

2m11.2824. 6

Université de Montréal

**Rôle de l'oligonucléotide antisens ciblant le récepteur  
PDGFR- $\beta$  dans la guérison vasculaire à la suite d'une lésion  
carotidienne chez le rat**

Par

**Caroline H. Boucher**

Département de pharmacologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M. Sc.)  
en pharmacologie

Août 2000

©Caroline H. Boucher, 2000



W  
4  
1558  
2000  
N. 086



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Rôle de l'oligonucléotide antisens ciblant le récepteur  
PDGFR- $\beta$  dans la guérison vasculaire à la suite d'une lésion  
carotidienne chez le rat**

présenté par :

**Caroline H. Boucher**

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Denis DeBlois.....président rapporteur

Dr Martin G. Sirois.....directeur de recherche

Dr Guy Rousseau .....membre du jury

Mémoire accepté le \_\_\_\_\_

## Sommaire

À la suite d'une lésion vasculaire, l'hyperplasie intimale est causée par la migration des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLv) de la média et leur prolifération dans la néointima. L'activation du récepteur « platelet-derived growth factor  $\beta$  » (PDGFR- $\beta$ ) des CMLv agressées serait indispensable à leur migration. Récemment, nous avons démontré qu'une administration périvasculaire soutenue de l'oligonucléotide antisens (AS) complémentaire à l'ARNm du PDGFR- $\beta$  bloquait son expression protéique (>90%) et l'hyperplasie néointimale (60-80%)<sup>235</sup>.

Le but de la présente étude était de vérifier si l'administration endovasculaire en bolus unique de l'AS PDGFR- $\beta$  au site de la lésion préviendrait l'hyperplasie intimale et serait plus approprié à une application clinique.

Lors de notre étude, la carotide de rat a été dénudée de son endothélium par un ballon cathéter et traitée avec l'AS PDGFR- $\beta$  ou une séquence dégénérée (ASD) (200  $\mu$ g/25  $\mu$ L) administré en bolus endovasculaire, lors du clampage de 30 minutes de l'artère. Les animaux ont été sacrifiés à différents temps (0, 3, 7, 14, 28 jours) après l'agression vasculaire. Les carotides furent prélevées pour les études de réactivité vasculaire et pour les colorations histologiques et immunohistochimiques.

Par immunohistochimie, l'expression basale du PDGFR- $\beta$  était faible dans les vaisseaux normaux (E+), mais l'agression vasculaire a induit une surexpression du récepteur à 3 et 7 jours dans la média et à 7 jours dans la néointima des vaisseaux simplement dénudés (E-) et traités avec l'ASD. À 14 et 28 jours, l'expression du récepteur est retournée vers les valeurs basales. Pour tous les temps étudiés, l'AS PDGFR- $\beta$  a réduit de 90% la surexpression du PDGFR- $\beta$  dans la média et de 60 et 50% dans l'intima 7 et 14 jours après la lésion vasculaire.

Lors des analyses morphométriques, l'AS PDGFR- $\beta$  a réduit significativement l'aire de la néointima à 14 et 28 jours suivant la dénudation ainsi que l'hyperplasie intimale de 46 et 58% respectivement, comparativement aux vaisseaux E-. Par ailleurs, l'AS



PDGFR- $\beta$  a diminué de 33 et 49%, respectivement à 14 et 28 jours, le décompte des CMLv présentes dans l'intima. L'immunohistochimie ciblant le « proliferating cell nuclear antigen » (PCNA) a révélé que l'AS PDGFR- $\beta$  n'a pas empêché la prolifération des CMLv dans la média et la néointima pour tous les temps étudiés.

La guérison vasculaire a ensuite été analysée par immunohistochimie ciblant la protéine « endothelial cell constitutive nitric oxide synthase » (ecNOS). La couverture endothéliale était presque complète pour les carotides E+, mais absente après la dénudation par ballon. Le retour des cellules endothéliales s'est fait graduellement dans le temps pour atteindre près de 25% après 28 jours, dans les vaisseaux E- et traités avec l'ASD. L'AS PDGFR- $\beta$  a presque doublé le taux de réendothélialisation à chaque temps étudié pour atteindre près de 50% à 28 jours.

Enfin, la contraction des carotides en bains tissulaires a été induite par la phényléphrine, puis leur relaxation a été testée par l'ajout croissant d'acétylcholine (ACh). Les vaisseaux E+ ont relaxé complètement à l'ACh, tandis que les carotides E- Jour 0 ne relaxaient pas du tout de façon endothélium dépendante. Au jour 14, les vaisseaux E- et ASD ont relaxé de 15%, tandis que les carotides traitées avec l'AS PDGFR- $\beta$  relaxaient deux fois plus. Cette tendance est encore plus marquée à 28 jours, car ces vaisseaux ont relaxé de 87%, comparativement à 24 et 36% pour les deux autres groupes. De plus, la concentration d'ACh donnant 50% de la relaxation maximale (EC<sub>50</sub>), est 5 fois plus faible pour les vaisseaux traités avec l'AS PDGFR- $\beta$  comparativement aux vaisseaux dénudés ou ceux ayant reçu la séquence dégénérée.

En conclusion, un traitement endovasculaire en bolus avec l'AS PDGFR- $\beta$  dans les carotides dénudées de rats a non seulement réduit l'hyperplasie intimale via l'inhibition de la migration des CMLv de la média, mais a également favorisé la réendothélialisation et la récupération des fonctions vasculaires. Ceci ouvre la voie à une nouvelle thérapie pour prévenir la resténose.

**Mots clés :** angioplastie, endothélium, hyperplasie intimale, oligonucléotide antisens, CMLv, PDGF-BB, PDGFR- $\beta$ .

## Table des matières

Sommaire.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xiii
1 Introduction.....	1
1.1 Physiologie vasculaire normale.....	2
1.1.1 Intima.....	2
1.1.2 Média.....	3
1.1.3 Adventice.....	4
1.1.4 Plaquettes sanguines.....	4
1.2 Établissement de la sténose vasculaire.....	4
1.2.1 Développement de l'athérosclérose.....	5
1.2.2 Facteur de croissance dérivé des plaquettes et son récepteur.....	9
1.2.3 Transmission du signal dans les cellules musculaires lisses vasculaires.....	13
1.3 Resténose.....	24
1.3.1 Importance clinique.....	24

1.3.2	Théories sur la pathophysiologie de la resténose humaine.....	25
1.3.3	Modèles d'étude de la resténose .....	28
1.3.4	Expression du facteur de croissance dérivé des plaquettes et de son récepteur dans les lésions vasculaires .....	32
1.3.5	Réendothélialisation.....	33
1.4	Approches utilisées pour réduire la resténose.....	34
1.5	Thérapie génique.....	40
1.5.1	Transfert de gènes .....	40
1.5.2	Régulation à la baisse de gènes par oligonucléotide antisens.....	40
1.6	Approches thérapeutiques pour prévenir la resténose ciblant plus spécifiquement les facteurs plaquettaires ou leurs récepteurs .....	48
1.6.1	Induction d'une thrombocytopénie.....	48
1.6.2	Trapidil.....	49
1.6.3	Anticorps contre le facteur de croissance dérivé des plaquettes ou son récepteur .....	50
1.6.4	Inhibiteurs de la phosphorylation du récepteur au facteur de croissance dérivé des plaquettes.....	52
1.6.5	Tranilast.....	54
1.6.6	Oligonucléotides antisens contre le récepteur $\beta$ du facteur de croissance dérivé des plaquettes.....	56
1.7	Rationnelle de la présente étude.....	57
2	Matériel et méthodes.....	58

2.1	Procédure chirurgicale .....	58
2.2	Analyse morphométrique.....	59
2.3	Étude de la réactivité vasculaire en bains tissulaires .....	62
2.4	Immunohistochimie.....	64
2.5	Analyse statistique .....	66
3	Résultats .....	66
3.1	Expression protéique du récepteur $\beta$ du facteur de croissance dérivé des plaquettes .....	66
3.2	Effet sur l'hyperplasie intinale d'un bolus endovasculaire de l'antisens contre le récepteur $\beta$ du facteur de croissance dérivé des plaquettes.....	70
3.3	Décompte des cellules musculaires lisses vasculaires.....	74
3.4	État de prolifération des cellules musculaires lisses.....	77
3.5	Réendothélialisation vasculaire.....	80
3.6	Réactivité vasculaire des carotides ex vivo.....	83
4	Discussion .....	87
5	Conclusion.....	92
6	Références.....	93
7	Annexe : Bolus endovascular PDGFR- $\beta$ antisense treatment suppressed intimal hyperplasia in a rat carotid injury model.....	xiv

## Liste des tableaux

Tableau I: Agents antiplaquettaires et antithrombotiques n'ayant pas réduit la resténose lors des études cliniques .....	36
Tableau II: Autres approches pharmacologiques n'ayant pas réduit la resténose lors des études cliniques .....	37
Tableau III: Approches pharmacologiques bénéfiques dans la réduction de la resténose clinique .....	38
Tableau IV: Approches pharmacologiques prometteuses chez l'animal, mais non testées cliniquement.....	39
Tableau V: Résumé des paramètres mesurés lors des expériences de réactivité des carotides de rat ex vivo. ....	86

## Liste des figures

Figure 1: Physiologie vasculaire normale. ....	3
Figure 2: Formation des stries graisseuses dans l'athérosclérose. ....	6
Figure 3: Formation d'une lésion avancée dans l'athérosclérose.....	8
Figure 4: Plaque fibreuse instable dans l'athérosclérose.....	9
Figure 5 : Liaisons possibles entre le PDGF-A ou B et le PDGFR- $\alpha$ ou $\beta$ .....	12
Figure 6 : Voies de signalisation menant à la prolifération ou la migration cellulaire et cycle cellulaire. ....	14
Figure 7: Mécanisme d'action des oligonucléotides antisens au niveau cellulaire. ....	41
Figure 8: Structure des oligonucléotides antisens. ....	44
Figure 9: Procédure de dénudation endothéliale par cathéter ballon. ....	60
Figure 10: Résumé de la procédure expérimentale. ....	61
Figure 11: Réactivité vasculaire en bains tissulaires.....	63
Figure 12: Principe de l'immunohistochimie.....	65
Figure 13: Expression du récepteur $\beta$ du facteur de croissance dérivé des plaquettes au jour 7 suivant la lésion vasculaire. ....	68
Figure 14: Expression relative du récepteur $\beta$ du facteur de croissance dérivé des plaquettes par les cellules musculaires lisses vasculaires. ....	69
Figure 15: Morphologie des vaisseaux colorés au Trichrome de Masson. ....	71

Figure 16 : Effet de l'antisens contre le récepteur $\beta$ du facteur de croissance dérivé des plaquettes sur le développement de l'hyperplasie intinale.....	73
Figure 17 : Décompte des cellules musculaires lisses vasculaires.....	76
Figure 18 : Expression de l'antigène nucléaire des cellules en prolifération au jour 7 suivant la lésion vasculaire. ....	78
Figure 19: Expression relative de l'antigène nucléaire des cellules en prolifération par les cellules musculaires lisses vasculaires.....	79
Figure 20: Expression par les cellules endothéliales de l'enzyme synthétisant l'oxyde nitrique de façon constitutive.....	81
Figure 21: Quantification de la guérison vasculaire dans le temps.....	82
Figure 22: Effets de l'antisens contre le récepteur $\beta$ du facteur de croissance dérivé des plaquettes sur les fonctions vasculaires.....	85

## Liste des abréviations

ACh : Acétylcholine

AII : Angiotensine II

AS : Oligonucléotide antisens

ASD : Oligonucléotide antisens de séquence dégénérée

ASP : Oligonucléotide antisens phosphorothioate

BrdU : Bromodésoxyuridine

CaI : Calcium ionophore A23187

cdk : « Cyclin dependant kinase »

CE : Cellules endothéliales

CMLv : Cellules musculaires lisses vasculaires

E- : Vaisseau dénudé de son endothélium

E+ : Vaisseau intact avec son endothélium

EC<sub>50</sub>: Concentration d'acétylcholine produisant 50% de la relaxation maximale

ecNOS : « Endothelial cell constitutive nitric oxide synthase »

EGF: « Epidermal growth factor »

FBS : « Fetal bovine serum »

IECA : Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine

IGF-1: « Insuline like growth factor »



LEI : Lame élastique interne

LEE : Lame élastique externe

MEC : Matrice extracellulaire

MMP : « Matrix metalloproteases »

NO : Monoxyde d'azote

NS : Non-significatif

PCNA : « Proliferating cell nuclear antigen »

PDGF : « Platelet-derived growth factor »

PDGFR- $\alpha$  ou- $\beta$  : « Platelet-derived growth factor receptor  $\alpha/\beta$  »

PE : Phényléphrine

PGI<sub>2</sub> : Prostacycline

PTCA : « Percutaneous transluminal coronary angioplasty »

SNP : « Sodium nitroprussiate »

TGF- $\beta$  : « Transforming growth factor  $\beta$  »

TNF- $\alpha$  : « Tumor necrosis factor  $\alpha$  »

TxA<sub>2</sub> : Thromboxane A<sub>2</sub>

VEGF : « Vascular endothelial growth factor »

vWF : « von Willebrand factor »

## Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement :

- mon directeur de recherche, le Dr Martin G. Sirois, pour avoir accepté de superviser mon projet et pour m'avoir accueillie dans son laboratoire; pour l'encadrement, les conseils et l'encouragement lors de mes travaux de maîtrise et la rédaction de cet ouvrage,
- mon partenaire dans ce projet de recherche, le Dr Nicolas Noiseux, résident en chirurgie cardiovasculaire, avec qui j'ai réalisé les expériences menant aux résultats présentés ici et sans qui ce projet n'aurait pu se conclure aussi rapidement,
- mes amis et collègues de travail, pour l'amitié, les conseils et le support de chaque instant,
- mes parents, pour leur amour, leur support moral et financier, mais surtout pour m'avoir encouragée à persévérer dans mes choix et à rechercher le travail bien fait,
- mon époux et fidèle conseiller, pour sa précieuse aide informatique, son soutien indéfectible, sa patience, son attention et son amour,
- le FCAR-FRSQ et la Fondation Desjardins pour leur soutien financier.

# 1 Introduction

Dans les sociétés industrialisées, la principale cause de décès chez les adultes demeure les maladies cardiovasculaires <sup>33</sup>. La maladie athérosclérotique entraîne plusieurs symptômes d'ischémie cardiaque et périphérique. Elle nécessite des procédures de revascularisation par angioplastie ou par pontage afin de rétablir un flux sanguin adéquat. Dans les mois suivant une angioplastie, 30 à 50% des patients souffrent de resténose et voient leurs symptômes réapparaître. Depuis 20 ans, les techniques de revascularisation se sont améliorées et plusieurs approches pharmacologiques ont tenté de prévenir la resténose, notamment en ciblant la cascade de la coagulation, mais aussi la prolifération excessive des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLv). Aujourd'hui, ce domaine de recherche est des plus actifs car très peu d'agents s'avèrent efficaces.

La thérapie génique est une approche récente qui est utilisée dans notre laboratoire pour empêcher la surexpression par les CMLv du PDGFR- $\beta$ , soit le récepteur pour le « platelet-derived growth factor B » (PDGF-B), un facteur de croissance relâché par les plaquettes activées à la suite d'une lésion vasculaire. L'activation de ce récepteur semble indispensable à la migration des CMLv de la média vers l'intima du vaisseau, une étape cruciale dans le développement de l'hyperplasie intimale qui mène à la resténose. Récemment, nous avons démontré qu'une administration périvasculaire soutenue d'un oligonucléotide antisens (AS) complémentaire à l'ARNm du PDGFR- $\beta$  abolissait complètement l'expression protéique de ce récepteur et réduisait l'hyperplasie intimale de 60 à 80%, dans un modèle de carotide de rat dénudée par ballon <sup>235</sup>.

Le but de mon projet de maîtrise était de vérifier si l'administration endovasculaire en bolus unique de l'AS PDGFR- $\beta$  au site de la lésion suffirait à prévenir l'hyperplasie intimale dans ce modèle. Si tel était le cas, cette approche serait plus applicable au contexte clinique et proposerait une nouvelle façon de prévenir la resténose postangioplastie. Ce mémoire résume les travaux qui ont été réalisés dans le cadre de ma

maîtrise et qui seront publiés en septembre 2000 dans la revue *Circulation*. L'épreuve de cet article se trouve en annexe.

## 1.1 Physiologie vasculaire normale

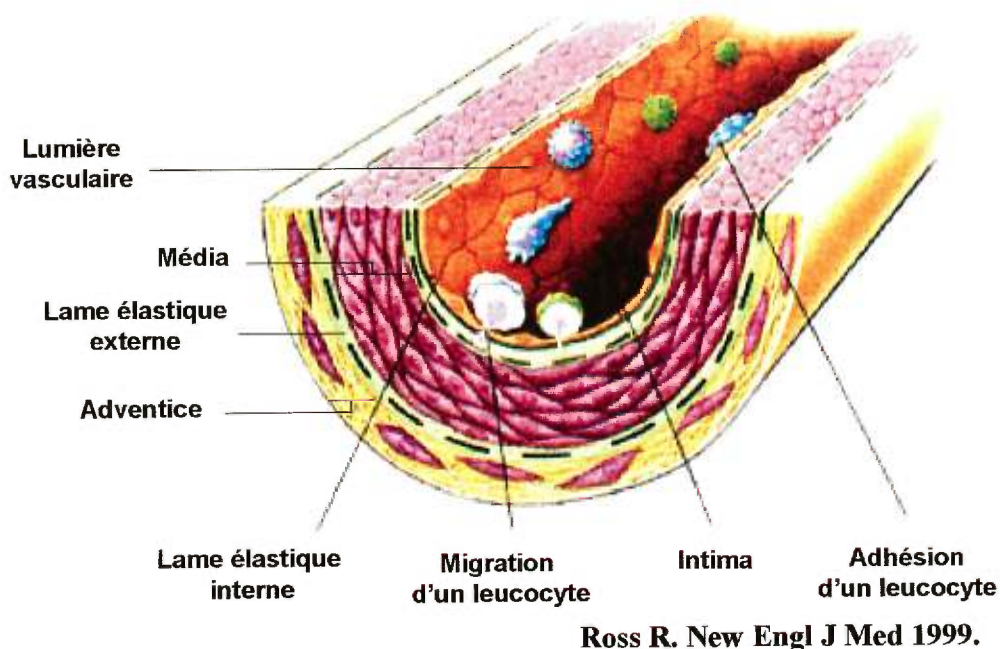
### 1.1.1 Intima

L'intima est la couche interne de la paroi vasculaire et elle est bordée par la lumière vasculaire vers l'intérieur et par la lame élastique interne (LEI) vers l'extérieur (Figure 1). L'intima est composée de cellules endothéliales (CE) et chez l'humain, le porc et certaines autres espèces animales, d'une zone subendothéliale contenant quelques CMLv et de rares macrophages<sup>64</sup>. Les CE d'une artère normale forment une monocouche de cellules pavimenteuses, orientées parallèlement à la direction du flot sanguin. Les caractéristiques du flot et des forces de cisaillement modifient la forme des CE en réarrangeant leur cytosquelette<sup>64</sup>. Les CE ont une grande durée de vie, soit entre 2 000 et 10 000 jours, sauf en conditions pathologiques où elles sont remplacées rapidement (quelques jours). La perméabilité de l'endothélium représente la facilité qu'ont les macromolécules plasmatiques à quitter la circulation pour pénétrer dans les tissus<sup>64</sup>. L'endothélium joue un rôle essentiel dans la régulation vasculaire normale, dans la réparation de la paroi artérielle à la suite d'une lésion et dans la pathogenèse de différentes maladies<sup>64</sup>. Très actives métaboliquement, les CE synthétisent la matrice extracellulaire (MEC) constituée de collagène, d'élastine, de fibronectine et de vitronectine, ainsi que les constituants de la membrane basale supportant l'endothélium, soit le collagène de type IV et V, la laminine et les protéoglycans<sup>123</sup>. Les CE synthétisent aussi des molécules d'adhésion comme la E-sélectine, la P-sélectine et le facteur von Willebrand (vWF), qui modulent l'interaction avec les composantes de la MEC, les leucocytes et les plaquettes (Figure 1).

Les CE interviennent aussi dans la transmission du signal vers les CMLv de la paroi vasculaire<sup>64</sup>. L'endothélium normal module le tonus vasculaire via la sécrétion paracrine de substances vasoactives régulant l'état de contraction des CMLv telles que l'endothéline, la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et le monoxyde d'azote (NO)<sup>238, 185, 218</sup>. Les variations du tonus vasculaire permettent de maintenir une force de cisaillement stable

sur l'endothélium lorsque le flot sanguin varie, ce qui préserve l'intégrité endothéliale

262



**Figure 1: Physiologie vasculaire normale.**

L'endothélium possède plusieurs caractéristiques empêchant la coagulation du sang dans les vaisseaux normaux. Tout d'abord, sa surface lisse prévient l'activation par contact de la voie intrinsèque de la coagulation. La couche de mucopolysaccharides couvrant l'endothélium prévient la liaison des plaquettes et des différents facteurs de coagulation<sup>99</sup>. De plus, la membrane endothéliale est liée à la protéine thrombomoduline qui a la propriété de s'attacher à la thrombine circulante afin de ralentir le processus de coagulation<sup>99</sup>. L'endothélium est aussi une barrière naturelle séparant les éléments sanguins de la matrice sous-endothéliale thrombogénique<sup>64</sup>.

### 1.1.2 Média

La média est la couche musculaire des vaisseaux sanguins, bordée par la LEI du côté de l'intima et par la lame élastique externe (LEE) du côté de l'adventice (Figure 1). La média est constituée principalement de CMLv orientées en spirale par rapport au flot sanguin, de collagène de type I et III, de fibres élastiques et de MEC riche en protéoglycans<sup>64</sup>. La couche médiale joue un rôle dans le maintien de l'intégrité et du

tonus vasculaire de la paroi, par la sécrétion de substances modulant l'activité des CE. Les CMLv participent aussi par leurs sécrétions à la fabrication de la MEC. À la suite d'une lésion endothéliale, les CMLv changent de phénotype, migrent et prolifèrent dans l'intima.

### **1.1.3 Adventice**

L'adventice est une couche conjonctive située à l'extérieur de la LEE, composée de fibroblastes sécrétant du collagène et des fibres élastiques, de fibres nerveuses et de petits vaisseaux nourrissant la paroi vasculaire (vasa vasorum).

### **1.1.4 Plaquettes sanguines**

Les plaquettes sont des fragments anucléés des mégacaryocytes retrouvés dans la moelle osseuse. Leur principale fonction est d'activer le mécanisme de coagulation du sang par la libération de nombreux médiateurs dont l'adénosine diphosphate, les isoformes du PDGF et le thromboxane A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>)<sup>99</sup>. La durée de vie des plaquettes est d'environ 10 jours et elles sont éliminées principalement par les macrophages. L'hémostase est le processus qui permet d'éviter la perte de sang à la suite d'une lésion vasculaire et comprend les étapes suivantes : 1) spasme vasculaire occasionnant une vasoconstriction du vaisseau lésé; 2) activation et agrégation des plaquettes; 3) formation d'un caillot sanguin; 4) organisation fibreuse puis dissolution du caillot sanguin. L'étape d'activation et d'agrégation plaquettaire comprend la relâche de granules- $\alpha$  contenant des facteurs actifs (« insuline like growth factor » (IGF-1), « epidermal growth factor » (EGF), « transforming growth factor  $\beta$  » (TGF- $\beta$ ) et PDGF), l'adhésion au collagène de la paroi vasculaire, la sécrétion d'adénosine diphosphate et de TxA<sub>2</sub>, ainsi que l'activation et l'agrégation des plaquettes voisines<sup>99</sup>.

<sup>15</sup>.

## **1.2 Établissement de la sténose vasculaire**

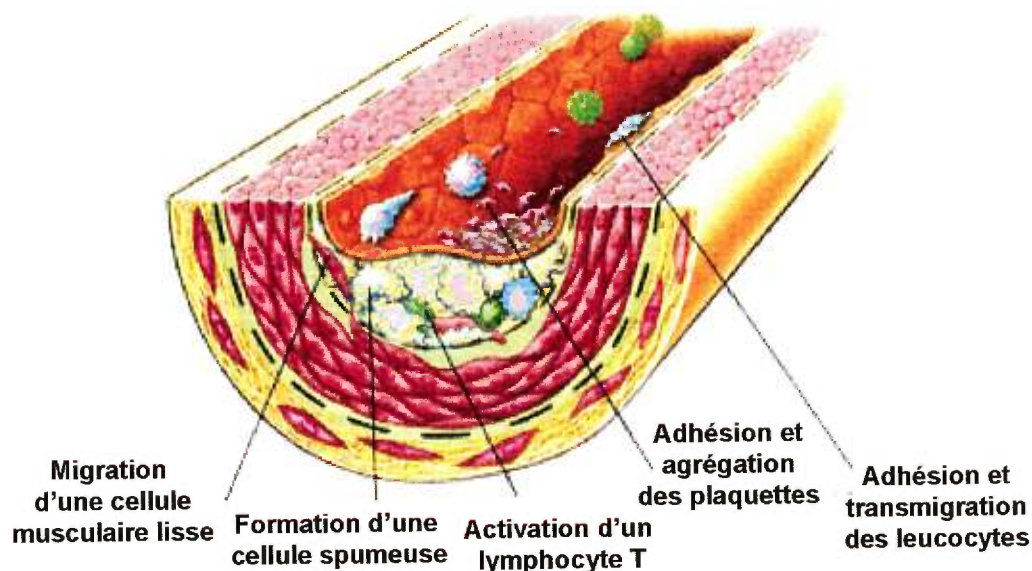
La sténose vasculaire est le résultat de plusieurs processus menant à l'obstruction partielle ou complète d'un vaisseau sanguin et entraîne des symptômes ischémiques importants. La principale cause de sténose vasculaire est l'athérosclérose<sup>99</sup>.

### 1.2.1 Développement de l'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire complexe et chronique des grandes et moyennes artères élastiques et musculaires <sup>217</sup>. Des plaques athéromateuses (lésions lipidiques) se forment sur la surface interne des artères, surtout aux embranchements, courbes et bifurcations et peuvent occasionner de l'ischémie cardiaque, cérébrale ou périphérique <sup>217</sup>. La perte d'intégrité fonctionnelle et structurelle de l'endothélium jouerait un rôle important dans l'athérogenèse et serait en partie causée par les macrophages présents dans l'intima <sup>64</sup>. La capacité des CE à réparer les sites dénudés s'avère très importante pour prévenir la formation de la plaque athérosclérotique. Les filaments d'actine et les microtubules composant le cytosquelette cellulaire, par leur capacité à se réorganiser rapidement, semblent jouer un rôle important dans la récupération de l'intégrité endothéliale à la suite d'une lésion <sup>64</sup>.

Les stries graisseuses sont considérées comme des précurseurs des plaques athéromateuses et elle seraient présentes chez tous les enfants, indépendamment du sexe, du groupe ethnique, de la géographie ou de l'environnement <sup>64</sup>. Les stries graisseuses sont des lésions inflammatoires renfermant des lymphocytes T, des macrophages, des fibres élastiques, du collagène, des protéoglycans et des CMLv étirées contenant des gouttelettes lipidiques (Figure 2) <sup>93</sup>. L'étendue des surfaces artérielles couvertes par les stries graisseuses augmente avec l'âge jusque dans la trentaine, puis ces stries sont remplacées par des plaques athéromateuses plus complexes <sup>93</sup>.





Ross R. New Engl J Med 1999.

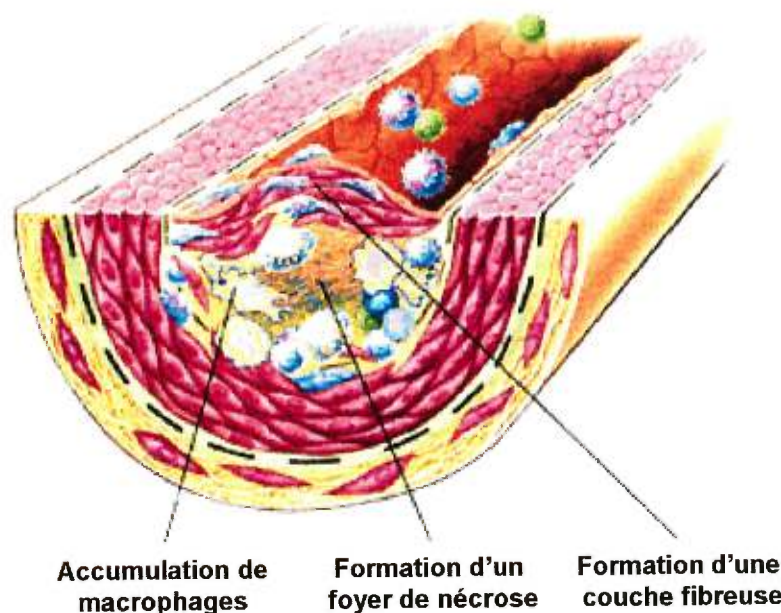
**Figure 2: Formation des stries graisseuses dans l'athérosclérose.**

Par ailleurs, les embranchements et les courbes des vaisseaux occasionnent des forces de cisaillement plus faibles et une turbulence plus grande <sup>217</sup>. Ces modifications caractéristiques du flot sanguin peuvent augmenter l'expression de gènes par l'endothélium, notamment ICAM-1, PDGF-B et le facteur tissulaire <sup>194, 162, 186</sup>. À ces endroits, l'endothélium lésé exprime des molécules d'adhésion pour les monocytes et les lymphocytes T comme la E- et P-sélectine et les immunoglobulines ICAM-1 et 2, VCAM et PECAM <sup>217</sup>. Ces molécules, en se liant à leurs ligands (les  $\beta_2$  intégrines MAC-1, LFA-1, P150, PSGL-1 et la L-sélectine) sur les leucocytes activés, permettront le roulement, l'adhésion et la transmigration des monocytes et des lymphocytes T dans l'espace sous-endothélial, occasionnant par le fait même, une perte de l'intégrité endothéliale (Figure 2) <sup>217</sup>. L'endothélium devient également moins thromborésistant et sa perméabilité augmente. L'adhésion et l'agrégation des plaquettes pour former un thrombus mural sont des phénomènes ubiquitaires dans l'initiation et la génération des lésions athérosclérotiques chez l'humain et l'animal <sup>217</sup>. Les plaquettes sont stimulées par les intégrines, la fibrine, le TxA<sub>2</sub> et le facteur tissulaire et elles peuvent adhérer à l'endothélium dysfonctionnel, au collagène exposé et aux macrophages <sup>217</sup>.



De plus, des molécules associées à la migration des leucocytes comme PECAM agissent conjointement avec des molécules chémoattractantes générées par l'endothélium, les CMLv et les monocytes comme le « monocyte chemotactic protein 1 », l'ostéopontine et les LDL modifiés, pour attirer les monocytes et les lymphocytes T dans la paroi artérielle<sup>191, 87, 210</sup>. Les monocytes ayant transmigré se transformeront en macrophages résidents de la paroi vasculaire, actifs dans la phagocytose et le métabolisme des lipides plasmatiques. Avec le temps et l'accumulation de cristaux de cholestérol, ils deviennent des cellules spumeuses remplies de gouttelettes de lipides (Figure 2)<sup>161</sup>. Les macrophages et les CMLv des lésions athérosclérotiques expriment à leur surface membranaire des antigènes d'histocompatibilité de classe II qui leur permettent de présenter des antigènes aux lymphocytes T pour les activer, notamment des fragments de LDL oxydés<sup>217, 244</sup>.

Les cellules spumeuses sécrètent des cytokines, comme les interleukines, le « tumor necrosis factor alpha » (TNF- $\alpha$ ) et le TGF- $\beta$ , des facteurs de croissance comme le « macrophage colony stimulating factor », le PDGF et l'IGF-1, des enzymes protéolytiques comme les métalloprotéinases de la matrice (MMP), et des chémokines<sup>217</sup>. L'entrée, la survie et la réplication des leucocytes mononucléés dans la plaque athérosclérotique dépend de la présence de facteurs comme le « macrophage colony stimulating factor » et le « granulocyte-macrophage colony-stimulating factor » pour les macrophages, l'interleukine-2 pour les lymphocytes<sup>217</sup>. Si la réponse inflammatoire initiale ne permet pas de neutraliser les LDL modifiés irritants pour l'endothélium et les CMLv, elle continuera indéfiniment<sup>217</sup>. Les médiateurs inflammatoires favoriseront le recrutement des leucocytes ainsi que la prolifération et la migration des CMLv qui infiltreront les régions d'inflammation et formeront une lésion intermédiaire (Figure 2)<sup>161, 217</sup>. Si cette réponse se poursuit, la paroi vasculaire s'épaissit et l'artère essaie de préserver le diamètre de la lumière vasculaire en se dilatant, phénomène appelé remodelage positif<sup>90</sup>.



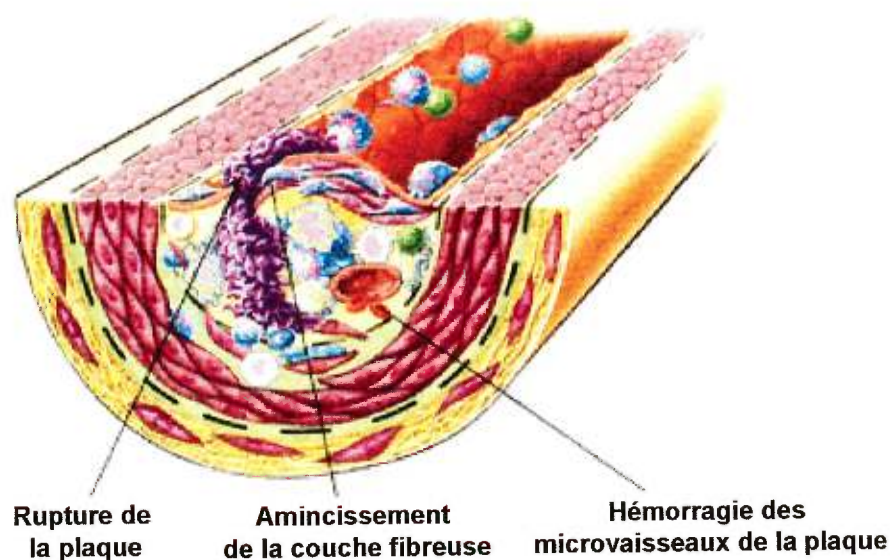
Ross R. *New Engl J Med* 1999.

**Figure 3: Formation d'une lésion avancée dans l'athérosclérose.**

Dans la média des artères, la MEC est principalement constituée de fibres organisées de collagène tandis que dans les plaques athérosclérotiques, on retrouve surtout des fibrilles de collagènes éparpillées parmi les protéoglycans <sup>217</sup>. Les CE et les CMLv des plaques athérosclérotiques sécrètent une MEC plus riche en sulfate de dermatan que dans les vaisseaux sains <sup>273</sup>. De plus, les fibroblastes présents dans la plaque sécrètent tellement de tissu conjonctif dense que l'artère perd sa capacité à changer son diamètre en fonction des besoins de l'organisme (étape de fibrose). Après plusieurs cycles d'accumulation de leucocytes, de migration et de prolifération des CMLv, de synthèse de MEC et de réorganisation de la lésion, une couche fibreuse recouvre un cœur de lipides et de tissus en nécrose (via l'apoptose des macrophages et des CMLv), c'est la lésion avancée ou compliquée (Figure 3) <sup>217</sup>. À ce moment, l'artère ne peut plus compenser en se dilatant, la lésion envahit la lumière vasculaire et perturbe le flot sanguin <sup>217</sup>. Plus tard, des sels de calcium précipitent avec les lipides présents dans la plaque, ce qui donne lieu à la calcification et au durcissement des artères <sup>99</sup>.

Ces processus mènent à la réduction de la lumière vasculaire et du flot sanguin au site des plaques athérosclérotiques et entraînent des symptômes ischémiques et des dou-

leurs pour le patient atteint. Les artères athérosclérosées perdent leur distensibilité et sont facilement rupturées à cause de la présence de foyers nécrotiques dans leurs parois et de la dégradation de la couche fibreuse de la lésion en réponse à la sécrétion de MMP (Figure 4) <sup>217</sup>. De plus, la morphologie irrégulière des plaques provoque la formation de caillots et mène à la thrombose intravasculaire, réduisant considérablement le flot sanguin en aval de l'artère ou causant des hémorragies majeures lors de la rupture du vaisseau <sup>99</sup>. À cause des complications multiples qu'elle entraîne (angine instable et infarctus du myocarde), l'athérosclérose est actuellement la principale cause de décès dans les sociétés industrialisées en Amérique du Nord, Europe et Asie <sup>33</sup>.



Ross R. *New Engl J Med* 1999.

**Figure 4: Plaque fibreuse instable dans l'athérosclérose.**

## **1.2.2 Facteur de croissance dérivé des plaquettes et son récepteur**

### **1.2.2.1 Facteur de croissance dérivé des plaquettes**

Le PDGF est un facteur mitogénique ubiquitaire découvert grâce à sa capacité d'induire la prolifération des cellules mésenchymateuses en culture. Ce facteur était présent dans le sang total, mais absent du sérum et il a été démontré plus tard que les granules- $\alpha$  des plaquettes en étaient la source <sup>208</sup>. Le PDGF est un facteur de croissance pour les cellules du tissu conjonctif comme les fibroblastes, les cellules gliales

et les CMLv<sup>208</sup>. Il peut être produit par des cellules normales, transformées ou néoplasiques comme les plaquettes, les CE, les monocytes/macrophages et les fibroblastes activés<sup>208</sup>.

Le PDGF isolé des plaquettes humaines est composé de deux chaînes polypeptidiques distinctes, mais homologues, appelées A et B et reliées par des ponts disulfures<sup>208</sup>. Le PDGF peut être assemblé en trois isoformes : PDGF-AA, PDGF-BB et PDGF-AB. Il a été estimé que 70% du PDGF humain se présente sous la forme d'un hétérodimère des chaînes A et B et le reste, sous la forme homodimère BB<sup>208</sup>. Une autre étude suggère que les trois isoformes du PDGF sont retrouvés en quantité égale dans les plaquettes humaines<sup>103</sup>. Par ailleurs, l'isoforme BB prédomine chez le porc, la souris, le rat, le bœuf, le mouton, le chien et le poulet, mais pas chez les primates<sup>208</sup>. Les gènes du PDGF et de ses récepteurs possèdent un taux d'homologie élevé entre les espèces<sup>208</sup>.

Le gène codant pour le PDGF-A est situé sur le chromosome 7 et contient 7 exons, tandis que le PDGF-B est codé par le protooncogène *c-sis* situé sur le chromosome 22 et comporte également 7 exons<sup>208</sup>. Les chaînes A et B du PDGF sont synthétisées sous forme de précurseurs et leurs formes matures actives composent la glycoprotéine hydrophile cationique<sup>208</sup>. Le poids moléculaire des isoformes du PDGF varie entre 28 et 35kDa et chaque monomère contient 8 résidus cystéine nécessaires au maintien de la structure tertiaire et à l'activité du dimère<sup>208</sup>. Des expériences de « pulse chase » ont montré que la dimérisation avait lieu rapidement après la synthèse et précédait la maturation protéolytique des molécules de PDGF<sup>208</sup>.

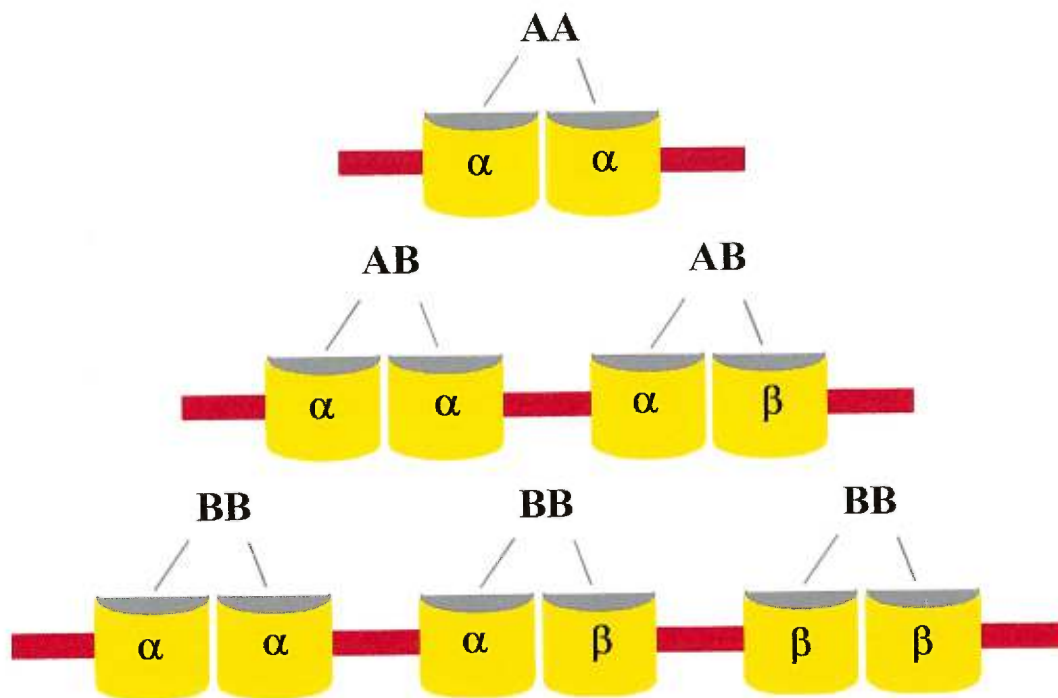
Les chaînes A et B du PDGF sont exprimées de façon constitutive régulée dans les cellules du tissu épithélial, conjonctif, musculaire, nerveux et d'origine hématopoïétique<sup>208</sup>. Dans les CMLv aortiques humaines ou de rat, les deux gènes du PDGF sont exprimés de façon graduée à travers le vaisseau : l'ARNm de la chaîne A est surtout détecté dans les CMLv de la média, tandis que l'ARNm de la chaîne B est surtout retrouvé dans les CE et les macrophages de la microvasculature de l'adventice<sup>208</sup>. L'expression des deux chaînes du PDGF peut être induite *in vivo* en réponse à des médiateurs présents au site d'une lésion vasculaire comme la thrombine<sup>208</sup>.

Lorsque administré *in vivo*, le PDGF est rapidement éliminé du plasma, car il serait séquestré à 80% par des protéines plasmatiques dont l' $\alpha_2$ -macroglobuline, qui empêcheraient la liaison du ligand à son récepteur<sup>208</sup>. Les monocytes/macrophages sécrètent aussi des protéines pouvant former des complexes regroupant plusieurs molécules de PDGF<sup>208</sup>. Ces stratégies diminuent rapidement la disponibilité du ligand en circulation, mais pourraient le protéger d'une dégradation enzymatique et ainsi prolonger sa disponibilité potentielle<sup>208</sup>.

#### **1.2.2.2 Récepteur pour le facteur de croissance dérivé des plaquettes**

Le récepteur du PDGF est dimérique, n'a qu'un seul passage transmembranaire et est formé par le recrutement des sous-unités  $\alpha$  et/ou  $\beta$ . La sous-unité  $\alpha$  peut lier les chaînes A et B du PDGF, tandis que la sous-unité  $\beta$  lie uniquement le PDGF-B<sup>208</sup>. (Figure 5). En absence de PDGF, les sous-unités existent sous forme de monomères séparés ou dimères instables, mais changent de conformation et forment un complexe de haute affinité en présence du ligand dimérique<sup>208</sup>. Les trois isoformes du ligand se lient avec une forte affinité au récepteur et la constante de dissociation est de l'ordre de  $10^{-11}$ M<sup>208</sup>. La séquence d'acides aminés du récepteur pour le PDGF humain et murin montre 87% d'homologie. L'expression des deux sous-unités du récepteur pour le PDGF est régulée de façon indépendante au niveau transcriptionnel<sup>144</sup>.





**Figure 5 : Liaisons possibles entre le PDGF-A ou B et le PDGFR- $\alpha$  ou  $\beta$ .**

Le domaine extracellulaire du récepteur pour le PDGF contient 5 domaines semblables aux immunoglobulines avec des résidus cystéines conservés<sup>208</sup>. Dans la portion intracellulaire du récepteur, la région ayant une activité tyrosine kinase intrinsèque est scindée en deux par une séquence non conservée d'environ 100 acides aminés qui serait impliquée dans la spécificité du substrat phosphorylé par les domaines tyrosine kinase<sup>208, 268</sup>. Les gènes codant les sous-unité  $\alpha$  et  $\beta$  du récepteur pour le PDGF sont situés respectivement sur les chromosomes 4 et 5 humains<sup>208</sup>. Les sous-unités sont produites sous forme de précurseurs cytoplasmiques de 160kDa ( $\alpha$ ) et 170kDa ( $\beta$ ), puis converties sous leur forme membranaire de 180kDa et 185kDa respectivement. Les deux sous-unités du récepteur pour le PDGF sont glycosylées sur leur domaine extracellulaire et il n'y aurait pas de ponts disulfures dans la forme dimérique<sup>208</sup>.

Les sous-unités du récepteur pour le PDGF sont exprimées par les cellules du tissu conjonctif (fibroblastes, CMLv), mais pas par les cellules épithéliales, endothéliales ou hématopoïétiques<sup>208</sup>. En absence de PDGF, la demi-vie des sous-unités  $\beta$  du récepteur est de 3 à 4 heures, tandis qu'en présence de ligand, elle est de 30 à 60 minutes<sup>208</sup>. Des études montrent que les sous-unités du récepteur ainsi que les isoformes du

ligand sont dégradées par les lysosomes après leur internalisation plutôt que d'être recyclées vers la membrane <sup>208</sup>.

### **1.2.3 Transmission du signal dans les cellules musculaires lisses vasculaires**

#### **1.2.3.1 Voie de signalisation menant à la prolifération cellulaire**

La dimérisation du récepteur pour le PDGF et son autophosphorylation subséquente sur des résidus tyrosine sont nécessaires à la transduction du signal menant à la prolifération et la migration cellulaire induite par le PDGF <sup>225</sup>. Les tyrosines phosphorylées deviennent des sites de liaison pour plusieurs protéines effectrices contenant des domaines SH2 comme la PLC $\gamma$ , RasGAP, la sous-unité régulatrice de la PI3K, GRB2, la phosphatase spécifique aux tyrosines Syp, Shc et des membres de la famille Src <sup>47, 3</sup>. (Figure 6). La signalisation intracellulaire de plusieurs récepteurs de facteurs de croissance comprend l'activation de la voie MAPKK. De façon plus précise, les protéines GRB2 et Sos (molécule d'échange du GTP lié à Ras) interagissent via le domaine SH2 de GRB2 avec le récepteur activé et phosphorylé. Ceci est suivi de la conversion de la protéine Ras-GDP inactive en Ras-GTP active pouvant activer Raf, celle-ci activant MAPKK, cette dernière phosphorylant et activant la MAPK, qui à son tour phosphorylera des facteurs de transcription comme les proto-oncogènes *c-fos* et *c-myc* <sup>208</sup>. Ces gènes sont des facteurs de transcription qui vont réguler l'expression de gènes requis pour la synthèse d'ADN, la prolifération, la migration ou la différenciation cellulaire (Figure 6). Il a été démontré que le PDGFR- $\beta$  activé lie GRB2 et que le PDGF-BB entraîne une activation forte et prolongée de la MAPKK et de la MAPK dans les CMLv humaines ou de rat en culture <sup>7, 207</sup>. De plus, l'activation de la PLC $\gamma$  n'est pas essentielle pour la synthèse d'ADN <sup>215</sup>, mais la PI3K serait requise et son activation serait indépendante de celle de la voie MAPK <sup>7</sup>. Le PDGF-AA peut également activer la voie MAPK et stimuler la prolifération cellulaire, mais avec une moins grande efficacité que le PDGF-BB (Figure 6) <sup>96, 144, 51, 128</sup>.

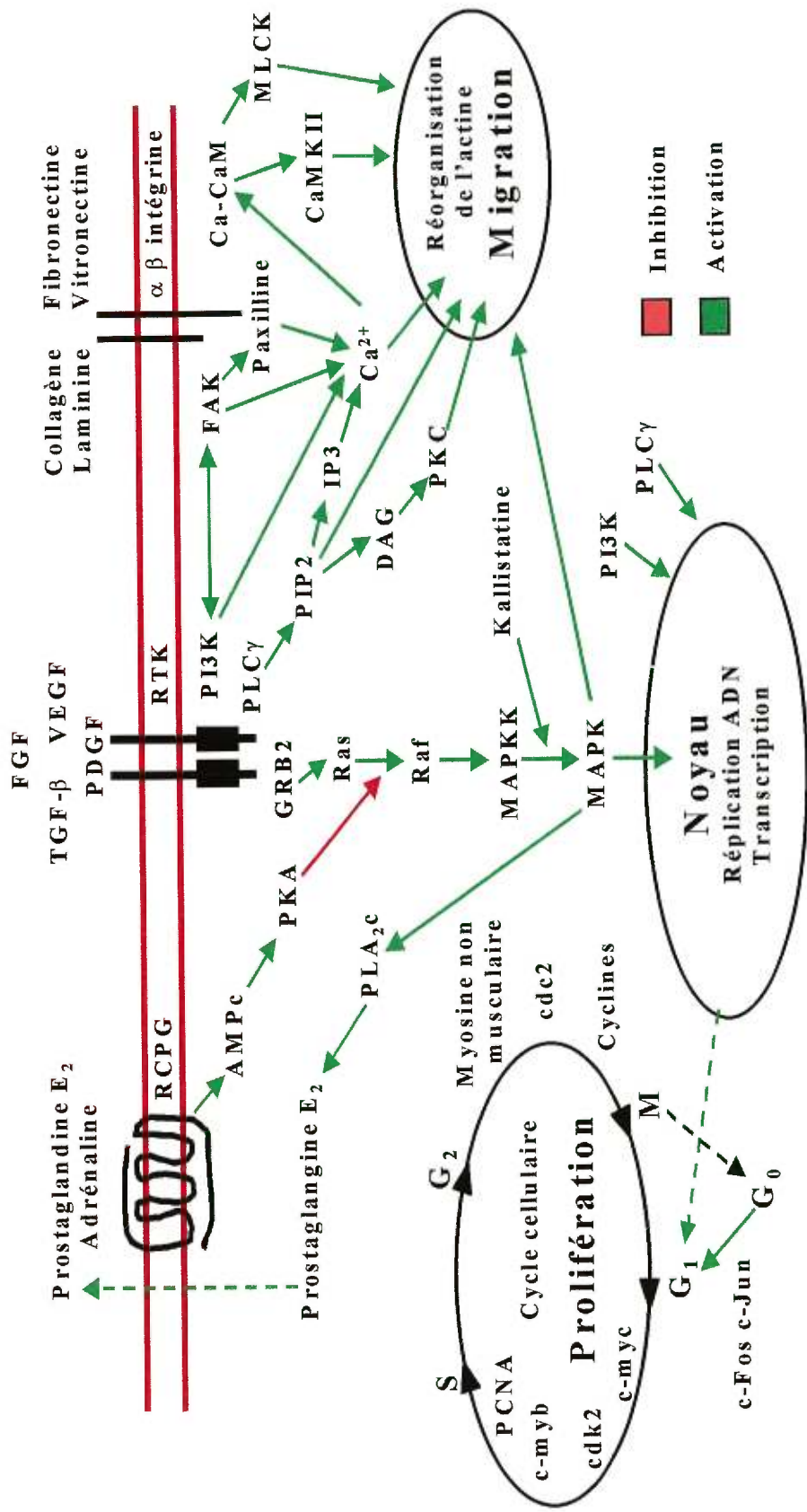


Figure 6 : Voies de signalisation menant à la prolifération ou la migration cellulaire et cycle cellulaire.

RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G, RTK : Récepteurs à activité tyrosine kinase



Un des premiers effets de l'interaction du PDGF avec son récepteur est l'activation de la PLC $\gamma$  menant à la dégradation du phosphatidylinositol biphosphate pour former le diacylglycérol et le phosphatidylinositol triphosphate, ce dernier étant responsable de la mobilisation des réserves de calcium intracellulaire, tandis que le diacylglycérol active différentes isoenzymes de la PKC<sup>208</sup>. Le diacylglycérol et le phosphatidylinositol triphosphate sont des seconds messagers qui stimulent la synthèse protéique et activent les facteurs de transcription nucléaires<sup>190</sup>.

La kallistatine est un agent vasodilatateur et un inhibiteur des protéinases à sérine exprimé par les CE et les CMLv<sup>180</sup>. La kallistatine exogène a augmenté l'activité MAPK, favorisé la prolifération et la migration des CMLv d'aorte de rat en culture<sup>180</sup>. De plus, le PDGF-BB a induit l'expression de kallistatine chez les CMLv en culture<sup>180</sup>. Dans le modèle de lésion de la carotide de rat, l'ARNm et le taux d'expression protéique de la kallistatine ont augmenté de 10 fois<sup>180</sup>. La livraison locale d'un adénovirus contenant l'antisens contre la kallistatine a réduit le taux d'ARNm de la kallistatine et la formation de néointima dans les vaisseaux lésés<sup>180</sup>. In vitro, l'antisens a inhibé l'expression de kallistatin, a atténué l'activité MAPK induite par le PDGF-BB et réduit la prolifération des CMLv<sup>180</sup>. Ces résultats suggèrent que la kallistatine jouerait un rôle dans l'activation de la voie MAPK par le PDGF dans les CMLv<sup>180</sup>.

L'interaction entre la signalisation par les récepteurs à activité tyrosine kinase et les récepteurs couplés aux protéines G résulte dans l'inhibition partielle par la PKA de la cascade MAPK, probablement au niveau de Raf. La PKA est activée par une élévation de l'AMPc en réponse à la stimulation  $\beta$ -adrénergique et à la prostaglandine E2<sup>30</sup>. La PKA agirait en réduisant la capacité de Ras à interagir avec ses cibles Raf et MEK (un activateur de la MAPKK différent de Raf)<sup>68, 100</sup>. L'activation de la PKA inhibe partiellement la synthèse d'ADN induite par le PDGF-AA ou -BB dans les CMLv<sup>96</sup>. De plus, l'AMPc réduit la prolifération des CMLv sans affecter la mobilisation du calcium<sup>9</sup>. Dans les CMLv humaines, l'activation de la PLC $\gamma$  par le PDGF-AA ou -BB ne semble pas être inhibée par l'AMPc<sup>96</sup> (Figure 6). De plus, le PDGF-BB et dans une moindre mesure, le PDGF-AA peuvent stimuler de manière rapide et transi-

toire l'accumulation d'AMPc et l'activation de la PKA de façon dépendante de la dose sur des CMLv humaines en culture <sup>95</sup>. Cet effet est inhibé par l'incubation avec l'indométhacine, un inhibiteur des cyclooxygénases, ce qui suggère l'implication des prostaglandines dans la stimulation de la formation de l'AMPc <sup>95</sup>. Il a aussi été démontré que la voie MAPK activait la phospholipase cytosolique de type A<sub>2</sub> (PLA<sub>2c</sub>) et que la relâche rapide d'acide arachidonique et la synthèse de prostaglandine E<sub>2</sub> induites par le PDGF-BB, pouvaient être bloquées par un inhibiteur de la PLA<sub>2c</sub> <sup>95</sup> (Figure 6). Également, la mobilisation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire semble requise pour la synthèse de prostaglandine E<sub>2</sub>, tandis que la PKC serait nécessaire à l'activation de la PKA par le récepteur à la prostaglandine E<sub>2</sub> <sup>95</sup>. Globalement, le mécanisme de rétroaction négative de la voie AMPc/PKA sur la voie MAPK dans les CMLv en culture ne serait pas assez fort pour inhiber complètement l'activation de la voie MAPK par les isoformes du PDGF <sup>95</sup>.

Les autres facteurs favorisant la prolifération des CMLv sont les médiateurs plaquet-taires (TxA<sub>2</sub>, thrombine, sérotonine), l'étirement de la paroi vasculaire, les facteurs de croissance (bFGF, aFGF, IGF-1, EGF), le calcium, l'insuline, le cholestérol, l'endothéline-1 et l'angiotensine II (AII) <sup>153, 156, 50</sup>. À l'opposé, les facteurs inhibant la prolifération des CMLv comprennent : la protéine kinase Cδ, les gènes suppresseurs de tumeurs (p27, p21, p53), la voie du NO, la PGI<sub>2</sub>, l'héparine, les antagonistes calcique dont le tranilast, le troglitazone, les antagonistes du PDGF-BB dont le trapidil, les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase du PDGFR-β, l'apolipoprotéine E, le dipyridamole, le collagène, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA) (via l'augmentation de bradykinine), les anticorps contre les facteurs de croissance, les antagonistes des récepteurs α<sub>1</sub> adrénergiques, les antagonistes de l'endothéline-1 et les antagonistes des récepteurs AT<sub>1</sub> de l'AII <sup>153</sup>.

### 1.2.3.2 Voie de signalisation menant à la migration cellulaire

En plus de la réponse mitogénique au PDGF-AA ou -BB, la migration des fibroblastes, des CMLv, des monocytes et des neutrophiles est stimulée par son effet chimio-tactique <sup>208, 30</sup>. Les signaux impliqués dans la migration induite par les isoformes du PDGF se résument principalement au métabolisme du phosphatidylinositol lié à

l'activation de la PLC $\gamma$  (Figure 6) <sup>30, 3</sup>. L'hydrolyse du phosphatidylinositol biphosphate et la mobilisation du calcium résulteraient en une dépolymérisation locale et transitoire des filaments d'actine, étape probablement requise pour l'extension de filopodes vers l'agent chimiotactique <sup>30</sup>. Par la suite, les isoformes du PDGF favoriseraient la polymérisation d'un nouveau filament d'actine via la protéine Rho liant le GTP, le retour à la normale des taux de phosphatidylinositol biphosphate et de calcium, ainsi que la génération de diacylglycérol qui favorise la nucléation de l'actine à la membrane plasmique <sup>227, 214</sup>. De plus, le PDGFR- $\beta$  peut lier et activer RasGAP, protéine qui catalyse la conversion de la protéine Ras-GTP active en Ras-GDP inactive, mais qui est également impliquée dans la régulation de Rho <sup>30</sup>.

Par ailleurs, des cellules exprimant le PDGFR- $\beta$  muté et incapable de lier la PLC $\gamma$  montrent une plus faible réponse chémoattractique au PDGF-BB, surtout si le récepteur est incapable de lier la PI3K <sup>151</sup>. Les résultats des études faites sur les CMLv en culture montrent que la capacité d'un facteur de croissance à induire le métabolisme du phosphatidylinositol est directement reliée à sa capacité d'induire la migration cellulaire, plutôt que la synthèse d'ADN et la prolifération <sup>30</sup>. En bout de ligne, selon le phénotype des CMLv, c'est la régulation de l'expression des molécules impliquées dans la signalisation associée aux isoformes du PDGF qui détermine si la CMLv va migrer ou proliférer. Ainsi, l'expression de la PLC $\gamma$  est très faible dans les CMLv natives ayant un phénotype contractile, mais elle est induite lorsque les CMLv adoptent un phénotype sécrétoire en culture <sup>114</sup>. De plus, l'expression de la MAPK et la prolifération cellulaire semblent être régulées par la MEC <sup>160</sup> et l'activation de la PLC $\gamma$  serait cruciale dans la stimulation des cellules à entrer en phase S du cycle cellulaire

208

En plus de mobiliser les réserves de calcium intracellulaire, le PDGF-BB peut aussi augmenter l'entrée du Ca<sup>2+</sup> extracellulaire via les canaux calciques sensibles au voltage et ceux contrôlés par un récepteur membranaire <sup>117</sup>. Cette élévation du Ca<sup>2+</sup> active la protéine calmoduline (CaM) qui entraîne à son tour l'activation de la « myosine light chain kinase » (MLCK) qui phosphorylera la myosine et favorisera la contraction du cytosquelette d'actine et la migration cellulaire <sup>117</sup> (Figure 6). Sur des

CMLv de veines saphènes humaines en culture, il a été observé qu'une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire était requise pour la migration induite par le PDGF-BB<sup>196</sup>. De plus, la présence des protéines de la MEC augmente l'amplitude et la durée de la mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  induite par le PDGF-BB, ce qui se traduit par une migration cellulaire plus importante<sup>196</sup>. La CaM est aussi impliquée dans l'activation de la protéine « calcium/calmoduline-dependent protein kinase II » (CaMKII) qui participe à la migration cellulaire induite par le PDGF-BB<sup>117</sup> (Figure 6). La PI3K et différentes isoformes de la PKC seraient aussi impliquées dans la migration cellulaire en réponse au PDGF-BB<sup>151, 207</sup> mais l'importance de chacune n'est pas encore clairement établie<sup>110</sup> (Figure 6).

Plusieurs études ont montré que la voie MAPK est impliquée dans la migration induite par le PDGF-BB *in vitro*<sup>94, 207, 170, 197</sup> bien que des résultats contradictoires ont également été obtenus<sup>31, 127</sup>. Par exemple, sur des CMLv de rat ou humaines en culture, un antisens dirigé contre l'ARNm des isoformes p42/44 de la MAPK a réduit l'expression de ces protéines de 65% après 48 heures ainsi que la migration induite par le PDGF-BB de 75%<sup>94</sup>. Ces résultats confirmaient l'inhibition de la migration induite par le PDGF-BB qui avait été obtenue en incubant les cellules avec le composé PD98059, un inhibiteur de la protéine MAPKK qui n'affecte pas la mobilisation du calcium induite par le PDGF-BB<sup>94</sup>. La MAPK pourrait favoriser la migration en phosphorylant la MLCK, la CaMKII ou le complexe d'adhésion focale<sup>137, 170, 197</sup> (Figure 6). De plus, les isoformes de la MAPK semblent être transloquées vers les membranes plasmiques et le cytosquelette<sup>133, 132</sup> ce qui expliquerait leur implication dans la migration cellulaire. Bien que la voie MAPK ne soit pas essentielle à la migration, elle peut induire ou augmenter l'effet d'un signal chimiotactique sur les CMLv<sup>207</sup>. De plus, il semble que les premières minutes de stimulation de la voie MAPK par le PDGF-BB soient associées à la migration des CMLv, tandis qu'une activation soutenue pendant 1 à 4 heures soit associée à leur prolifération<sup>197</sup>.

Les intégrines sont des récepteurs membranaires composés de chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  qui s'associent pour former des hétérodimères impliqués dans la liaison aux protéines de la MEC. Les intégrines sont responsables de la signalisation intracellulaire menant

aux changements dans l'adhésion, la prolifération, la morphologie, l'étalement et la migration des différents types cellulaires. Il a été observé que l'étalement et la migration des CMLV sur une matrice de collagène I en réponse au PDGF-BB requièrent le récepteur  $\alpha_2\beta_1$  intégrine et que ces processus peuvent être inhibés de façon dose dépendante en préincubant les cellules avec un anticorps anti- $\alpha_2\beta_1$  <sup>237</sup>. De plus, l'intégrine  $\alpha_5\beta_1$  qui est exprimée dans les plaques d'adhésion focales, confère la capacité aux cellules de lier la fibronectine et participerait à la migration <sup>276</sup>. Dans certains types cellulaires, la stimulation par les isoformes du PDGF résulte dans la phosphorylation de protéines impliquées dans les plaques d'adhésion focales comme p125<sup>FAK</sup> et paxilline et dans l'activation des protéines de la famille Src, probablement impliquées dans la signalisation des complexes d'adhésion (Figure 6) <sup>211, 3</sup>. Des études ont montré que le PDGF-BB pouvait phosphoryler la tensine et la FAK pour induire la migration des fibroblastes et des CMLV, tandis que le PDGF-AA n'avait pas cet effet sur les CMLV <sup>128, 3</sup>. Ces résultats suggèrent que la capacité du PDGF-BB à activer la voie des intégrines dépend du type cellulaire et de l'expression des isoformes du récepteur pour le PDGF <sup>3</sup>. De plus, l'activation du PDGFR- $\beta$  par le PDGF-BB favorise l'association stable entre la PI3K et la FAK, probablement via le recrutement de la PI3K au récepteur activé, ce qui favoriserait l'intégration des signaux médiés par les intégrines et ceux induits par les facteurs de croissance pour réguler la morphologie et la migration cellulaire <sup>46</sup>.

Il a été observé que la PLC $\gamma$  se liait à des résidus tyrosine phosphorylés sur le PDGFR- $\alpha$  et - $\beta$  <sup>47, 215</sup>. De plus, le PDGF-BB est un plus puissant inducteur du métabolisme du phosphatidylinositol dans les CMLV humaines que le PDGF-AA et il entraîne une augmentation dose dépendante du calcium intracellulaire <sup>31, 177</sup>. D'autres études ont également rapporté que le PDGF-AA induisait la migration de différents types cellulaires, notamment des CMLV <sup>105, 257, 69</sup>. Ferns et coll. a démontré que la signalisation via les isoformes du récepteur pour le PDGF variait en fonction de la densité des isoformes exprimés à la membrane plasmique <sup>69</sup>. Par exemple, la migration sur une matrice de fragments de collagène de type I en réponse au PDGF-AA est augmentée pour les cellules surexprimant le PDGFR- $\alpha$  <sup>69</sup>. Ce résultat suggère que le

faible nombre de PDGFR- $\alpha$  présent sur les CMLv est insuffisant pour induire la migration à un niveau comparable à celui induit par le PDGF-BB et impliquant l'expression abondante du PDGFR- $\beta$  <sup>145</sup>. Cet argument est partagé par Bornfeldt et coll., selon qui l'expression typiquement 10 fois plus grande de la sous-unité  $\beta$  du récepteur pour le PDGF <sup>31</sup> expliquerait pourquoi le PDGF-BB est un inducteur de migration et de prolifération plus fort que le PDGF-AA dans les cellules en culture <sup>30</sup>. Par contre, cette hypothèse n'explique pas pourquoi *in vivo*, il a été observé que le PDGF-BB est 10 fois plus puissant comme facteur chémotactique que mitogénique <sup>125, 193</sup>. Il semble donc que les mécanismes de régulation de l'expression ou de l'activité des isoformes du récepteur pour le PDGF varient selon que l'on soit *in vivo* ou *in vitro*.

Une étude de Abedi et coll. a montré sur des CMLv en culture, que le PDGF-AA n'a pas induit la phosphorylation de la FAK, de la paxilline, du PDGFR- $\alpha$  et n'a pas réussi à stimuler la prolifération et la migration cellulaire <sup>3</sup>. De plus, les auteurs n'ont détecté l'expression protéique du PDGFR- $\alpha$  que sur les fibroblastes, tandis que le PDGFR- $\beta$  était présent à la fois chez les CMLv et les fibroblastes <sup>3</sup>. Par contre, cette étude montre que le PDGF-AA et -BB peuvent tous deux induire la migration des fibroblastes en culture selon une relation en cloche, l'effet migratoire diminuant à forte concentration de ligand <sup>3</sup>. Les auteurs croient que l'inhibition de la migration des fibroblastes à forte concentration est due à la désintégration des filaments d'actine induite par les isoformes du PDGF <sup>3</sup>. Par contre, la chémotaxie des CMLv induite par le PDGF-BB était soutenue même à une concentration de 100 ng/mL, mais la migration maximale était obtenue avec une concentration variant entre 1 et 10 ng/mL <sup>3</sup>. De plus, cette étude a montré que la concentration nécessaire pour avoir un effet prolifératif maximal était plus élevée que celle requise pour la migration <sup>3</sup>. Ces résultats suggèrent que la réponse chémotactique au PDGF dépend du type cellulaire ainsi que des isoformes du ligand et du récepteur qui sont exprimés <sup>3</sup>.

Clunn et coll. a montré sur des CMLv de veines saphènes humaines, que le PDGF-BB induisait une forte migration à une concentration entre 1 et 10 ng/mL, mais qu'une concentration plus forte inhibait la chémotaxie induite par le FBS ou l'EGF <sup>51</sup>.

Bien que certaines études ont montré que les CMLv humaines expriment le PDGFR- $\alpha$  et migrent en présence de PDGF-AA<sup>209, 31</sup>, Clunn et coll. ont observé un effet chémo-tactique faible avec le PDGF-AB et nul avec le PDGF-AA<sup>51</sup>. De plus, une forte concentration de PDGF-AA a inhibé partiellement la migration induite par le PDGF-BB à faible concentration, tandis que le PDGF-AB l'a inhibé complètement<sup>51</sup>. Ces résultats suggèrent que le signal chémo-tactique induit par le PDGF est dominé par les récepteurs  $\beta$  et qu'il passe de positif à faible concentration, à négatif à forte concentration<sup>51</sup>. Par ailleurs, ces auteurs ont observé que la concentration de PDGF-BB nécessaire pour induire la prolifération cellulaire était typiquement 10 fois plus élevée que celle requise pour induire une migration maximale et ils suggèrent que la présence d'un gradient de PDGF-BB sert à coordonner le déplacement et la multiplication cellulaire<sup>51</sup>.

Koyama et coll. a également rapporté que le PDGF-AA n'avait pas d'activité chémo-tactique intrinsèque, mais qu'il pouvait inhiber l'effet migratoire du PDGF-BB et du PDGF-AB sur des CMLv de babouin ou de rat en culture<sup>146, 144, 146</sup>. L'utilisation de deux anticorps, l'un contre le PDGFR- $\alpha$ , l'autre contre le PDGFR- $\beta$ , a permis de conclure que c'était le récepteur  $\alpha$ , plutôt que le ligand PDGF-AA, qui était impliqué dans l'inhibition de la migration des CMLv *in vitro*<sup>144</sup>. Cette étude a montré que les CMLv de babouin exprimaient dans une proportion de 20% le PDGFR- $\alpha$  et de 80% le PDGFR- $\beta$ <sup>144</sup>. Pour expliquer comment le PDGFR- $\alpha$  génère un signal inhibant la migration, ce groupe soulève que la mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  induite par la PKC en réponse à l'activation du PDGFR- $\beta$  est inhibée par le PDGFR- $\alpha$ <sup>60</sup>. De plus, le métabolisme du phosphatidylinositol serait différent en présence de PDGF-AA et -BB dans les fibroblastes humains<sup>154</sup>.

Dans une autre étude *in vitro*, Koyama et coll. a montré que le PDGF-AA inhibait la migration des CMLv de babouin sur un filtre recouvert des protéines de la membrane basale ou de fibronectine, tandis qu'il n'avait aucun effet inhibiteur si le filtre était recouvert de collagène de type I<sup>145</sup>. La fibronectine contient des domaines de liaison à l'héparine qui seraient requis pour l'inhibition de la migration par le PDGF-AA<sup>145</sup>. Cette étude a aussi montré que le PDGF-AA favorisait plus fortement l'accumulation

de protéoglycans riches en sulfate d'héparan, que le PDGF-BB <sup>145</sup>. En particulier, le PDGF-AA augmente l'expression de l'ARNm de syndecan-1, qui serait essentiel au signal inhibiteur <sup>145</sup>. De plus, le PDGF-AA peut aussi induire la formation d'AMPC et l'activation de la PKA <sup>95</sup> et l'AMPC induirait l'expression de syndecan-1 <sup>82, 272</sup> ce qui suggère que l'induction de l'expression de syndecan-1 serait un mécanisme par lequel le PDGF-AA médierait l'inhibition de la migration induite par le PDGF-BB <sup>145</sup>. Dans l'étude de Koyama et coll., les effets du PDGF-AA sur la migration cellulaire et la synthèse de protéoglycans ont induit l'étalement des CMLv et des changements de leur morphologie <sup>145</sup>. Ces résultats suggèrent que le PDGF-AA, en influençant les interactions entre les protéines de la MEC et les CMLv, génère des signaux inhibant la migration cellulaire <sup>145</sup>. Une autre étude réalisée sur des CE de porc transfectées avec le PDGFR- $\alpha$  natif ou mutant a identifié 3 résidus tyrosine dans le domaine cytoplasmique du PDGFR- $\alpha$  qui seraient impliqués dans la signalisation inhibant la migration cellulaire <sup>274</sup>.

Enfin, il a été observé que le PDGF-AA était plus fortement exprimé dans les cellules en quiescence dans les tissus athérosclérosés humains que dans les plaques athérosclérotiques à un stade avancé <sup>192</sup>. Ainsi, par sa capacité à induire l'accumulation de protéoglycans riches en sulfate d'héparan, le PDGF-AA maintiendrait un phénotype cellulaire différencié et la structure vasculaire normale <sup>145, 40, 159</sup>. De plus, le PDGF-AA contrôlerait le remodelage vasculaire, notamment dans l'hypertension <sup>144</sup>. D'autres études sont requises pour clarifier le rôle du PDGF-AA et du PDGFR- $\alpha$  *in vivo* et permettront de réconcilier les faits disparates et contradictoires quant à l'implication des différents isoformes du PDGF dans la prolifération et la migration cellulaire <sup>145</sup>.

Globalement, le PDGF-BB active plusieurs voies de signalisation résultant en une forte stimulation de la migration cellulaire, mais d'autres facteurs peuvent induire la chémotaxie des CMLv vers le site de la lésion, ce sont l'AII, l'IGF-1, l'EGF, le bFGF, le TGF- $\beta$ , le facteur plaquettaire 4, le vWF et la thromboglobuline- $\beta$  <sup>222, 208, 196</sup>. Parmi les facteurs facilitant la migration, nommons la lysophosphatidylcholine, les MMP, les activateurs du plasminogène et les protéines composant la MEC <sup>222, 153, 196</sup>. Les substances inhibant la migration des CMLv sont le sulfate d'héparan et



l'héparine, les inhibiteurs des phosphodiésterases, les anticorps contre les isoformes du PDGF, le NO, les inhibiteurs des MMP, l'antisens PDGFR- $\beta$ , l'apolipoprotéine E, les antagonistes du calcium, la colchicine et la cytochalasine-B<sup>70, 153, 156, 235</sup>.

Par ailleurs, il a été démontré qu'après une lésion carotidienne chez le rat ou la lapin, les parois exposées à un faible flot sanguin développent plus de néointima et expriment plus de MMP-2 (activité collagénase de la matrice) que celles soumises à un fort flot<sup>141, 14</sup>. D'autres études ont aussi montré que les forces de cisaillement physiologiques inhibaient la formation de néointima dans les pontages vasculaires et à la suite d'angioplasties<sup>148, 84, 158</sup>. De plus, l'expression des isoformes du PDGF par les CE varie selon les forces de cisaillement, autant *in vitro*, qu'*in vivo*<sup>202</sup>. Afin d'étudier l'impact des facteurs hémodynamiques sur la formation de néointima, des CMLv d'aorte de bœuf en culture ont été soumises à une force de cisaillement laminaire de 12 dyne/cm<sup>2</sup> pendant 15 heures<sup>202</sup>. L'utilisation d'un montage de Boyden avec un filtre recouvert de protéines de la MEC a montré que le traitement des cellules avec la force de cisaillement a inhibé la migration cellulaire induite par le PDGF-BB et que cet effet pouvait être renversé en surexprimant le PDGFR- $\beta$ <sup>202</sup>. Sur les CMLv en culture, la force de cisaillement a réduit l'expression de l'ARNm et de la protéine PDGFR- $\beta$  et MMP-14 (l'activateur membranaire de la pro-MMP-2), ainsi que la sécrétion de MMP-2 dans le milieu de culture<sup>202</sup>. Ces résultats suggèrent que les forces de cisaillement diminuent la capacité des CMLv à migrer de la média vers l'intima à cause d'une moins grande réponse à l'activité du PDGF-BB et de la MMP-2<sup>202</sup>.

### 1.2.3.3 Cycle cellulaire et changement phénotypique des CMLv

Les facteurs de croissance induisent un changement phénotypique des CMLv qui passent d'un état quiescent caractérisé par la spécialisation contractile, à un stade prolifératif moins différencié, mais sécrétoire de MEC<sup>138</sup>. Ceci est associé à la régulation à la baisse du gène *gax*, à la régulation à la hausse du gène *MEF-2*, à la réexpression de l'isoforme B de la myosine non musculaire, du gène *H19*, de la tropoélastine et de l'ostéopontine, des gènes régulés lors du développement fœtal et impliqués dans la différenciation<sup>265, 73, 135, 263</sup>. À la sortie de la phase  $G_0$  du cycle cellulaire (phase de quiescence), les CMLv entrent en phase  $G_1$ , caractérisée par une expression accrue

d'enzymes impliquées dans la synthèse d'ADN et de facteurs de transcription ou de régulation, comme le « proliferating cell nuclear antigen » (PCNA) (Figure 6)<sup>190</sup>. La mitogénèse serait induite en deux étapes : tout d'abord, l'induction de la compétence par des facteurs de croissance comme le PDGF (trois isoformes), puis la progression dans le cycle cellulaire par des éléments plasmatiques comme l'EGF, l'IGF, le bFGF, l'ostéopontine et la kallistatin<sup>180, 208</sup>. La progression en phase G<sub>1</sub> requiert l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs tels que p53, p21, p16, p15, p27 et rétinoblastome qui sont des régulateurs négatifs des complexes formés des cyclines et des kinases dépendantes des cyclines (cdk)<sup>6</sup>. Après la phase G<sub>1</sub>, viennent les phases S (réplication de l'ADN), G<sub>2</sub> (point de contrôle préparant la cellule à la division) et M (mitose) (Figure 6). À ce moment, l'expression de plusieurs gènes est augmentée (récepteurs des facteurs de croissance, protéines nécessaires à la prolifération et la migration)<sup>153</sup>.

#### **1.2.3.4 Autres effets cellulaires et physiologiques du PDGF**

Les isoformes du PDGF stimulent la synthèse protéique de collagène de type IV et VIII, régulent la proportion de type IV versus type III et augmentent l'activité collagénase dans la MEC<sup>208, 16</sup>. La formation de thrombospondine (protéine de la MEC) et de plasmine (protéine requise pour la migration) via l'activateur tissulaire du plasminogène, sont également modulées par les isoformes du PDGF<sup>208, 122</sup>. La capacité du PDGF de stimuler à la fois la sécrétion de composants de la MEC ainsi que d'enzymes capables de la dégrader serait importante pour préparer le milieu extracellulaire à la migration et la mitose dans les processus normaux de guérison des lésions et lors du développement embryonnaire<sup>208</sup>. De plus, le PDGF protège les CMLv de l'apoptose<sup>20</sup>.

### **1.3 Resténose**

#### **1.3.1 Importance clinique**

La première « percutaneous transluminal coronary angioplasty » (PTCA) fut rapportée par Andreas Gruntzig en 1979 et marqua un tournant dans le traitement de la maladie coronarienne<sup>153</sup>. L'angioplastie par ballon permet de soulager rapidement et directement les obstructions coronaires avec un taux de succès de >90% et un faible

taux de mortalité et de morbidité <sup>153</sup>. Malgré l'amélioration de la technique et la réduction des complications, la réocclusion ou resténose chronique à la suite d'une telle procédure a lieu dans 30 à 50% des cas, avec une incidence majeure entre 1 et 4 mois après l'angioplastie <sup>153</sup>. En 1997 aux États-Unis, on estimait à plus de 1,5 milliard \$, les coûts annuels en soins de santé associés à la resténose et à 300 000, le nombre de PTCA effectuées pour réocclusion vasculaire <sup>153, 156</sup>. La classification du degré de resténose repose à la fois sur des critères angiographiques (>50% d'occlusion de la lumière) et cliniques (retour des symptômes ischémiques dans les 6 mois suivant la procédure et nécessité de recourir à des techniques de revascularisation) <sup>153</sup>.

### **1.3.2 Théories sur la pathophysiologie de la resténose humaine**

Plusieurs facteurs sont impliqués dans la pathophysiologie de la resténose, mais la contribution relative de chacun est encore source de discussion. La dilatation du ballon cathéter cause une lésion de l'endothélium vasculaire et de la plaque athérosclérotique qui expose la portion sous-endothéliale de la plaque, constituée de lipides et de matrice de collagène, aux éléments sanguins <sup>66</sup>. Dans la première phase de guérison dite thrombotique, les plaquettes adhèrent rapidement et proportionnellement à la surface lésée, grâce surtout au vWF <sup>66</sup>. Les plaquettes relâchent ensuite le TxA<sub>2</sub>, un puissant agent vasoconstricteur, qui favorise l'agrégation plaquettaire et la formation de thrombus <sup>153, 156</sup>. Le lendemain de l'angioplastie, la surface lésée devient moins thrombogénique car il y a passivation vasculaire partielle <sup>97</sup>. Dans les jours qui suivent, une réponse inflammatoire locale se produit, avec une invasion initiale de leucocytes polymorphonucléaires suivie par l'infiltration des monocytes/macrophages et des lymphocytes T dans la paroi vasculaire lésée <sup>66</sup>. Les plaquettes, l'endothélium, les cellules inflammatoires et les CMLv lésées relâcheront ensuite différents facteurs mitogéniques, dont le PDGF, l'adénosine diphosphate, la thrombine, l'épinéphrine, le FGF, l'AII, la sérotonine, la thrombospondine, les radicaux libres oxygénés, le TNF- $\alpha$ , le TGF- $\beta$ , l'IGF-1 et plusieurs interleukines <sup>153</sup>.

Dans la deuxième phase de guérison, dite granuleuse, les fibroblastes de l'adventice et les CMLv de la média ayant un phénotype plus mobile et synthétique, vont migrer, proliférer dans la néointima et sécréter une abondante MEC <sup>222, 230</sup>. Les inhibiteurs

endogènes de la prolifération des CMLv, normalement relâchés par l'endothélium intact, seraient également déficients<sup>153</sup>. Le résultat net est l'hyperplasie intimale, une réponse polyclonale à la lésion et non un désordre néoplasique, qui réduit la lumière vasculaire et mène à des symptômes ischémiques<sup>252</sup>. Dans la dernière phase dite de remodelage, les CMLv et les fibroblastes ne prolifèrent plus, mais continuent à sécréter et à organiser la MEC qui composera alors près de 50% de l'hyperplasie intimale<sup>266</sup>. La guérison vasculaire se termine par la réendothélialisation de la lésion entre la 4<sup>e</sup> et la 12<sup>e</sup> semaine chez l'humain<sup>66</sup>.

Cette théorie classique sur l'établissement de la resténose est appuyée par des observations pathologiques montrant une hyperplasie intimale constituée de CMLv en prolifération, de fibres de collagène et d'élastine chez les patients décédés 1 à 3 mois après PTCA<sup>153</sup>. La microscopie électronique a démontré la migration des CMLv de la média vers l'intima en observant des cellules s'étirer à travers les fenestrations de la LEI chez des patients décédés dans la première semaine suivant l'intervention<sup>153</sup>. La présence de macrophages dans les lésions vasculaires à la suite de PTCA a aussi été observée histologiquement chez l'humain<sup>153</sup>. Une théorie plus récente rapporte une contribution possible du cytomégalovirus humain, qui infecterait les CMLv dans les artères lésées et favoriserait la prolifération cellulaire via l'inactivation de la protéine p53<sup>240</sup>. Des taux élevés de p53 dans la néointima prélevée par athérectomie ainsi que la colocalisation avec l'antigène du cytomégalovirus suggèrent que la lésion occasionnée par la PTCA réactiverait une infection virale latente dans la paroi artérielle<sup>240</sup>.

La théorie de surguérison vasculaire est remise en question par l'importance grandissante accordée au retour élastique et à l'athérosclérose accélérée. En effet, l'analyse pathologique de lésions montre l'absence d'hyperplasie intimale dans 20 à 50% des cas, malgré des évidences angiographiques et cliniques de resténose<sup>261</sup>. D'autres observations à la suite d'autopsies ou d'athérectomies suggèrent que la prolifération cellulaire serait de moins de 1% dans les lésions de resténose et que le développement d'athérosclérose de novo caractériserait 20 à 30% des lésions<sup>83, 199</sup>. Tandis que la prolifération des CMLv fait l'unanimité dans la guérison vasculaire chez l'animal, les

études cliniques suggèrent que l'hyperplasie intimale chez l'humain serait surtout due à la migration des CMLv de la média et à la production de MEC <sup>190</sup>. De plus, l'angioplastie augmente la lumière vasculaire principalement en étirant les composantes élastiques de la paroi, tandis que la plaque athérosclérotique rigide se fracture, occasionnant des dissections locales de l'artère <sup>190, 66</sup>. Le retour élastique serait favorisé lors d'une distension disproportionnée de l'artère normale adjacente aux sites de plaque athéromateuse, ce qui expliquerait la perte aiguë de lumière vasculaire à la suite d'une angioplastie. La resténose peut aussi avoir lieu par occlusion à la suite d'un thrombus ou par guérison des fissures sans formation importante de néointima <sup>190</sup>. De plus, l'épaississement et la constriction de l'adventice causeraient une grande partie de la perte de lumière vasculaire <sup>190</sup>.

Le remodelage vasculaire est un changement permanent dans la taille du vaisseau, soit favorable (processus adaptatif normal ou compensatoire), soit défavorable (processus de mal adaptation) <sup>88</sup>. Des études animales suggèrent que l'hyperplasie intimale se produirait invariablement après une lésion vasculaire, mais que la présence ou l'absence de resténose refléterait des différences dans les capacités compensatoires de chaque vaisseau <sup>66</sup>. Le remodelage vasculaire est reconnu depuis plus de 40 ans pour son rôle dans l'élargissement compensatoire des vaisseaux chez les sportifs atteints d'athérosclérose <sup>56</sup>. Plus récemment, des autopsies ont montré que la taille des coronaires humaines augmente dans la phase initiale d'athérosclérose afin de préserver la lumière vasculaire <sup>90</sup>. Des études cliniques ont montré que le remodelage négatif (vasoconstriction) était responsable de plus de 60% de la perte tardive de lumière vasculaire, ainsi que l'absence de corrélation entre la lumière vasculaire et la taille de la plaque, indiquant une contribution plutôt faible de l'hyperplasie intimale <sup>181, 136</sup>. Les endoprothèses vasculaires (« stents ») induisent la formation d'une hyperplasie intimale, mais elles causent moins de resténose que les angioplasties par ballon seul, car elles empêchent le remodelage négatif de l'artère <sup>66</sup>.

Le remodelage implique un équilibre dynamique entre le retour élastique de l'artère, l'adaptation aux changements hémodynamiques de pression et de flot, ainsi que la composition de la MEC <sup>88</sup>. Le stimulus le plus puissant pour induire le remodelage

serait le flot sanguin, lui-même régulé par les variations de force de cisaillement, via les substances vasodilatatrices ou vasoconstrictrices issues de l'endothélium <sup>66</sup>. Des cytokines et facteurs de croissance qui stimulent de façon autocrine et paracrine la production de MEC par les CMLv et les fibroblastes, le TGF- $\beta$  est le plus puissant <sup>81</sup>. Le collagène représente 20 à 30% du contenu total en protéines dans les vaisseaux normaux <sup>129</sup>, mais sa biosynthèse ainsi que celle de l'élastine et des protéoglycans, augmente de 4 à 10 fois 4 semaines après la lésion chez le lapin <sup>245</sup>. Dans ce modèle, l'organisation et le contenu en collagène sont significativement réduits dans les vaisseaux resténosés, ce qui résulterait d'une dégradation accrue par les MMP, surtout les collagénases 1 et 2 <sup>52</sup>. Les inhibiteurs des MMP ont permis de réduire la migration des CMLv et la dégradation du collagène dans le modèle de carotide de rat <sup>277</sup>. De plus, la colchicine et la cytochalasine-B sont testées cliniquement, car ces agents réduisent la motilité des CMLv et leurs capacités d'organiser la MEC et semblent augmenter le remodelage positif <sup>157</sup>.

### **1.3.3 Modèles d'étude de la resténose**

#### **1.3.3.1 Explant artériel**

Le modèle d'explant artériel sert de pont entre la culture cellulaire et l'angioplastie, car il permet l'étude *ex vivo* de la transformation phénotypique des CMLv, leur migration et leur prolifération, tout en préservant les interactions cellulaires et le micro-environnement tissulaire, dont les influences autocrine et paracrine locales <sup>12</sup>.

#### **1.3.3.2 Souris**

La souris transgénique est un modèle permettant l'étude des causes génétiques des maladies comme l'athérosclérose et l'hyperlipidémie car son génome est bien caractérisé et peut être manipulé assez aisément <sup>79</sup>. À cause de difficultés techniques, c'est un modèle moins utilisé pour la resténose, mais il est possible d'induire une lésion sévère par un courant électrique péri-vasculaire dans les artères fémorales, ainsi qu'une hyperplasie intimale infiltrée de cellules inflammatoires dans une artère endothélialisée en ligaturant la bifurcation de la carotide commune <sup>41, 150</sup>.

### 1.3.3.3 Rat

Les rats ont une réponse facile à prévoir à la suite d'une lésion causée soit par dessèchement par jet d'air, soit par dénudation endothéliale par ballon <sup>189</sup>. Chez les animaux plus âgés, la réponse proliférative des CMLv est retardée, mais plus soutenue <sup>243</sup>. La carotide de rat est choisie pour son accès facile et l'absence d'embranchements sur une bonne longueur, ne permettant la réendothélialisation qu'à partir des extrémités non dénudées <sup>59</sup>. La facilité à se procurer des animaux peu coûteux et à les manipuler sont aussi des avantages <sup>189</sup>. Par contre, contrairement à la dilatation répétée d'un ballon d'angioplastie de diamètre supérieur à l'artère chez l'humain, la dénudation par ballon chez le rat ne cause pas de déformations mécaniques entraînant des déchirures dans la média et les lames élastiques <sup>59</sup>. De plus, le rat est relativement résistant à l'athérogenèse <sup>189</sup>.

Ce modèle est utile pour l'étude cinétique de la réponse des CMLv à la lésion ainsi que pour l'identification des molécules impliquées dans la formation de néointima <sup>222</sup>. Dans ce modèle, la formation de néointima diffère entre les sexes et dépend de la présence d'œstrogène <sup>59</sup>. La lésion par ballon cause initialement un peu de mort cellulaire suivie entre 24 et 72 heures, par la prolifération de 15 à 25% des CMLv de la média, sous l'influence principale du bFGF relâché par les CMLv mourantes <sup>166, 201</sup>. Sous l'action du PDGF-BB, les CMLv de la média migrent ensuite dans l'intima, puis la moitié d'entre elles traverseront trois cycles de division cellulaire avant de retourner dans un état de quiescence <sup>48, 50</sup>. Les facteurs mitogéniques surexprimés dans la 2<sup>e</sup> phase de prolifération des CMLv sont le PDGF-A, le TGF- $\beta$ , l'AII et l'IGF-I <sup>174, 259, 44</sup>. Les CMLv sont observées dans la néointima à partir du 3<sup>e</sup> jour suivant la lésion, leur nombre est maximal après 2 semaines et reste relativement constant par la suite <sup>50, 48</sup>. Dans ce modèle, il est bien établi que les CMLv ayant migré et proliféré sont la composante principale de l'hyperplasie intimale <sup>48</sup>.

Des expériences de marquage à la [<sup>3</sup>H]thymidine démontrent que la prolifération des CMLv dans la média est maximale 2 jours après la lésion et 4 jours après dans la néointima <sup>48</sup>. Par ailleurs, chez des rats rendus thrombocytopéniques, aucun effet n'est remarqué au sujet de la prolifération des CMLv de la média, mais il y a une forte ré-

duction de la taille de la néointima jusqu'à 14 jours après la lésion vasculaire<sup>236, 72</sup>. De plus, l'infusion continue de PDGF-BB et de [<sup>3</sup>H]thymidine chez des rats soumis à une dénudation par boucle de nylon a entraîné une augmentation de 21 fois du nombre de cellules non marquées dans l'intima et de 4 fois celles marquées dans la média<sup>125</sup>. Ces résultats montrent que dans l'hyperplasie intimale chez le rat, le PDGF-BB augmente surtout la migration des CMLv<sup>125</sup>. Les CMLv migrent et prolifèrent seulement en réponse aux lésions importantes et non lorsque la dénudation endothéliale est restreinte, même si dans les deux cas, la surface dénudée est couverte de plaquettes<sup>213</sup>. Une explication possible est qu'en présence d'une lésion moins sévère, l'endothélium intact adjacent produit assez de glycosaminoglycans semblables à l'héparine pour inhiber la migration et la prolifération des CMLv<sup>43, 173</sup>. De plus, la prolifération et la migration des CMLv est moins importante en l'absence de relâchement de bFGF, comme dans la dénudation artérielle sans dilatation médiale<sup>163, 164</sup>.

#### 1.3.3.4 Lapin

Le lapin est très susceptible à l'athérosclérose lorsqu'il est exposé à un taux de cholestérol sanguin élevé, soit à cause d'un déficit catabolique, soit à cause de la diète<sup>189</sup>. Dans l'intima des grandes artères, la plaque renferme surtout des cellules spumeuses, mais se développe rarement jusqu'au stade avancé présentant des zones de calcification, de nécrose, de thrombose et d'ulcération<sup>189</sup>. Il est possible d'obtenir des lésions plus semblables à celles observées chez l'humain avec une diète hypercholestérolémique intermittente seule ou après une lésion par ballon, ainsi que chez les lapins Watanabe déficients pour le récepteur des LDL<sup>67, 37</sup>. La dilatation des lésions de sténose primaire cause la rupture de la néointima, l'agrégation des plaquettes en thrombus et la resténose avec la formation stable après 6 semaines, d'une lésion lâche, riche en lipides et en CMLv en prolifération<sup>139, 32</sup>. Dans ce modèle, l'inhibition de protéines chémoattractives issues des macrophages par des anticorps a permis de réduire la formation de néointima<sup>153</sup>. De plus, l'hyperplasie intimale se développe dans les 2 semaines suivant l'implantation d'un collet souple de silicone autour de la carotide<sup>29, 140</sup>. Les avantages du modèle sont que le lapin athérosclérotique est facile à manipuler et peu dispendieux, que la taille de l'artère iliaque chez l'adulte est la même que celle



des coronaires humaines et que la lésion de resténose formée est reproductible<sup>189</sup>. Par contre, cette lésion comporte trop de lipides, l'artère iliaque a plusieurs collatérales et a une grande réactivité vasculaire<sup>189</sup>.

### 1.3.3.5 Porc

De tous les modèles animaux envisagés, le porc est le plus semblable à l'humain quant à sa susceptibilité à l'athérosclérose spontanée (après 4 à 8 ans) ou induite par la diète, à sa morphologie et à la physiologie de son système cardiovasculaire<sup>189</sup>. Une diète riche en lipides entraîne rapidement des changements au bilan lipidique sanguin et une activation du système de la coagulation, qui contrairement aux primates non-humains, ne dépendent pas de l'espèce ou du sexe de l'animal<sup>189</sup>. Bien que le porc soit un animal facile à se procurer et relativement peu dispendieux, l'inconvénient majeur est qu'il grossit rapidement, entraînant des coûts et des problèmes de logistique qui sont à éviter pour les études à long terme, mais qui peuvent être contournés en utilisant des porcs miniatures<sup>189</sup>.

L'angioplastie de la carotide et de la coronaire de porc avec un ballon de diamètre plus grand que l'artère entraîne une dénudation endothéliale complète, la formation d'un thrombus, la dissection de la LEI et la nécrose des CMLv de la média<sup>242</sup>. L'hyperplasie intimale est maximale 14 jours après la lésion. L'implantation d'une endoprothèse vasculaire dans les coronaires induit une lésion chronique caractérisée par une hyperplasie intimale très similaire aux lésions de resténose humaine<sup>221</sup>. Le modèle de resténose coronarienne à la suite d'une double PTCA chez le porc hypercholestérolémique ressemble à la situation humaine puisque la 2<sup>e</sup> angioplastie est réalisée sur une lésion existante, en présence d'un taux élevé de cholestérol plasmatique et dans un cadre chirurgical clinique permettant de mesurer le diamètre de la lumière vasculaire avant et après PTCA<sup>24</sup>. Comme chez l'humain, la formation d'un thrombus riche en plaquettes et en fibrine contribue de façon importante au développement de la néointima qui contient des CMLv, de la MEC et des lipides<sup>59, 189</sup>. Il a aussi été démontré que lors de la formation de la lésion, la mort cellulaire est en équilibre avec la prolifération, mais plus tard, l'apoptose des macrophages et des CMLv est visible dans les régions nécrotiques riches en lipides<sup>253</sup>. Également, la transfection

d'un plasmide codant pour le PDGF-B a induit la prolifération, la migration et la synthèse de MEC par les CMLv et a mené à la formation de néointima dans les artères <sup>193, 205</sup>.

### 1.3.3.6 Primate non-humain

Ce modèle reflète bien la situation humaine par son anatomie vasculaire, ses mécanismes d'homéostasie, sa propension à la formation de thrombus et le développement de lésions d'athérosclérose spontanées <sup>189</sup>. La nature exacte et l'étendue des plaques d'athérosclérose et de la réponse proliférative à la suite d'une lésion dépendent en partie de l'espèce et de la diète de l'animal, ce qui limite l'interpolation avec la situation humaine <sup>189</sup>. De plus, ces animaux sont dispendieux, très susceptibles à plusieurs maladies, difficiles à manipuler et à se procurer <sup>189</sup>. Bien que le babouin ne développe pas d'athérosclérose normalement, l'angioplastie ou l'endartérectomie induit une hyperplasie intimale importante qui ressemble beaucoup à celle causée par la mise en place d'une endoprothèse vasculaire chez l'humain et plusieurs études de prévention de la resténose ont été réalisées chez cet animal <sup>104</sup>.

### 1.3.4 Expression du facteur de croissance dérivé des plaquettes et de son récepteur dans les lésions vasculaires

Bien que les plaquettes recrutées au site d'une lésion vasculaire constituent la source primaire de PDGF-BB, les CMLv, les macrophages et l'endothélium en régénération produisent également ce facteur de façon continue <sup>208</sup>. Dans les lésions d'athérosclérose, 20 à 25% des macrophages expriment le PDGF-BB <sup>208</sup>. Des études d'immunohistochimie et d'hybridation *in situ* y ont également révélé la présence de PDGF-A et B, ainsi que de PDGFR- $\beta$  du 6<sup>e</sup> au 56<sup>e</sup> jours suivant la PTCA et l'absence des protéines et des ARNm aux sites non lésés <sup>256, 247</sup>. Dans les tissus prélevés d'endartérectomie carotidienne, les CMLv de l'intima et les CE expriment le PDGF-A et B <sup>208</sup>. Dans la carotide de rat 8 heures après la dénudation par ballon, les CE aux limites de la lésion commencent à exprimer le PDGF-B, après plusieurs jours, le PDGF-B est exprimé par la bordure de CE en migration et après 6 semaines, bien que la prolifération cellulaire ait cessé, l'ARNm du PDGF-B est toujours exprimé dans la zone dénudée <sup>165</sup>.

Plusieurs études ont rapporté que l'expression du PDGFR- $\beta$  est minimale dans les CMLv quiescentes des vaisseaux natifs, chute après 24 heures de lésion et augmente considérablement dans les deux semaines suivantes, surtout dans l'intima <sup>175</sup>. L'expression du PDGFR- $\beta$  est fortement augmentée dans les carotides de rat dénudées, les coronaires de porc et d'humain après angioplastie, l'hyperplasie intimale associée à la maladie des greffons chez le babouin et l'humain ainsi que la plaque athérosclérotique induite ou retrouvée naturellement chez l'animal et l'humain <sup>175, 267, 247, 149</sup>. Le PDGFR- $\alpha$  et - $\beta$  n'ont pas été détectés par immunohistochimie dans les artères normales de babouin, mais une faible expression basale du PDGFR- $\alpha$  dans la média de la carotide de rat a été rapportée <sup>89, 149, 203, 235</sup>. De plus, l'activité du PDGFR- $\beta$  augmente dans les jours suivant la lésion et persiste plusieurs semaines <sup>1, 203</sup>.

### 1.3.5 Réendothélialisation

À la suite d'une PTCA, la réparation endothéliale est axiale, les CE se régénérant plus vite dans la direction parallèle au flot sanguin que perpendiculairement <sup>64</sup>. La zone de CE en prolifération s'étendrait à près de 100 cellules en amont du site de lésion <sup>64</sup>. Le mécanisme de réendothélialisation est complexe et débute 2 à 4 heures après la dénudation, avec l'étalement des CE et leur migration. La synthèse d'ADN débute après 12 à 16 heures, mais n'est pas essentielle à leur migration <sup>42</sup>. La réendothélialisation est incomplète et cesse environ 6 semaines après une lésion importante de la carotide ou l'aorte de rat ou de lapin, mais elle peut être restimulée par l'administration de bFGF <sup>212, 163</sup>. La raison précise de l'arrêt de la croissance des CE avant la réendothélialisation complète est inconnue, mais le TGF- $\beta$  réduirait leur migration en augmentant l'expression de fibronectine, principale molécule d'adhésion à la MEC <sup>171</sup>. L'utilisation d'une boucle de fil de nylon pour dénuder l'endothélium en minimisant le traumatisme sur la média a démontré que la réendothélialisation incomplète dépendrait de la sévérité de la lésion plutôt que de la taille de la région dénudée <sup>71, 164</sup>. Ce type d'agression vasculaire se réendothélialisait complètement en 10 semaines et l'hyperplasie intimale n'était visible que dans les zones requérant plus de 7 jours pour se réendothélialiser <sup>71</sup>. La raison est qu'après dénudation par boucle de nylon, les CE

continuent à synthétiser du bFGF qui stimule leur réplication, tandis qu'après passage du ballon cathéter, elles cessent d'en produire pour les 4 premières semaines <sup>71</sup>.

Le « vascular endothelial growth factor » (VEGF) est une glycoprotéine mitogène pour les CE qui a un effet angiogénique *in vivo*. Le VEGF est exprimé par les myocytes et les CMLv en conditions d'ischémie et d'hypoxie et pourrait être surexprimé à la suite d'une angioplastie <sup>11,34</sup>. Dans la carotide de rat dénudé par ballon, un traitement local de 30 minutes avec la protéine recombinante VEGF<sub>165</sub> a augmenté de 50% l'endothélialisation finale à un mois, la lumière vasculaire était plus grande et l'hyperplasie intimale était réduite <sup>8</sup>. Des effets similaires chez le lapin ont été rapporté lors d'un traitement bihebdomadaire intraveineux <sup>39</sup>. Également, la transfection du gène « endothelial cell constitutive nitric oxide synthase » (ecNOS) a rétabli la relaxation de l'artère dénudée et a réduit de 70% la formation de néointima 14 jours après la dénudation par ballon de la carotide de lapin <sup>260</sup>. La réduction de la sténose due à la réendothélialisation serait en partie attribuable au relâchement par les CE de NO et de PGI<sub>2</sub> qui inhibent la prolifération des CMLv <sup>224</sup>. Une autre étude a rapporté qu'à la suite d'une lésion coronarienne chez le porc, les portions réendothélialisées du vaisseau développaient plus de néointima, avaient des réponses vasoconstrictrices à l'acétylcholine (ACh) et à la thrombine et étaient thrombogéniques <sup>231</sup>. Les effets négatifs du nouvel endothélium pourraient être dus à une production accrue de facteurs mitogéniques pour les CMLv et une synthèse réduite d'héparine et de NO <sup>42</sup>.

## 1.4 Approches utilisées pour réduire la resténose

Après plus de 20 ans d'utilisation de la PTCA et une soixantaine d'études cliniques majeures randomisées, très peu d'agents pharmacologiques se sont avérés efficaces pour empêcher de façon substantielle le développement de la resténose, ce qui reflète notre mauvaise compréhension de la pathologie (Tableaux I et II) <sup>76</sup>. Les thérapies combinant plusieurs agents pourraient s'avérer bénéfiques car plus d'un mécanisme semble être impliqué. Plusieurs agents qui ont échoué lors des études cliniques étaient efficaces chez l'animal (héparine, bloqueurs des canaux calciques, agents antiplaquet-taires et IECA), mais certains à des doses de 10 à 40 fois supérieures à celles attei-

gnables dans les coronaires humaines à cause de leur toxicité par voie systémique<sup>76</sup>. Les doses d'IECA qui réduisaient l'hyperplasie intimale chez le rat n'ont pas été efficaces chez le lapin, le porc, le babouin et l'humain<sup>116, 58, 206, 226, 101</sup>. Les périodes de prétraitement nécessaires à l'atteinte du niveau thérapeutique lors de l'angioplastie sont souvent inadéquates chez l'humain, comme pour les IECA, l'aspirine, l'héparine de faible poids moléculaire et la warfarine<sup>153, 156</sup>. Dans cette optique, des techniques de livraison des agents au site de la lésion vasculaire permettent d'atteindre des concentrations élevées avec des effets secondaires minimaux<sup>66</sup>. Cette voie récente d'administration réduit également les problèmes de faible biodisponibilité, d'élimination rapide et de dégradation par les protéases<sup>153</sup>. Une foule de cathéters et de matrices à relâchement graduel ont été développées et il a été démontré que les composés hydrophobes livrés localement résident plus longtemps dans la paroi vasculaire que les composés hydrophiles<sup>74</sup>.

Les cathéters de radiothérapie  $\beta$  et  $\gamma$  ainsi que les endoprothèses vasculaires radioactives se sont montrés efficaces chez les animaux pour réduire la formation de néointima et la densité cellulaire, probablement via l'induction de nécrose et d'apoptose<sup>106, 254</sup>. Cette approche nommée brachythérapie endovasculaire, est déjà employée chez l'humain, mais on n'en connaît pas bien les effets à long terme qui dépendent beaucoup de la dose et de la nature des isotopes utilisés<sup>249, 142</sup>. L'apoptose des CMLv prédisposerait la plaque athérosclérotique à la rupture et entraînerait la thrombose, tandis que l'apoptose des macrophages infiltrés dans la plaque éliminerait des cellules potentiellement dangereuses, ce qui stabiliserait la plaque<sup>19</sup>. L'apoptose des CMLv et des CE pourrait aussi provoquer la thrombose intravasculaire en exposant des sites activateurs de la thrombine<sup>75, 27</sup>.

Notons enfin que les artères utilisées dans les petits modèles animaux sont habituellement l'aorte, les carotides et les artères iliaques saines et hautement élastiques, alors que les coronaires humaines sont plus musculaires et présentent déjà des lésions athérosclérotiques compliquées<sup>59</sup>. Le contenu en élastine des coronaires de porc, de babouin et d'humain est très semblable<sup>189</sup>. De plus chez le rat et le lapin, l'espace sous-endothélial ne contient pas de CMLv, contrairement aux plus gros animaux et à

l'humain <sup>189</sup>. Bien que les modèles de resténose chez le lapin ou de sténose chez le rat reflètent moins la situation humaine, ils demeurent fort utiles, simples et moins coûteux pour tester un nouveau composé *in vivo* <sup>24</sup>.

**Tableau I: Agents antiplaquettaires et antithrombotiques n'ayant pas réduit la resténose lors des études cliniques**

Nom de l'agent	Mécanisme moléculaire ciblé
Aspirine, vapiprost, S-1452, solutroban	Inhibiteurs et antagonistes de la voie cyclooxygénase et du TxA <sub>2</sub> <sup>156, 153</sup> .
Dypiridamole	Vasodilatation et antagonisme des plaquettes via la potentialisation de la relâche et de l'action de la PGI <sub>2</sub> et effet sur le métabolisme de l'adénosine <sup>153</sup> .
Prostacycline et analogues (ciprostone, beraprost)	Vasodilatateur issu des CE, bloque l'agrégation plaquettaire <sup>156, 153</sup> .
Huiles de poisson (acides gras omega-3, acide eicosapentaénoïque, Maxepa)	Interfèrent dans le métabolisme de l'acide arachidonique, diminuent l'agrégation plaquettaire, propriétés anti-inflammatoires et antiprolifératives <sup>156, 153</sup> .
Ticlopidine	Antithrombotique, inhibition du vWF plaquettaire et du récepteur du fibrinogène sur les plaquettes <sup>156, 153</sup> .
Dextran	Antagonise l'interaction du facteur VII avec le vWF <sup>153</sup> .
Héparine totale et fractionnée (enoxaparine, reviparine, dalteparine, fraxiparine)	Antithrombotique (potentialise l'antithrombine III) effet antiprolifératif sur les CMLv en bloquant leur entrée en phase S <sup>156, 153</sup> .
Antithrombine III exogène et antagonistes directs de la thrombine (hirudine, hirulog, antistatine)	Inhibe les effets de la thrombine sur l'agrégation plaquettaire et la prolifération des CMLv <sup>156, 153</sup> .
Antagonistes de la vitamine K (warfarine)	Réduit la formation des facteurs de coagulation II, VII, IX et X <sup>153</sup> .
Antagonistes spécifiques du récepteur GpIIb/IIIa (intégreline, tirofiban, peptides RGD et KCD)	Intégrine GpIIb/IIIa ( $\alpha_2\beta_3$ ) impliquée dans la liaison du vWF, du fibrinogène, de la fibronectine et du collagène, essentielle à l'agrégation plaquettaire <sup>156, 153</sup> .

**Tableau II: Autres approches pharmacologiques n'ayant pas réduit la resténose lors des études cliniques**

Nom de l'agent	Mécanisme moléculaire ciblé
Stéroïdes (prednisone, méthylprednisolone)	Inhibition à court terme de la composante inflammatoire dans la réponse à la lésion vasculaire <sup>153</sup> .
Antagonistes des hormones hypophysaires (angiopeptine, octréotide)	Analogues de la somatostatine, réduction de la sécrétion de l'hormone de croissance et de l'IGF-1 <sup>156, 153</sup> .
Antagonistes de la sérotonine (kétansérine)	Antagoniste des récepteurs S <sub>2</sub> , inhibition de la vasoconstriction, des effets mitogéniques sur les CMLv et de l'activation plaquettaire <sup>153</sup> .
IECA (cilazapril, captopril, fosinopril, enalapril)	Inhibition des effets mitogéniques et chémoattractants de l'AII, augmentation du taux de bradykinine et de NO, vasodilatation <sup>153</sup> .
Antagonistes des récepteurs de l'AII	Inhibition des effets mitogéniques et chémoattractants de l'AII <sup>153</sup> .
Inhibiteurs des microtubules (colchicine, taxol, etoposide, vincristine, dactinomycine, cyclosporine, azathioprine, methotrexate)	Inhibition de la division et de la migration des CMLv et des leucocytes, antinéoplasique par l'interférence dans la formation du fuseau mitotique et des microtubules <sup>156, 153</sup> .
Inhibiteurs de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A réductase (lovastatin, pravastatin, fluvastatin)	Inhibition de la prolifération des CMLv et du cholestérol sanguin, restauration des fonctions endothéliales, réduction agrégation plaquettaire <sup>156, 153</sup> .
Antagonistes des canaux calciques (diltiazem, verapamil, nifedipine)	Réduction des vasospasmes, de la demande en O <sub>2</sub> du myocarde, des effets mitogéniques et chémoattractants des facteurs de croissance sur les CMLv <sup>156, 153</sup> .

**Tableau III: Approches pharmacologiques bénéfiques dans la réduction de la resténose clinique**

Nom de l'agent	Mécanisme moléculaire ciblé
Aphérèse des LDL	Réduction des taux plasmatiques de lipoprotéine A et de LDL-cholestérol <sup>153</sup> .
Probucol	Réduction du cholestérol sanguin et propriétés antioxydantes <sup>153</sup> .
Vitamines antioxydantes E et C	Augmentation de l'aire totale du vaisseau suggérant un remodelage positif <sup>153</sup> .
Antagonistes non spécifiques du récepteur GpIIb/IIIa (c7E3 fab, abciximab)	Inhibition de l'intégrine GpIIb/IIIa ( $\alpha_2\beta_3$ ) essentielle à l'agrégation plaquettaire, favorise la passivation vasculaire, propriétés antiprolifératives, inhibition de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (récepteur de la vitronectine) <sup>156, 153</sup> .
Anti-inflammatoires non stéroïdiens (ebselen, sulfinpyrazone)	Inhibition compétitive de l'activité cyclooxygénase plaquettaire <sup>153</sup> .
Antagonistes du PDGF (traniast, trapidil, anticorps contre le PDGF-BB ou le PDGFR- $\beta$ , inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase du PDGFR- $\beta$ )	Blocage de l'effet chémoattractant et mitogénique des isoformes du PDGF sur les CMLv, le trapidil a aussi un effet inhibiteur de TxA <sub>2</sub> et le tranilast est un antiallergique <sup>156, 153</sup> .  * certains composés n'ont pas encore été testés cliniquement
Donneurs d'oxyde nitrique (L-arginine, albumine nitrosatée, linsidomine, molsidomine)	Vasodilatation locale, inhibition de la prolifération et de la migration des CMLv, réduction de l'adhésion des cellules inflammatoires et des plaquettes, la livraison locale est plus efficace à cause de la courte demi-vie du NO <sup>156, 153, 59</sup> .



**Tableau IV: Approches pharmacologiques prometteuses chez l'animal, mais non testées cliniquement**

Nom de l'agent	Mécanisme moléculaire ciblé
Toxines chimériques recombinantes	Chimère constituée d'une toxine et d'un ligand, sélectivement internalisée par les cellules exprimant le récepteur au ligand choisi <sup>153</sup> .
Oligonucléotides antisens (c-myb, PCNA, myosine non-musculaire, cdk, PDGFR- $\beta$ )	Blocage de l'expression de gènes de courtes séquences d'ADN s'hybridant avec l'ARNm ciblé pour empêcher sa traduction <sup>153, 190, 235</sup> .
Thérapie génique (thymidine kinase, eNOS, gène rétinoblastome et suppresseurs de tumeurs)	Livraison <i>in vivo</i> au moyen d'un vecteur d'un gène fonctionnel dans les cellules somatiques en vue de guérir une maladie <sup>153, 190</sup> .
Activateur tissulaire du plasminogène, urokinase	Agents thrombolytiques <sup>153</sup> .
Photochimiothérapie (8-méthoxypsoralen, acide 5-amino laevulinique)	L'activation par les rayons UVA ou par un laser rouge crée des ponts dans l'ADN et bloque la réplication <sup>126, 153</sup> .
Oestrogène	Réduction du risque d'athérosclérose et effet anti-prolifératif <sup>59, 153</sup> .
Antagonistes de l'adhésion des leucocytes aux CE (anticorps anti CD11/CD18)	Anticorps monoclonaux inhibant le complexe d'adhésion leucocytaire CD11/CD18 et réduisant la prolifération néointimale <sup>153</sup> .
Prazosin, urapidil, carvedilol	Antagonistes des récepteurs $\alpha/\beta$ -adrénergiques <sup>153</sup> .
Cilostamide	Inhibiteur sélectif de la phosphodiesterase 3 des nucléotides cycliques, qui inhibe la synthèse d'ADN et augmente les taux d'AMPc <sup>118</sup> .
Thiazolidinediones (troglitazone)	Activateur du « peroxisome proliferator-activated receptor-gamma » qui inhibe la prolifération et la migration des CMLv <sup>155</sup> .
Suramin	Inhibe la prolifération des CMLv <sup>62</sup> .
Cytochalasin B	Inhibe la polymérisation de l'actine et le remodelage vasculaire négatif <sup>157</sup> .

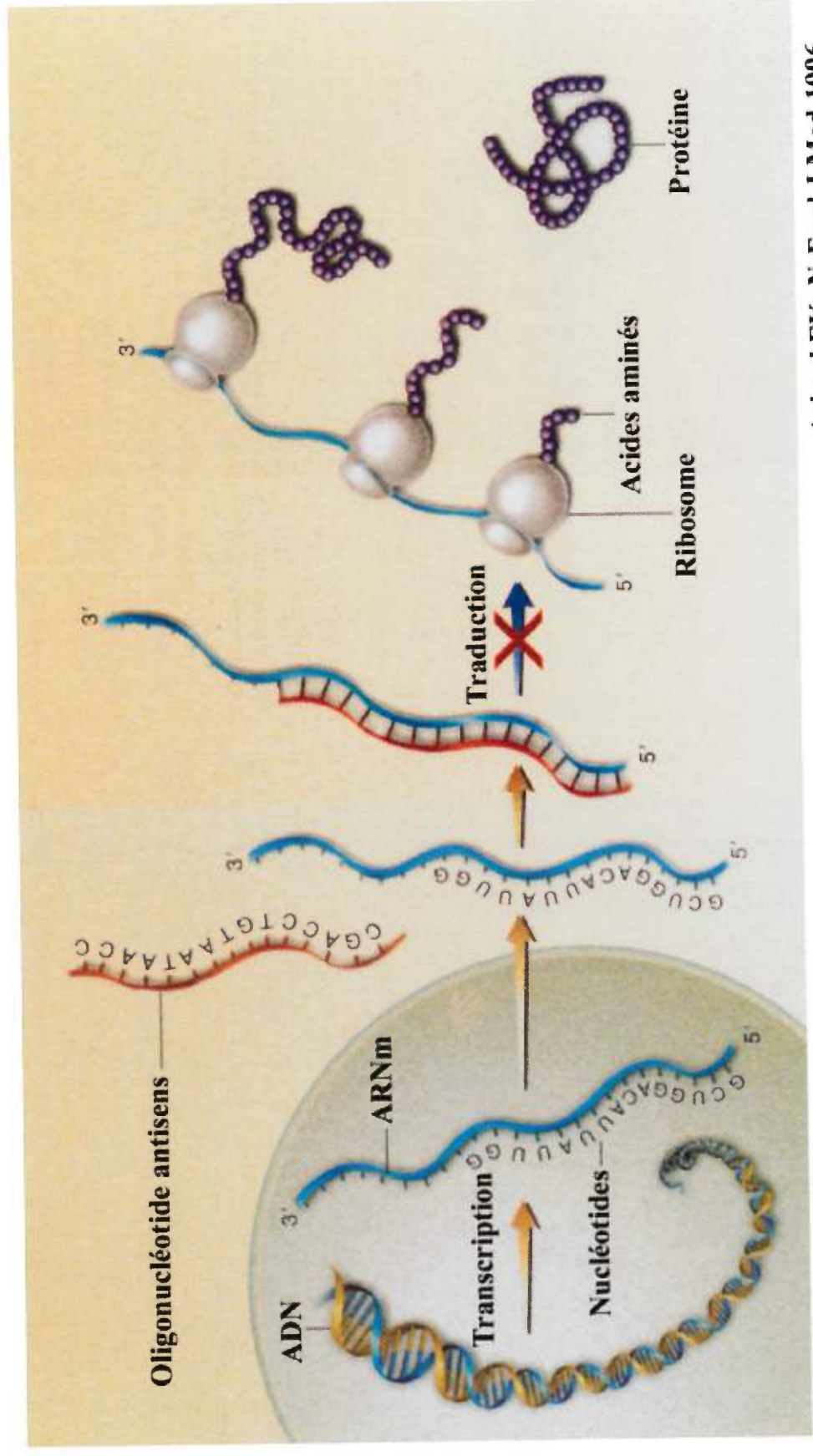
## 1.5 Thérapie génique

### 1.5.1 Transfert de gènes

Le transfert de gènes consiste en la livraison *in vivo* au moyen d'un vecteur, d'un gène fonctionnel dans les cellules somatiques en vue de guérir une maladie. Les gènes ciblés dans la resténose incluent des facteurs de croissance et leurs récepteurs, des composantes de la transduction du signal vers la vasodilatation, des agents antiplaquettaires, antithrombotiques, antiprolifératifs ou suppresseurs de tumeurs. Empêcher la progression dans le cycle cellulaire par la surexpression de gènes suppresseurs de tumeurs comme p53, p21 et p27 ou d'une forme non phosphorylable du gène rétinoblastome a permis de réduire le développement de l'hyperplasie intinale chez le rat et le porc à la suite d'une lésion par ballon <sup>45, 45</sup>.

### 1.5.2 Régulation à la baisse de gènes par oligonucléotide antisens

Les étapes menant à la synthèse protéique à partir de l'ADN sont multiples : déroulement de la double hélice d'ADN, transcription en ARN, exportation de l'ARN vers le cytoplasme, épissage de l'ARN et initiation de la traduction de l'ARNm par les ribosomes. Toutes ces étapes peuvent être bloquées en utilisant un AS, un ARNm antisens, un ribozyme (molécule d'ARN avec activité autocatalytique) ou en insérant une section d'ADN pour former une triple hélice et ainsi empêcher la transcription de l'ADN <sup>17</sup>. L'approche la plus étudiée est celle de l'AS qui est une courte séquence d'ADN ou d'ARN complémentaire à un ARNm spécifique avec lequel il formera un dimère hybride (Figure 7) <sup>17</sup>. La majorité des effets de l'AS serait attribuable à la RNase H, qui reconnaît l'hybride anormal et clive spécifiquement l'ARNm ciblé en libérant l'AS intact (Figure 7) <sup>17</sup>. Cette nucléase est présente dans les cellules de mammifères et reconnaît spécifiquement les dimères ADN-ARN <sup>17</sup>. L'AS peut également empêcher, par la liaison à sa cible, la maturation de l'ARN, son exportation à l'extérieur du noyau et exercer une interférence stérique lors de la liaison du ribosome pour la traduction de l'ARNm en protéines <sup>17</sup>.



Askari FK. N Engl J Med 1996

Figure 7: Mécanisme d'action des oligonucléotides antisens au niveau cellulaire.

L'utilisation d'un AS pour réduire l'expression d'un gène comporte divers avantages:

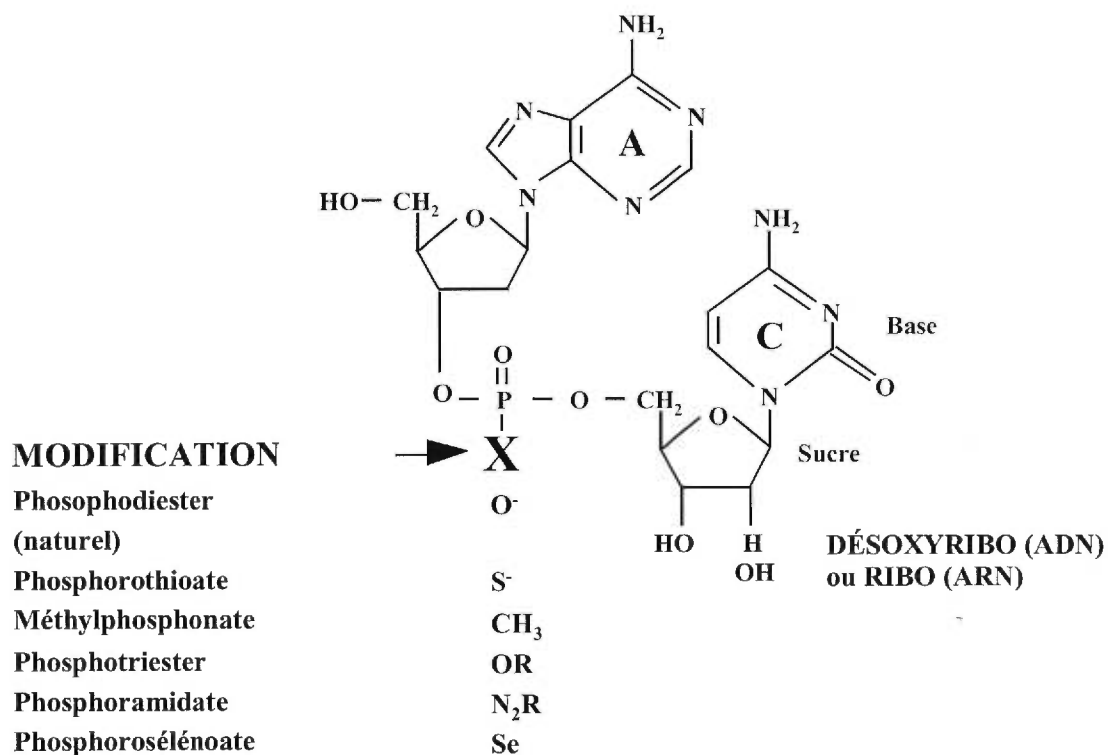
- Le design d'un agent spécifique pour sa cible grâce à l'appariement des bases azotées selon la loi de Watson-Crick qui permet aux oligonucléotides de distinguer des ARNm qui ne diffèrent que par une ou deux bases<sup>113, 18</sup>. Cette spécificité de l'AS est supérieure à celle des inhibiteurs pharmacologiques conventionnels qui agissent fréquemment sur une variété de protéines<sup>17</sup>.
- Le design et la synthèse d'un AS dirigé contre un ARNm précis sont plus faciles et plus rapides, comparativement aux autres classes d'agents pharmacologiques, puisque la séquence cible est connue<sup>17</sup>.
- Si l'administration de l'AS est faite correctement, ses effets seront très localisés. Les nucléotides sont internalisés par les cellules et ceux qui restent dans le milieu extracellulaire sont rapidement dégradés par les nucléases présentes dans le sérum<sup>17</sup>.

Les critères pour choisir le gène ciblé par l'AS sont les suivants :<sup>17, 204, :</sup>

- La protéine ciblée doit jouer un rôle unique et essentiel pour la cellule afin que l'inhibition de son expression ne puisse être compensée par une autre protéine.
- La suppression constante de l'expression de la protéine ciblée ne doit pas être nécessaire à l'observation d'un effet biologique. Il est plus efficace de choisir une cible dont une seule réduction du niveau protéique donne des effets irréversibles.
- La séquence exacte de l'ARNm ciblé doit être connue et celle de l'AS doit être spécifique et unique.
- Pour plus d'efficacité de l'AS, l'ARNm choisi doit être de faible abondance, être fréquemment transcrit et produire une protéine stable.
- L'AS ou son vecteur ne doit pas induire de réponse immunitaire ou inflammatoire et il doit être stable *in vivo*, autant au niveau intracellulaire, qu'extracellulaire.

- L'AS doit pouvoir pénétrer dans les cellules et se lier à sa séquence cible avec une haute affinité, à une concentration qui n'a pas d'effets toxiques.
- On doit pouvoir démontrer que les niveaux de l'ARNm ciblé et plus particulièrement de la protéine qu'il code, sont réduits par l'AS, sans affecter les autres protéines et les lipides.
- L'oligonucléotide doit être assez long pour reconnaître une séquence portée uniquement sur l'ARNm cible, mais pas trop long afin d'éviter la liaison à plusieurs ARNm et protéines de façon non-spécifique. Les oligonucléotides utilisés comprennent habituellement entre 15 et 20 bases. Il faut éviter d'avoir une séquence contenant 4 G consécutifs qui favorise les liaisons non-spécifiques de l'oligonucléotide.
- La séquence ciblée sur l'ARNm doit comporter très peu d'éléments de structure secondaire afin que l'AS puisse s'y hybrider facilement. Pour cette raison, les AS ciblant la région du codon d'initiation de la traduction sont souvent plus efficaces.
- L'AS doit être efficace lorsque l'on compare ses effets avec ceux d'un oligonucléotide sens et d'une séquence aléatoire.

Un facteur limitant l'efficacité de l'AS est sa grande susceptibilité à la dégradation par des nucléases intracellulaires et circulantes. Un oligodésoxyribonucléotide (ADN) est plus résistant qu'un oligoribonucléotide (ARN) et des modifications chimiques à la structure de l'AS peuvent augmenter sa demi-vie, comme le remplacement d'un oxygène sur un groupement phosphate entre deux bases azotées, par un groupe méthyle (CH<sub>3</sub>) (Figure 8). De ces modifications, la plus utilisée actuellement pour les agents potentiellement thérapeutiques, est le squelette phosphorothioate qui augmente la demi-vie de l'AS de 10 à 100 fois <sup>17</sup>.



**Figure 8: Structure des oligonucléotides antisens.**

Autant chez l'animal que chez l'humain, des études pharmacocinétiques révèlent qu'un oligonucléotide antisens phosphorothioate (ASP) administré par voie parentérale aura une absorption rapide et complète, une demi-vie sérique de 9 heures, une distribution tissulaire large entre 10 et 60 minutes et sera excrété intact ou modifié selon le cas, majoritairement via l'urine, avec un temps d'élimination variant entre 20 et 60 heures<sup>5, 204, 54</sup>. L'analyse pathologique des souris, rats et singes ayant reçu des ASP montre une accumulation rapide et importante dans le foie et le rein, moyenne dans l'estomac, l'intestin, le cœur, la peau, la rate, la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques, le tissu adipeux et musculaire, mais très faible dans le cerveau et le testicule, notamment à cause des barrières hématologiques de ces organes<sup>5, 53</sup>.

Bien que les ASP soient relativement stables face aux nucléases, la voie métabolique principale qu'ils empruntent reste la dégradation par les endonucléases, mais surtout les exonucléases<sup>54</sup>. Chez l'animal comme l'humain, le taux de dégradation plasmatique est supérieur à celui du tissu et consisterait surtout en une activité exonucléase en 3' de l'ASP<sup>250</sup>. Le foie et le rein éliminent rapidement les ASP en les conjuguant à

l'acide glucuronique, mais surtout en les dégradant en 3' et en 5' <sup>250</sup>. La stabilité in vivo, la clairance plasmatique, la distribution tissulaire et l'élimination des ASP dépendent de la séquence, surtout s'il y a possibilité de former une structure secondaire à l'une des extrémités de l'oligonucléotide qui en augmente la demi-vie et en ralentit la dégradation <sup>4</sup>.

Chez la souris, la dose d'ASP causant 50% de mortalité dépasse 500mg/kg <sup>54</sup>. Chez les rongeurs, les effets toxiques observés à fortes doses (>20mg/kg) sont une stimulation du système immunitaire se manifestant par une hyperplasie du tissu lymphoïde et de la rate, ainsi que par une infiltration cellulaire dans plusieurs organes, dont le foie et le rein <sup>107, 109</sup>. L'administration chronique d'ASP cause plus de toxicité, probablement à cause de la relâche de cytokines <sup>107</sup>. Des augmentations légères des enzymes hépatiques et une faible thrombocytopénie ont également été rapportées pour des doses dépassant 100mg/kg <sup>107</sup>.

Par ailleurs, le profil toxicologique chez le singe ne semble pas lié à la séquence, mais plutôt à la nature polyanionique des ASP <sup>80, 228</sup>. L'effet secondaire le plus important est une hypotension sporadique associée à une bradycardie et à l'activation du système du complément <sup>54</sup>. De plus, des troubles de coagulation dépendants de la dose ont été rapportés chez le primate non-humain et l'humain <sup>80, 108, 228</sup>. Dans le but d'augmenter la stabilité, la biodisponibilité orale, l'affinité pour la séquence ciblée et l'activation de la RNase H, ainsi que de réduire les effets secondaires associés aux ASP, des oligonucléotides de 2<sup>e</sup> génération contenant des liaisons phosphorothioates et phosphodiester dans les segments 2'-O-méthylribonucléosides sont en développement <sup>54, 204</sup>.

Puisque les AS font en moyenne de 4, 5 à 9kDa et que ce sont des polyanions, ils ne peuvent traverser librement la membrane plasmique. Leur incorporation dépend de la structure chimique, de la concentration et de la température, puisque cette étape requiert de l'énergie et est saturable dans le temps <sup>279, 17</sup>. Des études suggèrent que l'endocytose des oligonucléotides phosphodiester et phosphorothioate est accomplie par deux protéines de surface membranaire de 34 et 80kDa <sup>168, 270</sup>, et que des « scavengers receptors » et le récepteur à la transferrine seraient également impliqués <sup>22, 190</sup>. Une évidence directe de l'incorporation des AS par la cellule et de la présence

de dimères ARN-oligonucléotide a été obtenue par l'analyse de la nucléase S1, par fluorescence, par marquage radioactif et par immunohistochimie <sup>17,54</sup>.

L'incorporation des oligonucléotides phosphodiesters ou modifiés chimiquement demeure un processus qui peut être difficile, c'est pourquoi l'utilisation de liposomes (particules de lipides masquant les charges négatives sur les oligonucléotides) ou d'un système de transport viral comme le virus hémagglutinant du Japon (pouvant se fusionner directement avec la membrane plasmique et relâcher l'oligonucléotide dans le cytoplasme) a été étudiée <sup>17</sup>. De plus, notons que l'incorporation efficace des AS est réalisable au moyen d'un vecteur rétroviral seulement dans les cellules en division active, tandis que les adénovirus ont la capacité d'infecter plusieurs types cellulaires, mais qu'ils induisent une réponse inflammatoire <sup>204</sup>. Le virus associé aux adénovirus est un vecteur plus récent qui intègre efficacement et de façon spécifique le matériel génétique transporté dans le génome de l'hôte et il n'est pas pathogène, ce qui en fait un candidat intéressant lorsque la suppression à long terme d'un gène est souhaitable <sup>204</sup>. Dans la prévention de la resténose, l'administration des AS dans la paroi artérielle a été réalisée soit par transfection directe, soit par des complexes liposomes-virus hémagglutinant du Japon <sup>17</sup>. L'administration locale d'un AS dans une matrice à relâchement progressif déposée autour de la carotide de rat permet de réduire les taux de l'ARNm et de la protéine ciblés <sup>18, 235</sup>. La livraison intraluminale de l'AS avec interruption temporaire du flot sanguin est efficace dans la carotide de rat et la coronaire de porc, car la persistance de l'AS dans la paroi artérielle est observée jusqu'à 2 semaines après la lésion <sup>188, 187, 229</sup>.

Les effets biologiques des AS dépendent en partie de la localisation de la séquence sens contre laquelle ils sont dirigés. Par exemple, des AS dirigés contre ou près de l'extrémité 5' du site d'initiation de la transcription de l'ARNm empêchent fortement l'expression protéique, mais le déplacement à quelques paires de bases plus loin sur la séquence cible peut changer de façon importante l'efficacité de l'AS <sup>57, 239</sup>. Ceci s'expliquerait par une structure secondaire de l'ARNm près du site d'initiation de la transcription qui favoriserait l'hybridation de l'AS et qui serait aussi plus efficace pour empêcher la transcription par les ribosomes <sup>147, 124</sup>.



Des études ont également montré que certains AS pouvaient exercer leur effet bénéfique par des liaisons non-spécifiques à des ARNm non ciblés ou à des protéines intracellulaires<sup>269, 38</sup>. Les AS pourraient aussi inhiber la prolifération cellulaire via l'induction d'interféron  $\gamma$  ou l'inhibition du « heparin-like growth factor »<sup>258, 102</sup>. Plusieurs études ont observé que l'AS *c-myc* inhibait la prolifération et la migration des CMLv en culture, ainsi que la formation de néointima dans un modèle de carotide de rat et de coronaire de porc<sup>229, 18</sup>. Certaines études ont soulevé que l'activité antiproliférative des AS contre *c-myb* et *c-myc* résulterait d'un autre mécanisme que l'hybridation avec la cible selon l'appariement des paires de bases complémentaires<sup>38, 98</sup>. Dans une étude, l'AS *c-myc* administré de façon périadventicielle après une lésion de la carotide de rat, n'a pas eu d'effet sur la prolifération des CMLv, mais a permis de réduire l'aire de la néointima, le ratio des aires intima/média et d'augmenter la lumière vasculaire et le nombre de CMLv dans la média comparativement aux vaisseaux témoins<sup>21</sup>. Ces résultats suggèrent que le mécanisme d'action de cet AS sur le développement de l'hyperplasie intimale, serait de réduire la migration des CMLv, ce qui reflète des résultats obtenus *in vitro* montrant que l'action antimigratoire de l'AS *c-myc* est beaucoup plus importante que son action antiproliférative<sup>21, 25</sup>.

De plus, les oligonucléotides contenant 4 résidus guanosines consécutifs, comme celui utilisé contre *c-myc*, pourraient se lier au bFGF, aFGF, PDGF et VEGF sériques, ce qui réduirait l'interaction de ces facteurs avec leurs récepteurs ainsi que la transmission intracellulaire du signal menant à l'expression de protéines impliquées dans le cycle cellulaire comme *c-myc* et *c-myb*<sup>38, 98</sup>. Par contre, d'autres études ont montré *in vitro* et *in vivo* que les AS dépourvus de ces séquences de guanosines répétées avaient des effets spécifiques sur des protéines comme cdc2, cdk2, la myosine non-musculaire, le PCNA et le PDGFR- $\beta$ <sup>187, 233, 234, 235</sup>. De plus, la combinaison de deux AS différents comme cdc2 avec PCNA ou cdk2, semble augmenter l'efficacité du traitement<sup>188, 2</sup>. Les premières études cliniques bien contrôlées semblent montrer que les ASP agiraient via un mécanisme antisens dans diverses pathologies infectieuses, immunitaires ou cancéreuses<sup>55</sup>.

Par ailleurs, les ASP peuvent se lier de façon non-spécifique à l'albumine et à l' $\alpha_2$ -macroglobuline sériques avec une faible affinité (200-400  $\mu$ M), comparable à celle de l'aspirine ou de la pénicilline pour ces protéines, ce qui empêcherait l'excrétion rénale trop rapide des oligonucléotides et constituerait un réservoir potentiel<sup>54, 241</sup>. Des questions ont été soulevées quant à la livraison intravasculaire au site de la lésion chez l'humain atteint d'athérosclérose. On ignore encore dans quelle proportion la plaque athérosclérotique incorporera les AS comparativement aux modèles animaux avec artères saines et pendant combien de temps les AS devront être présents chez l'humain afin d'avoir des effets bénéfiques pour la prévention de la resténose<sup>17</sup>.

## **1.6 Approches thérapeutiques pour prévenir la resténose ciblant plus spécifiquement les facteurs plaquettaires ou leurs récepteurs**

Diverses études montrent l'importance des plaquettes et plus particulièrement du PDGF dans la réponse vasculaire à une lésion ainsi que le potentiel de l'interférence pharmacologique avec les facteurs plaquettaires. Par contre, cibler directement et vigoureusement les plaquettes comporte des risques d'hémorragies. Dans cette optique, l'inhibition du PDGF ou de son récepteur qui s'est avérée bénéfique dans plusieurs modèles animaux, pourrait être également utile chez l'humain, surtout que le PDGFR- $\beta$  et le PDGF-B sont colocalisés dans la plaque athérosclérotique et les coronaires humaines traitées par angioplastie<sup>247, 13</sup>. De plus, pour renverser complètement le développement de l'hyperplasie intimale, il faut non seulement empêcher l'action des facteurs plaquettaires, mais également que la lésion soit réendothélialisée et que les CMLv de la média retrouvent un état de quiescence<sup>236, 26, 195, 8</sup>.

### **1.6.1 Induction d'une thrombocytopénie**

L'administration quotidienne d'un anticorps contre les plaquettes a permis d'induire une thrombocytopénie qui a inhibé l'hyperplasie intimale dans l'aorte de lapin<sup>77</sup>. Si la thrombocytopénie est limitée aux premières 24 heures suivant la lésion vasculaire, la migration des CMLv est inhibée, mais leur prolifération n'est pas affectée<sup>72, 122</sup>.

L'hyperplasie intimale est atténuée par la thrombocytopénie 4 et 7 jours après la lésion, mais non après 14 jours, suggérant un effet transitoire<sup>72, 122</sup>.

Le busulfan est une toxine spécifique aux précurseurs des plaquettes dans la moelle osseuse et induit une thrombocytopénie soutenue<sup>236</sup>. Utilisé dans la carotide de rat dénudée par ballon, le busulfan a empêché le développement de l'hyperplasie intimale à 7 et 14 jours suivant la lésion<sup>236</sup>. Par contre, si les animaux demeuraient thrombocytopéniques pendant les deux premières semaines et que des transfusions de plaquettes étaient entreprises pour les deux semaines suivantes, l'hyperplasie intimale n'était pas différente de celle des animaux témoins 14 jours après la lésion<sup>236</sup>. De plus, l'expression par immunohistochimie du PDGFR- $\beta$  n'était pas affectée chez les animaux traités au busulfan<sup>236</sup>. Cette étude conclut que la média lésée des animaux thrombocytopéniques conserve sa capacité de répondre aux stimuli de prolifération et de migration venant des plaquettes réintroduites après la phase d'activation maximale des CMLv observée chez les animaux témoins<sup>236, 49</sup>.

### 1.6.2 Trapidil

Le trapidil (triazolopyrimidine) est un agent antiplaquettaire qui antagonise l'effet prolifératif du PDGF-BB sur les CMLv. Le trapidil est également un agent vasodilatateur qui inhibe le TxA<sub>2</sub> et s'est avéré efficace pour réduire la resténose autant chez l'animal (rat et lapin), que l'humain (réduction de 39% de la resténose angiographique comparativement au groupe témoin recevant de l'aspirine)<sup>255, 167, 200, 176</sup>. Sur des CMLv d'aorte de rat et de coronaire de boeuf, le trapidil a permis de réduire de façon dose-dépendante l'incorporation de [<sup>3</sup>H]thymidine et la prolifération cellulaire induite par le PDGF-BB<sup>115, 28</sup>. De plus, le trapidil augmente l'expression protéique du PDGFR- $\beta$ , sans affecter la phosphorylation induite par le PDGF-BB de la PLC $\gamma$ , de la sous-unité régulatrice de la PI3K, de Ras-GAP et de Shc<sup>115</sup>. Par contre, le trapidil inhibe l'induction par le PDGF-BB de Raf-1 (un activateur en amont de la MAPKK) et de la MAPK elle-même<sup>115, 28</sup>. Le trapidil a aussi augmenté l'expression de la MAPK phosphatase-1, une protéine inactivant la MAPK<sup>115</sup>. Ces actions du trapidil pourraient être médiées par l'augmentation de la génération d'AMPC<sup>115</sup>. Le trapidil

est aussi connu pour inhiber les phosphodiésterases et stimuler la production de PGI<sub>2</sub>, deux actions menant à une augmentation des taux d'AMPc<sup>131, 178</sup>. Ces résultats suggèrent que le trapidil réduit l'activation de la voie MAPK menant à la prolifération des CMLv via la voie inhibitrice PKA-AMPc<sup>115, 96</sup>. En effet, il a été démontré que le trapidil stimule l'activité de la PKA et que les effets antiprolifératifs du trapidil sont abolis par des inhibiteurs de la PKA<sup>28</sup>. Puisque la voie MAPK est utilisée par tous les facteurs de croissance, le trapidil inhibe aussi la prolifération induite par le bFGF et l'EGF<sup>86</sup>.

### 1.6.3 Anticorps contre le facteur de croissance dérivé des plaquettes ou son récepteur

Chez des rats athymiques « nude » ne pouvant développer de réponse immunitaire contre les larges doses d'anticorps qui leur sont données, l'administration quotidienne d'anticorps contre les trois isoformes du PDGF a réduit de 79% la migration des CMLv dans l'intima au jour 4 (pourcentage de la surface intimale couverte par les CMLv) et de 40% l'aire de la néointima au jour 8 suivant la dénudation<sup>122, 70</sup>. Quant à la synthèse d'ADN, la [<sup>3</sup>H]thymidine a marqué 4 à 5% des cellules dans la média et 27 à 31% dans la néointima, indifféremment chez les animaux témoins et ceux ayant reçu l'anticorps<sup>70</sup>. Ces résultats montrent que la réduction de l'hyperplasie intimale observée avec l'anticorps anti PDGF est attribuable à une interférence dans la migration des CMLv<sup>70</sup>.

Dans un modèle d'explants aortiques de babouin, l'héparine administrée avec un anticorps bloquant le PDGFR-β a inhibé la migration des CMLv<sup>104</sup>. De plus, sur des CMLv de babouin en culture, la combinaison de 10 μg/mL d'héparine à 1 μg/mL d'anticorps anti PDGFR-β a eu la même activité inhibitrice sur la prolifération et la migration cellulaire, que 25 μg/mL d'anticorps seul<sup>104</sup>. *In vivo*, l'angioplastie de l'artère saphène de babouin a été suivie par l'injection de l'anticorps chimérique murin/humain anti PDGFR-β et l'infusion d'héparine<sup>104</sup>. La prolifération des CMLv étudiée au 4<sup>e</sup> et au 28<sup>e</sup> jour suivant l'angioplastie par marquage au BrdU n'a pas montré de différences entre les artères témoins et celle traitées<sup>104</sup>. Par contre, cette appro-

che a réduit de 40% le ratio des aires intima/média et de 53% l'aire de la néointima 28 jours après l'angioplastie <sup>104</sup>. Ces résultats suggèrent que l'anticorps contre le PDGFR- $\beta$  a surtout contré la migration des CMLV <sup>104</sup>. Par immunohistochimie et essai ELISA, l'anticorps chimérique a été fortement détecté dans la média et l'adventice des segments lésés, tandis qu'il était absent des vaisseaux normaux <sup>104</sup>. Les auteurs de cette étude croient que l'héparine n'a servi qu'à diminuer la dose d'anticorps chimérique et qu'elle n'a pas eu d'effet direct sur la liaison du PDGF-BB au PDGFR- $\beta$  ou sur la capacité de l'anticorps à se lier au PDGFR- $\beta$  <sup>104</sup>. Des études antérieures chez l'humain et le babouin ont aussi montré l'inefficacité de l'héparine seule aux doses non-toxiques pour prévenir l'hyperplasie intimale et la resténose <sup>85, 130, 152</sup>.

Cette étude montre que le PDGF-BB joue un rôle clé dans le développement des lésions intimales chez les primates non-humains, mais ne renseigne pas sur l'issue de la lésion à long terme, une fois le traitement avec l'anticorps terminé <sup>104</sup>. À ce sujet, l'administration chez l'humain pendant les 12 premières heures suivant une angioplastie, de l'anticorps 7E3, un antagoniste non spécifique du récepteur GpIIb/IIIa impliqué dans l'agrégation plaquettaire, a réduit le besoin de recourir à des techniques de revascularisation pendant 1 an suivant l'intervention, ce qui suggère que le blocage d'événement initiaux dans la formation de la lésion peut avoir des effets bénéfiques prolongés <sup>104, 63</sup>.

Deux anticorps monoclonaux spécifiques soit au PDGFR- $\alpha$ , soit au PDGFR- $\beta$ , capables de neutraliser la liaison du ligand, l'autophosphorylation du récepteur et la signalisation mitogénique, ont été comparés quant à leur efficacité à inhiber la formation de néointima dans un modèle d'endartérectomie de la carotide et d'angioplastie de l'artère fémorale de primates non-humains <sup>89, 169</sup>. Des études immunohistochimiques ont révélé que les deux types de lésions induisaient la prolifération cellulaire et la surexpression du PDGFR- $\beta$ , mais non du PDGFR- $\alpha$  <sup>89</sup>. Sept jours après la lésion, l'expression du PDGFR- $\beta$  et les cellules en prolifération (marquage au BrdU) coïncidaient dans la néointima en formation, la média et l'adventice, tandis qu'après 30 jours, la néointima concentrique formée dans les artères carotide et fémorale exprimait fortement le PDGFR- $\beta$ , surtout près de la lumière vasculaire et le nombre de

cellules en prolifération était réduit<sup>89</sup>. Le traitement des babouins avec l'anticorps contre le PDGFR- $\beta$  pendant les six jours suivant la lésion a réduit l'aire de la néointima de 37% dans la carotide et de 48% dans l'artère fémorale et le ratio des aires intima/média respectivement de 28% et 47%, lorsque examiné après 30 jours<sup>89</sup>. Dans les mêmes conditions, l'anticorps contre le PDGFR- $\alpha$  n'a pas eu d'effet<sup>89</sup>. De plus, les animaux traités avec l'anticorps contre le PDGFR- $\beta$  montraient des taux de prolifération cellulaire très similaires aux animaux témoins, soit de 5 à 8% de cellules marquées au BrdU 7 jours après la lésion<sup>89</sup>.

#### **1.6.4 Inhibiteurs de la phosphorylation du récepteur au facteur de croissance dérivé des plaquettes**

Compte tenu des évidences reliant le PDGFR- $\beta$  et la resténose, le développement d'inhibiteurs spécifiques de l'activité tyrosine kinase du récepteur est devenu un axe de recherche très actif. L'inhibition de cette activité est attribuée aux quinolines substituées, aux analogues phénylamino-pyrimidine et aux biarylhydrazones<sup>172, 36, 220</sup>. Chez des minipores hypercholestérolémiques, le RPR101511A a été administré oralement pendant 28 jours suivant la 2<sup>e</sup> PTCA et l'analyse angiographique a révélé que le groupe témoin présentait une perte moyenne de 50% du gain de lumière vasculaire, tandis que le groupe traité ne présentait aucune réduction<sup>24</sup>. L'analyse morphométrique a montré que le RPR101511A a significativement réduit de 30% le ratio des aires intima/média. *In vitro*, ce composé a inhibé de façon dose dépendante l'autophosphorylation du PDGFR- $\beta$  induite par le PDGF-BB, ainsi que la prolifération et la migration des CMLv de coronaires de porc et d'aorte humaine<sup>24</sup>.

Par ailleurs, le 3-(4-diméthylamino-benzylidényl)-2-indolinone (DMBI) inhibe la prolifération cellulaire induite par le bFGF et le PDGF-BB sur des CMLv d'artère pulmonaire de rat en culture<sup>275</sup>. Cette étude a également montré que la protéine PDGFR- $\beta$  recombinante dont le domaine de liaison du ligand et le domaine transmembranaire ont été enlevés, était capable de former un dimère et conservait l'activité tyrosine kinase<sup>275</sup>. Ce résultat a permis de confirmer que le DMBI agissait en empêchant l'activité enzymatique du PDGFR- $\beta$ , probablement en compétitionnant

avec l'ATP pour se lier au récepteur, tel que démontré par cristallographie d'un complexe formé par le domaine kinase du récepteur 1 au FGF et d'un inhibiteur de la famille des indolinones <sup>275, 184</sup>.

Les tyrphostins sont également des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase des récepteurs aux facteurs de croissance qui interagissent de façon compétitive avec le domaine de liaison de l'ATP et les sous-sites de liaison du ligand <sup>184, 143</sup>. Les tyrphostins bloquent la transmission du signal médié par le récepteur pour les isoformes du PDGF, notamment la phosphorylation et l'activation de la PLC $\gamma$ , impliquée dans la migration des CMLv <sup>23, 35</sup>. *In vitro*, ces composés inhibent la synthèse d'ADN et la prolifération cellulaire induite par les isoformes du PDGF sur des CMLv de lapin, de même que la prolifération et la migration des CMLv de rat <sup>23, 232</sup>. Des résultats controversés quant à l'efficacité de différents tyrphostins à inhiber les processus de sténose et de resténose chez le rat et le porc ont été obtenus, notamment parce que les composés testés n'étaient pas spécifiques pour les récepteurs des facteurs de croissance principaux <sup>92, 121</sup>.

Le AG1295 (6, 7-diméthyl-2-phénylquinoxaline) est un tyrphostin très spécifique pour le PDGFR- $\beta$  et son addition préalable à la stimulation par le PDGF-BB des CMLv porcines et humaines en culture, a complètement inhibé la phosphorylation du PDGFR- $\beta$  sans affecter son niveau d'expression protéique <sup>12</sup>. *In vitro*, le AG1295 a entraîné une inhibition sélective et réversible de la prolifération des CMLv (76%), car la prolifération des CE n'était que faiblement affectée (13, 5%) de façon réversible <sup>12</sup>. Dans un modèle d'explants de carotides porcines et de tissus prélevés chez l'humain par athérectomie, le AG1295 a réduit le nombre de CMLv s'accumulant autour des explants respectivement de 82% et 92% <sup>12</sup>. Un plus grand pourcentage de CMLv ont conservé leur phénotype contractile (morphologie polygonale et étirée, expression d'actine  $\alpha$ ) dans les explants traités avec le AG1295 <sup>12</sup>. L'initiation de la migration des CMLv à l'extérieur de l'explant était fortement retardée par le AG1295 <sup>12</sup>. Également, des nanoparticules biodégradables imprégnées de AG1295 ont été administrées en bolus intravasculaire pendant 30 minutes, au site d'angioplastie de l'artère fémoro-

rale de porc et une réduction de 40% du ratio des aires intima/média a été observée 4 semaines plus tard <sup>12</sup>.

Dans une autre étude, le AG1295 a inhibé de façon réversible la prolifération des CMLv de rat induite par le PDGF-BB ou le sérum de veau foetal, indiquant que le AG1295 n'a pas d'effets toxiques <sup>74</sup>. L'effet antiprolifératif allait de pair avec une réduction réversible du niveau total de phosphotyrosine et du degré de phosphorylation du PDGFR- $\beta$  en présence du AG1295 *in vitro* <sup>74</sup>. Dans le modèle de carotide de rat dénudée par ballon, l'administration périsvasculaire soutenue du AG1295 au moyen d'une matrice à relâchement graduel a permis de réduire de 35% la formation de néointima 14 jours après la lésion <sup>74</sup>. La phosphorylation sur tyrosine des protéines de transduction du signal extraites des artères lésées était significativement augmentée 3 jours après la lésion, mais retournait aux valeurs basales à 14 jours <sup>74</sup>. Autant à 3 qu'à 14 jours, le traitement avec le AG1295 a réduit cette phosphorylation sous les valeurs basales <sup>74</sup>. De plus, le AG1295 a fortement inhibé la surexpression protéique du PDGFR- $\beta$  au 3<sup>e</sup> et 14<sup>e</sup> jour suivant la lésion <sup>74</sup>. Les protéines montrant une augmentation de phosphorylation sur tyrosine dans cette étude seraient la kinase d'adhésion focale, la sous-unité régulatrice de la PI3K, c-Src et les isoformes p42/44 de la MAPK <sup>74</sup>. Ces protéines seraient rapidement phosphorylées à la suite d'une stimulation par le PDGF-BB <sup>65, 203, 94</sup>.

### 1.6.5 Tranilast

Le tranilast (acide N-(3', 4'-diméthoxycinnamoyl) anthranilique) est un agent antiallergique qui peut inhiber la relâche de médiateurs chimiques par les mastocytes et les basophiles (via une action anticalcique) ainsi que l'accumulation de collagène <sup>10, 119, 10</sup>. Récemment, des études ont rapporté que le tranilast inhibait de façon importante la prolifération et la migration des CMLv, ainsi que leur synthèse de collagène <sup>78</sup>. Le tranilast est connu pour antagoniser l'AII, inhiber l'entrée de calcium dans les CMLv, inhiber la cyclooxygénase-2 et restaurer la production de NO induite par des cytokines, mais inhibée par le PDGF <sup>182, 111, 198</sup>. Le tranilast réduit aussi l'hyperplasie intimale chez le rat à la suite d'une lésion endothéliale induite par photochimie <sup>134</sup>. Sur des



cultures de CMLv de rats spontanément hypertendus, le tranilast a inhibé la prolifération induite par le « fetal bovine serum » (FBS), le PDGF-BB ou le TGF- $\beta$ 1, la migration induite par le PDGF-BB sur une matrice de collagène, ainsi que la synthèse de collagène et de glycosaminoglycans spontanée ou induite par le TGF- $\beta$ 1<sup>183</sup>.

De plus, le tranilast a réduit la prolifération des CMLv stimulée par le FBS 10% ou le PDGF-BB, en inhibant la phosphorylation de la protéine rétinoblastome<sup>246</sup>. La phosphorylation de cette protéine est régulée par les complexes cdk qui peuvent eux-mêmes être inhibés par les gènes suppresseurs de tumeurs<sup>246</sup>. Également, sur des CMLv stimulées par le FBS ou le PDGF-BB, le tranilast a supprimé de >80% l'activité des complexes CDK2 et CDK4, sans affecter leur expression protéique<sup>246</sup>. Ces effets ont été associés à une augmentation de l'expression de p53 et de p21, ainsi qu'à la formation accrue de complexes p21/CDK2 et p21/CDK4<sup>246</sup>. Dans le modèle de carotide de rat, le tranilast a réduit de 70% le ratio des aires intima/média 14 jours après la lésion<sup>246</sup>. Des analyses immunohistochimiques révèlent que chez les animaux traités, la protéine p21 était présente dans la néointima dès 7 jours et de façon plus marquée à 14 jours suivant la lésion, tandis que les animaux témoins ne l'exprimaient peu ou pas<sup>246</sup>. Ces résultats montrent que l'inhibition de l'activité CDK2/CDK4 via une augmentation de l'expression de p21, serait un mécanisme par lequel le tranilast inhiberait la prolifération des CMLv et préviendrait la resténose<sup>246</sup>. Des analyses immunohistochimiques de lésions de resténose humaine révèlent l'expression de CDK2, cycline E, PCNA et p21 dans les heures suivant l'angioplastie<sup>264</sup>. On rapporte également que l'expression de p21 est induite dans les artères porcines à la suite d'une lésion par ballon et qu'elle jouerait un rôle pour limiter la prolifération cellulaire *in vivo*<sup>271</sup>. De plus, la surexpression de p21 induite par un adénovirus dans le modèle de carotide de rat a inhibé la prolifération des CMLv et la formation de néointima<sup>45</sup>.

Chez le porc, le tranilast (3g/jour) a été administré oralement 3 jours avant et pendant les 28 jours suivant l'angioplastie de deux coronaires et l'implantation d'une endoprothèse vasculaire dans la troisième<sup>120</sup>. Dans les artères simplement dilatées, le tranilast a réduit de 37% l'aire de la néointima et de 23% celle de l'adventice, comparativement aux artères des animaux témoins<sup>120</sup>. Dans les segments ayant reçu une endo-

prothèse, le tranilast a réduit la formation de néointima de 32% <sup>120</sup>. Dans une petite étude clinique, le tranilast (600 mg/jour pendant 3 mois) était administré à la suite d'une angioplastie et le taux de resténose observé était de 14,7% comparativement à 46,5% pour les patients témoins <sup>251</sup>. Le tranilast fait présentement l'objet du projet PRESTO (« Prevention of restenosis with tranilast and its outcomes »), une étude clinique randomisée et multicentrique à double insu prévoyant recruter 11 500 patients à traiter par angioplastie simple ou avec implantation d'une endoprothèse vasculaire, combiné à 300 ou 450mg de tranilast à prendre 2 fois par jour, pendant 1 ou 3 mois <sup>112</sup>. C'est la première étude à être réalisée dans les populations occidentales et elle vise à confirmer les résultats angiographiques bénéfiques obtenus chez les Japonais <sup>112</sup>.

### **1.6.6 Oligonucléotides antisens contre le récepteur $\beta$ du facteur de croissance dérivé des plaquettes**

Dans le modèle de carotide de rat, Sirois et coll. ont appliqué autour de l'artère lésée 400 $\mu$ g d'AS complémentaire à l'ARNm du PDGFR- $\beta$  à l'aide d'une matrice à relâchement graduel, permettant ainsi une libération soutenue, constante et locale pendant les deux semaines suivant la lésion <sup>235</sup>. L'AS1 était dirigé contre les nucléotides 4 à 21 de la séquence murine du PDGFR- $\beta$ , tandis que l'AS2 ciblait les nucléotides 22 à 39 <sup>235</sup>. Après 14 jours de traitement, le ratio des aires intima/média était réduit de 80 et 60% respectivement avec l'AS1 et l'AS2, tandis que les deux séquences aléatoires n'ont pas affecté significativement les résultats obtenus avec les groupes témoins <sup>235</sup>. L'analyse par immunohistochimie a montré que l'AS1 s'est avéré plus efficace que l'AS2 pour réduire à la fois l'expression protéique du PDGFR- $\beta$  et l'hyperplasie intimale, probablement à cause de l'absence de structure secondaire complexe dans l'ARNm près du site d'initiation de la traduction, permettant un accès et une hybridation plus facile à l'AS <sup>235</sup>.

L'administration des AS1 et AS2 contre le PDGFR- $\beta$  et celle des séquences aléatoires n'a pas affecté de façon importante l'expression par immunohistochimie du PDGFR- $\alpha$ , témoignant de leur spécificité d'action <sup>235</sup>. De plus, l'immunobuvardage

Western des protéines isolées de CMLv cultivées en présence d'un AS et de PDGF-BB, a montré que l'expression basale du PDGFR- $\beta$  chutait de 53% 1 heure après la stimulation et d'un autre 32% 11 heures plus tard<sup>235</sup>. Le récepteur était réexprimé à sa valeur basale 48 heures après la stimulation initiale au PDGF-BB<sup>235</sup>. L'AS1 a réduit de 75% l'expression protéique du récepteur, comparativement à sa valeur basale, pendant les 48 heures d'observation. Cet effet était spécifique au récepteur  $\beta$  puisque la sous-unité  $\alpha$  n'a pas été affectée par l'AS1 et par la séquence aléatoire<sup>235</sup>. Afin d'éviter des effets non-spécifiques des AS, les séquences AS1 et AS2 ainsi que les séquences aléatoires ne contenaient pas plus de deux guanosines de suite<sup>235</sup>.

## 1.7 Rationnelle de la présente étude

Le but général de la présente étude était de vérifier si une livraison endoluminale de l'AS PDGFR- $\beta$  suffirait à prévenir l'hyperplasie intimale dans le modèle de carotide de rat dénudée par ballon. Cette approche a été envisagée car elle serait plus applicable au contexte clinique d'angioplastie. Pour atteindre ce but, il fallait répondre aux questions suivantes :

- est-ce qu'un seul traitement endovasculaire en bolus, au site de la lésion serait suffisant pour prévenir l'hyperplasie ?
- est-ce que ce traitement empêcherait l'expression protéique du PDGFR- $\beta$  ?
- est-ce que l'AS PDGFR- $\beta$  agit en inhibant la prolifération et/ou la migration des CMLv ?

## 2 Matériel et méthodes

### 2.1 Procédure chirurgicale

La procédure expérimentale a été approuvée par le comité d'éthique animale de l'Institut de Cardiologie et a été réalisée en accord avec les lignes directrices du Conseil canadien de la protection des animaux. La lésion de la carotide commune par ballon a été réalisée chez des rats mâles Sprague-Dawley (325-400g). Les animaux étaient anesthésiés par injection intrapéritonéale de kétamine HCl 75mg/kg et xylazine HCl 5mg/kg. Après l'exposition de la carotide commune gauche (Figure 9A et B), un ballon cathéter Fogarty 2 French a été inséré par une artériotomie de la carotide externe gauche (Figure 9C, D, E et H). Le ballon a été avancé jusqu'à l'arche aortique, gonflé suffisamment avec de l'air pour produire une faible résistance et a été retiré trois fois sur la longueur de la carotide commune gauche (Figure 9F).

Afin d'étudier la contribution du PDGFR- $\beta$  dans la formation de la néointima, une séquence désoxyribonucléotidique phosphorothioate antisens correspondant aux nucléotides 4 à 21 de l'ARNm du PDGFR- $\beta$  murin (groupe AS PDGFR- $\beta$  : 5'-TAT CAC TCC TGG AAG CCC-3') a été livrée en bolus endovasculaire unique au site de la lésion. Cette séquence a été utilisée car des résultats antérieurs ont montré l'efficacité de cet AS dans la prévention de l'hyperplasie intimale et de l'expression protéique du PDGFR- $\beta$  lors d'une livraison périvasculaire soutenue après une lésion par ballon de la carotide de rat<sup>235</sup>. Un groupe d'animaux témoin a reçu une séquence d'oligomères dégénérée (groupe ASD : 5'-GTG ATA GTA TGC CGA GCA-3') dans les mêmes conditions, afin de vérifier les effets non spécifiques d'un tel traitement. Les oligonucléotides ont été synthétisés à l'Institut Armand Frappier (Laval, Québec). Les oligonucléotides ont été lyophilisés, resuspendus dans du tampon PBS stérile et quantifiés par spectrophotométrie.

À la suite de la lésion vasculaire, une canule 22G a été introduite par l'artériotomie et 200 $\mu$ L de solution saline 0, 9% a été utilisé pour rincer les éléments sanguins résiduels de la carotide commune. Ensuite, 200 $\mu$ g/25 $\mu$ L d'AS PDGFR- $\beta$  ou d'ASD

étaient infusés dans la carotide commune isolée temporairement par deux sutures de soie. Après la période d'incubation de 30 minutes, le site de l'artériotomie était ligaturé de façon permanente et la circulation sanguine normale était rétablie dans la carotide commune (Figure 9G). Les plaies étaient fermées et les animaux étaient retournés dans leurs cages. Un troisième groupe d'animaux n'a subi que la dénudation de la carotide commune par ballon cathéter et agit comme témoin pour la procédure (groupe E-).

Les animaux furent sacrifiés à différents temps (jour 0, 3, 7, 14 et 28) après la lésion vasculaire par exsanguination sous anesthésie générale (xylazine et kétamine) (Figure 10). Une solution de lactate Ringer (100mL) était perfusée dans le ventricule gauche afin de rincer les carotides des éléments sanguins. La carotide gauche traitée et la droite native ont été prélevées, fixées dans la formaline tamponnée 10%, déshydratées et enrobées dans la paraffine. Des coupes de 6  $\mu\text{m}$  d'épaisseur ont ensuite été réalisées à l'aide d'un microtome.

## **2.2 Analyse morphométrique**

Une coloration de Trichrome de Masson a été réalisée pour toutes les carotides. Le Trichrome de Masson colore le collagène en bleu, les CMLv en rouge et permet de distinguer les lames élastiques grâce à leur indice de réfraction différent. Les aires de la média et de l'intima ont été mesurées grâce à une caméra vidéo digitale adaptée à un microscope et à la numérisation de l'image par ordinateur. Puisque l'épaisseur de la média des vaisseaux natifs varie entre les animaux et est fonction de la taille de la carotide, le ratio des aires de l'intima sur la média a été calculé pour chaque animal et sert d'indice d'hyperplasie intimale. L'analyse microscopique a été réalisée à simple insu afin d'éliminer la subjectivité dans la cueillette des résultats.

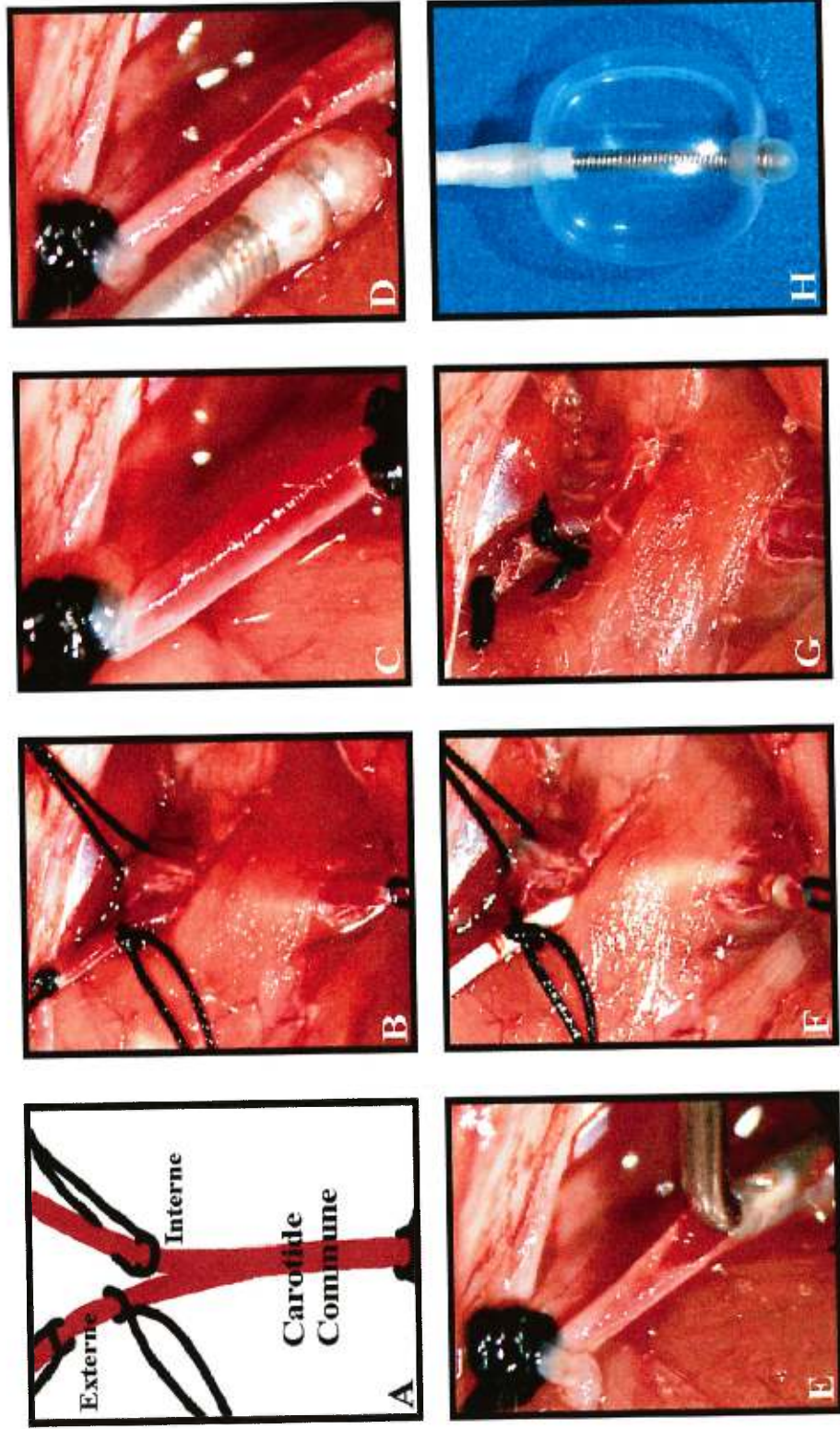


Figure 9: Procédure de dénudation endovasculaire par cathéter ballon.  
 A: Schéma de la carotide commune gauche et des sutures mises en place; B: Exposition de la carotide; C: Exposition de la carotide externe avant l'artériotomie; D: Comparaison de la taille de l'artériotomie et du ballon cathéter; E: Écartement de l'artériotomie; F: Ballon cathéter inséré jusqu'à l'arche aortique; G: Incubation de l'AS PDGFR- $\beta$  ou de l'ASD dans la carotide commune; H: Ballon cathéter Fogarty 2 French.

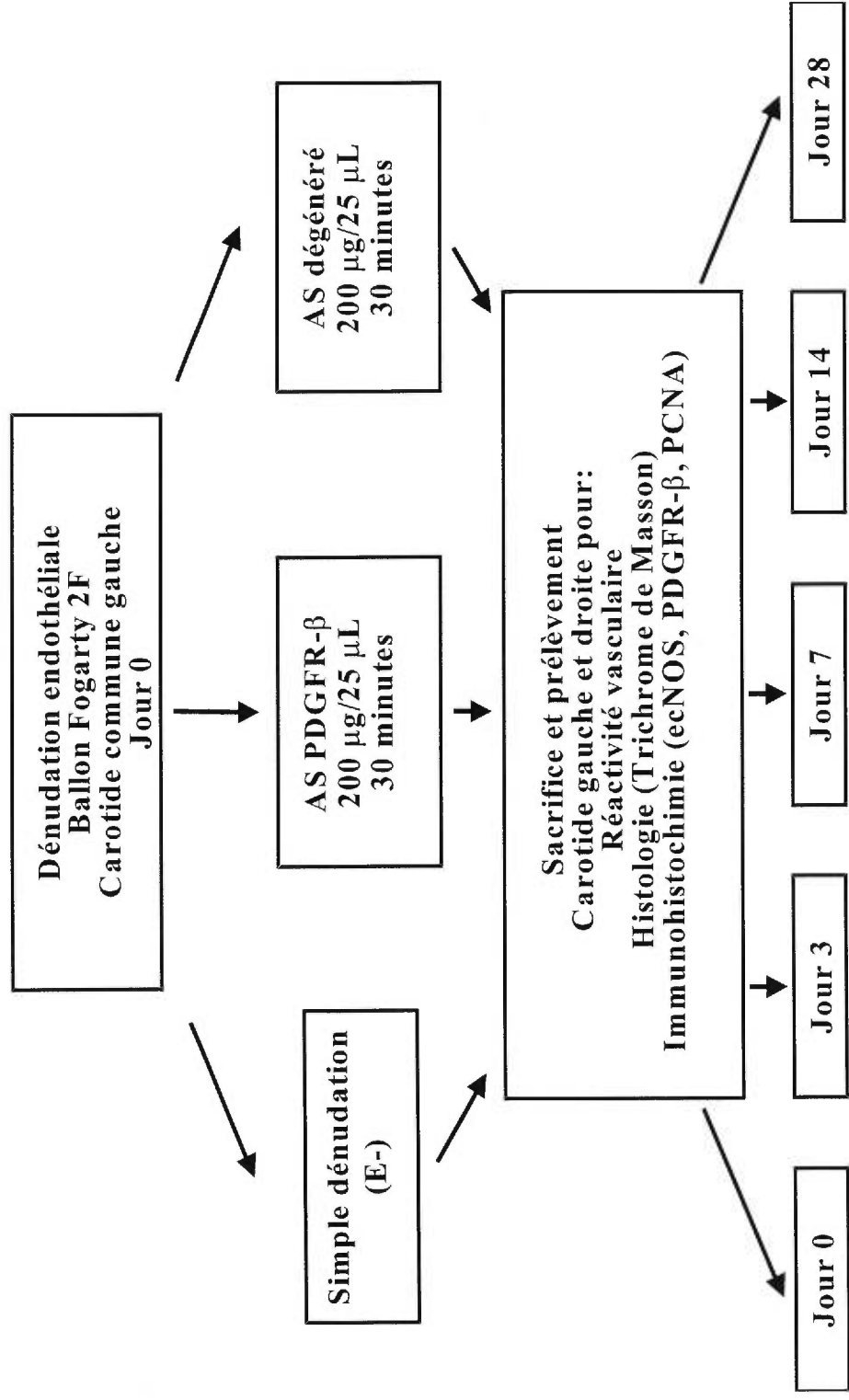


Figure 10: Résumé de la procédure expérimentale.



### 2.3 Étude de la réactivité vasculaire en bains tissulaires

Lors du sacrifice des animaux, un segment de 4mm de la portion médiale des carotides communes gauche (dénudée) et droite (native), non fixé à la formaline, a été suspendu par deux triangles de fil d'acier 5-0 et une fine tige d'acier à un transducteur de force isométrique de 10g relié à un amplificateur/enregistreur Gould afin de suivre sur papier les variations de tension isométrique (Figure 11). L'anneau artériel était immergé dans 25mL de solution Krebs-Ringer oxygénée (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) et chauffée à 37°C. Ce tampon renfermait (en mM) : 119 NaCl, 4,8 KCl, 2,6 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 15 glucose, 0,01 indométhacine. L'indométhacine inhibe l'enzyme cyclooxygénase et la production de prostanoïdes vasoactifs. Une tension passive de 1,5g a été obtenue par étirement graduel du vaisseau. L'atteinte de cette tension optimale a été suivie par la contraction générée par la dépolarisation au KCl 20mM. Les vaisseaux ont ensuite été mis en repos pour 45 minutes dans une solution Krebs-Ringer fraîche. La phényléphrine (PE, 10<sup>-6</sup>M) a été utilisée pour produire une contraction sous-maximale des carotides. Une vasorelaxation dépendante de l'endothélium a été induite par l'ajout croissant d'acétylcholine (ACh, 1X10<sup>-9</sup> à 3,17X10<sup>-5</sup>M) et d'une simple dose de calcium ionophore A23187 (CaI, 2,5X10<sup>-7</sup>M). Le nitroprussiate de sodium (SNP, 1X10<sup>-5</sup>M) a été ajouté afin d'induire une relaxation directe des CMLv (indépendante de l'endothélium).



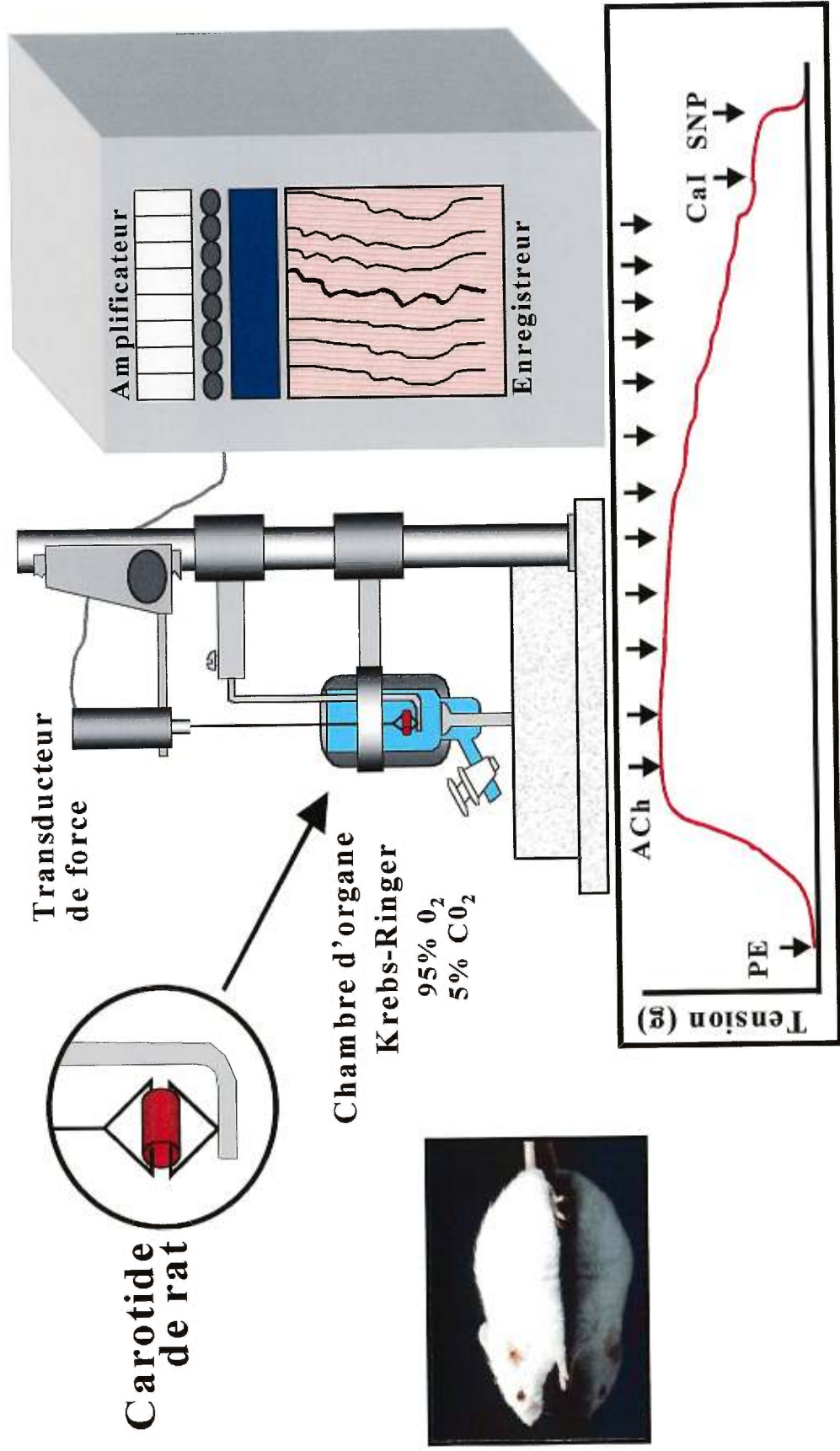


Figure 11: Réactivité vasculaire en bains tissulaires.

## 2.4 Immunohistochimie

Les coupes de carotides ont été déparaffinées et réhydratées dans des bains de xylène et d'éthanol. L'activité peroxydase endogène a été neutralisée par une solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de méthanol. La liaison non spécifique de l'anticorps primaire a été réduite en incubant les coupes avec du sérum 5% venant de l'espèce animale utilisée pour produire l'anticorps secondaire. Les carotides étaient ensuite exposées à l'anticorps primaire (IgG) ayant une réactivité croisée positive pour la protéine ciblée chez le rat, soit un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre le PDGFR- $\beta$  humain (UBI, Lake Placid, NY) dilué (1:100, 1:200, 1:500), un anticorps monoclonal de souris dirigé contre le PCNA humain (Zymed Laboratories, San Francisco, CA) dilué (1:25, 1:50) ou un anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'enzyme ecNOS humaine (Transduction Laboratories, Bio/Can Labs, Burlingame, CA) dilué (1:250, 1:500, 1:1000). Des IgG normales et non-spécifiques de souris ou de lapin ont été utilisées comme témoin négatif pour chaque carotide. Après l'incubation avec l'anticorps primaire, les coupes de vaisseaux étaient rincées avec du tampon PBS et mises en présence de l'anticorps secondaire biotinylé de chèvre (1:400) dirigé contre les IgG de lapin pour la détection du PDGFR- $\beta$ , ou dirigé contre les IgG de souris pour la détection du PCNA ou de ecNOS (Vector Labs, Burlingame, CA) (Figure 12). La visualisation des anticorps appariés à la protéine ciblée a été réalisée à l'aide d'un complexe avidine/ peroxydase (ABC kit, Vector Labs) mis en présence de 3, 3'-diaminobenzidine (DAB kit, Vector Labs) et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durant 3 à 4 minutes (Figure 12). Les noyaux cellulaires étaient contrecolorés à l'hématoxyline de Mayer, puis les coupes étaient rincées, déshydratées (éthanol et xylène) et recouvertes d'une lamelle de verre tenue en place par une solution Permount.

L'immunohistochimie de la protéine PDGFR- $\beta$  a permis de déterminer l'expression du PDGFR- $\beta$  à la suite d'une lésion vasculaire et d'évaluer l'efficacité de l'AS PDGFR- $\beta$  à réguler l'expression protéique du récepteur. Le pourcentage de CMLv exprimant le PDGFR- $\beta$  dans la média et l'intima a été obtenu en dénombrant les cel-

lules positives (coloration brune) par rapport à la population cellulaire totale dans la même région.

L'activité proliférative des CMLv à différents temps dans les vaisseaux lésés ou natifs a été évaluée par la détection de la protéine PCNA sur les coupes de carotides des animaux sacrifiés. Les cellules exprimant cette protéine nucléaire présentaient un noyau brun et le résultat de cette coloration est également exprimé en terme de pourcentage dans la média et l'intima. Une coupe de foie de rat servait de témoin positif.

Le degré de réendothélialisation vasculaire au niveau des carotides lésées a été étudié par la détection de la protéine membranaire ecNOS. Le pourcentage de réendothélialisation est le rapport entre la longueur totale des îlots de CE colorées en brun et la circonférence de la lumière vasculaire.

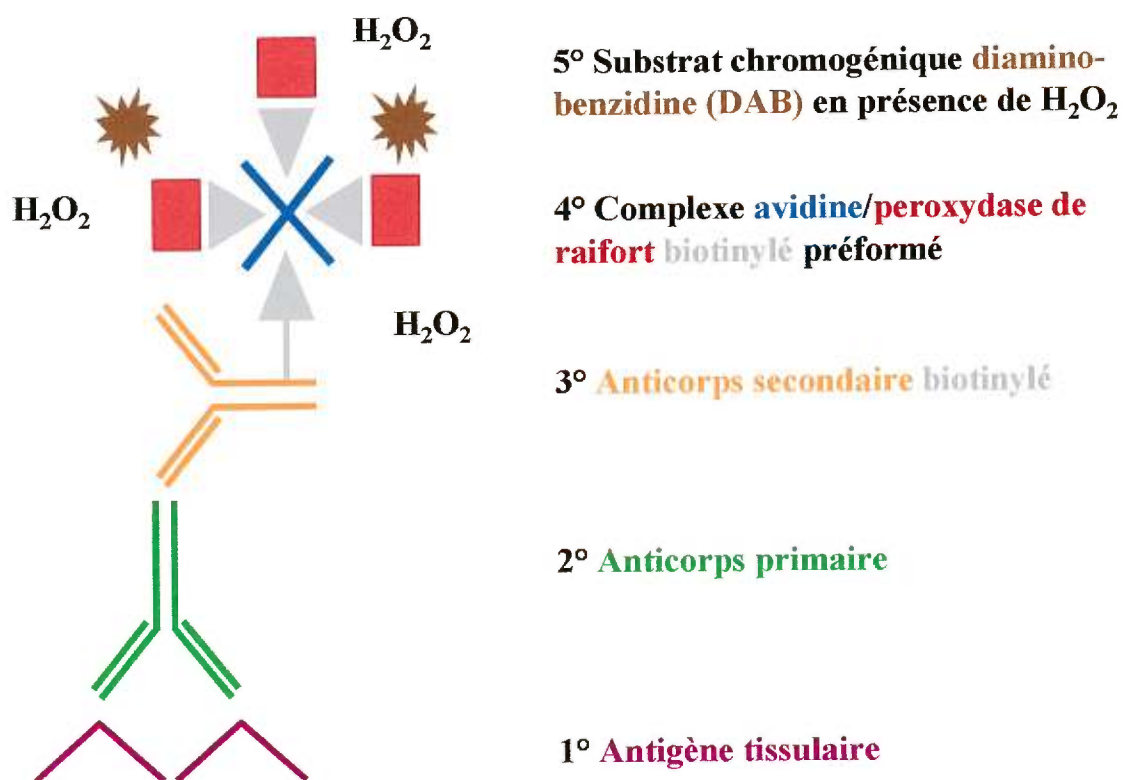


Figure 12: Principe de l'immunohistochimie.

## 2.5 Analyse statistique

Les données sont présentées sous la forme moyenne  $\pm$  erreur standard sur la moyenne (ESM). Une analyse de variance suivie d'un test t de Student pour des valeurs non appariées avec la correction de Bonferroni pour les comparaisons multiples, a été réalisée. Nous avons conclu à une différence significative entre les moyennes quand une valeur de  $P < 0,05$  était obtenue.

## 3 Résultats

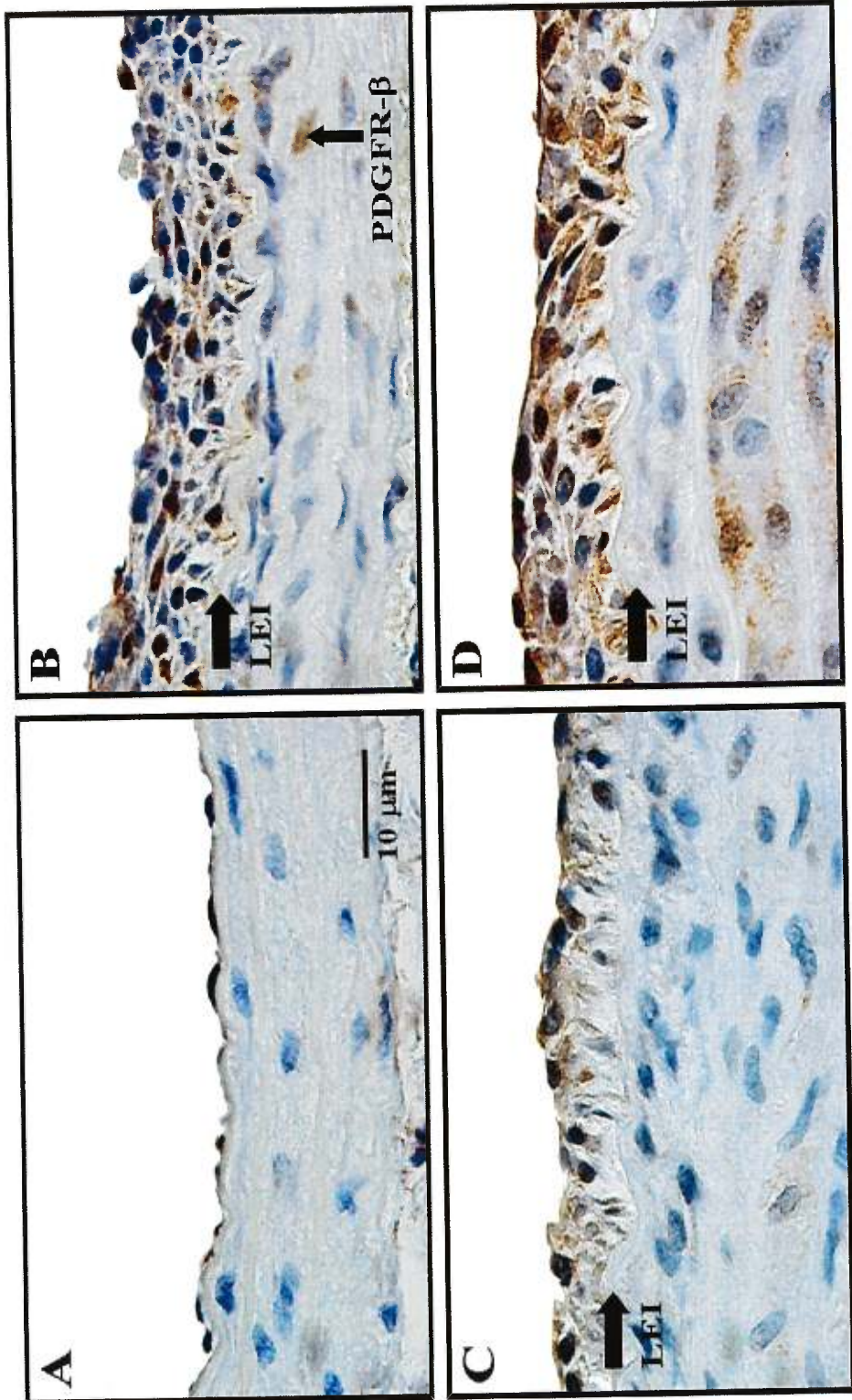
### 3.1 Expression protéique du récepteur $\beta$ du facteur de croissance dérivé des plaquettes

Nous avons tout d'abord évalué la capacité de l'AS dirigé contre l'ARNm du PDGFR- $\beta$  à bloquer l'expression protéique de la sous-unité  $\beta$  du récepteur au PDGF lors d'une livraison endovasculaire en bolus unique de l'AS, au site de la dénudation carotidienne chez le rat. L'expression du PDGFR- $\beta$  a été observée par immunohistochimie sur les CMLv de la média à l'aide d'un anticorps spécifique. En absence de lésion vasculaire,  $1,4 \pm 0,4\%$  des CMLv de la média des vaisseaux natifs (E+) ont montré une coloration positive (Figures 13A et 14). Trois jours après la lésion vasculaire, l'expression du PDGFR- $\beta$  a augmenté de 8,7 fois pour les CMLv de la média ( $13,1 \pm 2,5\%$ ,  $P < 0,001$ ), a atteint un plateau au 7<sup>e</sup> jour suivant la lésion vasculaire avec une augmentation de 12,6 fois ( $18,3 \pm 2,1\%$ ,  $P < 0,001$ ) et est graduellement retournée vers des valeurs basales d'expression au jour 14 et 28 (Figures 13B et 14). La présence de CMLv dans l'intima a été observée à partir du 7<sup>e</sup> jour suivant la lésion avec  $18,3 \pm 3,7\%$  des CMLv exprimant le PDGFR- $\beta$ , ceci étant équivalent à l'expression observée au niveau des CMLv de la média au même moment. Au 14<sup>e</sup> et 28<sup>e</sup> jour, le taux d'expression du PDGFR- $\beta$  pour les CMLv de l'intima est revenu à la valeur basale observée pour les CMLv de la média des vaisseaux natifs (Figure 14).

Comparativement aux vaisseaux dénudés par ballon (E-), un traitement avec l'AS PDGFR- $\beta$  a empêché la surexpression du PDGFR- $\beta$  observée au 3<sup>e</sup> et 7<sup>e</sup> jour pour les CMLv de la média, dans une proportion de 90 et 93% respectivement ( $P < 0,001$ ) et

de 60% ( $P < 0,05$ ) pour les CMLv de l'intima au jour 7 suivant la lésion (Figures 13C et 14). Au jour 14 et 28, le taux d'expression du PDGFR- $\beta$  par les CMLv de la média et de l'intima des vaisseaux traités avec l'AS PDGFR- $\beta$  est également retourné au niveau basal observé dans les CMLv de la média des carotides normales (Figure 14). Au jour 3 suivant la lésion vasculaire, le traitement avec l'oligomère ASD a réduit l'expression protéique du PDGFR- $\beta$  par les CMLv de la média de 42% ( $P < 0,05$ ), toutefois, cette diminution d'expression était significativement moindre que celle induite par l'AS PDGFR- $\beta$  (90%) (Figure 14). Au jour 7, l'ASD n'a pas réduit significativement l'expression protéique du PDGFR- $\beta$  des CMLv de la média et de l'intima (Figures 13D et 14). Tel qu'observé dans les deux autres groupes, l'expression du PDGFR- $\beta$  est revenue à la valeur basale au jour 14 et 28 pour les vaisseaux ayant reçu l'ASD (Figure 14).





**Figure 13:** Expression du récepteur  $\beta$  du facteur de croissance dérivé des plaquettes au jour 7 suivant la lésion vasculaire.  
 A: E<sup>+</sup>; B: E; C: AS; D: ASD

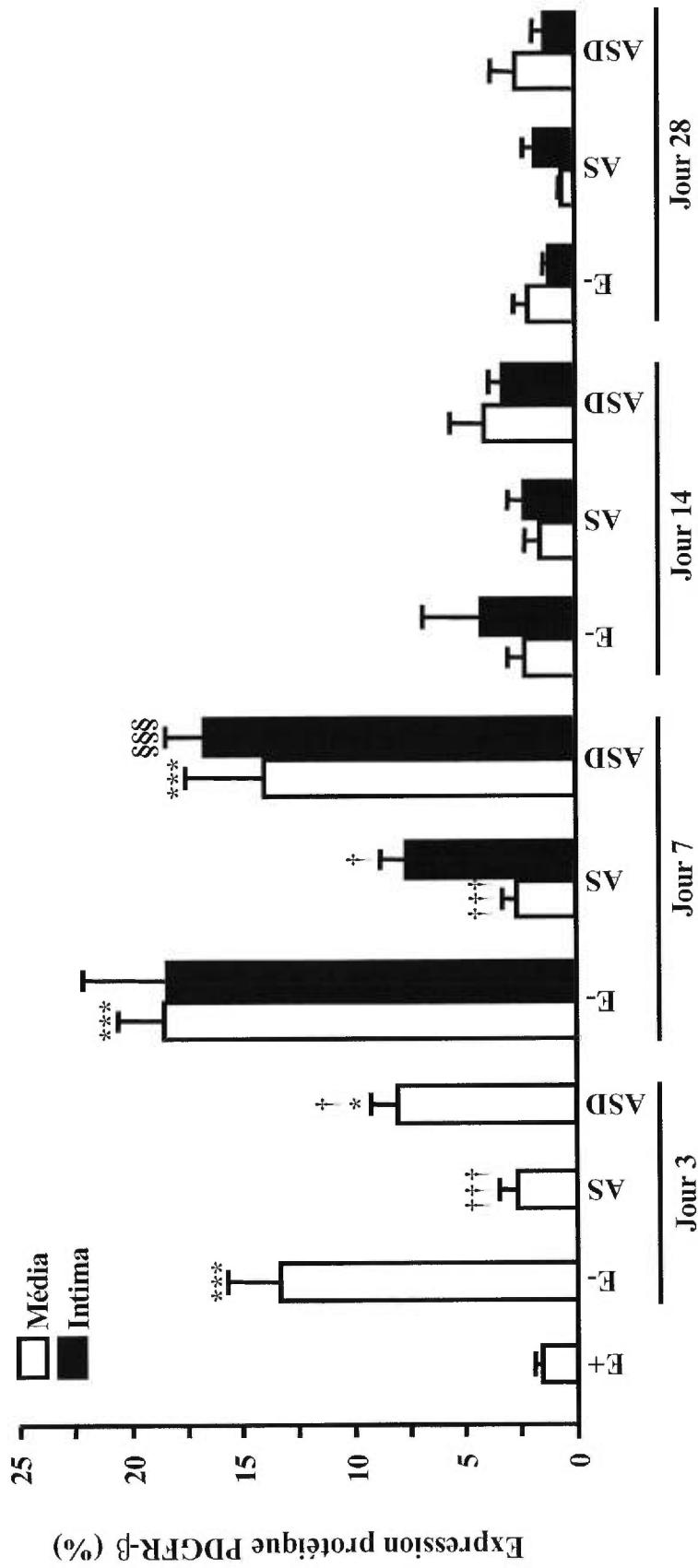


Figure 14: Expression relative du récepteur  $\beta$  du facteur de croissance dérivé des plaquettes par les cellules musculaires lisses vasculaires.

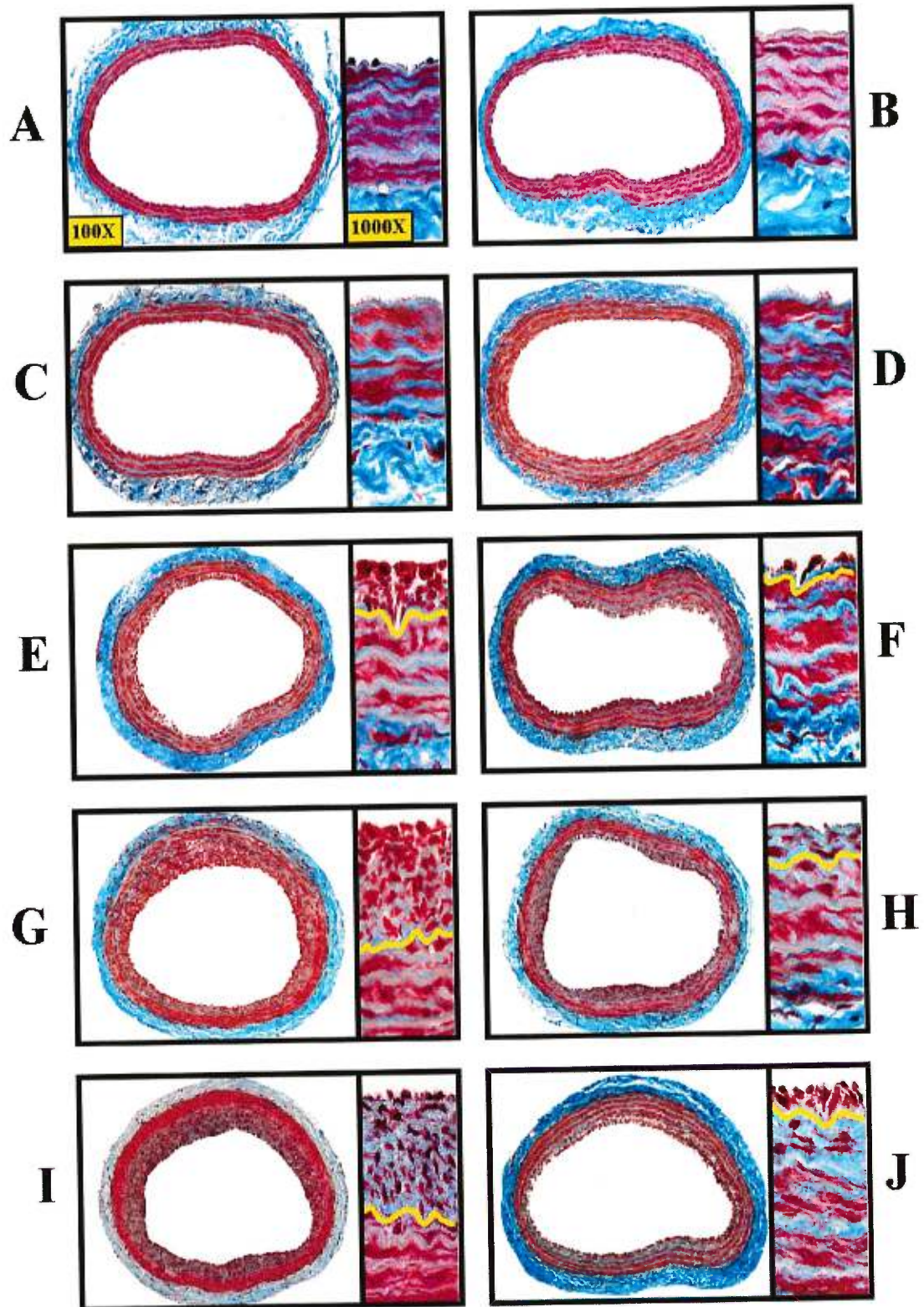
N = 4-11 animaux par traitement. \* vs E+, † vs E-, § vs AS. 1 symbole P<0, 05, 2 symboles P<0, 01, 3 symboles P<0, 001.

### **3.2 Effet sur l'hyperplasie intimale d'un bolus endovasculaire de l'antisens contre le récepteur $\beta$ du facteur de croissance dérivé des plaquettes**

Une coloration au Trichrome de Masson d'une artère carotidienne de rat non-lésée permet de distinguer les fibres musculaires (rouge), le collagène (bleu) et les noyaux cellulaires (noir) (Figure 15A, grossissement 1000X). Sur cette image, on distingue de haut en bas : la lumière vasculaire, l'intima formée d'une monocouche de CE aux noyaux noirs, la LEI en gris-bleu bordant le média constituée de CMLv (rouge), la LEE en gris-bleu bordant la portion externe de la média et l'adventice riche en collagène (bleu).

Le passage du ballon cathéter dénude la LEI de son endothélium (Figure 15B). L'envahissement de la lumière vasculaire par les CMLv de la média ayant migré n'est pas visible au 3<sup>e</sup> jour suivant la lésion (Figure 15C), mais est observable au 7<sup>e</sup> jour (Figure 15E, la LEI a été soulignée en jaune manuellement). L'hyperplasie intimale a atteint un maximum au jour 14 (Figure 15G). Au jour 28, un réarrangement des CMLv de la néointima et une synthèse accrue de MEC sont visibles (Figure 15I). Le traitement avec l'AS PDGFR- $\beta$  a permis de réduire l'hyperplasie intimale de façon importante pour tous les temps étudiés (Figure 15F, H, J, respectivement à 7, 14 et 28 jours).



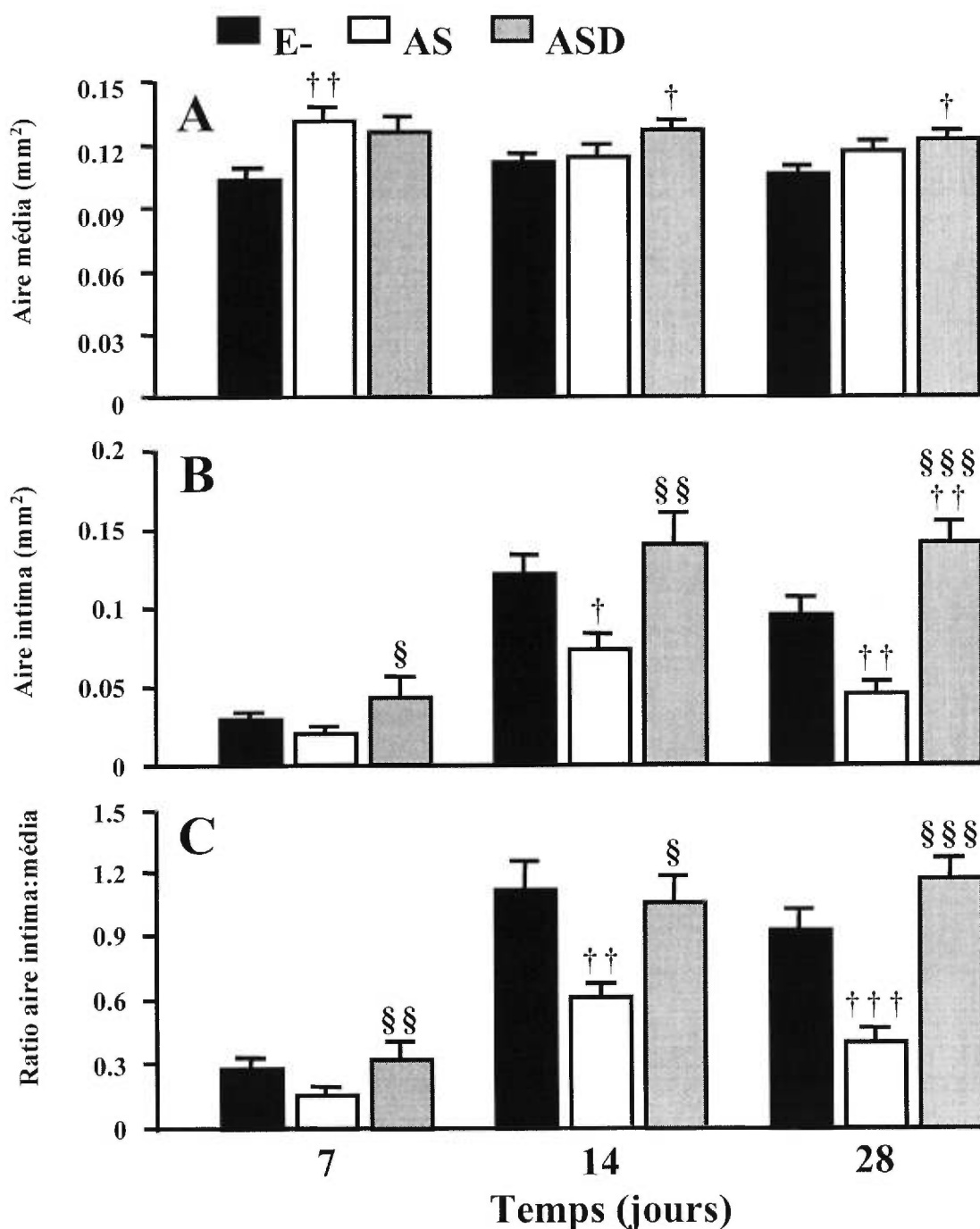


**Figure 15: Morphologie des vaisseaux colorés au Trichrome de Masson.**  
 A: E<sup>+</sup>; B: E- J0; C: E- J3; D: AS J3; E: E- J7; F: AS J7; G: E- J14;  
 H: AS J14; I: E- J28; J: AS J28.

Par la suite, l'analyse morphométrique a montré que l'aire de la média des vaisseaux simplement dénudés était de  $0,101 \pm 0,007$ ,  $0,109 \pm 0,005$  et  $0,105 \pm 0,004 \text{mm}^2$  respectivement à 7, 14 et 28 jours suivant la lésion (Figure 16A) et a fluctué de moins de 14% comparativement à l'aire de la média des vaisseaux natifs (données non montrées). Par rapport aux vaisseaux simplement dénudés, le traitement des carotides lésées avec l'AS PDGFR- $\beta$  ou l'ASD a augmenté légèrement l'aire de la média de 33, 3 et 13% avec l'AS PDGFR- $\beta$  ( $P < 0,01$  au jour 7 et  $P =$  non significatif (NS) au jour 14 et 28) et de 23, 14 et 16, 5% avec l'ASD ( $P =$  NS au jour 7 et  $P < 0,05$  au jour 14 et 28) (Figure 16A).

Trois jours après la lésion vasculaire, il n'y avait pas d'hyperplasie intimale, mais elle était présente à sept jours et a atteint un maximum après deux semaines. Les aires correspondantes de l'intima pour les vaisseaux E- au jour 7, 14 et 28 étaient respectivement de  $0,025 \pm 0,005$ ,  $0,116 \pm 0,012$  et  $0,091 \pm 0,011 \text{mm}^2$  (Figure 16B). Un traitement endovasculaire en bolus avec l'AS PDGFR- $\beta$  au site de la lésion a réduit l'aire de la néointima comparativement au groupe E- de 37, 40 et 56% ( $P = 0,07$  NS,  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ) au jour 7, 14 et 28 respectivement (Figure 16B). L'application de l'oligonucléotide ASD n'a pas réduit l'aire de la néointima pour chaque temps étudié (Figure 16B).

Dans les vaisseaux simplement dénudés, l'indice d'hyperplasie intimale, soit le ratio des aires intima/média, était respectivement de  $0,256 \pm 0,047$ ,  $1,102 \pm 0,126$  et  $0,899 \pm 0,099$  à 7, 14 et 28 jours suivant la lésion vasculaire (Figure 16C). L'administration de l'AS PDGFR- $\beta$  a réduit ces ratios de 50, 47 et 58% ( $P = 0,08$  NS,  $P < 0,01$ ,  $P < 0,001$ ) respectivement pour chacun des temps étudiés. Un traitement avec l'ASD n'a pas affecté de façon significative le ratio I:M comparativement au groupe E- (Figure 16C).



**Figure 16 : Effet de l'antisens contre le récepteur  $\beta$  du facteur de croissance dérivé des plaquettes sur le développement de l'hyperplasie intimale.**

N = 5-25 animaux par traitement. † vs E-, § vs AS. 1 symbole P<0,05, 2 symboles P<0,01, 3 symboles P<0,001.

### 3.3 Décompte des cellules musculaires lisses vasculaires

La dénudation par ballon cathéter des carotides de rat a augmenté légèrement le nombre de CMLv dans la média au jour 3, 7 et 14 comparativement au nombre présent dans la média des vaisseaux natifs ( $467 \pm 38$  CMLv). Cet effet n'était pas différent entre les groupes E-, AS PDGFR- $\beta$  ou ASD (Figure 17). Par contre, au jour 28 suivant la lésion, une augmentation du nombre de CMLv dans la média a été observée dans les trois groupes dénudés comparativement à la valeur pour la média des vaisseaux E+. Le nombre de CMLv dans le groupe E- s'est accru de 11% (P=NS), de 32% (P<0, 05) dans le groupe AS PDGFR- $\beta$  et de 47% (P<0, 01) dans le groupe ASD. Par contre, la différence entre le groupe AS PDGFR- $\beta$  et ASD n'était pas significative (Figure 17). Au jour 3 suivant la lésion vasculaire, les CMLv de la média n'ont pas encore commencé à envahir l'intima. Au jour 7, 14 et 28, le nombre de CMLv dans l'intima des carotides simplement dénudées était respectivement de  $422 \pm 67$ ,  $1285 \pm 100$  et  $1004 \pm 126$  cellules. Un traitement avec l'AS PDGFR- $\beta$  a diminué le nombre de CMLv dans l'intima au jour 7, 14 et 28 de 47, 33 et 50% respectivement (P<0, 05, P<0, 05, P<0, 01). Un traitement avec l'ASD n'a pas réduit le nombre de CMLv dans l'intima pour chacun des temps étudiés (Figure 17).

Afin de déterminer si la réduction de l'hyperplasie intimale observée avec l'AS PDGFR- $\beta$  était attribuable à une réduction de la prolifération des CMLv ou à une réduction de leur migration de la média vers l'intima, nous avons calculé la densité des CMLv de la média et de l'intima (cellules/mm<sup>2</sup>) ainsi que le niveau de prolifération cellulaire des vaisseaux des différents groupes étudiés. La densité des CMLv de la média des carotides normales était de  $4253 \pm 160$  CMLv/mm<sup>2</sup>. La fluctuation de la densité des CMLv de la média au jour 3, 7, 14 et 28 dans les groupes E-, AS et ASD n'a pas dépassé 20% comparativement à la densité observée dans les vaisseaux E+. La variation de la densité des CMLv dans la média du groupe E- comparée soit au groupe AS, soit au groupe ASD, était également inférieure à 20% pour chacun des temps étudiés (données non montrées). La densité des CMLv de l'intima du groupe E- était de  $14\,762 \pm 1\,143$ ,  $11\,466 \pm 496$  et  $11\,939 \pm 681$  CMLv/mm<sup>2</sup> respectivement

à 7, 14 et 28 jours suivant la lésion. L'AS PDGFR- $\beta$  a réduit significativement de 29% la densité des CMLv de l'intima au jour 7 seulement, tandis qu'au jour 14 et 28, le groupe traité ne s'est pas avéré différent du groupe simplement dénudé.

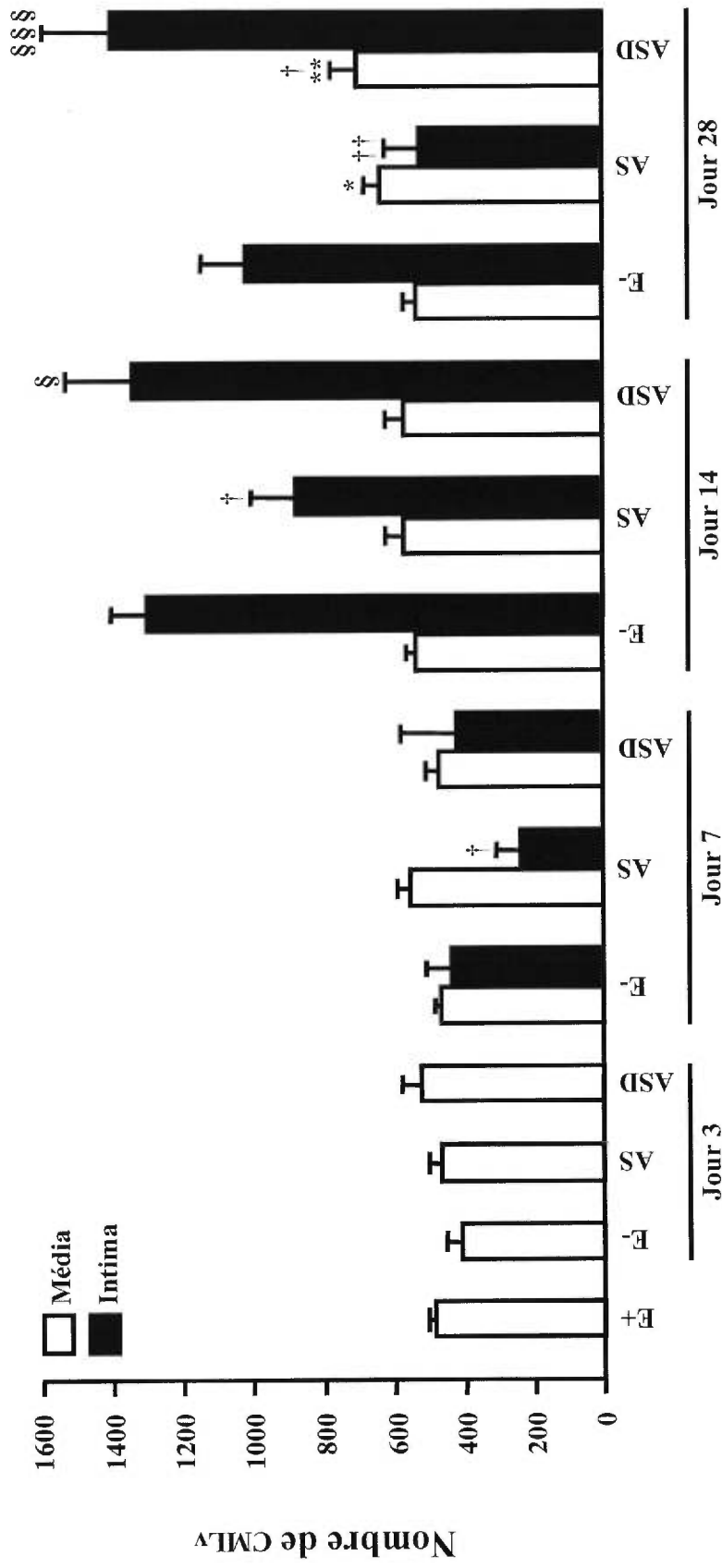


Figure 17 : Décompte des cellules musculaires lisses vasculaires.  
 N = 4-16 animaux par traitement. \* vs E+, † vs E-, § vs AS, ‡ vs ASD. 1 symbole P<0, 05, 2 symboles P<0, 01, 3 symboles P<0, 001.

### 3.4 État de prolifération des cellules musculaires lisses

L'activité proliférative des CMLv aux différents temps d'observation dans les vaisseaux natifs ou dénudés a été évaluée par immunohistochimie après le sacrifice des animaux, en ciblant l'expression de la protéine PCNA sur les coupes de carotides. Des études antérieures ont montré une bonne corrélation entre les résultats obtenus par immunohistochimie contre le PCNA et par incorporation de thymidine tritiée ou de bromodésoxyuridine (BrdU), deux autres marqueurs de prolifération cellulaire<sup>91, 278</sup>. Dans la média des vaisseaux normaux, le taux de prolifération des CMLv était de  $1,2 \pm 0,4\%$  (Figures 18A et 19). Au jour 3 et 7 suivant la lésion dans le groupe E-, l'expression protéique du PCNA dans les CMLv de la média a augmenté respectivement de 5,7 fois ( $7,8 \pm 2,4\%$ ,  $P < 0,01$ ) et 4,9 fois ( $6,8 \pm 1,3\%$ ,  $p < 0,001$ ), comparativement aux vaisseaux natifs (Figures 18B et 19). Pour les carotides E-, le taux de prolifération des CMLv de la média est retourné vers la valeur basale des carotides E+ à 14 et 28 jours suivant la lésion ( $1,0 \pm 0,5\%$  et  $1,6 \pm 0,5\%$ ) (Figure 19). Pour tous les temps d'observation, un traitement avec l'AS PDGFR- $\beta$  ou l'ASD n'a pas réduit significativement la surexpression du PCNA dans les CMLv de la média comparativement au groupe E- (Figures 18C, D et 19), les AS ont plutôt montré une tendance inverse au jour 3 (Figure 18). Dans le groupe AS PDGFR- $\beta$ , l'expression du PCNA était également maximale aux jours 3 et 7 ( $15,2 \pm 7,3\%$  et  $5,6 \pm 2,2\%$ ) et est revenue à la valeur basale observée dans les carotides E+ au jour 14 et 28 suivant la lésion ( $0,9 \pm 0,4\%$  et  $0,9 \pm 0,1\%$ ) (Figures 18A, C et 19).

L'expression du PCNA par les CMLv de l'intima a été quantifiée entre les jours 7 et 28 suivant la dénudation des carotides. Dans le groupe E-, le pourcentage de CMLv exprimant le PCNA dans l'intima au jour 7 était de  $9,8 \pm 2,4\%$  et est retourné vers le taux d'expression basal observé dans la média des vaisseaux E+ au jour 14 et 28 ( $0,4 \pm 0,2\%$  et  $0,6 \pm 0,3\%$ ) (Figures 18B et 19). Un traitement avec l'AS PDGFR- $\beta$  ou l'ASD n'a pas empêché la surexpression du PCNA dans l'intima au jour 7 (Figures 18C, D et 19). Dans ces deux groupes, le pourcentage de CMLv en prolifération au jour 14 et 28 s'est approché de la valeur basale observée dans le groupe E+ et était de  $2,0 \pm 1,3\%$  et  $2,4 \pm 1,3\%$  pour l'AS PDGFR- $\beta$  (Figure 19).



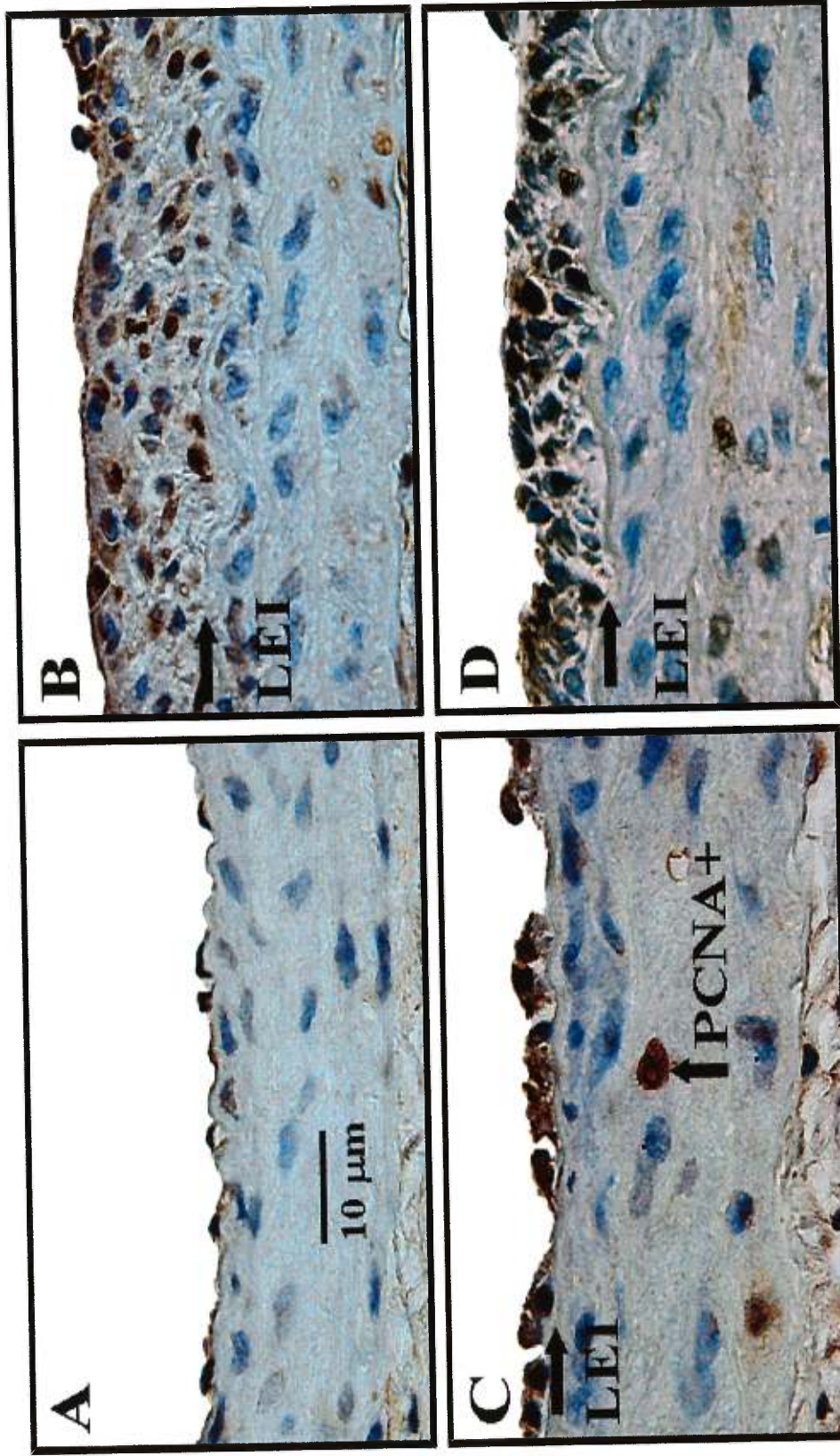
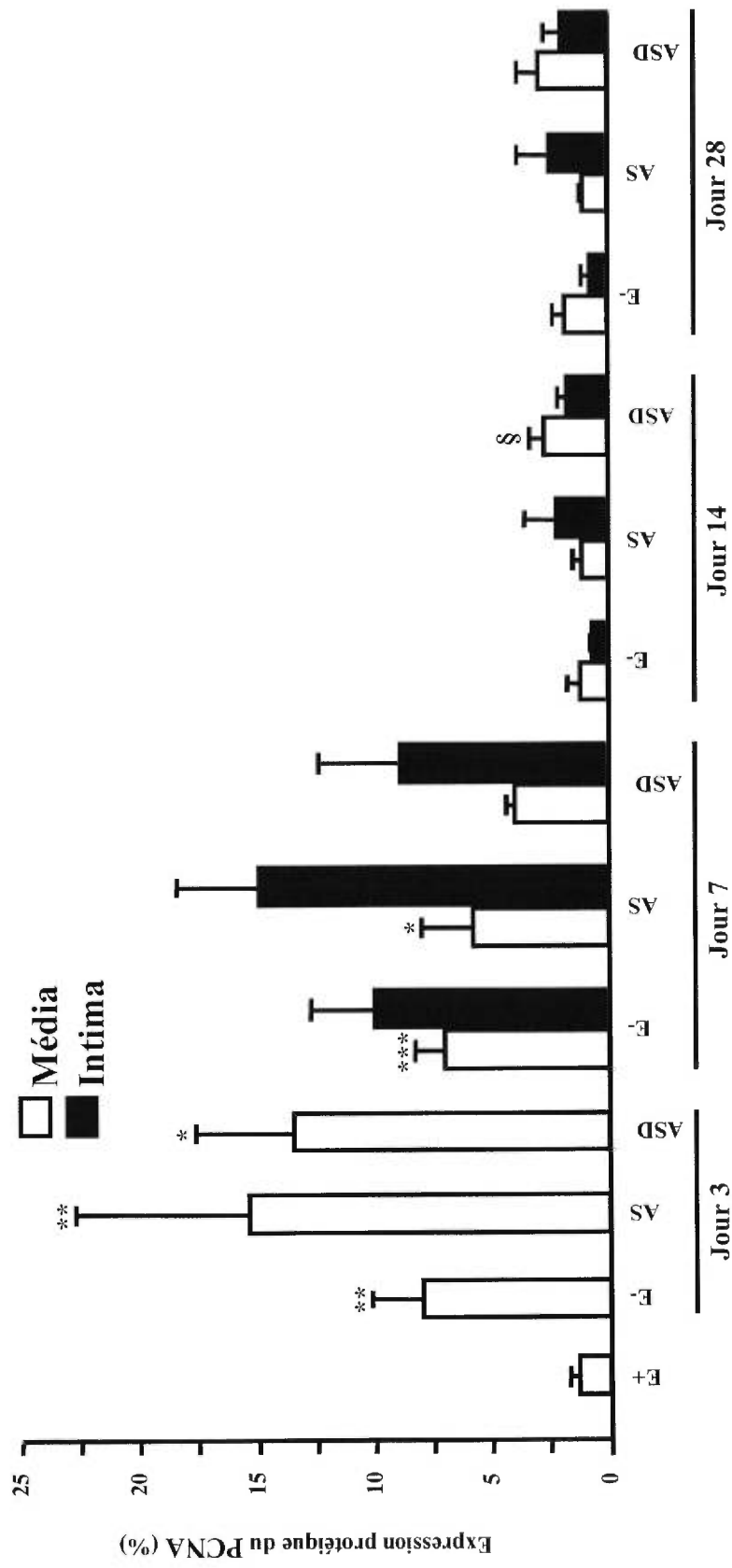


Figure 18 : Expression de l'antigène nucléaire des cellules en prolifération au jour 7 suivant la lésion vasculaire.  
 A: E<sup>+</sup>; B: E<sup>-</sup>; C: AS; D: ASD





**Figure 19: Expression relative de l'antigène nucléaire des cellules en prolifération par les cellules musculaires lisses vasculaires.**  
 N = 4-14 animaux par traitement. \* vs E, § vs AS. 1 symbole P<0, 05, 2 symboles P<0, 01, 3 symboles P<0, 001.

### 3.5 Réendothélialisation vasculaire

Nous avons voulu déterminer si un traitement avec l'AS PDGFR- $\beta$ , en plus de prévenir l'hyperplasie intimale, favoriserait la réendothélialisation et la guérison vasculaire dans les carotides de rats dénudées par ballon vues en section transverse. Afin de quantifier l'étendue de la réendothélialisation, l'expression de la protéine eNOS a été détectée par immunohistochimie et le pourcentage de la circonférence totale de l'intima couverte par des îlots de CE a été calculé. Les carotides natives avaient une couverture endothéliale de  $96,7 \pm 0,5\%$  (Figures 20A et 21). Immédiatement après les trois passages du ballon cathéter, le taux d'endothélialisation des carotides du groupe E- Jour 0 est tombé à  $2,7 \pm 0,3\%$  (Figures 19B et 20). Dans le groupe simplement dénudé, le processus de réendothélialisation s'est accentué dans le temps, mais est resté incomplet, atteignant  $2,7 \pm 0,8\%$  (jour 3),  $7,7 \pm 1,8\%$  (jour 7),  $17,2 \pm 2,4\%$  (jour 14) et  $24,4 \pm 1,9\%$  (jour 28) (Figures 20C et 21). Un traitement avec l'AS PDGFR- $\beta$  a augmenté à chaque temps d'observation l'étendue de la réendothélialisation comparativement au groupe E-. Le pourcentage de couverture endothéliale était de  $4,2 \pm 1,8\%$  (jour 3, P=NS),  $17,5 \pm 2,1\%$  (jour 7, P<0,001),  $30,2 \pm 3,2\%$  (jour 14, P<0,001) et  $49,6 \pm 3,5\%$  (jour 28, P<0,001) (Figures 20D et 21). Par rapport à la simple dénudation, l'ASD n'a pas favorisé la réendothélialisation pour chacun des temps étudiés (Figure 21).

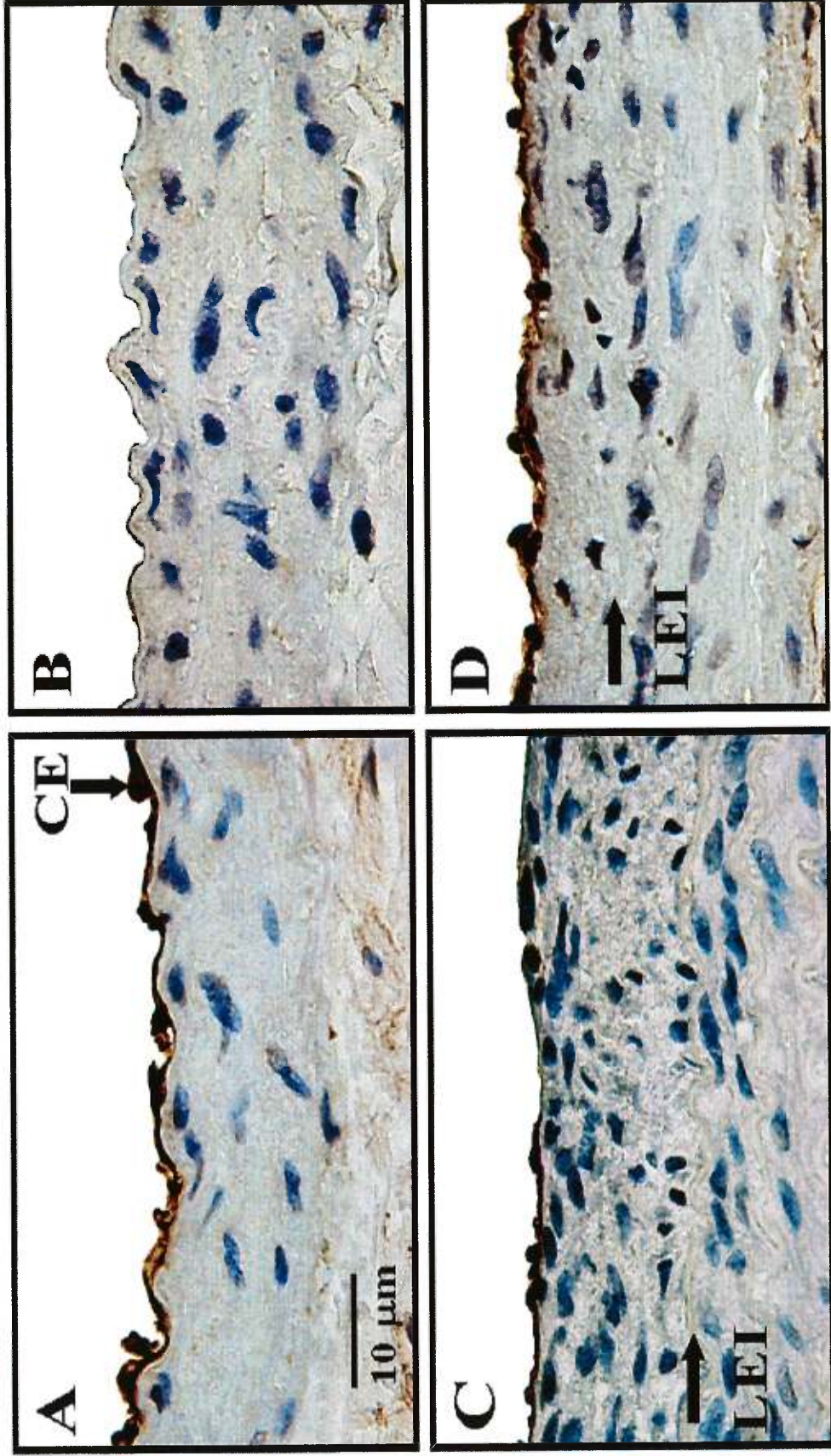


Figure 20: Expression par les cellules endothéliales de l'enzyme synthétisant l'oxyde nitrique de façon constitutive.

A: E<sup>+</sup>; B: E<sup>-</sup> J0; C: E- J28; D: AS J28

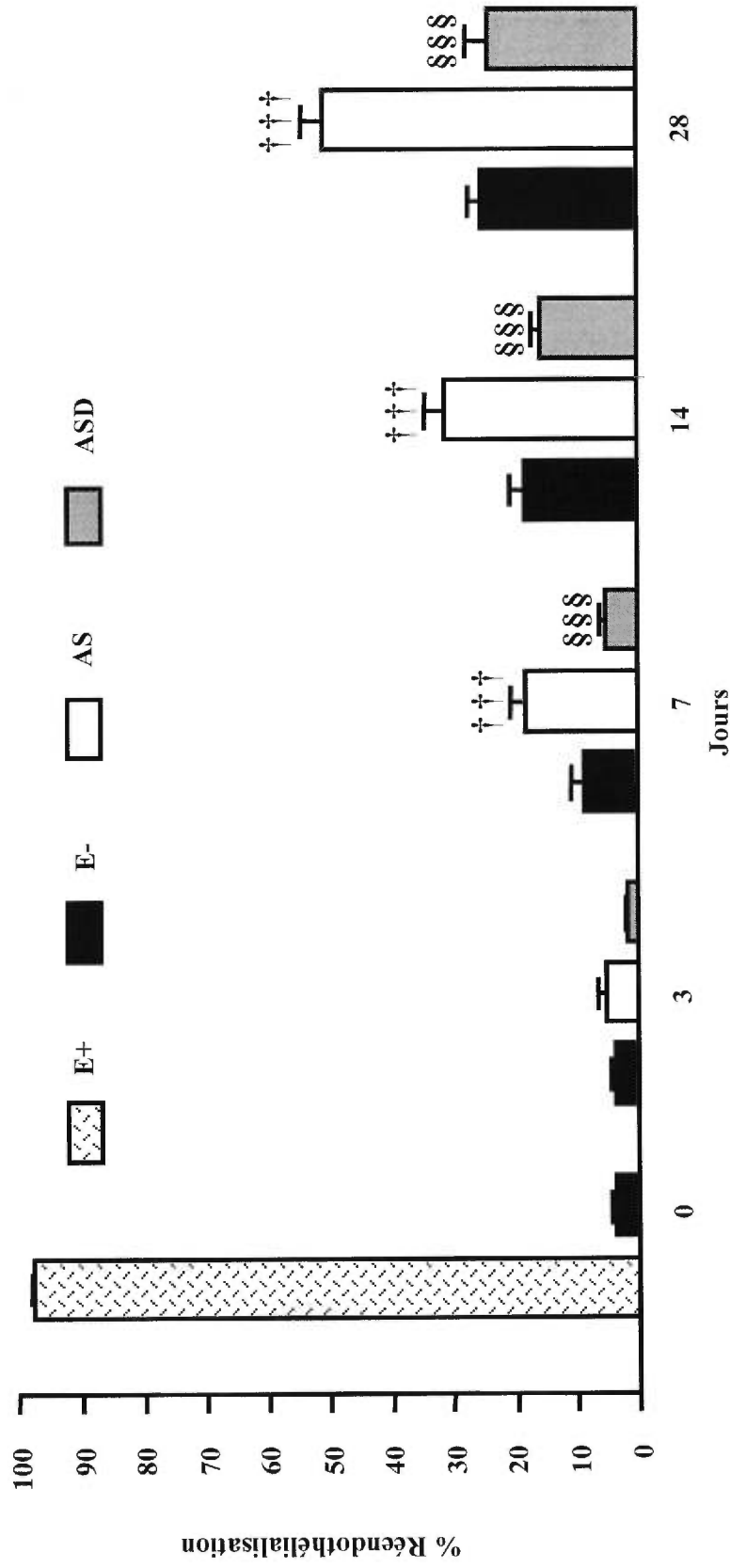


Figure 21: Quantification de la guérison vasculaire dans le temps.

N = 4-20 animaux par traitement. † vs E-, § vs AS. 3 symboles P<0, 001.

### 3.6 Réactivité vasculaire des carotides ex vivo

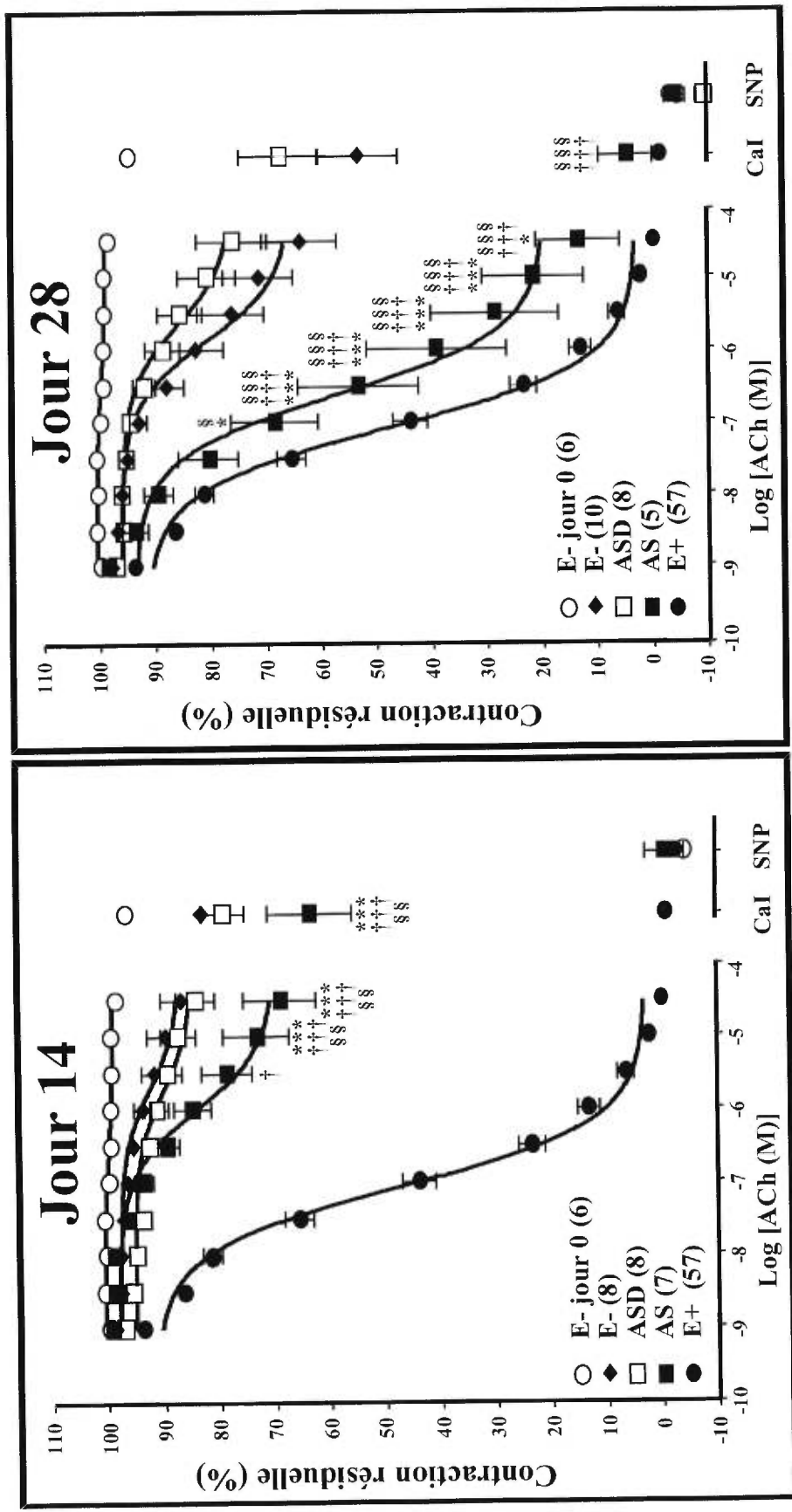
Les segments non fixés à la formaline 10% des carotides de rat ont été suspendus en bain d'organe pour l'étude de la réactivité vasculaire. Une tension passive de 1, 5g a été obtenue en étirant graduellement les anneaux artériels. L'atteinte de cette tension optimale a été suivie en provoquant la dépolarisation et la contraction des CMLv avec du KCl 20mM. La vasoconstriction enregistrée après l'administration de PE  $10^{-6}$ M dans les carotides natives était de  $0,68 \pm 0,04$ g et de  $1,38 \pm 0,12$ g dans les artères fraîchement dénudées (Tableau V). La réactivité vasculaire des carotides simplement dénudées, traitées avec l'AS PDGFR- $\beta$  ou l'ASD a été évaluée à 14 ou 28 jours après la lésion. Dans ces trois groupes, la vasoconstriction générée par la PE  $10^{-6}$ M se situait entre  $0,97 \pm 0,11$  et  $1,28 \pm 0,10$ g (Tableau V).

L'ajout de doses croissantes et cumulatives d'ACh ( $10^{-9}$  à  $3,17 \times 10^{-5}$ M) aux anneaux précontractés à la PE, a permis d'évaluer la relaxation endothélium dépendante des artères lésées et natives. Pour les artères E+, l'application d'ACh a induit une vasorelaxation dose dépendante et complète à  $3,17 \times 10^{-5}$ M (Figure 22). À l'opposé, les artères fraîchement dénudées (E- J0) ont à peine relaxé de 2% après la dose maximale d'ACh (Tableau V et Figure 21). Au jour 14 et 28, le pourcentage maximal de vasorelaxation atteint à l'ACh dans les vaisseaux E- était respectivement de  $13,4 \pm 3,7$  et  $36,1 \pm 6,8$ % (Tableau V et Figure 22). Le traitement avec l'AS PDGFR- $\beta$  a augmenté la vasorelaxation induite par l'ACh de façon significativement différente au jour 14 pour des concentrations comprises entre  $3,17 \times 10^{-6}$ M et  $3,17 \times 10^{-5}$ M et au jour 28, pour des concentrations comprises entre  $3,17 \times 10^{-7}$ M et  $3,17 \times 10^{-5}$ M, comparative-ment au groupe E- ( $P < 0,05$  à  $0,001$ ) (Figure 22). La relaxation endothélium dépendante maximale a été de  $31,2 \pm 6,5$  et  $86,6 \pm 7,6$ % respectivement à 14 et 28 jours pour le groupe traité avec l'AS PDGFR- $\beta$  (Figure 22 et Tableau V). Un traitement avec l'ASD n'a pas amélioré à 14 ou 28 jours, la capacité à relaxer à l'ACh (Tableau V et Figure 22).

La concentration d'ACh requise pour induire 50% de la relaxation maximale atteinte ( $EC_{50}$ ) a été établie à partir des courbes de la Figure 22. Dans les vaisseaux natifs, la

dose  $EC_{50}$  d'ACh était de  $8,55 \times 10^{-8} M$  (Tableau V). Au jour 14, elle était respectivement de  $1,98 \times 10^{-6} M$ ,  $1,01 \times 10^{-6} M$  et  $1,88 \times 10^{-6} M$  pour les groupes E-, AS PDGFR- $\beta$  et ASD (Tableau V). Au jour 28, cette dose était de  $1,34 \times 10^{-6} M$ ,  $2,47 \times 10^{-7} M$  et  $2,23 \times 10^{-6} M$  pour les groupes E-, AS PDGFR- $\beta$  et ASD (Tableau V). En conséquence, au jour 14 et 28 suivant la lésion, la concentration d'ACh induisant 50% de la vasorelaxation maximale des carotides traitées avec l'AS PDGFR- $\beta$ , comparativement au groupe E-, était 1,96 et 5,42 fois plus faible.

Après l'addition de la concentration maximale d'ACh ( $3,17 \times 10^{-5} M$ ), le CaI ( $2,5 \times 10^{-7} M$ ) était ajouté pour obtenir la relaxation endothélium dépendante maximale par un second mécanisme, différent de l'ACh. Au jour 14 et 28 suivant la lésion, l'ajout de CaI aux artères simplement dénudées ou ayant reçu l'ASD ou l'AS PDGFR- $\beta$ , a amélioré la capacité à relaxer de moins de 8% (Tableau V et Figure 22). Finalement, le SNP ( $10^{-5} M$ ) a été ajouté afin d'induire une relaxation directe des CMLv, non dépendante de l'endothélium. L'application du SNP a mené à une vasorelaxation complète dans les trois groupes d'artères dénudées au jour 14 et 28 (Tableau V et Figure 22).



**Figure 22: Effets de l'antisense contre le récepteur  $\beta$  du facteur de croissance dérivé des plaquettes sur les fonctions vasculaires.**  
 \* vs E+, † vs E-, § vs AS. 1 symbole P<0, 05, 2 symboles P<0, 01, 3 symboles P<0, 001.

Contraction maximale à la phényléphrine ± ESM								
Agent	E+	E- J0	E- J14	AS J14	ASD J14	ASD J28	AS J28	ASD J28
PE	0,68 ± 0,04	1,38 ± 0,12	1,20 ± 0,06	1,02 ± 0,06	1,00 ± 0,09	1,28 ± 0,10	1,05 ± 0,15	0,97 ± 0,11

Pourcentage de relaxation cumulative ± ESM									
Agent	log Ach	E+	E- J0	E- J14	AS J14	ASD J14	E- J28	AS J28	ASD J28
Ach	1X10 <sup>-9</sup> M	6,21 ± 0,68	0,17 ± 0,22	1,19 ± 0,37	0,64 ± 0,48	2,81 ± 0,7	2 ± 0,39	1,52 ± 1	2,94 ± 0,64
	3,17X10 <sup>-9</sup> M	13,44 ± 1,19	-0,69 ± 0,39	2,26 ± 0,55	1,36 ± 0,47	4,34 ± 0,52	3,18 ± 0,57	6,35 ± 2,35	4,1 ± 0,85
	1X10 <sup>-8</sup> M	18,59 ± 1,68	-0,36 ± 0,29	2,27 ± 0,4	1,23 ± 0,55	5,1 ± 0,8	3,95 ± 0,6	10,46 ± 2,65	3,79 ± 0,82
	3,17X10 <sup>-8</sup> M	34,43 ± 2,62	-0,66 ± 0,48	2,75 ± 0,54	3,5 ± 0,92	6,33 ± 1,08	4,93 ± 1,02	19,52 ± 5,35	4,59 ± 1
	1X10 <sup>-7</sup> M	56,05 ± 3,01	0,18 ± 0,21	3,44 ± 0,57	6,41 ± 1,64	6,37 ± 1,28	6,97 ± 1,57	31,48 ± 7,93	5,5 ± 1,05
	3,17X10 <sup>-7</sup> M	76,56 ± 2,42	0,6 ± 0,46	4,48 ± 0,82	10,77 ± 2,05	7,58 ± 1,56	11,97 ± 3,19	46,66 ± 10,91	8,02 ± 2,04
	1X10 <sup>-6</sup> M	86,82 ± 1,94	0,59 ± 0,45	6,36 ± 1,62	15,2 ± 3,33	8,8 ± 2,06	17,26 ± 4,97	60,75 ± 12,64	11,3 ± 3,08
Cal	3,17X10 <sup>-6</sup> M	93,49 ± 1,48	0,85 ± 0,3	8,4 ± 2,21	21,48 ± 4,54	10,83 ± 2,6	23,59 ± 6,01	71,52 ± 11,59	14,45 ± 3,97
	1X10 <sup>-5</sup> M	97,76 ± 1,1	0,74 ± 0,42	10,55 ± 3,38	26,85 ± 6,03	12,79 ± 3,1	28,59 ± 6,34	78,35 ± 9,28	19,27 ± 5,24
	3,17X10 <sup>-5</sup> M	100,05 ± 1,01	1,59 ± 0,6	13,32 ± 3,63	31,19 ± 6,49	15,92 ± 3,48	36,09 ± 6,82	86,55 ± 7,56	23,78 ± 6,31
EC <sub>50</sub> (M)	8,55X10 <sup>-8</sup>	ND	1,98X10 <sup>-6</sup>	1,01X10 <sup>-6</sup>	1,88X10 <sup>-6</sup>	1,34X10 <sup>-6</sup>		2,47X10 <sup>-7</sup>	2,23X10 <sup>-6</sup>
Cal	2,5X10 <sup>-7</sup> M	101,02 ± 0,95	3,88 ± 0,75	17,3 ± 4,26	36,85 ± 7,6	21,17 ± 3,96	45,7 ± 7,37	94,95 ± 4,95	31,29 ± 7,38
SNP	1X10 <sup>-5</sup> M	102,85 ± 0,84	104,37 ± 1,06	101,11 ± 2,6	100,96 ± 3,51	110,75 ± 1,59	103,65 ± 1,58	103,86 ± 1,9	109,22 ± 1,59
N		57	6	8	7	8	10	5	8

Tableau V: Résumé des paramètres mesurés lors des expériences de réactivité des carotides de rat ex vivo.



## 4 Discussion

Les résultats présentés dans ce mémoire montrent qu'une livraison en bolus endovasculaire de l'AS PDGFR- $\beta$  au site de la lésion carotidienne chez le rat, a non seulement réduit le développement de l'hyperplasie intimale, mais a également doublé la réendothélialisation et a restauré presque complètement la capacité de relaxation endothélium dépendante. De plus, l'AS PDGFR- $\beta$  a empêché la surexpression de la protéine PDGFR- $\beta$  pour tous les temps étudiés. Finalement, nous avons montré que la réduction de l'hyperplasie intimale engendrée par l'AS PDGFR- $\beta$  n'était pas due à une inhibition de la prolifération cellulaire dans la média ou l'intima, mais était plutôt attribuable à l'inhibition de la migration des CMLv vers l'intima.

À la suite de la dénudation par ballon de la carotide de rat, l'expression de la protéine PDGFR- $\beta$  a augmenté dans la média et l'intima pour atteindre un maximum à 7 jours suivant la lésion et revenir à la valeur basale d'expression après 14 et 28 jours. Ces résultats s'accordent avec d'autres études qui rapportent une surexpression transitoire du PDGFR- $\beta$  dans les artères lésées de rat et d'humain<sup>175, 203, 247</sup>. Par ailleurs, nos résultats nous amènent à faire trois observations importantes. Tout d'abord, l'application locale, endovasculaire et unique de l'AS PDGFR- $\beta$  a empêché la surexpression de la protéine PDGFR- $\beta$ . Ensuite, nous n'avons pas observé de surexpression retardée du PDGFR- $\beta$  sur les 28 jours d'étude. Finalement, le traitement local a été suffisant pour réduire le ratio intima/média de 58%, 28 jours après la lésion.

Bilder et coll. ont rapporté qu'un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase du PDGFR- $\beta$ , le RPR101511A, donné oralement deux fois par jour pendant 28 jours, a permis de réduire de 30% le ratio des aires intima/média dans les coronaires de porcs lésées<sup>24</sup>. Banai et coll. ont montré que la livraison locale, intravasculaire d'un autre composé inhibant l'activité tyrosine kinase du PDGFR- $\beta$ , le AG1295, a réduit de 40% le ratio intima/média dans les coronaires de porc lésées<sup>12</sup>. Fishbein et coll. ont montré que l'administration périvasculaire soutenue du AG1295 a permis de réduire de 35% la formation de néointima 14 jours après la lésion carotidienne chez le rat<sup>74</sup>. Ce compo-

sé a aussi fortement inhibé la surexpression protéique du PDGFR- $\beta$  au 3<sup>e</sup> et 14<sup>e</sup> jour suivant la lésion <sup>74</sup>. De plus, Giese et coll. ont montré que l'administration intraveineuse d'un anticorps monoclonal contre le PDGFR- $\beta$  pendant les 6 jours suivant l'endartérectomie de la carotide ou l'angioplastie de l'artère fémorale de babouin a réduit respectivement de 28% et 47% le ratio des aires intima/média 30 jours après la lésion, tandis qu'un anticorps contre le PDGFR- $\alpha$  n'avait pas d'effet <sup>89</sup>. Finalement, Hart et coll. ont montré que l'administration intraveineuse répétée d'anticorps contre le PDGFR- $\beta$  en combinaison avec de l'héparine, a également permis de réduire le ratio intima/média de 40% dans les artères saphènes de babouin <sup>104</sup>. Ces cinq études récentes ont montré une réduction substantielle de l'hyperplasie intimale en bloquant l'activation du PDGFR- $\beta$ .

Dans notre étude, la livraison de l'AS PDGFR- $\beta$  en bolus endovasculaire unique a suffi pour empêcher la surexpression protéique du PDGFR- $\beta$  tout au long des 28 jours d'observation, ce qui peut expliquer pourquoi notre traitement s'est avéré plus efficace pour limiter le développement de l'hyperplasie intimale chez le rat. Dans une étude antérieure, Sirois et coll. ont démontré que la livraison périvasculaire soutenue de l'AS PDGFR- $\beta$  a permis de réduire le ratio intima/média de 60 à 80% <sup>235</sup>. Les résultats présentés dans ce mémoire suggèrent qu'une livraison soutenue de l'AS PDGFR- $\beta$  n'est pas nécessaire pour obtenir un résultat biologique optimal, ce qui renforce le concept qu'une inhibition des événements initiaux à la suite d'une lésion vasculaire aiguë pourrait être suffisante pour engendrer des bénéfices prolongés <sup>104, 61, 63</sup>.

Afin de déterminer si la réduction de l'hyperplasie intimale attribuable à l'AS PDGFR- $\beta$  était reliée à une interférence dans la prolifération ou la migration des CMLv de la média, nous avons calculé la densité, le nombre et l'activité proliférative des cellules dans la média et l'intima, pour tous les groupes étudiés. Bien qu'une hausse du nombre de CMLv dans la média soit observée à 28 jours suivant la lésion dans les groupes dénudés, traités avec l'AS PDGFR- $\beta$  ou l'ASD, la densité de CMLv n'a pas fluctué de plus de 20% comparativement à la densité observée dans la média

des carotides normales. L'AS PDGFR- $\beta$  a réduit le nombre de CMLv dans l'intima au jour 7, 14 et 28 de près de 50% comparativement au groupe simplement dénudé et ce, sans modifier la densité intimaux aux jours 14 et 28.

Nous avons ensuite évalué l'activité proliférative des CMLv de l'intima et de la média. Dans le groupe E-, l'expression du PCNA aux jours 3 et 7 suivant la lésion a augmenté respectivement de 5, 8 et 4, 9 fois et est revenue au niveau basal retrouvé dans les vaisseaux normaux (~1%), à partir du jour 14. Un traitement avec l'AS PDGFR- $\beta$  ou l'ASD n'a pas réduit significativement la surexpression du PCNA dans les CMLv de la média et de la néointima pour tous les temps étudiés. Dans les deux groupes traités, 14 jours après la lésion, la surexpression du PCNA est retournée vers la valeur basale observée dans la média des vaisseaux natifs. Ces résultats démontrent que dans une carotide de rat lésée, le traitement avec l'AS PDGFR- $\beta$  n'a pas affecté l'activité proliférative des CMLv de la média et de l'intima. Ainsi, la réduction observée du nombre de CMLv dans l'intima et du ratio des aires intima/média est attribuable à l'inhibition de la migration des CMLv de la média vers l'intima.

Ces résultats sont en accord avec l'observation que l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs fluctue de façon inverse à l'incorporation du BrdU, révélant ainsi une prolifération faible en condition basale, maximale 7 jours après la lésion par ballon et de nouveau basale à 21 jours<sup>271</sup>. Une autre étude a observé une activité proliférative des CMLv de l'ordre de 3, 8% qui durait jusqu'à 12 semaines après la lésion<sup>48</sup>. De plus, le nombre de CMLv qui ne prolifèrent pas reste constant entre le 3<sup>e</sup> et le 14<sup>e</sup> jour suivant la lésion de la carotide chez le rat, montrant que si les cellules ont à proliférer, elles le font immédiatement<sup>50</sup>.

La surface des artères normales est couverte de CE quiescentes et confluentes qui ont la capacité d'inhiber la migration et la prolifération des CMLv, notamment via la relâche de NO, de TGF- $\beta_1$  et de protéoglycans comme le sulfate d'héparan<sup>42</sup>. L'induction d'une lésion vasculaire sévère affectant à la fois la couche intima et médiale est caractérisée par une réduction prolongée de la synthèse de NO par les CE, ainsi que par le développement d'hyperplasie intimaux<sup>179, 248</sup>. La réendothélialisation

incomplète de la lésion peut être attribuable au fait que les CMLv de la média migrent dans l'intima avant que les CE en bordure de la zone lésée aient migré vers le site dénudé<sup>42</sup>. De plus, en co-culture cellulaire, les CMLv ont la capacité d'inhiber la migration des CE, via la relâche de TGF- $\beta_1$  et son activation par la plasmine<sup>219</sup>, ce qui peut entraîner un arrêt du processus de guérison vasculaire. En conséquence, les stratégies thérapeutiques visant à inhiber la prolifération et/ou la migration des CMLv pourraient réduire l'hyperplasie intimale en facilitant indirectement le processus de réendothélialisation.

Dans notre étude, nous avons observé que le passage d'un ballon dans les carotides de rat a causé une dénudation endothéliale presque complète. Dans les vaisseaux E-, une réendothélialisation progressive n'a permis de couvrir que 25% de la surface intimale au jour 28 suivant la lésion. L'application de l'AS PDGFR- $\beta$  a doublé le degré de réendothélialisation à chaque temps d'observation, avec 50% de la néointima recouverte de nouvelles CE au jour 28. Ce résultat, combiné à une réduction de 58% du ratio des aires intima/média observée dans les mêmes carotides traitées avec l'AS PDGFR- $\beta$ , supporte l'hypothèse que l'inhibition de la migration des CMLv de la média lésée a eu un effet bénéfique double en réduisant l'hyperplasie intimale et en accélérant le processus de guérison vasculaire.

Enfin, nous avons voulu déterminer si l'effet bénéfique de l'AS PDGFR- $\beta$  sur la prolifération et la migration des CE s'était accompagné d'une amélioration de la fonction vasorégulatrice. Des études ont suggéré que les CE régénérées avaient une capacité réduite à produire les facteurs vasorelaxants endothéliaux, malgré le fait que la capacité des CMLv sous-jacentes à relaxer ou à contracter soit inchangée<sup>179, 248, 8</sup>. Nos résultats montrent que les fonctions contractiles (PE) et relaxantes (SNP) des CMLv ont été préservées et inchangées par les différents traitements. Il est important de noter que l'AS PDGFR- $\beta$  a amélioré significativement la relaxation endothélium dépendante induite par l'ACh à 14 jours et de façon encore plus marquée à 28 jours suivant la lésion. La relaxation maximale induite par l'ACh a plus que doublé et la concentration estimée d'ACh requise pour produire 50% de cet effet a été réduite respectivement de 2 et 5 fois, à 14 et 28 jours suivant la lésion, comparativement aux vaisseaux

E-. Nos résultats suggèrent qu'une réendothélialisation de 50% des carotides de rat dénudées serait suffisante pour induire une relaxation endothélium dépendante presque complète, comme observé pour les vaisseaux normaux. Des études récentes ont rapporté qu'un traitement avec la L-arginine a amélioré la relaxation endothélium dépendante à l'ACh des carotides de lapins dénudées par ballon<sup>248</sup>. De plus, dans les artères iliaques de lapin lésées par ballon, un traitement avec le bFGF (2, 5µg bihebdomadaire pour deux semaines en intraveineux) a doublé la réendothélialisation 4 semaines après la lésion. Comme dans notre étude, cette réendothélialisation induite par le bFGF était incomplète (60%), mais suffisante pour restaurer presque complètement la relaxation médiée par l'ACh. Par contre, le bFGF n'a pas empêché le processus d'hyperplasie intinale<sup>248</sup>.

Pour terminer, le modèle de dénudation de la carotide de rat avec un ballon cathéter induisant une hyperplasie intinale est le plus utilisé pour l'étude de la resténose et de l'implication particulière du PDGF<sup>223, 216</sup>. Nous l'avons choisi dans notre étude car c'est un modèle simple et bien caractérisé, qui a été utilisé dans l'étude initiale de Sirois et coll. visant à tester l'efficacité de l'AS PDGFR-β à prévenir l'hyperplasie intinale<sup>235</sup>. Les résultats bénéfiques obtenus par deux modes d'administration chez le rat permettent maintenant d'examiner son potentiel chez le porc, un modèle plus complexe de sténose vasculaire, qui reproduit mieux les phénomènes d'athérosclérose et de resténose observés en clinique, ce qui sera un facteur de prédiction utile quant au succès futur de cette nouvelle thérapie chez l'humain.

## 5 Conclusion

Dans le modèle de la carotide de rat dénudée par ballon, 28 jours après la lésion, un bolus endovasculaire de l'antisens complémentaire à l'ARNm du PDGFR- $\beta$  a permis :

- de réduire la surexpression protéique du PDGFR- $\beta$  dans la média de >90%;
- de réduire l'hyperplasie intimale de 58%;
- de réduire le nombre de CMLv dans la néointima de 49% et ce, sans empêcher la prolifération des CMLv dans la média et l'intima;
- d'augmenter la réendothélialisation de 103%;
- d'augmenter la réactivité vasculaire ( $EC_{50}$ ) de 5 fois.

Le traitement local et unique avec l'AS PDGFR- $\beta$  semble donc avoir eu un double effet bénéfique en réduisant l'hyperplasie intimale via l'inhibition de la migration des CMLv de la média et en favorisant le rétablissement de la réactivité vasculaire normale. Ces résultats démontrent le potentiel clinique de l'AS PDGFR- $\beta$  pour prévenir les artériopathies accélérées et promouvoir la guérison vasculaire à la suite d'une angioplastie.

## 6 Références

1. Abe JI, Deguchi JO, Matsumo T, Takuwa N, Noda M, Ohno M, Mahuuchi M, Kurokawa K, Takuwa Y. Stimulated activation of platelet-derived growth factor receptor in vivo in balloon injured arteries. *Circulation* 1997 ;96 :1906-1913.
2. Abe JI, Zhou W, Taguchi JI, Takuwa N, Miki K, Okazaki H, Kurokawa K, Kumada M, Takuwa Y. Suppression of neointimal smooth muscle cell accumulation in vivo by antisense cdc-2 and cdk-2 oligonucleotides in rat carotid artery. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;198:16-24.
3. Abedi H, Dawes KE, Zachary I. Differential effects of platelet-derived growth factor BB on p125 focal adhesion kinase and paxillin tyrosine phosphorylation and on cell migration in rabbit aortic vascular smooth muscle cells and Swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem.* 1995; 270(19):11367-11376.
4. Agrawal S, Tan W, Cai Q, Xie X, Zhang R. In vivo pharmacokinetics of phosphorothiate oligonucleotides containing contiguous guanosines. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1997;7 :245-249.
5. Agrawal S, Temsamani J, Tang JY. Pharmacokinetics, biodistribution and stability of oligodeoxynucleotide phosphorothioates in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7595-7599.
6. Alexandrow M, Moses H. Transforming growth factor  $\beta$  and cell cycle regulation. *Cancer Res.* 1995; 55: 1452-1457.
7. Arvidsson AK, Rupp E, Nanberg E, Downward J, Ronnstrand L, Wennstrom S, Schlessinger J, Heldin CH, Claesson-Welsh L. Tyr-716 in the platelet derived growth factor  $\beta$ -receptor kinase insert is involved in GRB2 binding and Ras activation. *Mol Cell Biol* 1994;14:6715-6726.
8. Asahara T, Bauters C, Pastore C, Kearney M, Rossow S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation* 1995; 91: 2793-2801.
9. Assender JW, Southgate KM, Hallett MB, Newby AC. Inhibition of proliferation, but not of  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization, by cyclic AMP and GMP in rabbit aortic smooth-muscle cells. *Biochem J* 1992;288 :527-532.
10. Azuma H, Banno K, Yoshimura T. Pharmacological properties of *N*-(3', 4'-dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid (*N*-5'), a new anti-atopic agent. *Br J Pharmacol* 1976;58:483-488.

11. Banai S, Shweiki D, Pinson A, Chandra M, Lazarovici G, Keshet E. Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis. *Cardiovasc Res.* 1994, 28: 1176-1179.
12. Banai S, Wolf Y, Golomb G, Pearle A, Waltenberger J, Fishbein I, Schneider A, Gazit A, Perez L, Huber R, Lazarovichi G, Rabinovich L, Levitzki A, Gertz D. PDGF-Receptor tyrosine kinase blocker AG1295 selectively attenuates smooth muscle cell growth in vitro and reduces neointimal formation after balloon angioplasty in swine. *Circulation* 1998;97:1960-1969.
13. Barrett TB, Benditt EP. Platelet-derived growth factor gene expression in human atherosclerotic plaques and normal artery wall. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:2810-2814.
14. Bassiouny HS, Song RH, Hong XF, Singh A, Kocharyan H, Glagov S. Flow regulation of 72-kD collagenase IV (MMP-2) after experimental arterial injury. *Circulation.* 1998; 98(2):157-163.
15. Baumgartner HR. Platelet interaction with vascular structures. *Thromb Diath Haemorrh* 1972;51(suppl):161-176.
16. Bendeck MP, Regenass S, Tom WD, Giachelli CM, Schwartz SM, Hart C, Reidy MA. Differential expression of alpha 1 type VIII collagen in injured platelet-derived growth factor-BB-stimulated rat carotid arteries. *Circ Res* 1996;79:524-531.
17. Bennett MR et Schwartz SM. Antisense therapy for angioplasty restenosis: some critical considerations. *Circulation.* 1995 ; 92 : 1981-1993.
18. Bennett MR, Anglin S, McEwan JR, Jagoe R, Newby AC, Evan GI. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo by c-myc antisense oligodesoxynucleotides. *J Clin Invest.* 1994; 93: 820-828.
19. Bennett MR, Boyle JJ. Apoptosis of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1998;138:3-9.
20. Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM. Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1995; 95: 2266-2274.
21. Bennett MR, Lindner V, DeBlois D, Reidy MA, Schwartz SM. Effect of phosphorothioated oligonucleotides on neointima formation in the rat carotid artery: dissecting the mechanism of action. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2326-2332.
22. Bijsterbosch MK, Manoharan M, Rump ET, Devrueh RLA, Van Veghel R, Tivel KL, Biessen EAL, Bennet CF, Cook PD, Van Berkel TJC. In vivo fate of



- phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides: Predominant uptake by scavenger receptors on endothelial cells. *Nucleic Acids Res* 1997;25 :3290-3296.
23. Bilder G, Krawiec JA, Gazit A, Gilon C, McVetry K, Lyall R, Zilberstein A, Levitzki A, Perrone M, Schreiber AB. Tyrosine kinases inhibit PDGF induced DNA synthesis, tyrosine specific protein kinase activity and c-fos mRNA expression in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1991;260:C 721-C 730.
  24. Bilder G, Wentz T, Leadley R, Amin D, Byan L, O'Conner B, Needle S, Galczenski H, Bostwick J, Kasiewski C, Myers M, Spada A, Merkel L, Ly C, Persons P, Page K, Perrone M, Dunwiddie C. Restenosis following angioplasty in the swine coronary artery is inhibited by an orally active PDGF-receptor tyrosine kinase inhibitor, RPR101511A. *Circulation* 1999;99:3292-3299.
  25. Biro S, Fu Y, Yu Z, Epstein S. Inhibitory effects of antisense oligonucleotides targeting c-myc mRNA on smooth muscle cell proliferation and migration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 654-658.
  26. Bjornsson TD, Dryjcki M, Tluczek J, Mennie R, Ronan J, Mellin TN, Thomas KA. Acidic fibroblast growth factor promotes vascular repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:8651-8655.
  27. Bombeli T, Karsan A, Tait JF, Harlan JM. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood* 1997; 89:2429-2442.
  28. Bönisch D, Weber AA, Wittpoth M, Osinski M, Schrör K. Antimitogenic effects of trapidil in coronary artery smooth muscle cells by direct activation of protein kinase A. *Mol Pharm* 1998; 54 (2), 241-248.
  29. Booth RFG, Martin JF, Honey AC, Hassal DG, Beesley JE, Moncada S. Rapid development of atherosclerotic lesions in the rabbit carotid artery induced by perivascular manipulation. *Atherosclerosis* 1989. 76 :257-269.
  30. Bornfeldt KE, Raines EW, Graves LM, Skinner MP, Krebs EG, Ross R. Platelet-derived growth factor: distinct signal transduction pathways associated with migration versus proliferation. *Annals New York Academy Sciences* 1995;766:416-430.
  31. Bornfeldt KE, Raines EW, Nakano T, Graves LM, Krebs EG, Ross R. Insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor-BB induce directed migration of human arterial smooth muscle cells via signaling pathways that are distinct from those of proliferation. *J Clin Invest* 1994;93(3):1266-1274.
  32. Bosmans JM, Kockx MM, Vrints CJ, Bult H, De Meyer GRY, Herman AG. Fibrin(ogen) and von Willebrand factor deposition are associated with intimal thickening after balloon angioplasty of the rabbit carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17 :634-645.

33. Brauwald E. Shattuck Lecture - cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns and opportunities. *N Engl J Med* 1997;337:1360-1369.
34. Brogi E, Wu T, Namiki A, Isner JM. 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.
35. Bryckaert MC, Eldor A, Gazit A, Osherov N, Gilon C, Fontenay M, Levitzki A, Tobelem G. Inhibition of platelet derived growth factor (PDGF) induced mitogenic activity by PDGF receptor tyrosine kinase (tyrphostins) inhibitors. *Exp Cell Res* 1992;199:255-261.
36. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Müller M, Regenass U, Lydon NB. Selective inhibition of the platelet-derived growth factor signal transduction pathway by a protein-tyrosine kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:2558-2562.
37. Buja LM, Kita T, Goldstein JL, Watanabe Y, Brown MS. Cellular pathology of progressive atherosclerosis in WHHL rabbit: an animal model of familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis* 1983;3 :87-101.
38. Burgess TL, Fisher EF, Ross SL, Bready JV, Quian YX, Bayewitch LA, Cohen AM, Herrera CJ, Hu SSF, Kramer TB, Lott FD, Martin FH, Pierce GF, Simonet L, Farrell CL. The antiproliferative activity of c-myb and c-myc antisense oligonucleotides in smooth muscle cells is caused by a nonantisense mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4051-4055.
39. Callow Ad, Choi ET, Trachtenberg JD, Stevens SL, Connolly DT, Rodi C, Ryan US. Vascular permeability factor accelerates endothelial regrowth following balloon angioplasty. *Growth Factors*. 1994; 10: 223-228.
40. Campbell JH, Rennick RE, Kalevitch SG, Campbell GR. Heparan sulfate-degrading enzymes induce modulation of smooth muscle phenotype: *Exp Cell Res*. 1992 May;200(1):156-67.
41. Carmeliet P, Moons L, Stassen J-M, De Mol M, Bouche A, van den Oord JJ, Kockx M, Collen D. Vascular wound healing and neointima formation induced by perivascular electric injury in mice. *Am J Physiol* 1997;150 :761-776.
42. Casscells W. Migration of smooth muscle and endothelial cells: Critical events in restenosis. *Circulation*. 1992; 86:723-729.
43. Castellot JJ, Favreau LV, Karnovsky MJ, Rosenberg RD. Inhibition of vascular smooth muscle growth by endothelial cell-derived heparin. *J Biol Chem* 1982;257:11256-11260.

44. Cercek B, Fishbein MC, Forrester JS, Helfant RH, Fagin JA. Induction of insulin-like growth factor I messenger RNA in rat aorta after balloon denudation. *Circ Res* 1990;66 :1755-1760.
45. Chang MW, Barr E, Lu MM, Barton K, Leiden JM. Adenovirus-mediated over-expression of the cyclin/cyclin-dependant kinase inhibitor, p21 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat carotid artery model of balloon angioplasty. *J Clin Invest*. 1995 ;96: 2260-2268.
46. Chen HC, Guan JL. Stimulation of phosphatidylinositol 3'-kinase association with focal adhesion kinase by platelet-derived growth factor. *J Biol Chem*. 1994; 269(49):31229-31233.
47. Claesson-Welsh L. Signal transduction by the PDGF receptors. In *Growth factor Research* 1994;5:37-53. Pergamon Press. Great Britain.
48. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest* 1983; 49: 327-333.
49. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Mechanisms of stenosis after arterial injury. *Lab Invest* 1983; 49:208-215.
50. Clowes AW, Schwartz SM. Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery. *Circ Res* 1985;56:139-145.
51. Clunn GF, Refson JS, Lymn JS, Hughes AD. Platelet-derived growth factor  $\beta$ -receptors can both promote and inhibit chemotaxis in human vascular smooth muscle cells. *arterioscler thromb vasc biol*. 1997; 17:2622-2629.
52. Coats WD Jr, Whittaker P, Cheung DT, Currier JW, Han B, Faxon DP. Collagen content is significantly lower in restenotic versus nonrestenotic vessels following balloon angioplasty injury in the atherosclerotic rabbit model. *Circulation* 1997;95 :1293-1300.
53. Cossum PA, Sasmor H, Dellinger D, Truong L, Cummins L, Owens SR, Markham PM, Shea JP, Crooke S. Disposition of the  $^{14}\text{C}$ -labeled phosphorothioate oligonucleotide ISIS 2105 after intravenous administration to rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;267 :1181-1190.
54. Crooke ST. An overview of progress in antisense therapeutics. *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 1998;8 :115-122.
55. Crooke ST. Basic principles of antisense therapeutics. In: *Handbook of experimental pharmacology: Antisense research and application*, Crooke ST, eds. Springer-verlag, Berlin, Heidelberg; 1998.

56. Currens JH, White PD. Half century of running: Clinical, physiologic and autopsy findings in the case of Clarence DeMar, "Mr. Marathoner." *N Engl J Med* 1961;265 :988-993.
57. Daaka Y, Wickstrom E. Target dependance of antisense oligodesoxynucleotide inhibition of c-HA-ras p21 expression and focus formation in T24-transformed NIH3T3 cells. *Oncogene Res* 1990;5:267-275.
58. De Meyer GRY, Bult H Kockx MM, Herman AG. Effect of angiotensin converting enzyme inhibition on neo-intima formation in the rabbit collared carotid artery. *J Cardivasc Pharmacol* 1995;26 :614-620.
59. De Meyer GRY, Bult H. Mechanisms of neointima formation - lessons from experimental models. *Vascular Medicine* 1997;2 :179-189.
60. Diliberto PA, Gordon GW, Yu CL, Earp HS, Herman B. Platelet-derived growth factor (PDGF)  $\alpha$  receptor activation modulates the calcium mobilizing activity of the PDGF  $\beta$  receptor in Balb/c3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 1992; 267:11888-11897.
61. Edelman ER, Simons M, Sirois MG, Rosenberg RD. C-myc in vasculoproliferative disease. *Circ Res.* 1995; 76: 176-182.
62. Engisch R, Schurmann K, Bienert H, vom Dahl J, Voss M, Gunther RW, Vorwerk D. Suramin inhibits proliferation of human arterial smooth muscle cells in vitro: potential drug for prevention of restenosis by local drug delivery. *J Vasc Interv Radiol* 2000; 11(5):639-644.
63. EPIC Investigators. Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high risk coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1994; 330:956-961.
64. Ettenson DS, Gotlieb AI. Role of Endothelial Cells in Vascular Integrity and Repair in Atherosclerosis, *Advances in Pathology and Laboratory Medecine*. Édition Mosby-Year Book Inc., 1993; vol. 6: 285-303.
65. Fang S. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236:706-711.
66. Faxon DP, Coats W, Currier J. Remodeling of the coronary artery after vascular injury. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 1997; 40; (2): 129-140.
67. Faxon DP, Weber VJ, Haudenschild C, Gottsman SB, McGovern WA, Ryan TJ. Acute effects of transluminal angioplasty in three models of atherosclerosis. *Arteriosclerosis*. 1982;2 :125-133.
68. Feig LA, Schaffhausen B. The hunt for Ras targets. *Nature* 1994;370:508-509.

69. Ferns GA, Sprugel KH, Seifert RA, Bowen-Pope DF, Kelly JD, Murray M, Raines EW, Ross R. Relative platelet-derived growth factor receptor subunit expression determines cell migration to different dimeric forms of PDGF. *Growth Factors*. 1990; 3(4):315-324.
70. Ferns GAA, Raines EW, Sprugel KH, Motani AS, Reidy MA, Ross R. Inhibition of neointimal smooth muscle cell accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science* 1991; 253: 1129-1132.
71. Fingerle J, Au YP, Clowes AW, Reidy MA. Intimal lesion formation in rat carotid arteries after endothelial denudation in absence of medial injury. *Arteriosclerosis* 1990; 10: 1082-1087.
72. Fingerle J, Johnson R, Clowes AW, Majesky MW, Reidy MA. Role of platelets in smooth muscle cell proliferation and migration after vascular injury in the rat carotid artery. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:8412-8416.
73. Firulli AB, Miano JM, Bi W, Johnson AD, Casscells W, Olson EN, Schwarz JJ. Myocyte enhancer binding factor-2 expression and activity in vascular smooth muscle cells. Sssociation with the activated phenotype. *Circ Res*. 1996 ; 78 : 196-204.
74. Fishbein I, Waltenberger J, Banai S, Rabinovich L, Chorny M, Levitzki A, Gazit A, Huber R, Mayr U, Gertz S D, Golomb G. Local delivery of platelet-derived growth factor receptor-specific tyrphostin inhibits neointimal formation in rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:667-676.
75. Flynn P, Byrne C, Baglin T, Weissberg P, Bennett M. Thrombin generation by apoptotic vascular smooth muscle cells. *Blood* 1997;89:4373-4384.
76. Franklin SM, Faxon DP. Pharmacologic prevention of restenosis after coronary angioplasty: Review of the randomized clinical trials. *Coronary Artery Dis* 1993;4 :232-242.
77. Friedman RJ, Stemerman MB, Wenz B, Moore S, Gauldie J, Gent M, Tiell ML, Spaet TH. The effect of thrombocytopenia on experimental atherosclerotic lesion formation in rabbits: smooth muscle cell proliferation and re-endothelialization. *J Clin Invest* 1977;60:1191-1201.
78. Fukuyama J, Miyazawa K, Hamano S, Ujiiie A. Inhibitory effects of tranilast on proliferation, migration, and collagen synthesis of human vascular smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol* 1996;74:80-84.
79. Fuster V, Poon M, Willerson JT. Learning from the Transgenic Mouse. Endothelium, Adhesive Molecules, and Neointimal Formation. *Circulation* 1998;97 :16-18.

80. Galbraith WM, Hobson WC, Giclas PC, Schechter PJ, Agrawal S. Complement activation and hemodynamic changes following intravenous administration of phosphorothioate oligonucleotides in the monkey. *Antisense Res Dev* 1994;4:201-206.
81. Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Unemori EN, Lark MW, Amento E, Libby P. Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res* 1994; 75:181-189.
82. Gallo RL, Povsic TJ, Bernfield M. PR-39, an antimicrobial peptide, induces syndecans, binds a receptor and increases cAMP in mesenchymal cells [abstract]. *Mol Biol Cell* 1995; 6a:162.
83. Garratt KN, Edwards WD, Kaufmann UP, Vlietstra RE, Holmes DR Jr. differential histopathology of primary atherosclerotic and restenotic lesions in coronary arteries and saphenous vein bypass grafts: Analysis of tissue obtained from 73 patients by directional atherectomy. *J Am Coll Cardiol* 1991; 17:442-8.
84. Geary RL, Kohler TR, Vergel S, Kirkman TR, Clowes AW. Time course of flow-induced smooth muscle cell proliferation and intimal thickening in endothelialized baboon vascular grafts. *Circ Res.* 1994; 74(1):14-23.
85. Geary RL, Koyama N, Wang TW, Vergel S, Clowes AW. Failure of heparin to inhibit intimal hyperplasia in injured baboon arteries: the role of heparin-sensitive and -insensitive pathways in the stimulation of smooth muscle cell migration and proliferation. *Circulation* 1995;91:2972-2981.
86. Gesualdo L, Di Paolo S, Ranieri E, Schena FP. Trapidil inhibits human mesangial cell proliferation: effect on PDGF  $\beta$ -receptor binding and expression. *Kidney Int* 1994; 46:1002-1009.
87. Giachelli CM, Lombardi D, Johnson RJ, Murry CE, Almeida M.. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *Am J Pathol* 1998;152:353-358.
88. Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med* 1994;330 :1431-1438.
89. Giese NA, Marijjanowski MMH, McCook O, Hancock A, Ramakrishnan V, Fretto LJ, Chen C, Kelly AB, Koziol JA, Wilcox JN, Hanson SR. The role of alpha and beta platelet-derived growth factor receptor in the vascular response to injury in nonhuman primates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:900-909.
90. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1987;316:1371-1375.

91. Gordon D, Reidy MA, Benditt EP, Schwartz SM. Cell proliferatin in human coronary arteries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87: 4600-4604.
92. Gottsauner-Wolf M, Jang Y, Lincoff AM, Cohen JL, Labhassetwar V, Poptic EJ, Forudi F, Guzman LA, DiCorleto PE, Levy RJ, Topol EJ, Ellis SG. Influence of local delivery of the protein tyrosine kinase receptor inhibitor tyrphostin-47 on smooth-muscle cell proliferation in a rat carotid balloon-injury in pigs. *Am Heart J* 1997;133:329-334.
93. Gown AM, Tsukada T, Ross R. Human atherosclerosis II. Immunocytochemical analysis of the cellular composition of human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 1986; 125: 191-207.
94. Graf K, Xi XP, Yang D, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. Mitogen-activated protein kinase activation is involved in platelet-derived growth factor-directed migration by vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1997;29(pt 2):334-339.
95. Graves LM, Bornfeldt KE, Sidhu JS, Argast GM, Raines EW, Ross R, Leslie CC, Krebs EG. Platelet-derived growth factor stimulates protein kinase A through a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in human arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1996; 271(1):505-511.
96. Graves LM, Bornfeldt KE, Raines EW, Potts BC, MacDonald SG, Ross R, Krebs EG. Protein kinase A antagonizes platelet-derived growth factor-induced signaling by mitogen-activated protein kinase in human arterial smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10300-10304.
97. Groves HM, Kinlough-Rathbone RL, Mustard JF. Development of nonthrombogenicity of injured rabbit aortas despite inhibition of platelet adherence. *Arteriosclerosis* 1986;6 :189-195.
98. Guvakova MA, Yakubov LA, Vlodaysky I, Tonkinson JL, Stein CA. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides bind to basic fibroblast growth factor, inhibit its binding to cell surface receptors, and remove it from low affinity binding sites on extracellular matrix. *J Biol Chem* 1995;270:2620-2627.
99. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology*. 9<sup>c</sup> edition. Editions WB Saunders Company, Philadelphie. USA. 1996. chap 32, 33, 36 (coagulation), 68 (athérocécrose). 1148 pages.
100. Hafner S, Adler HS, Mischak H, Janosch P, Heidecker G, Wolfman A, Pippig S, Lohse M, Ueffing M, Kolch M. Mechanism of inhibition of Raf-1 by protein kinase A. *Mol Cell Biol* 1994;14:6696-6703.
101. Hanson SR, Powell JS, Dodson T, Lumsden A, Kelly AB, Anderson JS, Clowes AW, Harker LA. Effects of angiotensin converting enzyme inhibition with cilazapril on intimal hyperplasia in injured arteries and vascular grafts in the baboon. *Hypertension* 1991;18 :II-70-II-76.

102. Hansson GK, Jonasson L, Holm J, Clowes MM, Clowes AW.  $\gamma$ -Interferon regulates vascular smooth muscle proliferation and its expression in vivo and in vitro. *Circ Res.* 1988; 63: 712-719.
103. Hart CE, Bailey M, Curtis DA, Osborn S, Raines E, Ross R, Forstrom JW. Purification of PDGF-AB and PDGF-BB from human platelet extracts and identification of all three PDGF dimers in human platelets. *Biochemistry* 1990 ;29 :166-172.
104. Hart CE, Kraiss LW, Vergel S, Gilbertson D, Kenagy R, Kirkman T, Crandall DL, Tickle S, Finney H, Yarranton G, Clowes AW. PDGF $\beta$  receptor blockade inhibits intimal hyperplasia in the baboon. *Circulation* 1999;99:564-569.
105. Hayashi N, Takehara K, Soma Y. Differential chemotactic responses mediated by platelet-derived growth factor alpha- and beta-receptors. *Arch Biochem Biophys.* 1995 ; 322(2):423-428.
106. Hehrlein C, Gollan C, Dönges K, Metz J, Riessen R, Fehsenfeld P, von Hodenberg E, Kübler W. Low-dose radioactive stents inhibit smooth muscle cell proliferation and neointimal thickening in rabbits. *Circulation* 1995 ;92 :1570-1575.
107. Henry SP, Grillone LR, ORR JL, Brunner RH, Kornbrust DJ. Comparison of the toxicity profiles of ISIS 1082 and ISIS 2105, phosphorothioate oligonucleotides, following subacute intradermal administration in Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 1997;116 :77-88.
108. Henry SP, Novotny W, Leeds J, Auletta C, Kornbrust DJ. Inhibition of coagulation by a phosphorothioate oligonucleotide. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1997;7 :503-510.
109. Henry SP, Taylor J, Midgley L, Levin AA, Kornbrust DJ. Evaluation of the toxicity profile of ISIS 2302, a phosphorothioate oligonucleotide in a 4-week study in CD-1 mice. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1997;7 :145-155.
110. Higaki M, Sakaue H, Ogawa W, Kasuga M, Shimodado K. Phosphatidylinositol 3-kinase-independent signal transduction pathway for platelet-derived growth factor-induced chemotaxis. *J Biol Chem* 1996; 271(46):29342-29346.
111. Hishikawa K, Nakaki T, Hirahashi J, Marumo T, Saruta T. Tranilast inhibits the effects of platelet-derived growth factor on cell proliferation and induction of nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 1995;291:435-438.
112. Holmes D, Fitzgerald P, Goldberg S, LaBlanche JM, Lincoff AM, Savage M, Serrys PW, Willerson J, Granett JR, Chan R, Shusterman NH, Poland M. The PRESTO (Prevention of restenosis with tranilast and its outcomes) protocol: a double-blind, placebo-controlled trial. *Am Heart J* 2000;139 :23-31.



113. Holt JT, Redner RL, Nienhuis AW. An oligomer complementary to c-myc mRNA inhibits proliferation of HL-60 promyelocytic cells and induces differentiation. *Mol Cell Biol* 1988;8:963-973.
114. Homma Y, Sakamoto H, Tsunoda M, Aoki M, Takenawa T, Ooyama T. Evidence for involvement of phospholipase C $\gamma$ 2 in signal transduction of platelet-derived growth factor in vascular smooth muscle cells. *Biochem. J* 1993; 290:649-653.
115. Hoshiya M et Awazu M. Trapidil inhibits platelet-derived growth factor-stimulated mitogen-activated protein kinase cascade. *Hypertension* 1998;31:665-671.
116. Huber KC, Schwartz RS, Edwards WD, Camrud AR, Bailey KR, Jorgenson MA, Holmes DR Jr. Effects of angiotensin converting enzyme inhibition on neo-intima proliferation in a porcine coronary injury model. *Am Heart J* 1993;125 :695-701.
117. Hughes AD, Clunn GF, Refson J, Demoliou-Masson C. Platelet-derived growth factor (PDGF): actions and mechanisms in vascular smooth muscle. *Gen Pharmac* 1996; 27(7):1079-1089.
118. Inoue Y, Toga K, Sudo T, Tachibana K, Tochizawa S, Kimura Y, Yoshida Y, Hidaka H. Suppression of arterial intimal hyperplasia by cilostamide, a cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 inhibitor, in a rat balloon double-injury model. *Br J Pharmacol* 2000; 130(2):231-241.
119. Isaji M, Nakajoh M, Naito J. Selective inhibition of collagen accumulation by N-(3, 4-dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid (N-5') in granulation tissue. *Biochem Pharmacol* 1987 ;36 :469-474.
120. Ishiwata S, Verheye S, Robinson KA, Salame MY, de Leon H, King SB 3<sup>rd</sup>, Chronos NA. Inhibition of neointimal formation by tranilast in pig coronary arteries after balloon angioplasty and stent implantation. *J Am Coll Cardiol* 2000;35 :1331-1337.
121. Ito A, Shimokawa H, Kadokami T, Fukumoto Y, Owada MK, Shiraishi T, Nakaike R, Takayanagi T, Egashira K, Takeshita A. Tyrosine kinase inhibitor suppresses coronary arteriosclerotic changes and vasospastic responses induced by chronic treatment with interleukin-1  $\beta$  in pigs in vivo. *J Clin Invest* 1995 ;96 :1288-1294.
122. Jackson CL, Raines EW, Ross R, Reidy MA. Role of endogenous platelet-derived growth factor in arterial smooth muscle cell migration after balloon catheter injury. *Arterioscler Thromb* 1993;13 :1218-1226.
123. Jaffe EA. Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol* 1987; 18: 605-613.

124. Jaroszewski JW, Kaplan O, Syi JL, Sehested M, Faustino PJ, Cohen JS. Concerning antisense inhibition of the multidrug resistance gene. *Cancer Commun* 1990;2:287-294.
125. Jawien A, Bowen-Pope DF, Lindner V, Schwartz SM, Clowes AW. Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty. *J Clin Invest* 1992;89:507-511.
126. Jenkins MP, Buonaccorsi GA, Mansfield R, Bishop CC, Bown SG, McEwan JR. Reduction in the response to coronary and iliac artery injury with photodynamic therapy using 5-aminolaevulinic acid. *Cardiovasc Res* 2000; 45(2):478-485.
127. Jiang B, Yamamura S, Nelson P, Mureebe L, Kent KC. Differential effects of platelet-derived growth factor isotypes on human smooth muscle cell proliferation and migration are mediated by distinct signaling pathways. *Surgery* 1996; 120:427-432.
128. Jiang B, Yamamura S, Nelson PR, Mureebe L, Kent KC. Differential effects of platelet-derived growth factor isotypes on human smooth muscle cell proliferation and migration are mediated by distinct signaling pathways. *Surgery*. 1996; 120(2):427-431; discussion 432.
129. Karim MA, Miller DD, Farrar MA, Eleftheriades E, Reddy BH, Breland CM, Samarel AM. Histomorphometric and biochemical correlates of arterial procollagen gene expression during vascular repair after experimental angioplasty. *Circulation* 1995; 91 :2049-2057.
130. Karsch KR, Preisack MB, Baidon R, Eschenfelder V, Foley D, Garcia EJ, Kaltenbach M, Meisner C, Selbmann HK, Serruys PW, Shiu MF, Sujatta M, Bonan R. Low molecular weight heparin (reviparin) in percutaneous transluminal coronary angioplasty: results of a randomized, double-blind, unfractionated heparin and placebo-controlled, multicenter trial (REDUCE trial). *J Am Coll Cardiol*. 1996;28:1437-1443.
131. Kawamura T, Kitani T, Okajima Y, Okuda S, Urano S, Watada M, Nakagawa M, Ijichi H. Effect of trapidil on prostacyclin generation of arterial wall. *Prostaglandins Med* 1980;5:113-121.
132. Khalil RA, Menice CB, Wang CL, Morgan KG. Phosphotyrosine-dependent targeting of mitogen-activated protein kinase in differentiated contractile vascular cells. *Circ Res*. 1995; 76(6):1101-8.
133. Khalil RA, Morgan KG. PKC-mediated redistribution of mitogen-activated protein kinase during smooth muscle cell activation. *Am J Physiol*. 1993; 265(2 Pt 1):C 406-C 411.

134. Kikuchi S, Umemura K, Kondo K, Nakashima M. Tranilast suppresses intimal hyperplasia after photochemically induced endothelial injury in the rat. *Eur J Pharmacol* 1996;295:221-227.
135. Kim DK, Zhang L, Dzau VJ, Pratt RE. H19, a developmentally regulated gene, is reexpressed in rat vascular smooth muscle cells after injury. *J Clin Invest.* 1994; 93: 355-360.
136. Kimura T, Kaburagi S, Yokoi H. Acute gain and late loss relationship after coronary angioplasty correlates with geometric remodeling but not with changes in plaque volume. *J Am Coll Cardiol* 1996;17 :390A. (Abstract).
137. Klemke R, Cai S, Giannini A, Gallagher P. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol* 1997; 137:481-492.
138. Kocher O, Gabbiani F, Gabbiani G, Reidy MA, Cokay MS, Peters H, Huttner I. Phenotypic features of smooth muscle cells during the evolution of experimental carotid artery intimal thickening: Biochemical and morphological studies. *Lab Invest.* 1991; 65: 459-470.
139. Kockx MM, De Meyer GRY, Andries LJ, Bult H, Jacob WA, Herman AG. The endothelium during cuff-induced neointima formation in the rabbit carotid artery. *Arterioscler Thromb* 1993;13 :1874-1884.
140. Kockx MM, De Meyer GRY, Jacob WA, Bult H, Herman AG. Triphasic sequence of neointimal formation in the cuffed carotid artery of the rabbit. *Arterioscler Thromb* 1992;12 :1447-1457.
141. Kohler TR, Jawien A. Flow affects development of intimal hyperplasia after arterial injury in rats. *Arterioscler Thromb.* 1992; 12(8):963-971.
142. Kotzerke J, Hanke H, Hoher M. Endovascular brachytherapy for the prevention of restenosis after angioplasty. *Eur J Nucl Med* 2000;27 :223-236.
143. Kovalenko M, Rönstrand L, Heldin CH, Loubtchenkov M, Gazit A, Levitzki A, Böhmer FD. Phosphorylation site-specific inhibition of platelet-derived growth factor  $\beta$ -receptor autophosphorylation by the receptor blocking tyrophostin AG1296. *Biochemistry* 1997;36:6260-6269.
144. Koyama N, Hart CE, Clowes AW. Different function of the platelet-derived growth factor- $\alpha$  and - $\beta$  receptors for the migration and proliferation of cultured baboon smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; 75:682-691.
145. Koyama N, Kinsella MG, Wight TN, Hedin U, Clowes AW. Heparan sulfate proteoglycans mediate a potent inhibitory signal for migration of vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1998; 83(3):305-313.

146. Koyama N, Morisaki N, Saito Y, Yashida S. Regulatory effects of platelet-derived growth factor-AA homodimer on migration of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1992; 267:22806-22812.
147. Kozak M. Influences of mRNA secondary structure on initiation by eucariotic ribosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:2850-2854.
148. Kraiss LW, Kirkman TR, Kohler TR, Zierler B, Clowes AW. Shear stress regulates smooth muscle proliferation and neointimal thickening in porous polytetrafluoroethylene grafts. *Arterioscler Thromb*. 1991; 11(6):1844-1852.
149. Kraiss LW, Raines EW, Wilcox JN, Seifert RA, Barrett TB, Kirkman TR, Hart CE, Bowen-Pope DF, Clowes AW. Regional expression of the platelet-derived growth factor and its receptors in a primate graft model of vessel wall assembly. *J Clin Invest* 1993;92:338-348.
150. Kumar A, Lindner V. Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17 :2238-2244.
151. Kundra V, Escobedo JA, Kazlauskas A, Kim HK, Rhee SG, Williams LT, Zetter BR. Regulation of chemotaxis by the platelet-derived growth factor receptor- $\beta$ . *Nature* 1994; 367:474-476.
152. Lablanche JM, McFadden EP, Meneveau N, Lusson JR, Bertrand B, Metzger JP, Legrand V, Grollier G, Macaya C, De Bruyne B, Vahanian A, Grentzinger A, Masquet C, Wolf JE, Tobelem G, Fontecave S, Vacheron A, D'Azemar P, Bertrand ME. Effect of nadroparin, a low-molecular-weight heparin, on clinical and angiographic restenosis after coronary balloon angioplasty: the Fact study. *Circulation* 1997;96:3396-3402.
153. Landzberg BR, Frishman WH, Lerrick K . Pathophysiology and pharmacological approaches for prevention of coronary artery restenosis following coronary artery balloon angioplasty and related procedures. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 1997; 39; (4) : 361-398, 1997.
154. Lassing I, Mellstrom K, Nister M. Comparison of PDGF-AA- and FDGF-BB-induced phosphoinositide formation in human and mouse fibroblasts. *Exp Cell Res* 1994; 211:286-295.
155. Law RE, Goetze S, Xi XP, Jackson S, Kawano Y, Demer L, Fishbein MC, Meehan WP, Hsueh WA. Expression and function of PPAR $\gamma$  in rat and human vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2000; 101(11):1311-1318.
156. Lefkovits J, Topol EJ. Pharmacological approaches for the prevention of restenosis after percutaneous coronary intervention. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 1997; 40; (2): 141-158.

157. Lehmann KG, Popma JJ, Werner JA, Lansky AJ, Wilensky RL. Vascular remodeling and the local delivery of cytochalasin B after coronary angioplasty in humans. *J Am Coll Cardiol* 2000;35 :583-591.
158. Leimgruber PP, Roubin GS, Hollman J, Cotsonis GA, Meier B, Douglas JS, King SB Jr, Gruentzig AR. Restenosis after successful coronary angioplasty in patients with single-vessel disease. *Circulation*. 1986; 73(4):710-717.
159. Leppa S, Mali M, Miettinen HM, Jalkanen M. Syndecan expression regulates cell morphology and growth of mouse mammary epithelial tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Feb 1;89(3):932-6.
160. Li X, Tsai P, Wieder ED, Kribben A, Van Putten V, Schrier RW, Nemenoff RA. Vascular smooth muscle cells grown on Matrigel. A model of the contractile phenotype with decreased activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1994; 269:19653-19658.
161. Libby P, Jansson GK. Biology of disease. Involvement of the immune system in human atherosclerosis: Current knowledge of unanswered questions. *Lab Invest*. 1991; 64: 5-15.
162. Lin MC, Almus-Jacobs F, Chen HH, Parry GC, Mackman N, Shyy JY, Chien S. Shear stress induction of the tissue factor gene. *J Clin Invest* 1997;99:737-744.
163. Lindner V, Majack RA, Reidy MA. Basic fibroblast growth factor stimulates endothelial regrowth and proliferation in denuded arteries. *J Clin Invest* 1990;85 :2004-2008.
164. Lindner V, Reidy MA, Fingerle J. Regrowth of arterial endothelium: Denudation with minimal trauma leads to complete endothelial cell regrowth. *Lab Invest* 1989; 61: 556-563.
165. Lindner V, Reidy MA. Platelet-derived growth factor ligand and receptor expression by large vessel endothelium in vivo. *Am J Pathol* 1995;146:1488-1497.
166. Lindner V, Reidy MA. Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 3739-3743.
167. Liu MW, Roubin GS, Robinson KA, Black AJ, Hearn JA, Siegel RJ, King SB 3d. Tirofiban in preventing restenosis after balloon angioplasty in the atherosclerotic rabbit. *Circulation* 1990;81 :1089-1093.
168. Loke S, Stein C, Zhang X, Mori K, Nakanishi M, Sabashinge C, Cohen J, Neckers L. Characterization of oligonucleotide transport into living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3474-3478.

169. Lokker NA, O'hare JP, Barsoumian A, Tomlinson JE, Ramakrishnan V, Fretto LJ, Giese NA. Functional importance of platelet-derived growth factor (PDGF) receptor extracellular immunoglobulin-like domains: identification of PDGF binding site and neutralizing monoclonal antibodies. *J Biol Chem* 1997;272 :33037-33044.
170. Lundberg MS, Curto KA, Bilato C, Monticone RE, Crow MT. Regulation of vascular smooth muscle migration by mitogen-activated protein kinase and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II signaling pathways. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30:2377-2389.
171. Madri JA, Reidy MA, Kocher O, Bell L. Endothelial cell behavior after denudation injury is modulated by transforming growth factor-beta1 and fibronectin. *Lab Invest* 1989; 60:755-765.
172. Maguire MP, Sheets KR, McVety K, Spada AP, Zilberstein A. A new series of PDGF receptor tyrosine kinase inhibitors: 3-substituted quinoline derivatives. *J Med Chem* 1994;37:2129-2137.
173. Majack RA, Clowes AW. Inhibition of vascular smooth muscle cell migration by heparin-like glycosaminoglycans. *J Cell Physiol* 1984; 118:253-256.
174. Majesky MW, Lindner V, Twardzik DR, Schwartz SM, Reidy M. Production of transforming growth factor  $\beta_1$  during repair of arterial injury. *J Clin Invest* 1991;88 :904-910.
175. Majesky MW, Reidy MA, Bowen-Pope DF, Hart CE, Wilcox JN, Schwartz SM. PDGF ligand and receptor gene expression during repair of arterial injury. *J Cell Biol* 1990;111:2149-2158.
176. Maresta A, Balducelli M, Cantini L, Casari A, Chioin R, Fabbri M, Fontanelli A, Monici Preti PA, Repetto S, Servi S, Varani E, for the STARC Investigators. Trapidil (triazolopyrimidine), a platelet-derived growth factor antagonist, reduces restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty : results of the randomized, double-blind STARC study. *Circulation* 1994;90:2710-2715.
177. Matsui T, Pierce JH, Fleming TP, Greenberger JS, LaRochelle WJ, Ruggiero M, Aaronson SA. Independent expression of human  $\alpha$  or  $\beta$  platelet-derived growth factor receptor cDNAs in a naïve hematopoietic cell leads to functional coupling with mitogenic and chemotactic signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989; 86:8314-8318.
178. Mazurov AV, Menshikov MYu, Leytin VL, Tkachuk VA, Repin VS. Decrease of platelet aggregation and spreading via inhibition of the cAMP phosphodiesterase by trapidil. *FEBS Lett* 1984;172:167-171.

179. Meurice T, Vallet B, Bauters C, Dupuis B, Lablanche JM, Bertrand ME. Role of endothelial cells in restenosis after coronary angioplasty. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 1996;10:234-242.
180. Miao RQ, Murakami H, Song Q, Chao L, Chao J. Kallistatin stimulates vascular smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and neointima formation in balloon-injured rat artery. *Circ Res.* 2000; 86(4):418-424.
181. Mintz GS, Popma JJ, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Wong C, Hong MK, Kovach JA, Leon MB. Arterial remodeling after coronary angioplasty. A serial intravascular ultrasound study. *Circulation.* 1996 ; 94 : 35-43.
182. Miyazawa K, Fukuyama J, Misawa K, Hamano S, Ujiie A. Tranilast antagonizes angiotensin II and inhibits its biological effects in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1996;121:167-173.
183. Miyazawa K, Kikuchi S, Fukuyama J, Hamano S, Ujiie A. Inhibition of PDGF- and TGF- $\beta$ 1-induced collagen synthesis, migration and proliferation by tranilast in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Atherosclerosis* 1995;118:213-221.
184. Mohammadi M, McMahon G, Lun L, Tang C, Hirth P, Yeh BK, Hubbard SR, Schlessinger J. Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors. *Science* 1997;276:955-960.
185. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991 ; 43 : 109-142.
186. Mondy JS, Lindner V, Miyashiro JK, Berk BC, Dean RH, Geary RL. Platelet-derived growth factor ligand and receptor expression in response to altered blood flow in vivo. *Circ Res* 1997;81:320-327.
187. Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Nakajima M, von der Leyen H, Zhang L, Kaneda Y, Ogihara T, Dzau VJ. Intimal hyperplasia after vascular injury is inhibited by antisense cdc2 kinase oligonucleotides. *J Clin Invest* 1994; 93: 1458-1464.
188. Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Nakajima M, Zhang L, Kaneda Y, Ogihara T, Dzau VJ. Single intraluminal delivery of antisense cdc2 kinase and proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotides results in chronic inhibition of neointimal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 8474-8478.
189. Muller DWM, Ellis SG, Topol EJ. Experimental models of coronary artery restenosis. *J Am Coll Cardiol* 1992;19 :418-432.
190. Muller DWM. The role of proto-oncogenes in coronary restenosis. *Progress in Cardiovascular Diseases.* 1997; 40; (2): 117-128.

191. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* 1993;178:449-460.
192. Murry CE, Bartosek T, Giachelli CM, Alpers CE, Schwartz SM. Platelet-derived growth factor-A mRNA expression in fetal, normal adult, and atherosclerotic human aortas. *Circulation* 1996; 93:1095-1106
193. Nabel EG, Yang Z, Liptay S, San H, Gordon D, Haudenschild CC, Nabel GJ. Recombinant platelet-derived growth factor B gene expression in porcine arteries induces intimal hyperplasia in vivo. *J Clin Invest* 1993 ;91 :1822-1829.
194. Nagel T., Resnick N, Atkinson WJ, Dewey CF Jr, Gimbrone MA Jr. Shear Stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1994;94:885-891.
195. Nathan A, Nugent MA, Edelman ER. Tissue engineered perivascular endothelial cell implants regulate vascular injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8130-8134.
196. Nelson PR, Yamamura S, Kent KC. Platelet-derived growth factor and extracellular matrix proteins provide a synergistic stimulus for human vascular smooth muscle cell migration. *J Vasc Surg* 1997; 26:104-12.
197. Nelson PR, Yamamura S, Mureebe L, Itoh H, Kent KC. Smooth muscle cell migration and proliferation are mediated by distinct phases of activation of the intracellular messenger mitogen-activated protein kinase. *J Vasc Surg* 1998; 27:117-25.
198. Nie L, Kanzaki M, Shibata H, Kojima I. Blockade of DNA synthesis induced by platelet-derived growth factor by tranilast, an inhibitor of calcium entry, in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 1996; 50:763-769
199. O'Brien ER, Alpers CE, Stewart DK, Ferguson M, Tran N, Gordon D, Benditt EP, Hinohara T, Simpson JB, Schwartz SM. Proliferation in primary and restenotic coronary atherectomy tissue: implications for antiproliferative therapy. *Circulation Research*. 1993 ; 73: 223-231.
200. Ohnishi H, Yamaguchi K, Shimada S, Sato M, Funato H, Katsuki Y, Dabasaki T, Suzuki Y, Saitoh Y, Kumagai A. An evidence for 'response to injury' hypothesis. *Life Sci* 1982;31:2595-2602.
201. Olson NE, Chao S, Lindner V, Reidy M. Intimal smooth muscle cell proliferation after balloon catheter injury. *Am J Pathol* 1992;140 :1017-1023.
202. Palumbo R, Gaetano C, Melillo G, Toschi E, Remuzzi A, Capogrossi MC. Shear stress downregulation of platelet-derived growth factor receptor-beta and matrix metalloprotease-2 is associated with inhibition of smooth muscle cell invasion and migration. *Circulation*. 2000; 102(2):225-230.



203. Panek RL, Dahring TK, Olszewski BJ, Keiser JA. PDGF receptor protein tyrosine kinase expression in the balloon-injured rat carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1283-1288.
204. Phillips I. Antisense inhibition and andeno-associated viral vector delivery for reducing hypertension. *Hypertension* 1997 ;29(part 2) :177-187.
205. Pompili VJ, Gordon D, San H, Yang Z, Muller DW, Nabel GJ, Nabel EG. Expression and function of a recombinant PDGF B gene in porcine arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15 :2254-2264.
206. Powell JS, Clozel JP, Muller RK, Kuhn H, Hefti F, Hosang M, Baumgartner HR. Inhibitors of angiotensin converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. *Science* 1989;245 :186-188.
207. Pukac L, Huangpu J, Karnovsky MJ. Platelet-derived growth factor-BB, indulin-like growth factor-1, and phorbol ester activate different signaling pathways for stimulation of vascular smooth muscle cell migration. *Experimental cell research* 1998; 242:548-560.
208. Raines EW, Bowen-Pope DF, Ross R. Platelet-derived growth factor. *In* Sporn MB, Roberts AB, eds. *Peptide growth factors and their receptors I*. New York, NY: Springer-Verlag; 1991; 173-262.
209. Raines EW, Ross R. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J*. 1993; 69(1 Suppl):S30-S37. Review.
210. Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* 1990 ;344 :254-257.
211. Rankin S, Rozengurt E. Platelet-derived growth factor modulation of focal adhesion kinase (p125FAK) and paxilin tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* 1994;269 :704-710.
212. Reidy MA, Clowes AW, Scharf SM, Endothelial regeneration. V. Inhibition of endothelial regrowth in arteries of rat and rabbit. *Lab Invest*. 1983; 49: 569-575.
213. Reidy MA, Schwartz SM. Endothelial regeneration III. Time course of intimal changes after small defined injury to rat aortic endothelium. *Lab Invest* 1981;44 :301-308.
214. Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 1992;70:389-399.

215. Ronnstrand L, Mori S, Arvidsson AK, Eriksson A, Wernstedt C, Hellman U, Claesson-Welsh L, Heldin CH. Identification of two C-terminal autophosphorylation sites in the PDGF  $\beta$ -receptor: involvement in the interaction with phospholipase C $\gamma$ . *EMBO J* 1992;11:3911-3919.
216. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-809.
217. Ross R., Atherosclerosis - An Inflammatory Disease, *New England J Medicine* 1999;340(2):115-126.
218. Rubanyi GM, Parker B. LH. Endothelins. *FASEB J.* 1991; 5:2713-2720.
219. Sato Y, Rifkin DB. Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells : Activation of a latent transforming growth factor- $\beta$ 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J Cell Biol* 1989; 109:309-405.
220. Sawutz DG, Bode DC, Briggs M, Reid JR, Canniff P, Caldwell L, Faltynek CR, Miller D, Dunne JA, de Garavilla L, Guiles JW, Weigelt C, Michne W, Trearurywala AM, Silver PJ. In vitro characterization of a novel series of platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Biochem Pharmacol* 1996;51:1631-1638.
- 
221. Schwartz RS, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, Holmes DR. Restenosis after balloon angioplasty: a practical proliferative model in porcine coronary arteries. *Circulation* 1990;82 :2190-2200.
222. Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ERM. The intima:soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 1995;77:445-465.
223. Schwartz SM, Heinmark RL, Majesky MW. Developmental mechanisms underlying pathology of arteries. *Physiol Rev* 1990; 70: 1177-1209.
224. Scott-Burden T, Vanhoutte PM. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. *Circulation.* 1993; 87 (suppl V): V-51-V-55.
225. Seifert RA, Hart CE, Phillips PE, Forstrom JW, Ross R, Murray MJ, Bowen-Pope DF. Two different subunits associate to create isoform-specific platelet-derived growth factor receptors. *J Biol Chem* 1989; 264:8771-8778.
226. Serruys PW, Rutsch W, Danchin N. Does the new angiotensin converting enzyme inhibitor cilazapril prevent restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty? Results of the Mercator study: a multicenter, randomized double-blind placebo-controlled trial. *Circulation* 1992;86 :100-10.
227. Shariff A., Luna EJ. Diacylglycerol-stimulated formation of actin nucleation sites at plasma membranes. *Science* 1992;256:245-247.

228. Shaw DR, Rustagi PK, Kandimalla ER, Manning AN, Jiang Z, Agrawal S. Effects of synthetic oligonucleotides on immune stimulation. *Biochem Pharmacol* 1997;53 :1123-1132.
229. Shi Y, Fard A, Galeo A, Hutchinson HG, Vermani P, Dodge GR, Hall DJ, Shaheen F, Zalewski A. Transcatheter delivery of c-myc antisense oligomers reduces neointimal formation in a porcine model of coronary artery balloon injury. *Circulation* 1994 ; 90 : 944-951.
230. Shi Y, O'Brien JE, Fard A, Mannion JD, Wang D, Zalewski A. Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries. *Circulation*. 1996 ;94 :1655-1664.
231. Shibano T, Vanhoutte PM. Involvement of 5-HT<sub>2</sub> receptors in chronic endothelial dysfunction after balloon injury of porcine coronary arteries. *Circulation*. 1994 ; 89 :1776-1785.
232. Shimokado K, Umezawa K, Ogata J. Tyrosine kinase inhibitors inhibit both proliferation and chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;748:171-176
233. Simons M, Edelman ER, Rosenberg RD. Antisense proliferating nuclear antigen oligonucleotides inhibit intimal hyperplasia in a rat carotid artery injury model. *J Clin Invest* 1994;93 : 2351-2356.
234. Simons M, Rosenberg RD. Antisense nonmuscle myosin heavy chain and *c-myb* oligonucleotides suppress smooth muscle cell proliferation in vitro. *Circ Res*. 1992 ; 70 : 835-843.
235. Sirois MG, Simons M, Edelman ER. Antisense oligonucleotide inhibition of PDGFR- $\beta$  receptor subunit expression directs suppression of intimal thickening. *Circulation* 1997;95:669-676.
236. Sirois MG, Simons M, Kuter DJ, Rosenberg RD, Edelman ER. Rat arterial wall retains myointimal hyperplastic potential long after arterial injury. *Circulation* 1997;96:1291-1298.
237. Skinner MP, Raines EW, Ross R. Dynamic expression of  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 and  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 integrin receptors by human vascular smooth muscle cells:  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 integrin is required for chemotaxis across type I collagen-coated membranes. *Am J Pathol* 1994;145 :1070-1081.
238. Spector AA. Lipid and lipoprotein effects on endothelial eicosanoid formation. *Semin Thromb Hemost*. 1988; 14:196-201.
239. Speir E, Epstein SE. Inhibition of smooth muscle cell proliferation by an oligodesoxynucleotide targeting the messenger RNA encoding proliferating cell nuclear antigen. *Circulation*. 1992 ; 86 : 538-547.

240. Speir E, Modali R, Huang ES, Leon MB, Shawl F, Finkel T, Epstein SE. Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science*. 1994; 265: 391-394.
241. Srinivasan SK, Tewary HK, Iversen PL. Characterization of binding sites, extent of binding, and drug interactions of oligonucleotides with albumin. *Antisense Res Dev* 1995;5 :131-139.
242. Steele PM, Chesebro JH, Stanson AW, Holmes DR Jr, Dewanjee MK, Badimon L, Fuster V. Balloon angioplasty: natural history of the pathophysiological response to injury in a pig model. *Circ Res* 1985;57 :105-112.
243. Stemerman MB, Weinstein R, Rowe J, Maciag T, Fuhro R, Gardner R. Vascular smooth muscle cell growth kinetics in vivo in aged rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79 :3863-3866.
244. Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, Hansson GK. T Lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3893-3897.
245. Strauss BH, Chisholm RJ, Keeley FW, Gotlieb AI, Logan RA, Armstrong PW. Extracellular matrix remodeling after balloon angioplasty injury in a rabbit model of restenosis. *Circ Res* 1994;75 :650-658.
246. Takahashi A, Taniguchi T, Ishikawa Y, Yokoyama M. Tranilast inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia by induction of p21<sup>waf1/cip1/sdi1</sup> and p53. *Circ Res* 1999;84:543-550.
247. Tanizawa S, Ueda M, van der Loos CM, van der Wal AC, Becker AE. Expression of platelet derived growth factor B chain and  $\beta$  receptor in human coronary arteries after percutaneous transluminal coronary angioplasty: an immunohistochemical study. *Heart* 1996;75:549-556.
248. Tarry WC, Makhoul RG. L-arginine improves endothelium-dependent vasorelaxation and reduces intimal hyperplasia after balloon angioplasty. *Arterioscler Thromb* 1994; 14:938-943. .
249. Teirstein PS, Massullo V, Jani S, Popma JJ, Russo RJ, Schatz RA, Guarneri EM, Steuterman S, Sirkin K, Cloutier DA, Leon MB, Tripuraneni. Three-year clinical and angiographic follow-up after intracoronary radiation : results of a randomized clinical trial. *Circulation* 2000;101 :360-365.
250. Tamsamani J, Roskey A, Chaix C, Agrawal S. In vivo metabolic profile of a phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1997;7 :159-165.

251. The TREAT Study Investigation. The impact of tranilast on restenosis following coronary angioplasty: The Tranilast Restenosis Following Angioplasty Trial (TREAT). *Circulation* 1994;90(suppl I):I-652 Abstract.
252. Thomas WA, Kim DN. Biology of disease. Atherosclerosis as a hyperplastic and/or neoplastic process. *Lab Invest.* 1983; 48: 245-255.
253. Thomas WA, Reiner JM, Florentin FA, Lee KT, Lee WM. Population dynamics of arterial smooth muscle cells. V. Cell proliferation and cell death during initial 3 months in atherosclerotic lesions induced in swine by hypercholesterolemic diet and intimal trauma. *Exp Mol Pathol* 1976; 24:360-74.
254. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267:1456-1462.
255. Tiell ML, Sussman II, Gordon PB, Sanders RN. Suppression of fibroblast proliferation in vitro and of neointimal hyperplasia in vivo by the triazolopyrimidine, trapidil. *Artery* 1983;12 :33-50.
256. Ueda M, Becker AE, Kasayuki N, Jojima A, Morita Y, Tanaka S. In situ detection of platelet-derived growth factor-A and -B chain mRNA in human coronary arteries after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am J Pathol* 1996;149:831-843.
257. Uren A, Yu JC, Gholami NS, Pierce JH, Heidarman MA. The alpha PDGFR tyrosine kinase mediates locomotion of two different cell types through chemotaxis and chemokinesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 204(2):628-634.
258. Villa AE, Guzman LA, Poptic EJ, Labhasetwar V, D'Souza S, Farrell CL, Plow EF, Levy RJ, DiCorleto PE, Topol EJ. Effects of antisense c-myc oligonucleotides suppress smooth muscle cell accumulation in vivo. *Circ Res.* 1995 ; 76 : 505-513.
259. Viswanathan M, Strömberg C, Seltzer A, Saavedra JM. Balloon angioplasty enhances the expression of angiotensin II AT<sub>1</sub> receptors in neointima of rat aorta. *J Clin Invest* 1992;90 :1707-1712.
260. von der Leyen HE, Gibbons GH, Morishita R, Lewis NP, Zhang L, Nakajima M, Kaneda Y, Cooke JP, Dzau VJ. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1137-1141.
261. Waller BF, Pinerton CA, Orr CM. Restenosis 1 to 24 months after clinically successful coronary balloon angioplasty: A necropsy study of 20 patients. *J Am Coll Cardiol* 1991;17 :58B-70B.

262. Walpole PL, Gotlieb AI, Langille GL. Monocyte adhesion and changes in endothelial cell number, morphology and F-actin distribution elicited by low shear stress in vivo., *Am J Pathol* 1993; 142:1392-1400.
263. Wang X, Loudon C, Ohlstein EH, Stadel JM, Gu JL, Yue TL. Osteopontin expression in platelet-derived growth factor-stimulated vascular smooth muscle cells and carotid artery after balloon angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16 :1365-1372.
264. Wei GL, Krasinski K, Kearney M, Isner JM, Walsh K, Andres V. Temporally and spatially coordinated expression of cell cycle regulatory factors after angioplasty. *Circ Res* 1997 ;80 :418-426.
265. Weir L, Chen D, Pastore C, Isner JM, Walsh K. Expression of gax, a growth arrest homeobox gene, is rapidly down-regulated in the rat carotid artery during the proliferative response to balloon injury. *J Biol Chem.* 1995; 270: 5457-5461.
266. Wight TN, Potter-Perigo S, Aulinskas T. Proteoglycans and vascular cell proliferation. *Am Rev Respir Dis* 1989;140 :1132-1135.
267. Wilcox JN, Smith KM, Williams LT, Schwartz SM, Gordon D. Platelet-derived growth factor mRNA detection in human atherosclerotic plaques by in situ hybridization. *J Clin Invest* 1988; 82:1134-1143.
268. Williams L. Signal transduction by the platelet-derived growth factor receptor, *Science.* 1989; 243: 1564-1570.
269. Woolf TM, Melton DA, Jennings CGB. Specificity of antisense oligonucleotides in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89: 7305-7309.
270. Yakubov LA, Deeva EA, Zarytova VF, Ivanova EM, Ryte AS, Yurchenko LV, Vlassov VV. Mechanism of oligonucleotide uptake by cells : involvement of specific receptors ? *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:6454-6458.
271. Yang ZY, Simari RD, Perkins ND, San H, Gordon D, Nabel GJ, Nabel EG. Role of the p21 cyclin-dependant kinase inhibitor in limiting intimal cell proliferation in response to arterial injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93:7905-7910.
272. Yeaman C, Rapraeger AC. Post-transcriptional regulation of syndecan-1 expression by cAMP in peritoneal macrophages. *J Cell Biol* 1993; 122(4):941-950.
273. Ylä- Herttuala S, Sumuvuori H, Karkola K, Mottonen M, Nikkari T. Glycosaminoglycans in normal and atherosclerotic human coronary arteries. *Lab Invest.* 1986; 54:402-407.
274. Yokote K, Mori S, Siegbahn A, Ronnstrand L, Wernstedt C, Heldin CH, Claesson-Welsh L. Structural determinants in the platelet-derived growth factor

- alpha-receptor implicated in modulation of chemotaxis. *J Biol Chem* 1996; 271(9):5101-5111.
275. Zaman GJR, Vink PMF, van den Doelen AA, Veeneman GH, Theunissen HJM. Tyrosine kinase activity of purified recombinant cytoplasmic domain of platelet-derived growth factor  $\beta$ -Receptor ( $\beta$ -PDGFR) and discovery of a novel inhibitor of receptor tyrosine kinases. *Biochem Pharmacol* 1999;57(1):57-64.
276. Zang Z, Morla AO, Vuori K, Bauer JS, Juliano RL, Ruoslahti E. The  $\alpha v \beta 5$  integrin functions as a fibronectin receptor but does not support fibronectin matrix assembly and cell migration on fibronectin. *J Cell Biol* 1993;122:235-242.
277. Zempo N, Kenagy RD, Au YP, Bendeck M, Clowes MM, Reidy MA, Clowes AW. Matrix metalloproteinases of vascular wall cells are increased in balloon-injured rat carotid artery. *J Vasc Surg* 1994;20 :209-217.
278. Zeymer U, Fishbein MC, Forrester JS, Cercek B. Proliferating cell nuclear antigen immunohistochemistry in rat aorta after balloon denudation: comparison with thymidine and bromodeoxyuridine labeling. *Am J Pathol* 1992;141:685-690.
279. Zhao Q, Zhou R, Tamsamani J, Zhang Z, Roskey A, Agrawal S. Cellular distribution of phosphorothioate oligonucleotide following intravenous administration in mice. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1998;8 :451-458.

## **7 Annexe : Bolus endovascular PDGFR- $\beta$ antisense treatment suppressed intimal hyperplasia in a rat carotid injury model**

Cette section contient l'épreuve de l'article intitulé « **Bolus endovascular PDGFR- $\beta$  antisense treatment suppressed intimal hyperplasia in a rat carotid injury model** » qui sera publié dans la revue *Circulation* en septembre 2000 et qui comprend les résultats présentés dans ce mémoire.



# Bolus Endovascular PDGFR- $\beta$ Antisense Treatment Suppressed Intimal Hyperplasia in a Rat Carotid Injury Model

Nicolas Noiseux, MD, MSc; Caroline H. Boucher, BSc; Raymond Cartier, MD; Martin G. Sirois, PhD

**Background**—Intimal thickening in accelerated arteriopathies relies on the migration of medial vascular smooth muscle cells (VSMCs) and their proliferation within the neointima. Activation of platelet-derived growth factor receptor- $\beta$  (PDGFR- $\beta$ ) expressed in injured VSMCs is responsible for the migration of medial VSMCs to the intima. In the present study, we wanted to assess whether a single local endovascular delivery of antisense PDGFR- $\beta$  in injured rat carotid arteries would be sufficient to prevent intimal hyperplasia and how it might contribute to the vascular healing process.

**Methods and Results**—A bolus of antisense PDGFR- $\beta$  delivered into injured rat carotid arteries reduced PDGFR- $\beta$  protein overexpression by >90% from day 3 to 28 after injury. At day 28 after injury, compared with injured untreated carotids, treatment with antisense PDGFR- $\beta$  reduced intimal hyperplasia by 58% and medial VSMC migration by 49% and improved vascular reendothelialization by 100% and vascular reactivity (EC<sub>50</sub>) to acetylcholine by 5-fold.

**Conclusions**—A single-bolus luminal delivery of antisense PDGFR- $\beta$  to injured rat carotids reduced intimal hyperplasia, improved the reendothelialization process, and led to the recovery of endothelium-dependent regulation of vascular tone. (*Circulation*. 2000;102:●●●-●●●.)

**Key Words:** gene therapy ■ angioplasty ■ growth substances ■ restenosis

Restenosis after coronary angioplasty occurs in 20% to 50% of treated patients and remains the major limitation to the long-term effectiveness of this procedure.<sup>1-3</sup> The expanded catheter removes the endothelium and injures many of the vascular smooth muscle cells (VSMCs) located in the innermost layer of the media of the artery. This is followed by the proliferation of medial VSMCs as early as 1 day after injury, followed by their migration from the media into the intima (4 to 7 days), after which proliferation of intimal VSMCs results in intimal hyperplasia.<sup>4-6</sup>

Reports support the role of platelet-derived growth factor (PDGF) in mediating arterial intimal hyperplasia after an angioplasty and in the formation of atherosclerotic lesions.<sup>7-10</sup> PDGF is secreted as 3 different isoforms: PDGF-AA, -AB, and -BB, and binds to 2 distinct subtype receptors, PDGFR- $\alpha$  and - $\beta$ , which can form homodimers and heterodimers.<sup>11,12</sup> PDGF dimers and both PDGF receptor subtypes are overexpressed in VSMCs from human atherosclerotic plaques and at sites of postangioplasty repair in animal and human arteries.<sup>10,13-15</sup>

In rats, administration of polyclonal antibodies to all forms of PDGF before and after balloon injury (BI) of carotid arteries inhibited intimal hyperplasia but not the first wave of proliferation in the media.<sup>16-18</sup> Interestingly, antibodies directed against the PDGF-B chain blocked intimal thickening,

whereas antibodies to the PDGF-A chain prevented intimal hyperplasia.<sup>19</sup> Infusion of PDGF-BB into a carotid BI in rats increased intimal thickening but had little effect on intimal VSMC proliferation, suggesting that the decrease in intimal hyperplasia was due to the inhibition of medial VSMC migration.<sup>20</sup>

We recently reported that a sustained perivascular delivery for 14 days of an antisense (AS) oligomer complementary to specific PDGFR- $\beta$  mRNA sequences after a BI in rat carotids prevented PDGFR- $\beta$  protein overexpression and intimal hyperplasia.<sup>15</sup> The aim of the present study was to investigate whether a single endovascular delivery of AS PDGFR- $\beta$  would be sufficient to reduce intimal hyperplasia by limiting either VSMC migration or proliferation. We also investigated the possibility that inhibition of PDGFR- $\beta$  overexpression would favor endothelial regrowth and the return of vasomotor activity.

## Methods

### Induction of Intimal Hyperplasia

BI of common carotid arterial endothelium was performed in male Sprague-Dawley rats (325 to 400 g) as described previously.<sup>15</sup> Animals were euthanized at different periods of time (0, 3, 7, 14, and 28 days) after injury with an overdose of ketamine and xylazine, exsanguinated, and perfused with 100 mL of Ringer's lactate solution by the left ventricle. The left (treated) and right (untreated)

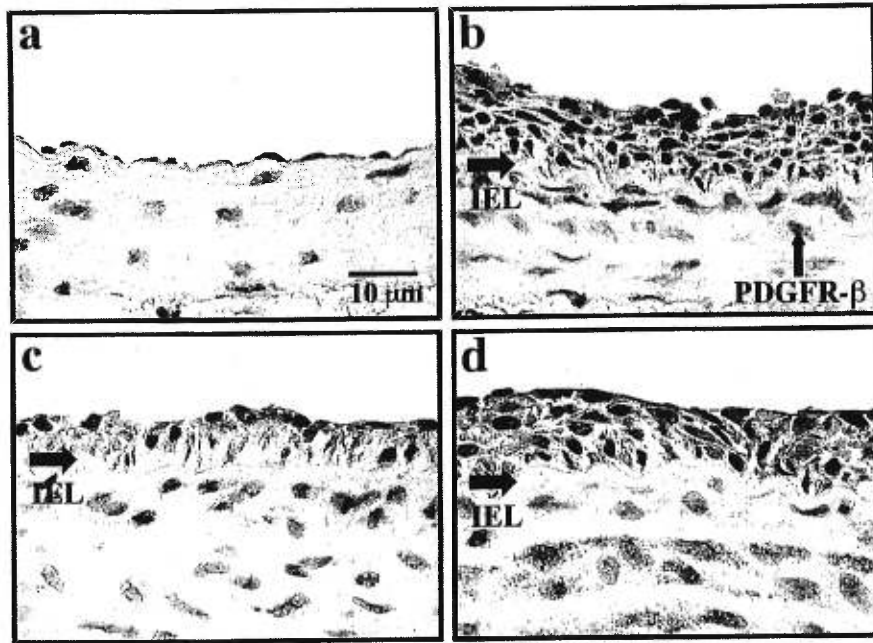
Received February 18, 2000; revision received April 6, 2000; accepted April 7, 2000.

From the Montreal Heart Institute and Department of Pharmacology, University of Montreal, Montreal, Québec, Canada.

Correspondence to Martin G. Sirois, PhD, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger St, Montreal, Québec, Canada H1T 1C8. E-mail: mgsirois@icm.umontreal.ca

© 2000 American Heart Association, Inc.

*Circulation* is available at <http://www.circulationaha.org>



**Figure 1.** PDGFR- $\beta$  protein expression 7 days after injury. Positive PDGFR- $\beta$  expression on arterial VSMCs was detected by immunohistochemistry (cells stained brown; vertical arrow). Baseline expression in native arteries was almost nil (a); it was maximal at day 7 in BI arteries (b); AS-PDGFR- $\beta$  prevented PDGFR- $\beta$  protein overexpression (c); SCR treatment had no effect (d). Internal elastic lamina (IEL; horizontal arrow) is indicated to delimit intimal from medial area of injured arteries.

segments of the common carotid arteries were removed and fixed in 10% formalin PBS. The segments were embedded in paraffin, cut into 6- $\mu$ m longitudinal sections, and stained with Masson's trichrome solution. The areas of the intima and media and the intima-to-media (I:M) area ratio were calculated by computerized digital planimetry.

### AS Oligonucleotide Therapy

We used an AS oligonucleotide phosphorothioate backbone sequence to the murine PDGFR- $\beta$  mRNA subunit (AS-PDGFR- $\beta$ : TATCACTCCTGGAAGCCC). A scrambled (SCR) sequence (SCR-PDGFR- $\beta$ : GTGATAGTATGCCGAGCA) was used as control. In the present study, we used only 1 AS sequence, because we showed the efficiency of this AS in a previous report.<sup>15</sup> After BI of the left common carotid artery, we introduced a 22-gauge infusion cannula into the external carotid arteriotomy and administered 0.2 mL of 0.9% NaCl solution to flush the residual blood-borne elements. The AS or SCR oligonucleotide solution (200  $\mu$ g/25  $\mu$ L of PBS 0.01 mol/L) was infused into the temporarily isolated segment of the left common carotid artery for a 30-minute period. Then the arteriotomy was ligated, the left common carotid artery was released, the wounds were closed, and the animals were returned to their cages. The protocol was performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines.

### Evaluation of Vascular Reactivity

Carotid arteries were harvested at death and placed in Krebs-Ringer solution. Rings of 4 to 5 mm from the medial portion of the left (treated) and right (untreated) carotids were mounted with 2 triangle 5-0 stainless steel wires. The adjacent segments (distal and proximal) were fixed in formalin for analysis. Experiments were performed in organ chambers filled with 25 mL of Krebs-Ringer solution and indomethacin 0.01 mmol/L and gassed with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> at 37°C. Vessels were passively stretched ( $\approx$ 1.5 g) while the contraction generated by a depolarizing solution containing physiological KCl (20 mmol/L) was assessed. The organ chamber was rinsed with fresh Krebs-Ringer solution and equilibrated for 45 minutes. Phenylephrine (PE; 10<sup>-6</sup> mol/L) was used to achieve a submaximal contraction. An endothelium-dependent vasorelaxation was induced by the addition of cumulative acetylcholine (ACh) concentrations (10<sup>-9</sup> to 3.17 $\times$ 10<sup>-5</sup> mol/L). Calcium ionophore A23187 (2.5 $\times$ 10<sup>-7</sup> mol/L) was added to obtain the maximal endothelium-dependent vasorelaxation. Sodium nitroprusside (10<sup>-5</sup> mol/L) was added to mediate a direct VSMC relaxation.

### Immunohistochemistry of PDGFR- $\beta$ , PCNA, and eNOS Expression

The immunohistochemistry procedures on arterial sections were performed as described previously.<sup>15</sup> The primary antibodies used were rabbit polyclonal anti-human PDGFR- $\beta$  IgG (UBI), monoclonal anti-human proliferative cell nuclear antigen (PCNA) IgG (Zymed Laboratories Inc), and monoclonal anti-human endothelial cell constitutive nitric oxide synthase (eNOS) IgG (Transduction Laboratories).

### Statistical Analysis

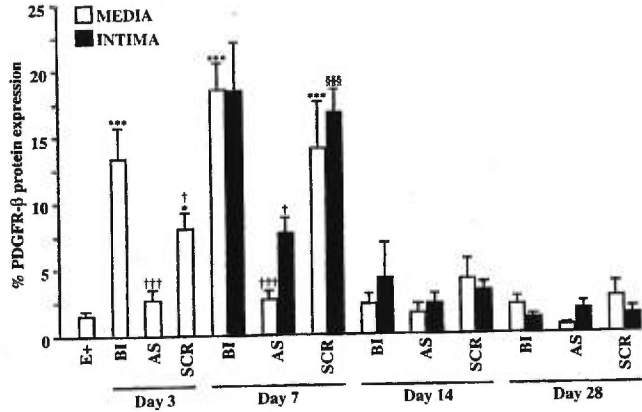
Data are mean  $\pm$  SEM. Statistical comparisons were determined by ANOVA followed by an unpaired Student's *t* test with Bonferroni's correction for multiple comparisons. Data were considered significantly different if a value of  $P < 0.05$  was observed. Relaxation is expressed as a percentage of precontracting tone. EC<sub>50</sub> (concentration of ACh producing a half-maximal relaxation) has been calculated for each segment with the Statview program.

## Results

### Expression of PDGFR- $\beta$ Protein Subunit

In native arteries, basal expression of the PDGFR- $\beta$  subunit was observed immunohistochemically on 1.4 $\pm$ 0.4% of medial VSMCs (Figures 1A and 2). PDGFR- $\beta$  protein increased 8.7-fold in medial VSMCs ( $P < 0.001$ ) by day 3 after injury, reached a plateau at day 7 (12.6-fold increase,  $P < 0.001$ ), and returned to basal levels by day 14 (Figures 1B and 2). The presence of intimal VSMCs was observed by day 7 after injury, with 18.3 $\pm$ 3.7% of intimal VSMCs staining positively for PDGFR- $\beta$  protein. By day 14, the PDGFR- $\beta$  protein expression in intimal VSMCs returned to basal level (Figures 1B and 2).

Treatment with AS-PDGFR- $\beta$  prevented PDGFR- $\beta$  protein overexpression in medial VSMCs at days 3 and 7 by 90% and 93%, respectively ( $P < 0.001$ ). Similarly, PDGFR- $\beta$  protein level was reduced by 60% ( $P < 0.05$ ) in intimal VSMCs at day 7 (Figures 1C and 2) and was at the basal level observed in native medial VSMCs at day 14 (Figure 2). Three days after injury, treatment with an SCR oligomer reduced



**Figure 2.** Quantification of VSMCs expressing PDGFR- $\beta$  protein. Baseline expression of PDGFR- $\beta$  protein in media of uninjured carotid arteries (E+). Denuding BI led to PDGFR- $\beta$  protein overexpression (up to day 7) in BI and SCR-treated vessels and returned to basal level. AS-PDGFR- $\beta$  reduced medial and intimal expression of PDGFR- $\beta$  compared with BI.  $n=4$  to 11 animals per treatment. One symbol,  $P<0.05$ ; 2 symbols,  $P<0.01$ ; 3 symbols,  $P<0.001$  \*vs E+, †vs BI, §vs AS.

the PDGFR- $\beta$  protein expression on medial VSMCs by 42% ( $P<0.05$ ). This reduction, however, was significantly less ( $P<0.05$ ) than the reduction mediated by the AS-PDGFR- $\beta$  (90%) (Figure 2). At day 7, SCR treatment did not reduce PDGFR- $\beta$  protein expression in medial or intimal VSMCs (Figures 1D and 2), and by day 14 the PDGFR- $\beta$  protein expression returned to basal levels (Figure 2).

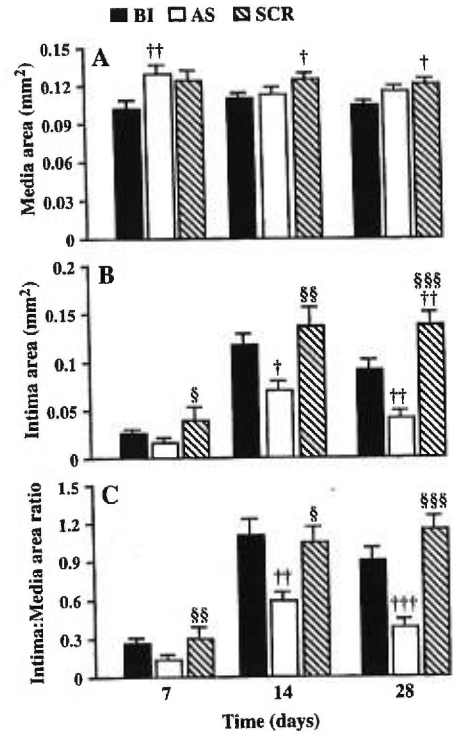
### Neointimal Hyperplasia

The intimal and medial areas ( $\text{mm}^2$ ) and the I:M area ratio were determined after a vascular injury. The medial areas in BI rat carotid arteries at days 7, 14, and 28 after injury were  $0.101 \pm 0.007$ ,  $0.109 \pm 0.005$ , and  $0.105 \pm 0.004$   $\text{mm}^2$ , respectively (Figure 3A) and fluctuated by  $<14\%$  compared with the medial area of native carotid arteries (data not shown). Treatment of the BI carotid arteries with AS-PDGFR- $\beta$  increased the medial area by 33%, 3%, and 13% at days 7, 14, and 28, respectively ( $P<0.01$  at day 7 and  $P=NS$  at days 14 and 28). SCR treatment increased the medial area by 23%, 14%, and 16.5% ( $P=NS$  at day 7 and  $P<0.05$  at days 14 and 28) (Figure 3A).

Intimal hyperplasia developed during the first 7 days and was maximal within 14 days. The intimal areas in BI groups at days 7, 14, and 28 were  $0.025 \pm 0.005$ ,  $0.116 \pm 0.012$ , and  $0.091 \pm 0.011$   $\text{mm}^2$  (Figure 3B). An AS-PDGFR- $\beta$  treatment reduced the intimal hyperplasia by 37%, 40%, and 56% ( $P=0.07$  [NS],  $P<0.05$ , and  $P<0.01$ ) at days 7, 14, and 28, respectively, whereas the SCR treatment did not reduce the intimal hyperplasia (Figure 3B). The I:M area ratios in BI carotids were  $0.256 \pm 0.047$ ,  $1.102 \pm 0.126$ , and  $0.899 \pm 0.099$ , respectively (Figure 3C). An AS-PDGFR- $\beta$  treatment reduced these ratios by 50%, 47%, and 58% ( $P=0.08$  [NS],  $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ), respectively, whereas the SCR treatment did not significantly alter the I:M area ratios compared with BI groups (Figure 3C).

### SMC Count

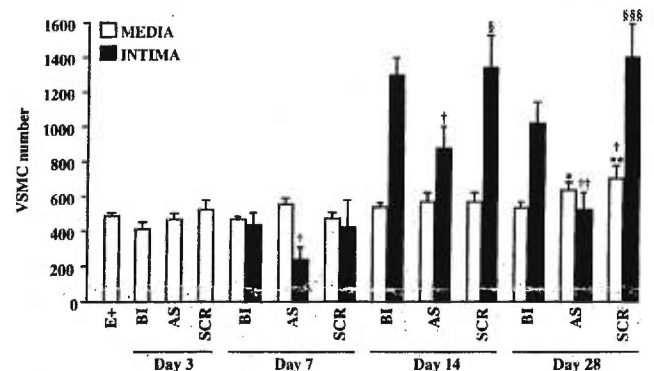
The induction of a carotid BI did not affect the medial VSMC count throughout the first 14 days compared with native



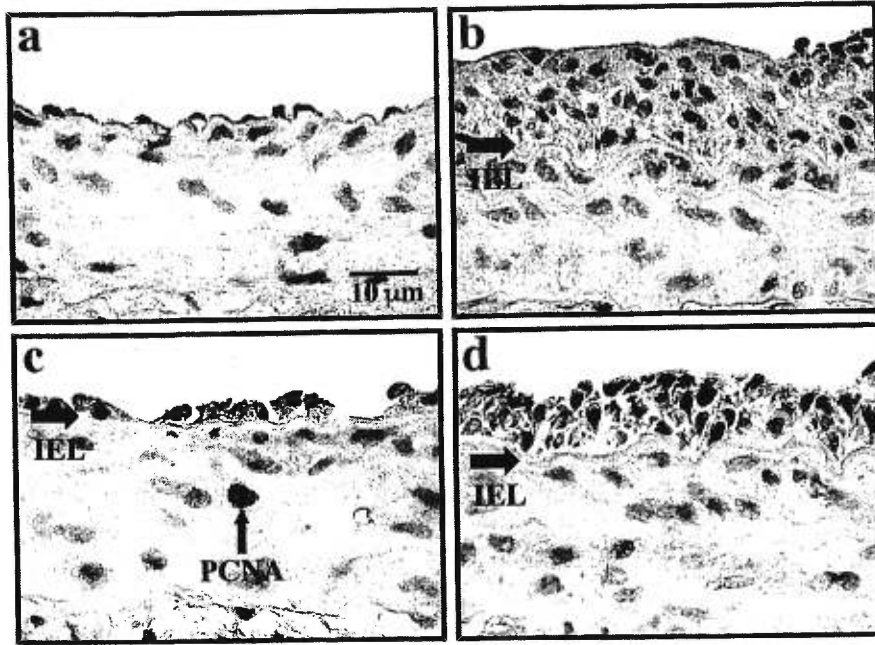
**Figure 3.** Effect of AS-PDGFR- $\beta$  on intimal hyperplasia. Medial area of vessels treated with AS-PDGFR- $\beta$  or SCR oligomers was increased slightly compared with an injured, untreated artery (BI) (A). AS-PDGFR- $\beta$  reduced neointimal area at 14 and 28 days after injury (B). I:M area ratio was reduced by application of AS-PDGFR- $\beta$  at days 14 and 28 after injury (C).  $n=5$  to 25 animals per treatment. Symbols as in Figure 2.

E4

vessels ( $467 \pm 38$  cells) (Figure 4). At day 28 after injury, however, all groups demonstrated an increased number of medial VSMCs compared with native media. The VSMC count increased by 11% ( $P=NS$ ) in the untreated BI group, by 32% ( $P<0.05$ ) in the AS-PDGFR- $\beta$ -treated group, and by 47% ( $P<0.01$ ) in the SCR-treated group. The difference between the AS-PDGFR- $\beta$  and the BI groups was not significant (Figure 4). At days 7, 14, and 28, the number of intimal VSMCs in BI arteries was  $422 \pm 67$ ,  $1285 \pm 100$ , and  $1004 \pm 126$ , respectively. AS-PDGFR- $\beta$  reduced the number of intimal VSMCs at days 7, 14, and 28 by 47%, 33%, and



**Figure 4.** Quantification of VSMC number in media and neointima of injured carotid arteries. AS-PDGFR- $\beta$  reduced number of VSMCs in intima compared with BI group.  $n=4$  to 16 animals per treatment. Symbols as in Figure 2.



**Figure 5.** PCNA protein expression 7 days after injury. Positive PCNA expression was detected by immunohistochemistry (cells stained in brown; vertical arrow). Baseline PCNA expression in native arteries was almost nil (a); it was overexpressed at day 7 in intima and media of injured arteries (b); AS-PDGFR- $\beta$  (c) and SCR treatment (d) did not prevent PCNA protein overexpression. Internal elastic lamina is indicated (IEL; horizontal arrow).

50% ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), respectively, compared with the BI group. The SCR oligomer did not reduce the intimal VSMC count at any time point (Figure 4).

**SMC Density**

The medial density of VSMCs in native carotid arteries was  $4253 \pm 160$  VSMCs/mm<sup>2</sup>. The fluctuation density of medial VSMCs at days 3, 7, 14, and 28 after injury in BI or AS-PDGFR- $\beta$  or SCR-treated groups was always  $< 20\%$  compared with the VSMC density observed in native medial VSMCs. The variation of medial VSMC density between the BI group and the groups treated either with AS-PDGFR- $\beta$  or SCR oligomer was also  $< 20\%$  (data not shown). The intimal VSMC densities in the BI group at days 7, 14, and 28 after injury were  $14\,762 \pm 1143$ ,  $11\,466 \pm 496$ , and  $11\,939 \pm 681$  VSMCs/mm<sup>2</sup>. The AS-PDGFR- $\beta$  significantly reduced the intimal VSMC density by 29% only at day 7 (data not shown).

**SMC Proliferative Activity**

In native carotid arteries, the percentage of proliferative medial VSMCs was  $1.2 \pm 0.4\%$  (Figures 5A and 6). At days 3 and 7 in the BI group, PCNA expression on medial VSMCs increased to  $7.8 \pm 2.4\%$  ( $P < 0.01$ ) and  $6.8 \pm 1.3\%$  ( $P < 0.001$ ) compared with native medial VSMCs and returned to the basal level of PCNA expression observed in uninjured medial VSMCs by day 14 (Figures 5B and 6). Intimal VSMC PCNA expression was quantified from days 7 to 28 after injury. In the BI group, the percentage of PCNA expression at day 7 was  $9.8 \pm 2.4\%$ , and it returned to near basal expression by day 14 (Figures 5B and 6). A treatment with AS-PDGFR- $\beta$  or SCR oligomer did not significantly reduce PCNA overexpression on medial and intimal VSMCs compared with the BI group at any time point (Figures 5C and 5D and 6).

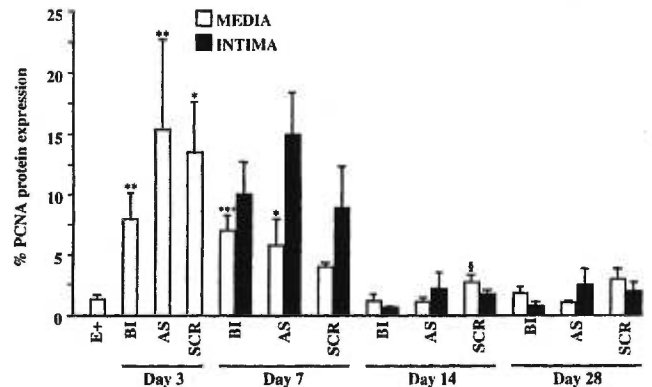
**Vascular Reendothelialization**

To evaluate the extent of reendothelialization, immunohistochemical staining was performed to detect the expression of

ecNOS. In native carotid arteries, ecNOS-positive cells covered  $96.7 \pm 0.5\%$  of the internal elastic lamina (Figures 7A and 8). Immediately after the passage (3 times) of an inflated balloon, the degree of endothelialization (day 0) was reduced to  $2.7 \pm 0.3\%$  (Figures 7B and 8). In the BI group, reendothelialization occurred but remained incomplete (Figures 7C and 8). Treatment with AS-PDGFR- $\beta$  increased the extent of reendothelialization at each time point compared with the BI group (Figures 7D and 8). The application of SCR oligomer did not favor reendothelialization (Figure 8).

**Ex Vivo Carotid Vascular Reactivity**

Segments of carotid arteries were precontracted to submaximal level with PE ( $10^{-6}$  mol/L). PE-induced contraction in endothelium-intact native arteries (E+;  $0.68 \pm 0.04$  g) was less than in freshly denuded arteries (day 0;  $1.38 \pm 0.12$  g). At 14 and 28 days after injury, PE-induced contraction varied

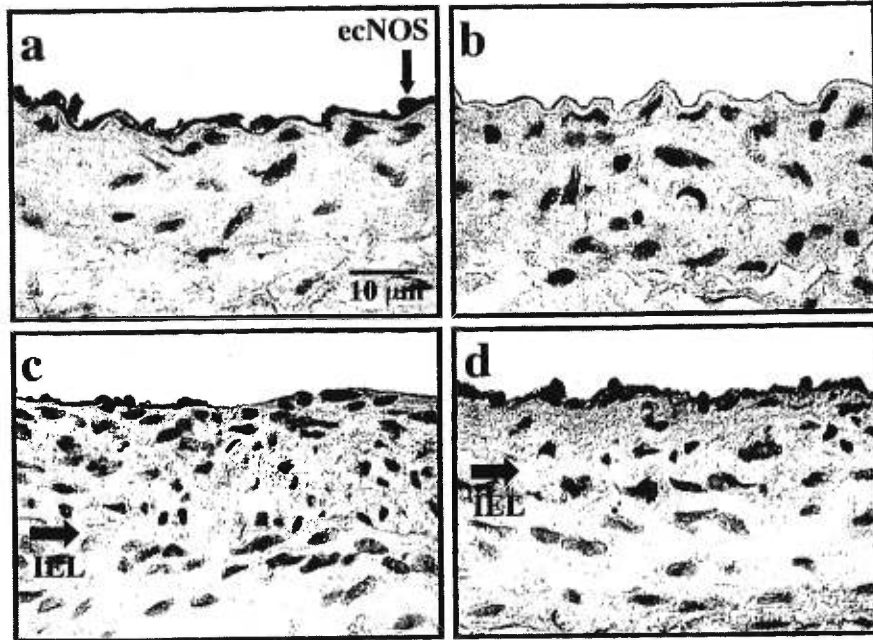


**Figure 6.** Quantification of VSMCs in proliferative state. Baseline expression of PCNA protein in media of uninjured carotid arteries (E+) was 1.15%. Vascular injury induced PCNA overexpression in media at days 3 and 7 and in intima at day 7; values returned to baseline levels by day 14. Treatment with either AS-PDGFR- $\beta$  or SCR oligomer did not prevent PCNA protein overexpression.  $n = 4$  to 14 animals per treatment. Symbols as in Figure 2.

F7  
F8

short





**Figure 7.** ecNOS detection on injured carotid arteries. Positive ecNOS expression was detected by immunohistochemistry (cells stained brown; vertical arrow). Baseline ecNOS expression in native arteries was present on each endothelial cell (a), absent immediately after a vascular injury (b), and partial 28 days after injury (c). In AS-PDGFR- $\beta$ -treated group, extent of reendothelialization was improved (d). Internal elastic lamina is indicated (IEL; horizontal arrow).

between  $0.97 \pm 0.11$  and  $1.28 \pm 0.10$  g in BI or AS-PDGFR- $\beta$  and SCR-treated arteries (data not shown).

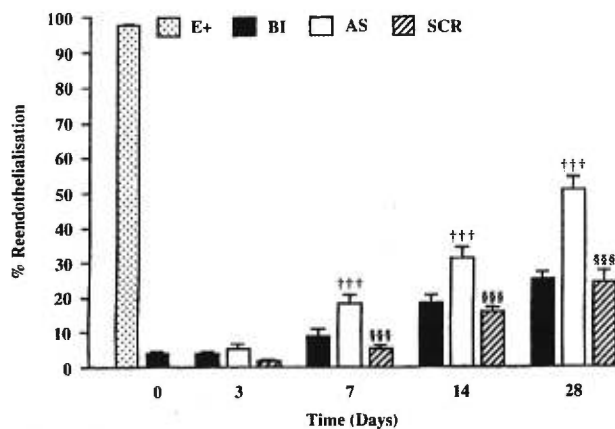
On PE-precontracted arteries, ACh induced a complete relaxation of endothelium-intact segments (E+; Figure 9). The relaxant effect of ACh, which was absent in freshly denuded arteries (BI day 0) and maximal on days 14 and 28, produced only  $13.4 \pm 3.7\%$  (day 14) and  $36.1 \pm 6.8\%$  (day 28) of vasorelaxation (Figure 9). AS-PDGFR- $\beta$  but not SCR significantly improved (time-dependently) the efficacy of ACh-induced relaxation compared with the BI group (Figure 9). After the addition of the highest concentration of ACh ( $3.17 \times 10^{-5}$  mol/L), the calcium ionophore A23187 ( $10^{-7}$  mol/L) was added to obtain the maximal endothelium-dependent vasorelaxation. The addition of A23187 to injured carotid arteries either untreated (BI) or treated with the

AS-PDGFR- $\beta$  or SCR oligomers never induced  $>10\%$  relaxation at 14 and 28 days after injury (Figure 9). Sodium nitroprusside ( $10^{-5}$  mol/L), which induces a direct VSMC relaxation, produced 100% relaxation in all treated groups (Figure 9).

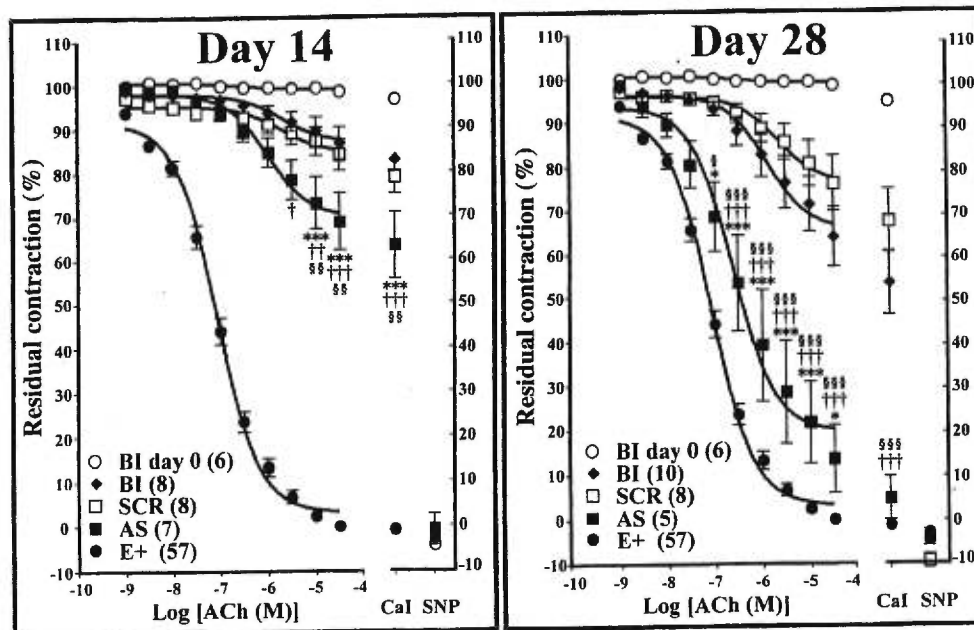
### Discussion

In the present study, we show that a local endovascular delivery of AS-PDGFR- $\beta$  at the injured carotid artery site not only reduced the formation of intimal hyperplasia but also enhanced reendothelialization and almost completely restored the endothelium-dependent relaxing function. It is also very interesting to note that such treatment prevented, rather than simply delaying, the overexpression of PDGFR- $\beta$  protein, which normally peaks 7 days after injury. Finally, we showed that the reduction of intimal hyperplasia mediated by AS-PDGFR- $\beta$  treatment was not due to a reduction of medial and/or intimal VSMC proliferative activity but rather was attributable to the inhibition of medial VSMC migration into the intima.

After a BI, PDGFR- $\beta$  protein expression increased in the media and the neointima. This was maximal at day 7 and returned to its baseline level at day 14. These results are in agreement with previous reports that have shown transient PDGFR- $\beta$  protein overexpression in rat and human injured arteries.<sup>10,14</sup> Bilder et al<sup>21</sup> reported that a selective PDGFR- $\beta$  tyrosine kinase inhibitor given orally twice a day for 28 days decreased by 30% the I:M area ratio in injured porcine coronary arteries. Banai et al<sup>22</sup> showed that a local intravascular delivery of a PDGF-receptor tyrosine kinase blocker reduced by 40% the I:M area ratio of BI porcine femoral arteries. Finally, Hart et al<sup>23</sup> showed that repeated intravenous administration of mouse/human chimeric anti-PDGFR- $\beta$  antibodies combined with a sustained heparin delivery decreased the I:M area ratio by 40% in BI baboon saphenous arteries. In our study, the single-bolus endovascular applica-



**Figure 8.** Vascular reendothelialization of injured carotid arteries. Expression of ecNOS in uninjured carotid arteries (E+) covered 96.6% of luminal circumference of artery. Immediately after BI, endothelium covered 2.6% of vascular lumen. Treatment with AS-PDGFR- $\beta$  improved reendothelialization process at each time point compared with BI group, whereas SCR oligomer had no beneficial effect.  $n=4$  to 20 animals per treatment. Symbols as in Figure 2.



**Figure 9.** Restoration of vascular reactivity. Results are expressed as percentage of residual contraction to PE. Normal vessels (E+) relax completely to ACh, whereas freshly denuded carotids (BI day 0) did not show any endothelium-dependent relaxation. At day 14, BI untreated and SCR-treated vessels had 15% relaxation to ACh, whereas treatment with AS-PDGFR- $\beta$  doubled vasorelaxation to ACh. At day 28, BI, SCR, and AS groups relaxed by 24%, 36%, and 87%, respectively, under ACh  $10^{-5}$  mol/L treatment. At day 28, ACh EC<sub>50</sub> was  $1.34 \times 10^{-6}$  mol/L for BI vessels,  $2.23 \times 10^{-6}$  mol/L for SCR-treated, and  $2.47 \times 10^{-7}$  mol/L for AS-PDGFR- $\beta$ -treated vessels. *n*=5 to 10 animals per treatment and *n*=57 for native arteries. Cal indicates calcium ionophore. Symbols as in Figure 2.

tion of AS-PDGFR- $\beta$  was sufficient to prevent the overexpression of PDGFR- $\beta$  protein throughout the entire 28 days of our experiment, and this might explain why our treatment was more efficient (58%) in reducing the development of intimal hyperplasia than the above-mentioned studies. In our previous report,<sup>15</sup> the sustained perivascular application of AS-PDGFR- $\beta$  reduced the I:M area ratio by 60% to 80%. Our present results suggest that a sustained release of the AS-PDGFR- $\beta$  is not necessary to achieve its optimal biological effect and reinforce the concept that the blockade of initial events after acute vascular injury might be sufficient to have prolonged benefits.<sup>23,24</sup>

We calculated the number of medial and intimal VSMCs and their density per square millimeter (VSMCs/mm<sup>2</sup>), as well as the VSMC proliferative activity in the different groups studied. Although medial VSMC count was increased 28 days after injury in all 3 groups, medial VSMC density at each time point in BI and AS-PDGFR- $\beta$  (or SCR oligomer)-treated groups never fluctuated by >20% compared with VSMC density observed in the media of native carotid arteries. AS-PDGFR- $\beta$  treatment reduced the number of intimal VSMCs at days 7, 14, and 28 by up to 50% compared with the BI group without altering intimal VSMC density at days 14 and 28. In addition, a treatment with either the AS-PDGFR- $\beta$  or the SCR oligomer did not significantly reduce PCNA overexpression at any time point in medial and intimal VSMCs as observed in the BI group (Figures 5 and 6). These results demonstrate that the treatment of an injured rat carotid artery with AS-PDGFR- $\beta$  did not alter the proliferative activity of the medial or intimal VSMCs. Thus, the reduction in intimal VSMC number and the I:M area ratio is attributed to the inhibition of medial VSMC migration into intima.

We observed that the passage of an inflated balloon in rat carotid arteries led to an almost complete denudation of the endothelium. In the untreated BI arteries, a progressive reendothelialization was achieved, but <25% of the luminal area was covered by day 28. The application of AS-PDGFR- $\beta$  increased the extent of reendothelialization by 2-fold at each time point, such that nearly 50% of the neointima was covered by neendothelial cells at 28 days. This result, combined with a 58% reduction of the I:M ratio observed in the same carotid arteries treated with AS-PDGFR- $\beta$ , supports the hypothesis that the inhibition of VSMC migration from the injured media has the double beneficial effects of reducing intimal hyperplasia and improving the vascular healing process.

Finally, our results demonstrate that the contractile (PE) and relaxant (sodium nitroprusside) properties of VSMCs were unaltered by the different treatments. Most importantly, at 14 days and more convincingly at 28 days after injury, AS-PDGFR- $\beta$  treatment significantly improved endothelium-dependent relaxation. The maximal relaxation produced by ACh more than doubled, and the estimated concentration of ACh needed to induce 50% of its maximal relaxation was reduced by 2- and 5-fold at 14 and 28 days, respectively, compared with injured untreated carotid arteries. Our results suggest that a 50% reendothelialization of injured rat carotid arteries might be sufficient to induce an almost complete endothelium-dependent vasorelaxation as observed in native arteries.

In conclusion, we have shown that the local endovascular delivery of a single bolus of AS-PDGFR- $\beta$  at the injury site is sufficient to block the initial and delayed PDGFR- $\beta$  protein overexpression, reduce the formation of intimal hyperplasia,

and improve the degree of reendothelialization sufficiently to restore endothelium-dependent relaxant function to the injured carotid arteries. These data demonstrate the clinical potential of AS-PDGFR- $\beta$  to prevent accelerated arteriopathies and promote vascular healing of injured areas.

### Acknowledgments

This study was supported by grants from the Medical Research Council of Canada (MT-14378) and the Heart and Stroke Foundation of Québec to Dr Sirois. Dr Sirois is a recipient of a scholarship from the Heart and Stroke Foundation of Canada, and C.H. Boucher of a studentship from the FCAR-FRSQ foundation. We wish to thank Dominique Lauzier for her technical assistance and Dr Jean-François Tanguay for his scientific input.

### References

- Liu MW, Roubin GS, King SB III. Restenosis after coronary angioplasty: potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia. *Circulation*. 1989;79:1374-1387.
- Schwartz RS, Holmes DR Jr, Topol EJ. The restenosis paradigm revisited: an alternative proposal for cellular mechanisms. *J Am Coll Cardiol*. 1992;20:1284-1293.
- Meurice T, Vallet B, Bauters C, et al. Role of endothelial cells in restenosis after coronary angioplasty. *Fundam Clin Pharmacol*. 1996;10:234-242.
- Clowes AW, Schwartz SM. Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery. *Circ Res*. 1985;56:139-145.
- Lindner V, Reidy MA. Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:3739-3743.
- Clowes AW, Clowes HM, Reidy MA. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury, III: endothelial and smooth muscle growth factor in chronically denuded vessels. *Lab Invest*. 1986;54:295-303.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362:801-809.
- Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell*. 1986;46:155-169.
- Williams LT. Signal transduction by the platelet-derived growth factor receptor. *Science*. 1989;243:1564-1570.
- Tanizawa S, Ueda M, van der Loos CM, et al. Expression of platelet derived growth factor B chain and  $\beta$  receptor in human coronary arteries after percutaneous transluminal coronary angioplasty: an immunohistochemical study. *Heart*. 1996;75:549-556.
- Raines EW, Bowen-Pope DF, Ross R. Platelet-derived growth factor. In: Sporn MB, Roberts AB, eds. *Handbook of Experimental Pharmacology: Peptide Growth Factor and Their Receptors*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag; 1990:73-262.
- Seifert RA, Hart CE, Phillips PE, et al. Two different subunits associate to create isoform-specific platelet-derived growth factor receptors. *J Biol Chem*. 1989;264:8771-8778.
- Ross R, Masuda J, Raines EW, et al. Localization of PDGF-B protein in macrophages in all phases of atherogenesis. *Science*. 1990;248:1009-1012.
- Majesky MW, Reidy MA, Bowen-Pope DF, et al. PDGF ligand and receptor gene expression during repair of arterial injury. *J Cell Biol*. 1990;111:2149-2158.
- Sirois MG, Simons M, Edelman ER. Antisense oligonucleotide inhibition of PDGFR- $\beta$  receptor subunit expression directs suppression of intimal thickening. *Circulation*. 1997;95:669-676.
- Ferns GAA, Raines EW, Sprugel KH, et al. Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by antibody to PDGF. *Science*. 1991;253:1129-1132.
- Jackson CL, Raines EW, Ross R, et al. Role of endogenous platelet-derived growth factor in arterial smooth muscle cell migration after balloon catheter injury. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:1218-1226.
- Rutherford C, Martin W, Salame M, et al. Substantial inhibition of neo-intimal response to balloon injury in the rat carotid artery using a combination of antibodies to platelet-derived growth factor-BB and basic fibroblast growth factor. *Atherosclerosis*. 1997;130:45-51.
- Hart CE, Clowes AW. Platelet-derived growth factor and arterial response to injury. *Circulation*. 1997;95:555-556.
- Jawien A, Bowen-Pope DF, Lindner V, et al. Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty. *J Clin Invest*. 1992;89:507-511.
- Bilder G, Wentz T, Leadley R, et al. Restenosis following angioplasty in the swine coronary artery is inhibited by an orally active PDGF-receptor tyrosine kinase inhibitor, RPR101511A. *Circulation*. 1999;99:3292-3299.
- Banai S, Wolf Y, Golomb G, et al. PDGF-receptor tyrosine kinase blocker AG1295 selectively attenuates smooth muscle cell growth in vitro and reduces neointimal formation after balloon angioplasty in swine. *Circulation*. 1998;97:1960-1969.
- Hart CE, Kraiss LW, Vergel S, et al. PDGFR $\beta$  receptor blockade inhibits intimal hyperplasia in the baboon. *Circulation*. 1999;99:564-569.
- Edelman ER, Simons M, Sirois MG, et al. c-myc in vasculoproliferative disease. *Circ Res*. 1995;76:176-182.