

POLYMORPHISME DU VEGF ET RÔLE EN PATHOLOGIE RÉNALE

par

P.E.C. BRENCHLEY, S.A. RALPH et A. SUMMERS*

BIOLOGIE DU VEGF

Le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) a été étudié de manière extensive au cours des 12 dernières années et il est devenu évident que ce facteur joue un rôle clé non seulement dans la vasculogénèse mais aussi dans l'angiogénèse impliquée dans différentes pathologies. Le rôle fondamental du VEGF dans l'initiation et le contrôle de la vasculogénèse, la formation des vaisseaux sanguins durant l'embryogénèse, sont démontrés par l'inactivation spécifique du gène, dont la perte d'un seul allèle est létale chez la souris à E9,5 [1]. L'analyse des cellules embryonnaires différenciées avec un ou deux allèles du VEGF délétés montre que l'expansion et la différenciation des cellules endothéliales sont bloquées durant la vasculogénèse [2]. La surexpression du VEGF de deux ou trois fois son niveau endogène chez des souris transgéniques conduit à des anomalies sévères du développement cardiaque et à la mort à E12,5-E14, démontrant clairement la nécessité d'une régulation très fine de la concentration de VEGF pour un développement normal [3].

Le VEGF a été initialement décrit comme un puissant mitogène des cellules endothéliales [4] et il induit l'angiogénèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux préexistants. Le rôle crucial de VEGF dans la néo-angiogénèse est illustré par les études de modèles tumoraux employant des anticorps neutralisant le VEGF qui préviennent la néo-vascularisation et ainsi inhibent la croissance tumorale et les métastases [5]. Le VEGF est un des plus puissants modulateurs de la perméabilité capillaire (50 000 fois plus actif que l'histamine), comme cela a été mis en évidence par l'injection intradermique de VEGF dans la peau de cochon d'Inde, qui induit une perméabilité capillaire facilement détectable par le test de Miles [6]. En dehors de la peau, d'autres

* Manchester Clinic, Manchester Royal infirmary, Manchester, United-Kingdom.

lits vasculaires répondent au VEGF incluant le péritoine, le mésentère, le diaphragme, le muscle crémastère, les poumons et le cerveau [7-9]. L'injection de VEGF induit rapidement des changements de perméabilité qui sont souvent détectables en quelques minutes. Cet effet est transitoire durant 30 à 60 minutes et de façon importante, il n'induit pas de lésion d'endothélium.

Récemment, le mécanisme par lequel le VEGF augmente la perméabilité capillaire a été élucidé [9]. L'injection intradermique de VEGF humain recombinant augmente la perméabilité non seulement des veinules post-capillaires, comme l'histamine, mais aussi des veinules musculaires et des capillaires. De façon tout à fait intéressante, le VEGF induit en 10 minutes une fenestration de l'endothélium des lits vasculaires qui normalement n'en possèdent pas. En plus de fenestration comportant un seul diaphragme, des canaux transendothéliaux avec des diaphragmes sur le côté luminal et abluminal de la membrane ont été détectés. Cet effet, spécifique du VEGF, non retrouvé avec d'autres inducteurs de perméabilité comme l'histamine, est bloqué par des anticorps anti-VEGF. In vitro, le VEGF augmente à la fois la conductivité hydraulique et la perméabilité à l'albumine dans les cellules endothéliales de l'aorte et des microvaisseaux cultivées en monocouche sur filtres poreux [10]. Le VEGF augmente la perméabilité des monocouches de cellules endothéliales en réduisant l'expression de l'occludine, interrompant son interaction avec ZO-1, conduisant ainsi au désassemblage des jonctions serrées [11].

Le VEGF exerce ses effets biologiques spécifiques sur les cellules endothéliales par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques [12]. Une co-localisation du VEGF marqué à l'iode¹²⁵ et du facteur VIII par immunomarquage a été retrouvée sur l'endothélium des microvaisseaux fenestrés ou non, ainsi que sur l'endothélium des larges vaisseaux. Trois récepteurs du VEGF ont été clonés, Flt-1 ou VEGF récepteur 1 [13], KDR ou VEGF récepteur 2 [14] et plus récemment, la neuropiline, un récepteur spécifique de l'isoforme VEGF₁₆₅ [15]. Des études récentes montrent que Flt-1 et KDR sont les récepteurs de haute affinité pour VEGF.

LE GÈNE VEGF ET SES PRODUITS D'ÉPISSAGE ALTERNATIF

Cinq différents ARNm produits par épissage alternatif ont été identifiés à partir de banques d'ADNc humains. Ces espèces, VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ et VEGF₂₀₆ codent une partie N-terminale identique comportant un signal peptide de 26 acides aminés dont le clivage génère des protéines de 121-145-165-189 et 206 acides aminés. Le gène humain VEGF est organisé en 8 exons [16] ; VEGF₁₂₁ ne comporte pas les exons 6 et 7, VEGF₁₄₅ a perdu l'exon 7, VEGF₁₆₅ a perdu l'exon 6, VEGF₁₈₉ contient les 8 exons et VEGF₂₀₆ a en plus une insertion de 51 paires de bases entre l'exon 6 et l'exon 7. VEGF₁₆₅ (la forme la plus abondante) et VEGF₁₂₁ sont sécrétés et sont des facteurs solubles [17]. VEGF₂₀₆ et VEGF₁₈₉ sont sécrétés mais restent associés à la cellule probablement par l'intermédiaire d'héparane sulfate [18]. Une nouvelle isoforme, VEGF₁₄₈ (qui n'a ni l'exon 6 ni la partie terminale des exons 7 et 8) a été détectée dans 27 p. 100 des glomérules normaux et son rôle reste à déterminer [19]. Récemment, un précurseur de VEGF de 47kD provenant d'un site d'initiation à partir d'un codon CUG (nt 499), a été identifié, mais il ne semble pas avoir les fonctions du VEGF classique [20].

EXPRESSION DU VEGF DANS LE REIN NORMAL

L'ARN messager et la protéine VEGF sont colocalisés dans les cellules glomérulaires épithéliales viscérales et dans les canaux collecteurs du rein humain fœtal (6-24 semaines) et dans le rein adulte par hybridation in situ et immunohistochimie [21]. Par RT-PCR, les ARNm de VEGF₁₈₉, VEGF₁₆₅ et VEGF₁₂₁ sont retrouvés dans le cortex du rein fœtal et adulte. Les ARNm de KDR et Flt-1 sont retrouvés de façon similaire dans l'endothélium glomérulaire et les capillaires péri-tubulaires dans le rein fœtal et adulte. Le récepteur VEGF-R3 a récemment été retrouvé dans les cellules endothéliales glomérulaires [22] et les podocytes [23], ce qui soulève la possibilité d'une boucle de signalisation autocrine. Dans le rein de rat, les isoformes de VEGF présentes dans le cytoplasme des cellules tubulaires semblent se redistribuer au domaine basolatéral de la membrane en réponse à une hypoxie aiguë [24]. Il semble très clairement que la voie du VEGF est importante pour l'ontogenèse rénale et son expression constitutive dans le rein adulte est nécessaire pour sa fonction physiologique. Cependant, les modèles transgéniques de surexpression du VEGF n'ont pas retrouvé d'effet sur la fonction glomérulaire. Dans le rein de rat âgé, l'expression de VEGF est augmentée focalement dans le cortex par rapport au cortex de jeune rat, alors que l'on observe une nette diminution d'expression dans la médullaire externe et interne (aire totale d'expression du VEGF 19,2 p. 100 ± 11,4 p. 100 versus 39,3 p. 100 ± 7,6 p. 100 ; p < 0,05). L'expression du VEGF tubulaire était corrélée dans cette étude avec la densité des capillaires péri-tubulaires (r2 = 0,57 ; p < 0,01) et inversement corrélée avec l'expression tubulaire de l'ostéopontine (r2 = - 0,55 ; p < 0,05) et l'infiltration par des macrophages (r2 = - 0,64 ; p < 0,01) [25].

CONTRÔLE DE L'EXPRESSION DU GÈNE DU VEGF

Le contrôle de la transcription et de la traduction du gène VEGF est complexe. Le gène VEGF a une partie 5' non transcrite, inhabituellement longue de 1 038 pb et riche en nucléotides GC, qui est impliquée dans le contrôle complexe de l'expression du VEGF. Un site d'entrée interne ribosomique (IRES), prédit par les bases de données, a été retrouvé à l'extrémité 3' non transcrite, et a été montré comme étant actif [26]. De plus, un site alternatif d'initiation de la transcription existe 633 bp en aval du site principal d'initiation de la transcription. Une séquence importante de 125 paires de bases dans la région 3'UTR est cruciale pour la stabilité de l'ARNm [27] et participe à la formation de complexes ARN-protéines induits par l'hypoxie, tels que les complexes comprenant la protéine liant l'ARN, HuR [28].

Régions de chromatine accessibles au locus VEGF

L'étude de la chromatine à la recherche de régions d'hypersensibilité à la DNase I dans le gène VEGF a identifié quatre sites différents [29]. Deux de ces sites, centrés en - 550 et + 1 du promoteur, sont exprimés dans tous les types cellulaires. La région autour du site + 1 était attendue, étant donné que des régions d'hypersensibilité à la DNase sont souvent observées au niveau du site d'initiation

de la transcription et cette région contient des éléments régulateurs conservés permettant la fixation des facteurs de transcription SP1 et AP-2. La région autour de -550 (approximativement -450 à -650) n'a pas d'élément régulateur identifié mais est hautement conservée à travers les espèces (homme, souris, rat) et des résultats non publiés indiquent que cette région permet une régulation en cis dans des études utilisant le gène luciférase comme rapporteur. Deux autres sites d'accessibilité à la chromatine ont été retrouvés dans certaines cellules seulement, approximativement 300 pb centrées sur le HRE (approximativement -960) et approximativement 200 bp centrées en +500. Cette dernière région contient un site de fixation pour SP-1 (+521) et est adjacente à l'IRES (approximativement 633). De plus, des résultats non publiés suggèrent que cette région a la capacité d'activer un gène rapporteur en cis.

Régulation par l'hypoxie

L'hypoxie est un puissant stimulant de l'ARNm du VEGF in vitro in vivo [30-32]. La surexpression de VEGF résulte à la fois d'une activité transcriptionnelle et d'une stabilisation très importante de l'ARNm de VEGF qui, normalement, est labile [33-34].

L'induction hypoxique du gène VEGF est médiée en partie par un facteur de transcription hétérodimérique, le facteur de transcription inductible par l'hypoxie HIF-1 (composé de HIF-1 α et HIF-1 β) qui est activé dans les cellules exposées à l'hypoxie ou au cobalt et qui lie une séquence consensus (5'-TACGTGCT-3'), décrite initialement dans la région 3' enhancer du gène de l'érythropoïétine [35]. Les conditions d'hypoxie conduisent à la formation d'un complexe liant l'ADN contenant à la fois HIF-1 α et p300/CBP, des cofacteurs de transcription qui sont ciblés par l'oncoprotéine E1A [36]. L'étude du promoteur du gène VEGF par mutagenèse dirigée montre un site de liaison de HIF-1 (TACGTG) et une séquence accessoire pour HIF-1 (CAGGT) dans la région de réponse à l'hypoxie (HRE) (-985 à -939). Ces régions cis sont nécessaires pour l'activation transcriptionnelle du VEGF par l'hypoxie ou le monoxyde d'azote [37].

En plus de HIF-1 α et HIF-1 β , d'autres facteurs HIF-1 like (HLF's) existent et ont une expression différente selon les tissus [38]. Ainsi, un arrangement complexe de facteurs agissant en cis et en trans semble être nécessaire à l'induction du VEGF par l'hypoxie, impliquant les facteurs de transcription SP1 et AP1 agissant possiblement en coopération avec HIF-1.

Les études de la régulation de la stabilité de l'ARNm du VEGF se sont concentrées sur le rôle de la région 3'UTR de 1,9 kb qui contient plusieurs copies d'une séquence consensus nonamérique d'éléments déstabilisants riches en séquences AU. Cependant, la région 3'UTR de VEGF n'est pas suffisante pour induire l'instabilité d'un ARN messager rapporteur in vivo. L'analyse systématique de l'ARNm de VEGF démontre également des éléments déstabilisants 5'UTR dans la séquence codante et dans la région 3'UTR [40]. Chaque région peut indépendamment induire la dégradation de l'ARNm et elles agissent de manière additive pour induire une dégradation rapide dans des conditions de normoxie. La combinaison de deux régions seulement s'est avérée inefficace pour induire une réponse à l'hypoxie. La présence d'un élément stabilisant dans la région 5'UTR est tout à fait inhabituelle et reste à caractériser.

Une tension basse en oxygène est retrouvée dans les lésions induites par l'ischémie. Dans un modèle de cœur de rat, l'ischémie transitoire induit l'ARNm de VEGF en 30 minutes pour une durée n'excédant pas 3 heures [41]. De plus, l'angiogenèse rétinienne a été attribuée à l'induction de VEGF par l'hypoxie [42]. Dans des reins humains, la réduction du flux sanguin par obstruction vasculaire de manière aiguë ou chronique induit une profonde surexpression de l'ARNm du VEGF, détectée par hybridation in situ dans les tubes proximaux et distaux du cortex et dans la médullaire. La protéine VEGF a été retrouvée dans les cellules tubulaires épithéliales en immunohistochimie. Dans des reins soumis à des conditions de diminution du flux sanguin de façon chronique, la majorité des tubes atrophiés était négative pour le VEGF (ARNm et protéine) alors que les cellules interstitielles exprimaient l'ARNm du VEGF. Dans les artères arquées avec fibrose intimale et adventitielle ainsi que dans certaines cellules musculaires lisses de la media, l'ARNm du VEGF était retrouvé. Dans les glomérules avec sclérose segmentaire, les podocytes viables montraient une expression nette de l'ARNm du VEGF. Les cellules mésangiales n'exprimaient pas VEGF dans ces cas [43].

Contrôle de l'expression du VEGF par les cytokines

Il est établi clairement que le VEGF peut être induit par différentes cytokines/facteurs de croissance dans des conditions pro-inflammatoires. L'IL- β [44], PDGF-BB et TGF- β [31], bFGF [45], peuvent induire l'ARNm de VEGF dans les cellules musculaires lisses. TGF- β peut également stimuler l'induction de VEGF dans les fibroblastes et les cellules épithéliales [46], ce qui peut rendre compte de certaines propriétés pro-angiogéniques du TGF- β [47]. Les cellules glomérulaires mésangiales, proches des cellules musculaires lisses, peuvent produire du VEGF en culture après stimulation par les esters de phorbol et le TGF- β [48]. Nous avons montré que TNF- α , TGF- β et PIGF augmentaient l'expression de VEGF dans les cellules mononuclées du sang [49, 50], ce qui a des implications dans les maladies inflammatoires aiguës et chroniques.

Contrôle de l'expression du VEGF par les œstrogènes

L'œstradiol entraîne une augmentation (8 fois) de l'ARNm du VEGF après deux heures dans l'utérus de rat [51]. Il y a de nombreux arguments expérimentaux indiquant que les œstrogènes et leurs antagonistes (par exemple, le tamoxifène) régulent l'expression du VEGF dans le tissu utérin normal et dans les tumeurs sensibles aux hormones. La co-transfection d'un fragment du promoteur VEGF de 385 pb (-1 580 à -1 175) cloné en amont du gène rapporteur luciférase, avec un vecteur d'expression pour le récepteur alpha des œstrogènes, entraîne une augmentation de 6 fois de l'activité luciférase [52]. L'analyse de la séquence de ce fragment du promoteur révèle la présence d'un élément de réponse aux œstrogènes (ERE) proche de la séquence consensus qui lie les complexes œstradiol-ER ; l'activité de cette séquence est perdue après mutagenèse dirigée. Des éléments fonctionnels ERE ont également été décrits à la fois dans la région 5'UTR et 3'UTR [53]. Les séquences 3' se comportent comme un enhancer traditionnel en présence de ER- α et ER- β , activant la transcription indépendamment de leur orientation. Les séquences 5'UTR, débutant à +406 et différentes de l'élément ERE classique

d'une paire de bases, ont des propriétés uniques. En orientation inverse, cette séquence confère en présence de ER- α une induction par les œstrogènes qui peut être bloquée par le ICI182,780 (anti-œstrogène pur). Dans son orientation naturelle, cet élément réprime la transcription en présence d'œstrogène. Ainsi, en fonction de son orientation, cet élément active ou inhibe la transcription en présence de ER- α et d'œstrogène. L'élément 5' révèle également des propriétés uniques dans des cellules co-transfectées avec ER- β . Dans l'orientation naturelle, cet élément est inerte en présence de ER- β . En orientation inverse, l'œstradiol active la transcription qui n'est plus bloquée par le ICI182,780.

Angiotensine II, endothéline-1 et VEGF

L'identification de l'angiotensine II comme promoteur de l'activité du VEGF est d'un intérêt tout particulier pour les néphrologues [54]. L'angiotensine II active directement la transcription du gène VEGF sans modifier la demi-vie de l'ARNm. Des expériences avec gènes rapporteurs ont identifié un élément de réponse à l'angiotensine II dans la région à -1 180 à -888 [55]. Étant donné que l'angiotensine II augmente aussi l'expression du TGF β , ceci peut représenter un mécanisme indirect d'activation du VEGF par l'Ang II. L'endothéline-1 est également un facteur pro-angiogénique possiblement par un mécanisme VEGF-dépendant [56].

POLYMORPHISME DU GÈNE VEGF

Nous avons été les premiers à décrire des polymorphismes dans le promoteur du VEGF et dans la région 5'UTR [57, 58]. Parmi les 15 SNPs (*single nucleotide polymorphism*) identifiés, nous avons étudié l'association des SNPs en position -460 et +405 (fig. 1) avec le syndrome néphrotique cortico-sensible, des maladies rénales primitives progressives, le rejet chronique d'allogreffe et la pré-éclampsie. D'autres ont identifié des polymorphismes dans la région 3'UTR, dont l'un (936C/T) pourrait être associé avec les concentrations plasmatiques de VEGF [59].

Nous avons démontré que le polymorphisme +405G/C est lié au niveau de production du VEGF en réponse aux endotoxines dans les cellules en culture [58]. Nous avons noté que la production de VEGF en culture en réponse aux ions cobalt (un stimulus hypoxique) varie selon les individus et d'autres ont rapporté des variations individuelles significatives en réponse à l'hypoxie chez les patients ayant une maladie coronarienne [60] ou une rétinopathie diabétique [61]. Nous sommes en train d'étudier l'association de polymorphismes du VEGF avec la néphropathie diabétique et avec la perte d'ultrafiltration chez les patients en dialyse péritonéale ambulatoire.

Polymorphisme du VEGF dans le syndrome néphrotique cortico-sensible

VEGF a des propriétés similaires à celles attribuées au facteur de perméabilité vasculaire supposé jouer un rôle dans la pathogénie du syndrome néphrotique cortico-sensible de l'enfant (SSNS). Cependant, nous avons été incapables de montrer que le VEGF induisait une protéinurie dans un modèle expérimental [62]. Nous

Polymorphismes du VEGF et régions régulatrices

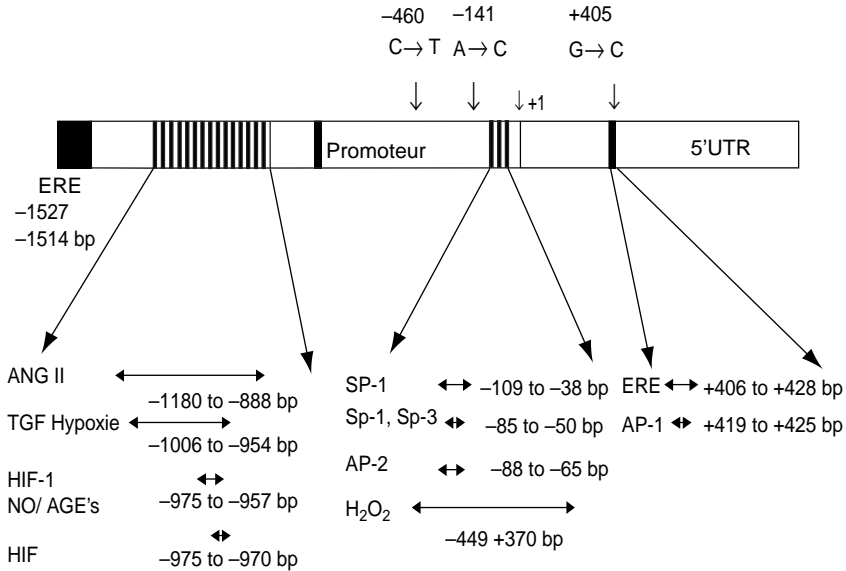


FIG. 1. — Localisation des polymorphismes du VEGF par rapport aux éléments de réponse du promoteur du VEGF.

avons alors entrepris une étude d'association du génotype VEGF avec la susceptibilité au SSNS. Nous avons étudié la fréquence de 3 polymorphismes du VEGF chez 116 enfants atteints de SSNS et 150 sujets contrôles en employant la technique de polymorphisme de fragment de restriction après PCR (PCR-RFLP). Il n'y avait pas d'association significative entre les différents génotypes chez les patients SSNS et les contrôles. Nous en concluons que les polymorphismes en position -460, -141 et +405 du VEGF ne sont pas associés avec une susceptibilité au SSNS.

Polymorphisme du VEGF et progression de l'insuffisance rénale chronique

Selon une hypothèse communément acquise basée sur des modèles expérimentaux, la progression des maladies rénales chroniques, quelle que soit la nature du processus pathologique initial, survient par réduction néphronique [63]. Bien que la réponse des néphrons survivant telle que l'hyperfiltration glomérulaire et l'hypertrophie aient un effet bénéfique temporaire en augmentant la filtration glomérulaire individuelle de chaque néphron, avec le temps, ceci aboutit à la glomérulosclérose et à l'atrophie tubulaire. Ainsi, un processus de perte néphronique en résulte, conduisant à l'insuffisance rénale chronique.

L'hyperpression capillaire glomérulaire (GCH) qui induit l'hyperfiltration adaptative est étroitement liée avec la glomérulosclérose dans des modèles expérimentaux de par l'action de l'angiotensine II et du TGF β 1 [64]. La GCH est maintenue

par des mécanismes dépendant de l'angiotensine opérant à la fois par l'hypertension artérielle systémique et l'hémodynamique locale glomérulaire. L'effet réno-protecteur des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) et des antagonistes des récepteurs de l'angiotensine contrôle la GCH avec un effet bénéfique retardant la progression de l'IRC.

Les mécanismes conduisant aux lésions chroniques tubulo-interstitielles qui sont étroitement corrélées avec la perte de la fonction rénale comportent une augmentation de la production de la matrice extracellulaire sous la dépendance de facteurs de croissance et une atrophie tubulaire secondaire à l'ischémie. La majorité des études se sont concentrées sur la biologie des cellules tubulaires et ont peu exploré le rôle des capillaires péri-tubulaires (PTC) dans ce processus. Dans une étude de reins humains atteints de différentes néphropathies tubulo-interstitielles chroniques, on montrait une perte de 50 p. 100 des PTC et une réduction significative de la taille des PTC (55 p. 100-88 p. 100) en comparaison au rein normal. La densité des capillaires péri-tubulaires est corrélée positivement à la densité et à la taille des tubes proximaux [65]. Alors que dans le rein normal l'expression du VEGF est principalement restreinte aux podocytes, dans les néphropathies tubulo-interstitielles chroniques il y a une augmentation nette d'expression du VEGF dans tous les segments tubulaires des néphrons intacts et hypertrophiques, alors que l'immunomarquage est réduit ou absent dans les glomérules scléreux. Récemment, une corrélation inverse a été retrouvée entre les concentrations urinaires de VEGF et la clairance de la créatinine dans l'insuffisance rénale chronique mais pas dans l'insuffisance rénale aiguë [66]. L'expression urinaire de VEGF semblait indépendante des concentrations plasmatiques, suggérant que le VEGF urinaire était produit par le rein. Ainsi, il semble y avoir un paradoxe entre une augmentation de l'immunomarquage du VEGF tubulaire et des taux urinaires élevés de VEGF alors que l'on observe une diminution des PTC dans les néphropathies tubulo-interstitielles chroniques. Cependant, la diminution de densité des PTC n'est pas toujours associée avec une augmentation de l'expression du VEGF. Dans les reins de rats âgés, en comparaison aux jeunes rats, il y a une réduction similaire des PTC et une diminution nette (50 p. 100) du marquage du VEGF dans la médullaire externe et interne [25].

Les stimuli responsables de l'augmentation de la production du VEGF dans les tubules rénaux des NTIC sont probablement multifactoriels. Clairement, dans les NTIC, l'hypoxie [67], le TGF- β 1 et l'angiotensine II sont de puissants stimulateurs du VEGF et jouent un rôle important dans la progression de ces maladies. Il apparaît cependant paradoxal que l'augmentation de production du VEGF soit incapable de compenser l'atrophie tubulaire et la perte des PTC car le VEGF est un facteur de survie connu pour les cellules épithéliales tubulaires [68] et les cellules endothéliales et un des plus puissants facteurs angiogéniques.

Nous avons étudié l'association de polymorphismes du gène du VEGF avec la progression de maladies rénales dans un groupe de 91 patients ayant une glomérulopathie identifiée par biopsie. Les patients ont été classés comme ayant une maladie progressive si sur une période de 5 ans leur créatinine plasmatique augmentait de 30 p. 100 où si ils atteignaient le stade d'insuffisance rénale terminale. Le groupe des non progresseurs avait une augmentation de la créatinine de – de 30 p. 100 et n'avait pas nécessité le recours à la dialyse ou à la transplantation sur la période de 5 ans. Les deux groupes étaient similaires en terme d'âge, de sex-ratio, et de classification histopathologique de la maladie. Il n'a pas été observé de différence des génotypes du VEGF en –460 ou +405 chez les patients et les 101 contrôles.

Les patients qui avaient une maladie progressive avaient plus fréquemment le génotype – 460CC en comparaison aux patients non progressifs ($p = 0,008$), ce qui se traduisait par une augmentation significative de l'allèle C ($p = 0,009$). Nous avons cherché à confirmer ces résultats en utilisant un groupe différent de 100 patients qui avaient été transplantés dans les deux années précédentes en prédisant que la fréquence du génotype VEGF – 460CC serait augmentée. Cette étude a confirmé l'association de l'allèle C avec la progression de la maladie rénale conduisant à l'IRCT.

VEGF et néphropathie chronique d'allogreffe (CAN)

La néphropathie chronique d'allogreffe est caractérisée sur le plan histologique par un épaississement fibro-intimal vasculaire, l'atrophie tubulaire, la fibrose interstitielle et une glomérulopathie chronique du transplant. Le VEGF est augmenté dans la CAN notamment dans l'interstitium, dans les glomérules focalement scléreux et dans les cellules musculaires lisses des parois artérielles [43] [69].

Dans la CAN, l'hypoxie chronique pourrait rendre compte de l'augmentation de l'expression du VEGF dans les cellules musculaires lisses des larges vaisseaux, dans les podocytes, dans les cellules tubulaires épithéliales et dans les macrophages de l'interstitium [70], ainsi que cela a été observé en immunohistochimie [71]. L'ischémie induit aussi une redistribution du VEGF vers le pôle baso-latéral des tubes dans le cortex de rein de rat [44]. Dans la CAN, l'augmentation d'expression de TGF β -1 seul [71] ou en combinaison avec l'hypoxie, semble être liée à l'induction du VEGF [72]. L'augmentation de l'expression de l'Ang II [73] peut aussi stimuler l'expression du VEGF dans la CAN.

Afin d'étudier le rôle des polymorphismes du VEGF dans la CAN, nous avons étudié 73 patients qui avaient été transplantés entre 1988 et 1999 avec un suivi moyen de 6 ans. Trente-six patients avaient développé une CAN identifiée par la biopsie et 37 patients n'avaient pas développé de signes cliniques de CAN. Il y avait une augmentation significative de la fréquence du génotype CC en – 460 (38,9 p. 100 versus 16,2 p. 100, $p = 0,03$) chez les sujets CAN+ comparés aux sujets CAN– [74].

Durant la CAN, il y a plusieurs stimuli (l'hypoxie, l'angiotensine II et les facteurs de croissance) qui peuvent donc augmenter l'expression du VEGF. Initialement, le VEGF pourrait être bénéfique durant la CAN en augmentant le flux sanguin rénal et en protégeant les cellules endothéliales et tubulaires du greffon. À un stade plus avancé de la maladie cependant, le VEGF pourrait avoir un effet délétère en recrutant les monocytes et en promouvant le développement d'une plaque instable. Cependant, dans la CAN comme dans les glomérulopathies chroniques progressives, l'augmentation du VEGF ne semble pas protéger le rein de la perte des capillaires péritubulaires. Ceci contraste avec les effets bénéfiques du VEGF dans des organes comme le cœur pour lequel le développement et le maintien de vaisseaux collatéraux semblent possibles [75].

Rôle du VEGF dans la pré-éclampsie (PE)

Le VEGF a été étudié de manière extensive dans la PE. Il y a de bons arguments pour attribuer au VEGF un rôle pivot dans la pathogénie de la PE. Les taux sanguins maternels de VEGF sont augmentés dans la PE et ont été rapportés comme

corrélés à la sévérité de la maladie [76-77]. Le VEGF augmente la production de prostacycline dans les cellules endothéliales de façon dose-dépendante, de manière similaire au plasma des femmes atteintes de pré-éclampsie [78]. La source de l'augmentation de la production du VEGF dans la PE reste mystérieuse. Le VEGF est exprimé dans placenta et des études *in vitro* ont montré que les trophoblastes en culture soumis à l'hypoxie produisaient du VEGF [79]. D'autres études ont montré une augmentation de production du NO par les trophoblastes en culture médiés par le récepteur 1 du VEGF [80]. Les vaisseaux résistifs du myomètre ont une réponse réduite à la bradykinine qui pouvait être bloquée avec des anticorps anti-VEGF-R1. D'autres études ont montré que les effets du VEGF sur les vaisseaux résistifs simulaient les effets obtenus avec du plasma de femmes atteintes de pré-éclampsie [81].

Nous avons montré une association significative entre le génotype VEGF + 405 GG et la PE. L'étude du DNA de 85 femmes atteintes de pré-éclampsies, comparées à 98 grossesses normales, a identifié une augmentation significative du génotype GG (52,9 p. 100 versus 36,7 p. 100, $p = 0,028$). Nous sommes en train d'étudier le rôle des œstrogènes dans la modulation différentielle de la production de VEGF en fonction du polymorphisme + 405 qui est situé à côté d'un élément de réponse aux œstrogènes. Ces études génétiques confirment donc l'importance du VEGF dans l'éclampsie.

CONCLUSIONS

Le niveau d'expression du VEGF est critique pour le développement tissulaire normal puisque une production insuffisante ou excessive de VEGF conduit à de sévères malformations vasculaires et à une léthalité embryonnaire. Différentes études convergent pour suggérer que l'expression pathologique du VEGF en réponse à l'hypoxie est variable et est soumise à un contrôle génétique. Nous avons identifié un polymorphisme dans le promoteur du VEGF en position - 460 qui est lié à la progression de l'insuffisance rénale et du rejet chronique. Nous étudions le rôle de ces polymorphismes dans la baisse d'ultrafiltration observée chez les patients en dialyse péritonéale chronique ambulatoire. De façon intéressante, un autre polymorphisme du VEGF en 5'UTR en position + 405 est associé avec la pré-éclampsie. Ce polymorphisme est connu pour contrôler le niveau de production du VEGF en réponse aux endotoxines et est situé à proximité d'un élément de réponse aux œstrogènes. Nous étudions les interfaces possibles entre le contrôle génétique de l'expression du VEGF en réponse à l'hypoxie, l'angiotensine II, les cytokines et les œstrogènes dans le contexte des maladies rénales avec augmentation d'expression du VEGF. Dans le rein, en dépit de l'augmentation d'expression du VEGF qui est censée préserver l'intégrité des cellules tubulaires et des capillaires, on observe de façon générale dans les maladies rénales primitives ou dans le rejet chronique une perte des capillaires péri-tubulaires. La résolution de ce paradoxe apparent devrait conduire à une meilleure compréhension du rôle du VEGF dans le rein normal et pathologique.

Remerciements

Nous remercions très vivements le Pr Bertrand Knebelmann qui a bien voulu se charger de la traduction de ce texte.

BIBLIOGRAPHIE

1. CARMELIET P, FERREIRA V, BREIER G et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 1996, **380**, 435-439.
2. BAUTCH VL, REDICK SD, SCALIA A et al. Characterization of the vasculogenic block in the absence of vascular endothelial growth factor-A. *Blood*, 2000, **95**, 1979-1987.
3. MIQUEROL L, LANGILLE BL, NAGY A. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development*, 2000, **127**, 3941-3946.
4. GOSPODAROWICZ D, ABRAHAM JA, SCHILLING J. Isolation and characterisation of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**, 7311-7315.
5. KIM KJ, LI B, WINER J et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*, 1993, **362**, 841-844.
6. SENGER DR, CONNOLLY DT, VAN DE WATER L et al. Purification and N-terminal amino acid sequence of guinea pig tumour-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res*, 1990, **50**, 1774-1778.
7. SENGER DR, GALLI SS, DVORAK AM et al. Tumour cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 1983, **219**, 983-985.
8. NAGY JA, MASSE EM, HERZBERG KT et al. Pathogenesis of ascites tumor growth : Vascular permeability factor, vascular hyperpermeability, and ascites fluid accumulation. *Cancer Research*, 1995, **55**, 360-368.
9. ROBERTS WG, PALADE GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci*, 1995, **108** (Pt 6), 2369-2379.
10. CHANG YS, MUNN LL, HILLSLEY MV et al. Effect of vascular endothelial growth factor on cultured endothelial cell monolayer transport properties. *Microvasc Res*, 2000, **59**, 265-277.
11. WANG W, DENTLER WL, BORCHARDT RT. VEGF increases BMEC monolayer permeability by affecting occludin expression and tight junction assembly. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, **280**, H434-H440.
12. JAKEMAN LB, WINER J, BENNETT GL et al. Binding sites for VEGF are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest*, 1992, **89**, 244-253.
13. DE VRIES C, ESCOBEDO JA, UENO H et al. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*, 1992, **255**, 989-991.
14. TERMAN BI, DOUGHER-VERMAZEN M, CARRION ME et al. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *J Clin Invest*, 1992, **187**, 1579-1586.
15. SOKER S, TAKASHIMA S, MIAO HQ et al. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, 1998, **92**, 735-745.
16. HOUCK KA, FERRARA N, WINER J et al. The vascular endothelial growth factor family : identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol*, 1991, **5**, 1806-1814.
17. HOUCK KA, LEUNG DW, ROWLAND AM et al. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem*, 1992, **267**, 26031-26037.
18. PARK JE, KELLER GA, FERRARA N. The vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) Isoforms – Differential Deposition into the Subepithelial Extracellular Matrix and Bioactivity of Extracellular Matrix-Bound Vegf. *Mol Biol Cell*, 1993, **4**, 1317-1326.
19. WHITTLE C, GILLESPIE K, HARRISON R et al. Heterogeneous VEGF isoform mRNA and receptor mRNA expression in human glomeruli, and the identification of VEGF148 mRNA, a novel truncated splice variant. *Clin Sci*, 1999, **97**, 303-312.
20. TEE MK, JAFFE RB. A precursor form of vascular endothelial growth factor arises by initiation from an upstream in-frame CUG codon. *Biochem J*, 2001, **359** (Pt 1), 219-226.
21. SIMON M, GRONE HJ, JOHREN O et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in human renal ontogenesis and in adult kidney. *Am J Physiol*, 1995, **37**, F240-F250.
22. PARTANEN TA, AROLA J, SAARISTO A et al. VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. *FASEB J*, 2000, **14**, 2087-2096.
23. HARPER SJ, XING CY, WHITTLE C et al. Expression of neuropilin-1 by human glomerular epithelial cells in vitro and in vivo. *Clin Sci*, 2001, **101**, 439-446.

24. KANELIS J, MUDGE SJ, FRASER S et al. Redistribution of cytoplasmic VEGF to the basolateral aspect of renal tubular cells in ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int*, 2000, **57**, 2445-2456.
25. KANG DH, ANDERSON S, KIM YG et al. Impaired angiogenesis in the aging kidney : vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 in renal disease. *Am J Kidney Dis*, 2001, **37**, 601-611.
26. AKIRI G, NAHARI D, FINKELSTEIN Y et al. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription. *Oncogene*, 1998, **17**, 227-236.
27. CLAFFEY KP, SHIH SC, MULLEN A et al. Identification of a human VPF/VEGF 3' untranslated region mediating hypoxia-induced mRNA stability. *Mol Biol Cell*, 1998, **9**, 469-481.
28. LEVY NS, CHUNG SM, FURNEAUX H et al. Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem*, 1998, **273**, 6417-6423.
29. LIU PQ, REBAR EJ, ZHANG L et al. Regulation of an endogenous locus using a panel of designed zinc finger proteins targeted to accessible chromatin regions. Activation of vascular endothelial growth factor A. *J Biol Chem*, 2001, **276**, 11323-11334.
30. SHWEIKI D, ITIN A, SOFFER D et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 1992, **359**, 843-845.
31. BROGI E, WU TG, NAMIKI A et al. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation*, 1994, **90**, 649-652.
32. GOLDBERG MA, SCHNEIDER TJ. Similarities Between the Oxygen-Sensing Mechanisms Regulating the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Erythropoietin. *J Biol Chem*, 1994, **269**, 4355-4359.
33. IKEDA E, ACHEN MG, BRIER G et al. Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem*, 1995, **270**, 19761-19766.
34. LEVY AP, LEVY NS, WEGNER S et al. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem*, 1995, **270**, 13333-13340.
35. SEMENZA GL, NEJFELT MK, CHI SM et al. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**, 5680-5684.
36. ARANY Z, HUANG LE, ECKNER R et al. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *J Immunol Meth*, 1996, **93**, 12969-12973.
37. KIMURA H, WEISZ A, OGURA T et al. Identification of hypoxia-inducible factor 1 ancillary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide. *J Biol Chem*, 2001, **276**, 2292-2298.
38. EMA M, TAYA S, YOKOTANI N et al. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**, 4273-4278.
39. DAMERT A, IKEDA E, RISAU W. Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-inducible factor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells. *Biochem J*, 1997, **327**, 419-423.
40. DIBBENS JA, MILLER DL, DAMERT A et al. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor mRNA stability requires the cooperation of multiple RNA elements. *Mol Biol Cell*, 1999, **10**, 907-919.
41. HASHIMOTO E, OGITA T, NAKAOKA T et al. Rapid induction of vascular endothelial growth factor expression by transient ischemia in rat heart. *Am J Physiol*, 1994, **36**, H1948-H1954.
42. PEER J, SHWEIKI D, ITIN A et al. Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal cells is a common factor in neovascularizing ocular diseases. *Lab Invest*, 1995, **72**, 638-645.
43. GRONE HJ, SIMON M, GRONE EF. Expression of vascular endothelial growth factor in renal vascular disease and renal allografts. *J Pathol*, 1995, **177**, 259-267.
44. LI J, PERRELLA MA, TSAI JC et al. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 1995, **270**, 308-312.
45. STAVRI GT, ZACHARY IC, BASKERVILLE PA et al. Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells : Synergistic interaction with hypoxia. *Circulation*, 1995, **92**, 11-14.

46. PERTOVAARA L, KAIPAINEN A, MUSTONEN T et al. Vascular Endothelial Growth Factor Is Induced in Response to Transforming Growth Factor-beta in Fibroblastic and Epithelial Cells. *J Biol Chem*, 1994, **269**, 6271-6274.
47. PEPPER MS, VASSALLI JD, ORCI L et al. Biphasic effect of transforming growth factor-beta 1 on in vitro angiogenesis. *Exp Cell Res*, 1993, **204**, 356-363.
48. IJIMA K, YOSHIKAWA N, CONNOLLY DT et al. Human Mesangial Cells and Peripheral Blood Mononuclear Cells Produce Vascular Permeability Factor. *Kidney Int*, 1993, **44**, 959-966.
49. BOTTOMLEY MJ, WEBB NJ, WATSON CJ et al. Peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis spontaneously secrete vascular endothelial growth factor (VEGF) : specific up-regulation by tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in synovial fluid. *J Autoimmun*, 1999, **117**, 171-176.
50. BOTTOMLEY MJ, WEBB NJ, WATSON CJ et al. Placenta growth factor (PIGF) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from mononuclear cells and is co-expressed with VEGF in synovial fluid. *J Autoimmun*, 2000, **119**, 182-188.
51. CULLINAN-BOVE K, KOOS RD. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus : rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. *Endocrinology*, 1993, **133**, 829-837.
52. MUELLER MD, VIGNE JL, MINCHENKO A et al. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**, 10972-10977.
53. HYDER SM, NAWAZ Z, CHIAPPETTA C et al. Identification of functional estrogen response elements in the gene coding for the potent angiogenic factor vascular endothelial growth factor. *Cancer Res*, 2000, **60**, 3183-3190.
54. WILLIAMS B, BAKER AQ, GALLACHER B et al. Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 1995, **25**, 913-917.
55. OTANI A, TAKAGI H, OH H et al. Angiotensin II-stimulated vascular endothelial growth factor expression in bovine retinal pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, **41**, 1192-1199.
56. SALANI D, DI CASTRO V, NICOTRA MR et al. Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma. *Am J Pathol*, 2000, **157**, 1537-1547.
57. WATSON C, WEBB NJ, BOTTOMLEY MJ et al. Polymorphisms in the VEGF gene promoter are not associated with the development of proteinuria in minimal change nephrotic syndrome and focal segmental sclerosis. *J Am Soc Nephrol*, 1998, **9**, 489 A.
58. WATSON CJ, WEBB NJ, BOTTOMLEY MJ et al. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor gene : correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine*, 2000, **12**, 1232-1235.
59. RENNER W, KOTSCHAN S, HOFFMANN C et al. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J Vasc Res*, 2000, **37**, 443-448.
60. SCHULTZ A, LAVIE L, HOCHBERG I et al. Interindividual heterogeneity in the hypoxic regulation of VEGF : significance for the development of the coronary artery collateral circulation. *Circulation*, 1999, **100**, 547-552.
61. MARSH S, NAKHOUL FM, SKORECKI K et al. Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor is markedly decreased in diabetic individuals who do not develop retinopathy. *Diabetes Care*, 2000, **23**, 1375-1380.
62. WEBB NJ, WATSON CJ, ROBERTS IS et al. Circulating vascular endothelial growth factor is not increased during relapses of steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Kidney Int*, 1999, **55**, 1063-1071.
63. BRENNER BM, MEYER TW, HOSTETTER TH. Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease : the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease. *N Engl J Med*, 1982, **307**, 652-659.
64. KETTELER M, NOBLE NA, BORDER WA. Transforming growth factor-beta and angiotensin II : The missing link from glomerular hyperfiltration to glomerulosclerosis. *Annu Rev Physiol*, 1995, **57**, 279-295.

65. CHOI YJ, CHAKRABORTY S, NGUYEN V et al. Peritubular capillary loss is associated with chronic tubulointerstitial injury in human kidney : altered expression of vascular endothelial growth factor. *Hum Pathol*, 2000, **31**, 1491-1497.
66. KITAMOTO Y, MATSUO K, TOMITA K. Different response of urinary excretion of VEGF in patients with chronic and acute renal failure. *Kidney Int*, 2001, **59**, 385-386.
67. EL AWAD B, KREFT B, WOLBER EM et al. Hypoxia and interleukin-1beta stimulate vascular endothelial growth factor production in human proximal tubular cells. *Kidney Int*, 2000, **58**, 43-50.
68. KANELIS J, FRASER S, KATERELOS M. Vascular endothelial growth factor is a survival factor for renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000, **278**, F905-F915.
69. PILMORE HL, ERIS JM, PAINTER DM et al. Vascular endothelial growth factor expression in human chronic renal allograft rejection. *Transplantation*, 1999, **67**, 929-933.
70. TISALA S, HAKKARAINEN M, MAJURI ML et al. Down-Regulation of Monocytic VLA-4 Leads to a Decreased Adhesion to VCAM-1. *FEBS Lett*, 1993, **332**, 19-23.
71. SHIHAB FS, YAMAMOTO T, NAST CC et al. TGF beta and matrix protein expression in acute and chronic rejection of human renal allografts. *J Am Soc Nephrol*, 1995, **6**, 286-294.
72. SANCHEZ-ELSNER T, BOTELLA LM, VELASCO B et al. Synergistic Cooperation between Hypoxia and Transforming Growth Factor-beta Pathways on Human Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression. *J Biol Chem*, 2001, **276**, 38527-38535.
73. AMUCHASTEGUI SC, AZZOLLINI N, MISTER M et al. Chronic allograft nephropathy in the rat is improved by angiotensin II receptor blockade but not by calcium channel antagonism. *J Am Soc Nephrol*, 1998, **9**, 1948-1955.
74. COTTON SA, WILLIAMS S, COUPES BM et al. VEGF -460CC genotype is associated with chronic vascular rejection in renal allografts. *J Am Soc Nephrol*, 2001, **12**, 928A.
75. FREEDMAN SB, ISNER JM. Therapeutic angiogenesis for ischemic cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, **33**, 379-393.
76. BAKER PN, KRASNOW J, ROBERTS JM et al. Elevated serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with preeclampsia. *Obstet Gynecol*, 1995, **86**, 815-821.
77. SHARKEY AM, COOPER JC, BALMFORTH JR et al. Maternal plasma levels of vascular endothelial growth factor in normotensive pregnancies and in pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Eur J Clin Invest*, 1996, **26**, 1182-1185.
78. BROCKELSBY JC, ANTHONY FW, JOHNSON IR et al. The effects of vascular endothelial growth factor on endothelial cells : a potential role in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 2000, **182**, 176-183.
79. TAYLOR CM, STEVENS H, ANTHONY FW et al. Influence of hypoxia on vascular endothelial growth factor and chorionic gonadotrophin production in the trophoblast-derived cell lines : JEG, JAr and BeWo. *Placenta*, 1997, **18**, 451-458.
80. AHMED A, DUNK C, KNISS D et al. Role of VEGF receptor-1 (Flt-1) in mediating calcium-dependent nitric oxide release and limiting DNA synthesis in human trophoblast cells. *Lab Invest*, 1997, **76**, 779-791.
81. BROCKELSBY J, HAYMAN R, AHMED A et al. VEGF via VEGF receptor-1 (Flt-1) mimics preeclamptic plasma in inhibiting uterine blood vessel relaxation in pregnancy : implications in the pathogenesis of preeclampsia. *Lab Invest*, 1999, **79**, 1101-1111.