mice by immunostaining with MAC-3 antibody, while these inflammatory cells were always present at the migrating border of the neovascular membrane in WT controls (not shown).

Is there a place for MMP inhibition in the treatment of choroidal neovascularization? Although TIMP-3 has efficacy for the inhibition of the pathological process (45), it also has proapoptotic properties, which obviously limit its therapeutic potential in a senescent eye (46). Accordingly, we therefore evaluated the effects of TIMP-1 and TIMP-2 with adenoviral delivery. Although TIMP-2 overexpression was less efficient than TIMP-1 for the inhibition of in situ gelatinolytic activity, it was more effective in preventing the formation of the choroidal reaction. Whether this affects the ability of TIMP-2, but not TIMP-1, to inhibit MT1-MMP (42), which is also induced in early stages of choroidal neovascularization, formation remains to be determined. MT1-MMP could act either through its fibrinolytic activity or through its capacity to activate MMP-2 to facilitate choroidal neovascularization. Unfortunately, our experimental model cannot be applied to MT1-MMP deficient mice, which die shortly after birth (47). A synthetic MMP inhibitor interacting preferentially with MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP (Ro 28-2653) inhibited the choroidal neovascularization more effectively than the nonspecific inhibitor (Fig. 5F). It is of interest to note that similar observations have recently been reported in a tumor model (48). This

suggests that broad spectrum inhibition of MMP activity might also repress some beneficial MMP effects (49). Indeed, RT-PCR analysis (unpublished data) showed that other MMPs (including MMP-8, MMP-12, and MMP-19) are expressed during choroidal neovascularization formation the role of which in the disease is at present unknown. MMPs can stimulate angiogenesis or generate antiangiogenic factors (such as angiostatin or endostatin) and degrade basement membranes, which may limit the extent of angiogenesis at a later stage by destabilizing the newly formed blood vessels (10, 11, 50). Altogether, these results suggest that a selective inhibition of only some MMPs might be more efficient than an inhibition of the complete MMP repertoire for angiogenesis control.

In conclusion, we have shown that MMP-2 and MMP-9 cooperate in experimental laser-induced choroidal neovascularization. In mice with a combined deficiency of both MMP-2 and MMP-9 genes, both the incidence and the severity of the pathological choroidal reaction were significantly reduced, highlighting the differences between physiological (double knockouts developed normally) and pathological angiogenesis (51). Since a selective MMP synthetic inhibitor could also effectively inhibit subretinal angiogenesis, we believe that inhibition of MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP may represent a promising strategy for the treatment or for the prevention of the exudative form of age-related macular degeneration.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank L. Naa and F. Olivier for collaboration and P. Gavitelli for technical assistance. B. Wielockx and C. Libert kindly provided the double genes MMP-2,9 deficient mice and fluorescein-conjugated gelatin, Z. Werb the MMP-9, and T. Itoh the MMP-2 knockouts. C. Galopin and M. Jost contributed to establish the zymography technique in our laboratory. These studies were supported by funds from Les Amis des Aveugles (Ghlin), the Fonds de la Recherche Scientifique Médicale (FRSM), the Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS, Belgium), and The Steinbach Foundation (to Z. Werb). C. Munaut is a research associate and A. Noël is a senior research associate from the National Fund for Scientific Research (FNRS), Belgium.

REFERENCES

1. Fine, S. L., Berger, J. W., Maguire, M. G., and Ho, A. C. (2000) Age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* **342**, 483–492
2. VanNewkirk, M. R., Nanjan, M. B., Wang, J. J., Mitchell, P., Taylor, H. R., and McCarty, C. A. (2000) The prevalence of age-related maculopathy: the visual impairment project. *Ophthalmology* **107**, 1593–1600
3. Campochiaro, P. A. (2000) Retinal and choroidal neovascularization. *J. Cell. Physiol.* **184**, 301–310
4. Carmeliet, P., and Jain, R. K. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**, 249–257
5. Schwesinger, C., Yee, C., Rohan, R. M., Jousseaume, A. M., Fernandez, A., Meyer, T. N., Poulaki, V., Ma, J. J., Redmond, T. M., Liu, S., et al. (2001) Intrachoroidal

- neovascularization in transgenic mice overexpressing vascular endothelial growth factor in the retinal pigment epithelium. *Am. J. Pathol.* **158**, 1161–1172
6. Ogata, N., Wada, M., Otsuji, T., Jo, N., Tombran-Tink, J., and Matsumura, M. (2002) Expression of pigment epithelium-derived factor in normal adult rat eye and experimental choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 1168–1175
 7. Dawson, D. W., Volpert, O. V., Gillis, P., Crawford, S. E., Xu, H., Benedict, W., and Bouck, N. P. (1999) Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* **285**, 245–248
 8. Krzystolik, M. G., Afshari, M. A., Adamis, A. P., Gaudreault, J., Gragoudas, E. S., Michaud, N. A., Li, W., Connolly, E., O'Neill, C. A., and Miller, J. W. (2002) Prevention of experimental choroidal neovascularization with intravitreal anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment. *Arch. Ophthalmol.* **120**, 338–346
 9. Mori, K., Gehlbach, P., Ando, A., McVey, D., Wei, L., and Campochiaro, P. A. (2002) Regression of ocular neovascularization in response to increased expression of pigment epithelium-derived factor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 2428–2434
 10. Egeblad, M., and Werb, Z. (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 161–174
 11. Overall, C. M., and Lopez-Otin, C. (2002) Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 657–672
 12. Holmbeck, K., Bianco, P., Caterina, J., Yamada, S., Kromer, M., Kuznetsov, S. A., Mankani, M., Robey, P. G., Poole, A. R., Pidoux, I., et al. (1999) MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* **99**, 81–92
 13. Vu, T. H., Shipley, J. M., Bergers, G., Berger, J. E., Helms, J. A., Hanahan, D., Shapiro, S. D., Senior, R. M., and Werb, Z. (1998) MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* **93**, 411–422
 14. Shapiro, S. D. (1998) Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 602–608
 15. Lund, L. R., Romer, J., Bugge, T. H., Nielsen, B. S., Frandsen, T. L., Degen, J. L., Stephens, R. W., and Dano, K. (1999) Functional overlap between two classes of matrix-degrading proteases in wound healing. *EMBO J.* **18**, 4645–4656
 16. Carmeliet, P., Moons, L., Lijnen, R., Baes, M., Lemaitre, V., Tipping, P., Drew, A., Eeckhout, Y., Shapiro, S., Lupu, F., et al. (1997) Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nat. Genet.* **17**, 439–444
 17. Chang, C., and Werb, D. (2001) The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol.* **11**, S37–S43

18. Manes, S., Llorente, M., Lacalle, R. A., Gomez-Mouton, C., Kremer, L., Mira, E., and Martinez, A. C. (1999) The matrix metalloproteinase-9 regulates the insulin-like growth factor-triggered autocrine response in DU-145 carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 6935–6945
19. Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T. H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z., et al. (2000) Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat. Cell Biol.* **2**, 737–744
20. Dong, Z., Kumar, R., Yang, X., and Fidler, I. J. (1997) Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell* **88**, 801–810
21. Das, A., McGuire, P. G., Eriqat, C., Ober, R. R., DeJuan, E., Jr., Williams, G. A., McLamore, A., Biswas, J., and Johnson, D. W. (1999) Human diabetic neovascular membranes contain high levels of urokinase and metalloproteinase enzymes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 809–813
22. Kadonosono, K., Yazama, F., Itoh, N., Sawada, H., and Ohno, S. (1999) Expression of matrix metalloproteinase-7 in choroidal neovascular membranes in age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* **128**, 382–384
23. Weber, B., Vogt, G., Pruett, R. C., Stohr, H., and Felbor, U. (1994) Mutations in the tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3) in patients with Sorsby's fundus dystrophy. *Nat. Genet.* **8**, 352–356
24. Lambert, V., Munaut, C., Jost, M., Noel, A., Werb, Z., Foidart, J. M., and Rakic, J. M. (2002) Matrix metalloproteinase-9 contributes to choroidal neovascularization. *Am. J. Pathol.* **161**, 1247–1253
25. Lambert, V., Munaut, C., Noel, A., Frankenne, F., Bajou, K., Gerard, R., Carmeliet, P., Defresne, M. P., Foidart, J. M., and Rakic, J. M. (2001) Influence of plasminogen activator inhibitor type 1 on choroidal neovascularization. *FASEB J.* **15**, 1021–1027
26. Steen, B., Sejersen, S., Berglin, L., Seregard, S., and Kvanta, A. (1998) Matrix metalloproteinases and metalloproteinase inhibitors in choroidal neovascular membranes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **39**, 2194–2200
27. Kvanta, A., Shen, W. Y., Sarman, S., Seregard, S., Steen, B., and Rakoczy, E. (2000) Matrix metalloproteinase (MMP) expression in experimental choroidal neovascularization. *Curr. Eye Res.* **21**, 684–690
28. Longo, G. M., Xiong, W., Greiner, T. C., Zhao, Y., Fiotti, N., and Baxter, B. T. (2002) Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J. Clin. Invest.* **110**, 625–632
29. Itoh, T., Matsuda, H., Tanioka, M., Kuwabara, K., Itohara, S., and Suzuki, R. (2002) The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis. *J. Immunol.* **169**, 2643–2647

30. Itoh, T., Ikeda, T., Gomi, H., Nakao, S., Suzuki, T., and Itohara, S. (1997) Unaltered secretion of β -amyloid precursor protein in gelatinase A (matrix metalloproteinase 2)-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **272**, 22389-22392
31. Munaut, C., Noel, A., Weidle, U. H., Krell, H. W., and Foidart, J. M. (1995) Modulation of the expression of interstitial and type-IV collagenases in coculture of HT1080 fibrosarcoma cells and fibroblasts. *Invasion Metastasis* **15**, 169-178
32. Pagenstecher, A., Stalder, A. K., Kincaid, C. L., Volk, B., and Campbell, I. L. (2000) Regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitor genes in lipopolysaccharide-induced endotoxemia in mice. *Am. J. Pathol.* **157**, 197-210
33. Baker, A. H., Zaltsman, A. B., George, S. J., and Newby, A. C. (1998) Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis. *J. Clin. Invest.* **101**, 1478-1487
34. Carmeliet, P., Moons, L., Lijnen, R., Janssens, S., Lupu, F., Collen, D., and Gerard, R. D. (1997) Inhibitory role of plasminogen activator inhibitor-1 in arterial wound healing and neointima formation: a gene targeting and gene transfer study in mice. *Circulation* **96**, 3180-3191
35. Lein, M., Jung, K., Ortel, B., Stephan, C., Rothaug, W., Juchem, R., Johannsen, M., Deger, S., Schnorr, D., Loening, S., et al. (2002) The new synthetic matrix metalloproteinase inhibitor (Roche 28-2653) reduces tumor growth and prolongs survival in a prostate cancer standard rat model. *Oncogene* **21**, 2089-2096
36. Rakic, J. M., Lambert, V., Munaut, C., Bajou, K., Peyrollier, K., Alvarez-Gonzalez, M. L., Carmeliet, P., Foidart, J. M., and Noël, A. (2003) Mice lacking uPA, tPA or Plasminogen genes are resistant to experimental choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 1732-1739
37. Lijnen, H. R. (2002) Matrix metalloproteinases and cellular fibrinolytic activity. *Biochemistry (Mosc.)* **67**, 92-98
38. Pepper, M. S. (2001) Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 1104-1117
39. Hiraoka, N., Allen, E., Apel, I. J., Gyetko, M. R., and Weiss, S. J. (1998) Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell* **95**, 365-377
40. Qi, J. H., Ebrahem, Q., Yeow, K., Edwards, D. R., Fox, P. L., and Anand-Apte, B. (2002) Expression of Sorsby's fundus dystrophy mutations in human retinal pigment epithelial cells reduces matrix metalloproteinase inhibition and may promote angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 13394-13400

41. Berglin, L., Sarman, S., van der Ploeg, I., Steen, B., Ming, Y., Itohara, S., Seregard, S., and Kvanta, A. (2003) Reduced choroidal neovascular membrane formation in matrix metalloproteinase-2-deficient mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 403–408
42. Brew, K., Dinakarandian, D., and Nagase, H. (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim. Biophys. Acta* **1477**, 267–283
43. Dvorak, H. F., Brown, L. F., Detmar, M., and Dvorak, A. M. (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **146**, 1029–1039
44. Lelongt, B., Bengatta, S., Delauche, M., Lund, L. R., Werb, Z., and Ronco, P. M. (2001) Matrix metalloproteinase 9 protects mice from anti-glomerular basement membrane nephritis through its fibrinolytic activity. *J. Exp. Med.* **193**, 793–802
45. Takahashi, T., Nakamura, T., Hayashi, A., Kamei, M., Nakabayashi, M., Okada, A. A., Tomita, N., Kaneda, Y., and Tano, Y. (2000) Inhibition of experimental choroidal neovascularization by overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in retinal pigment epithelium cells. *Am. J. Ophthalmol.* **130**, 774–781
46. Majid, M. A., Smith, V. A., Easty, D. L., Baker, A. H., and Newby, A. C. (2002) Sorsby's fundus dystrophy mutant tissue inhibitors of metalloproteinase-3 induce apoptosis of retinal pigment epithelial and MCF-7 cells. *FEBS Lett.* **529**, 281–285
47. Holmbeck, K., Bianco, P., Caterina, J., Yamada, S., Kromer, M., Kuznetsov, S. A., Mankani, M., Robey, P. G., Poole, A. R., Pidoux, I., et al. (1999) MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* **99**, 81–92
48. Arlt, M., Kopitz, C., Pennington, C., Watson, K. L., Krell, H. W., Bode, W., Gansbacher, B., Khokha, R., Edwards, D. R., and Kruger, A. (2002) Increase in gelatinase-specificity of matrix metalloproteinase inhibitors correlates with antimetastatic efficacy in a T-cell lymphoma model. *Cancer Res.* **62**, 5543–5550
49. Jiang, Y., Goldberg, I. D., and Shi, Y. E. (2002) Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene* **21**, 2245–2252
50. Yamada, E., Tobe, T., Yamada, H., Okamoto, N., Zack, D. J., Werb, Z., Soloway, P. D., and Campochiaro, P. A. (2001) TIMP-1 promotes VEGF-induced neovascularization in the retina. *Histol. Histopathol.* **16**, 87–97
51. Carmeliet, P. (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* **6**, 389–395

Received May 9, 2003; accepted August 11, 2003.

Table 1**RT-PCR parameters**

Gene and accession number	Position	Oligonucleotide sequence (5'-3')	Size of PCR Product	Number of cycles
28S U13369	12403F 12614R	G TTCACCCACTAATAGGGAACGTGA G GATTCTGACTTAGAGGCGTTCAGT	212 bp	19
h, m MMP-2 NM_004530 NM_008610	1740F (h) or 1500F (m) 1964R (h) or 1724R (m)	A GATCTTCTTCTCAAGGACCGGTT G GCTGGTCAGTGGCTTGGGGTA	225 bp	35
h MMP-9 NM_004994	1592F 1800R	G CCGAGATTGGGAACCAGCTGTA G ACGCGCCTGTGTACACCCACA	209 bp	35
m MMP-9 NM_013599	1612F 1819R	G TTTTGTGATGCTATTGCTGAGATCCA C CCACATTTGACGTCCAGAGAAGAA	208 bp	35
h TIMP-1 X03124	93F 259R	C ATCCTGTTGTTGCTGTGGCTGAT G TCATCTTGATCTCATAACGCTGG	167 bp	35
m TIMP-1 X04684	137F 306R	G GCATCCTCTTGTGCTATCACTG G TCATCTTGATCTCATAACGCTGG	169 bp	35
h, m TIMP-2 J05593 (h) M93954 (m)	570F (h) or 308F (m) 724R (h) or 462R (m)	C TCGCTGGACGTTGGAGGAAAGAA A GCCCATCTGGTACCTGTGGTTCA	155 bp	35
h,m MT1-MMP NM_004995 X83536	1288F (h) or 1226F (m) 1508R (h) or 1446R (m)	G GATACCCAATGCCCATTTGGCCA C CATTGGGCATCCAGAAGAGAGC	221 bp	35

Fig. 1

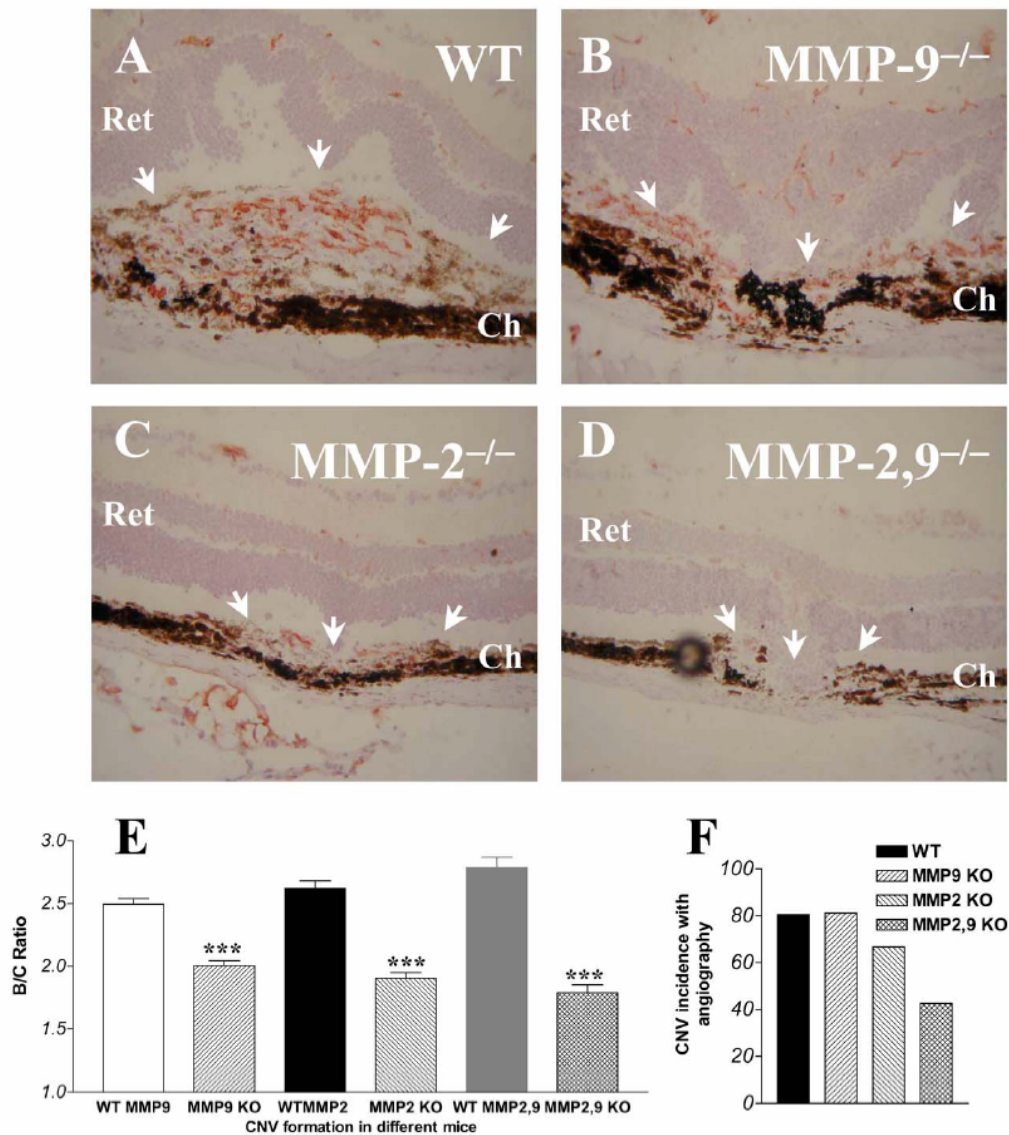


Figure 1. Absence of MMP-2 and MMP-9 prevents the development of experimental choroidal neovascularization. Hematoxylin-eosin staining of a representative area of choroidal neovascularization at the site of laser-induced trauma in control (*A*) or in mice deficient for MMP-9 (*B*), MMP-2 (*C*), and both MMP-2,9 (*D*). Almost complete absence of neovascularization is visible in mice deficient for both MMP-2 and MMP-9 when vessels were immunostained with anti-mouse PECAM antibody (immunostained in orange with AEC) compared with other conditions, confirming thereby the reduced incidence of neovascularization calculated before death by fluorescein angiography evaluation of the number of leaking laser spots (*F*). Neovascular reaction was determined with computer-assisted image analysis by evaluating the B/C ratio as described previously (24, 25) at day 14 after laser injury of the Bruch's membrane in single/double deficient mice and in the corresponding WT controls (*E*). The neural retina (ret) and choroidal layer (ch) are indicated, and the neovascular area is arrowed. *** $P < 0.001$; error bars = SE. Original magnification = x200.

Fig. 2

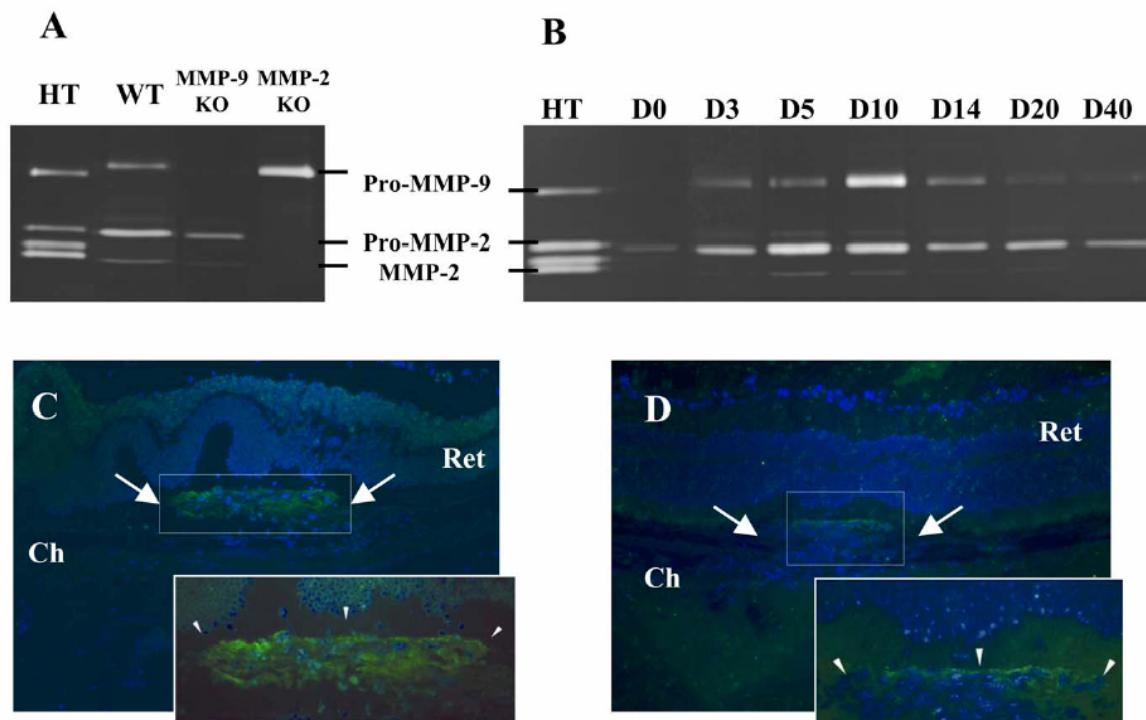


Figure 2. Zymographic analysis of MMP-2 and MMP-9 in knockouts and WT mice. At day 5 after the induction of choroidal neovascularization by laser, animals were killed and posterior segment extract samples (5 ng/lane) from eyes of WT and MMP-2 or MMP-9 deficient mice were analyzed by gelatin zymography (4). As positive control, medium conditioned by human HT1080 cells was included ("HT"). Data are the results of a single experiment, which was 1 of 3 with similar results. In WT mice, a kinetic zymographic evaluation was also performed at different intervals after laser-induced CNV demonstrating a temporal increase in pro-MMP-9 and the appearance of active forms of MMP-2 (B). In situ zymography with fluorescein-conjugated gelatin demonstrates the concentration of gelatinolytic activity at the level of the neovascular membrane growing under the retina (C), with limited residual activity at the top of the membrane in double MMP-2,9 deficient mice (D). The neural retina (ret) and choroidal layer (Ch) are indicated, and arrows indicate the neovascular area. Original magnification = x200 and x400.

Fig. 3

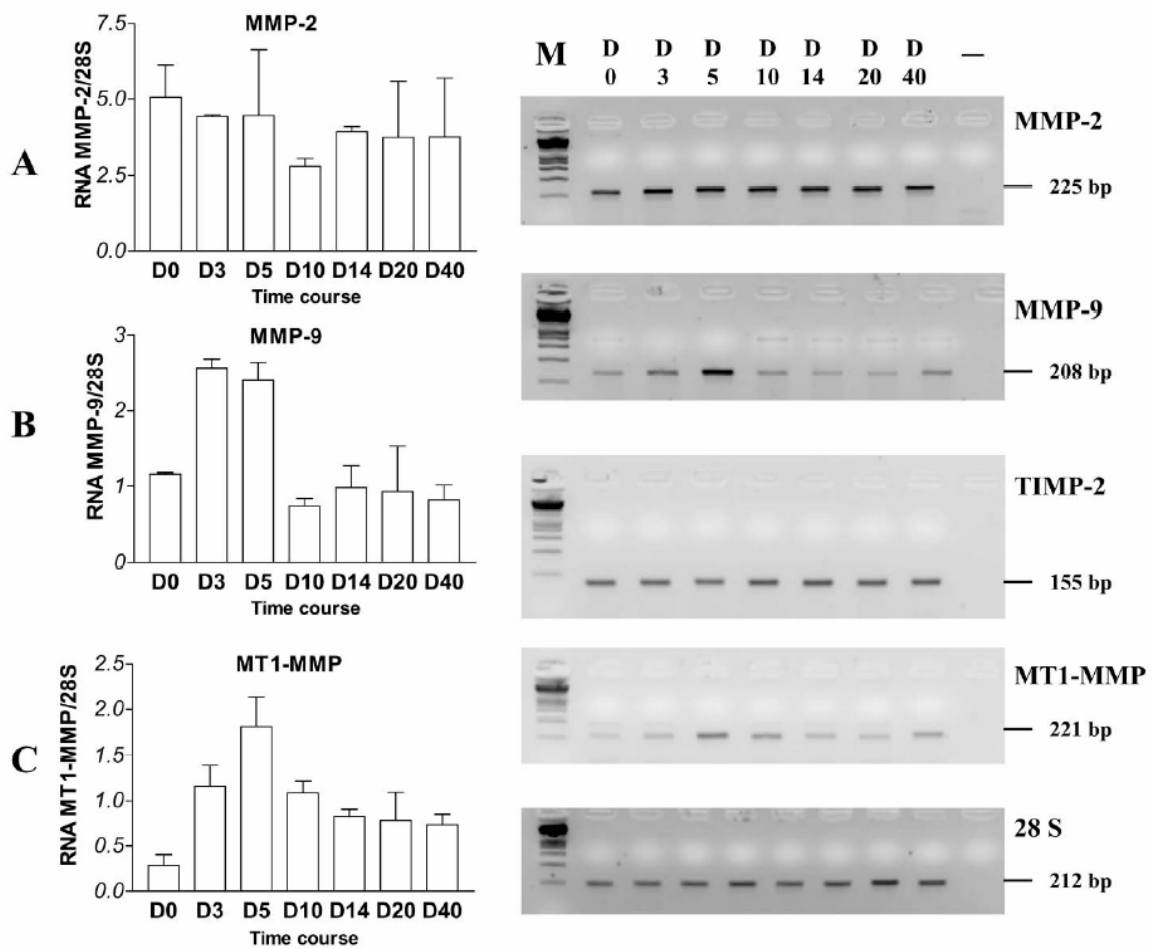


Figure 3. Kinetic evaluation of MMP expression by semiquantitative RT-PCR during the development of experimental CNV. The histograms correspond to the densitometric quantification of MMP-2 (*A*), MMP-9 (*B*), and MT1-MMP (*C*) mRNA normalized to the 28S signal at different endpoints. Evaluation was performed on the entire posterior segment after the induction of multiple wounds to Bruch's membrane. Unlike MMP-2 and TIMP-2 (histogram not shown), which remained relatively constant, MMP-9 and MT1-MMP mRNA expression appeared to be induced during the early phases of CNV development. Representative gels are displayed with RT-PCR products expected size (bp) at right.

Fig. 4

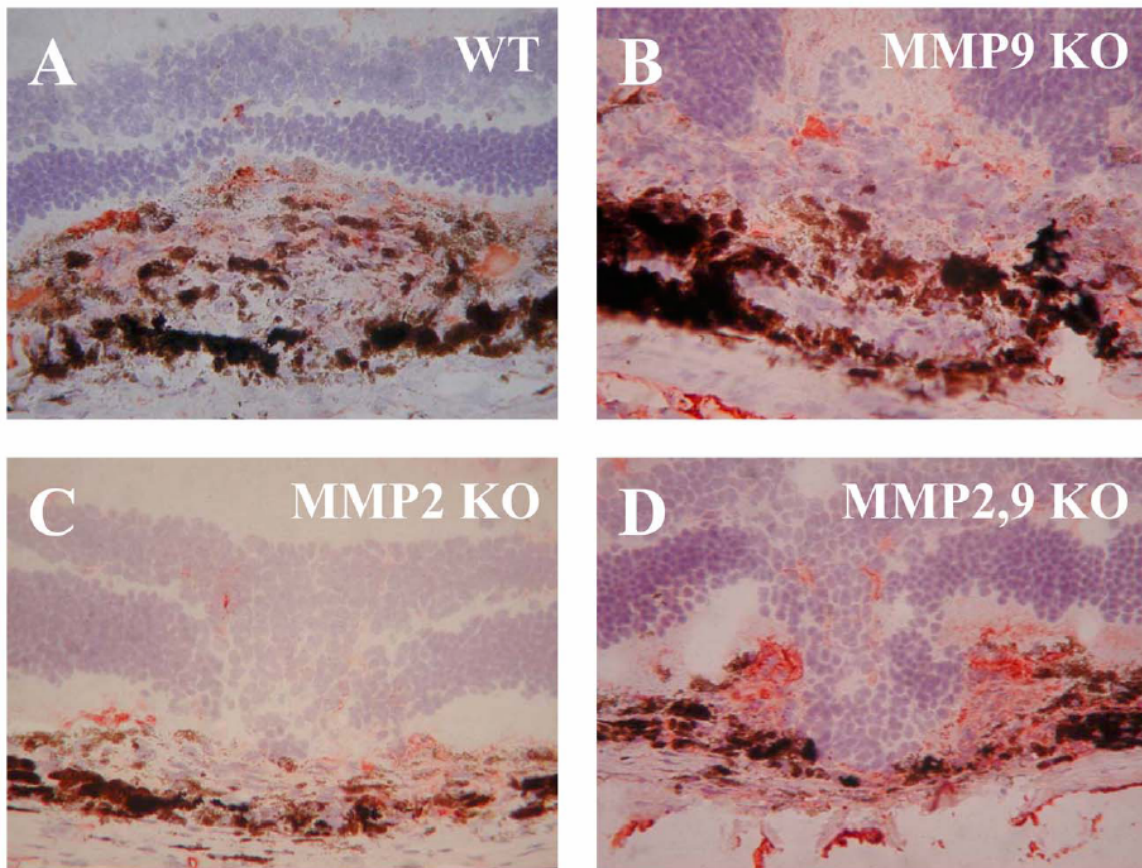


Figure 4. Immunohistochemical staining for fibrinogen/fibrin at the site of laser-induced wound in WT and deficient mice. Frozen ocular sections from wild-type (*A*), MMP-9^{-/-} (*B*), and MMP-2^{-/-} (*C*) mice reveal the presence of limited amount of fibrin (stained in orange with AEC) in WT mice or single MMP gene-deficient mice contrasting with the accumulation of fibrin at the site of restricted choroidal reaction observed in double gene MMP-2,9 deficient animals (*D*). Original magnification = x400.

Fig. 5

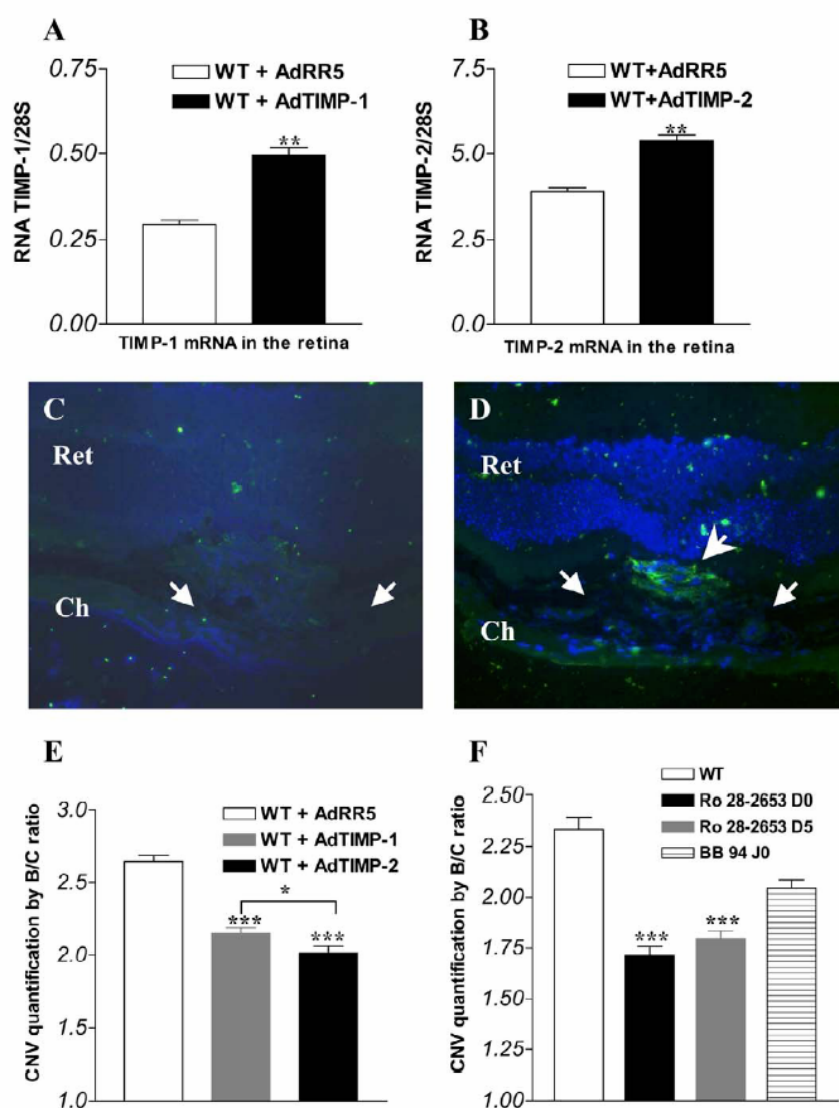


Figure 5. Decreased CNV formation with endogenous or synthetic MMP inhibitors. Systemic injection of adenoviral vectors carrying recombinant human TIMP-1 or TIMP-2 resulted in local overexpression of these MMP inhibitors demonstrated by semiquantitative RT-PCR analysis of injected mice compared with animals injected with control AdRR5 virus (*A-B*). Analysis was performed on posterior ocular segments at day 5 after laser-induced choroidal neovascularization. In situ zymographic evaluation demonstrates a complete inhibition of gelatinolytic activity with AdTIMP-1 transduction, contrasting with signs of residual gelatinolysis with AdTIMP-2 (*C-D*). Evaluation of the choroidal neovascular reaction by B/C ratio calculation showed that both TIMP-1 and TIMP-2 overexpression significantly reduced the pathological reaction. TIMP-2 adenoviral-mediated delivery seemed to be more efficient ($P < 0.05$) than TIMP-1 local overexpression (*E*). Evaluation of pharmacological inhibition of MMPs on choroidal pathological angiogenesis demonstrated that a selective gelatinase and MT1-MMP synthetic inhibitor administered with daily intraperitoneal injections at day 0 or at day 5 after laser induction was much more efficient ($P < 0.001$) than a broad spectrum inhibitor (BB-94) (*F*). The neural retina (ret), and choroidal layer (Ch) are indicated, and the neovascular area is arrowed. *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; error bars = SE. Original magnification = $\times 200$.