

Université de Montréal

**Importance des interactions plaquettes/neutrophiles
et des sélectines dans la resténose post-angioplastie**

par

Jean-Guy Bienvenu

Programme de Sciences Biomédicales

Département de médecine

Faculté de médecine

**Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en sciences biomédicales**

mai 2000

©Jean-Guy Bienvenu, 2000



W

4

US8

2001

v. 006

Page d'identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

**Importance des interactions plaquettes/neutrophiles
et des sélectines dans la resténose post-angioplastie**

présentée par:

Jean-Guy Bienvenu

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Eric Thorin	Président-rapporteur
Dr Yahye Merhi	Directeur de recherche
Dr Jean-François Tanguay	Codirecteur
Dr Monique Doré	Membre du jury
Dr Mony Frojmovic	Examineur externe
Dr Céline Fiset	Représentante du doyen

Thèse acceptée le : _____

Contribution de Jean-Guy Bienvenu à la réalisation des contributions originales

1. Inhibition of platelet-neutrophil interactions by fucoidan reduces adhesion and vasoconstriction after acute arterial injury by angioplasty in pigs. Patrick Chauvet, **Jean-Guy Bienvenu**, Jean-François Théorêt, Jean-Gilles Latour et Yahye Merhi. J Cardiovasc Pharmacol. 1999, 34 : 597-603
Contribution : 20%, supervision des étudiants, discussion et analyse des résultats.
2. Relationship between platelets and neutrophils adhesion and neointimal growth after repeat arterial wall injury induced by angioplasty in pigs. **Jean-Guy Bienvenu**, Jean-François Tanguay, Patrick Chauvet, Yahye Merhi.
Contribution : 100%.
3. Platelet activation and binding to neutrophils following perfusion over intact and damaged arterial surfaces : Importance of P-selectin and PSGL-1. Jean-François Théorêt, **Jean-Guy Bienvenu**, Anjali Kumar, Jean-Gilles Latour et Yahye Merhi.
Contribution : 20%, supervision des étudiants, discussion et analyse des résultats.
4. rPSGL-Ig reduces restenosis via inhibition of platelet-neutrophil adhesion after double angioplasty in swine. **Jean-Guy Bienvenu**, Jean-François Tanguay, Jean-François Théorêt, Anjali Kumar, Robert G. Schaub et Yahye Merhi.
Contribution : 100%.

SOMMAIRE

L'angioplastie par ballonnet représente une alternative à la chirurgie cardiaque lors d'occlusions vasculaires. Cette procédure peut entraîner toutefois des lésions vasculaires profondes se traduisant par la formation d'un thrombus intramural et intraluminal avec infiltration de leucocytes et présence d'un vasospasme proximal et distal à la région dilatée. De plus, dans environ 30-40% des cas, une resténose est observée dans les 6 mois suivant l'angioplastie. Les molécules d'adhésion de la famille des sélectines contribuent largement aux interactions des leucocytes et des plaquettes au site d'un dommage vasculaire via des liaisons entre le PSGL-1 des leucocytes et la P-sélectine exprimée par les plaquettes activées. Ces interactions, qui ont été observées chez des patients souffrant d'angine, d'infarctus du myocarde ou suite à l'angioplastie, peuvent contribuer à augmenter les réactions inflammatoires ainsi que la formation de thrombi lors de la réponse vasculaire suite au dommage.

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier l'importance des interactions cellulaires médiées par les sélectines dans les événements aigus suite à l'angioplastie. Pour ce faire, nous avons utilisé un bloqueur des sélectines, la fucoïdine, dans un modèle porcin d'angioplastie en mesurant l'adhésion de plaquettes-Cr⁵¹ et de neutrophiles-In¹¹¹ de même que la vasoconstriction artérielle. L'adhésion de ces cellules fut aussi évaluée dans des études *in vitro* en chambres de perfusion de suspensions de plaquettes-Cr⁵¹ et/ou de neutrophiles-In¹¹¹ sur des surfaces artérielles endommagées. L'utilisation de fucoïdine (5 mg/kg) a produit une réduction importante de la déposition plaquettaire (73%) et de l'adhésion neutrophilique (84%) sur les lésions sévères suite à l'angioplastie de même qu'une diminution de 51% de la réponse vasoconstrictrice au site de lésions vasculaires. De plus, lors d'études de perfusion, l'emploi de fucoïdine (20 et 100 µg/mL) s'est traduit par une inhibition plus marquée de l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles aux surfaces endommagées lors de perfusion de suspensions cellulaires mixtes, indiquant que la fucoïdine interfère avec les interactions plaquettes-neutrophiles. Ces résultats confirment que les sélectines augmentent l'activation mutuelle des plaquettes et des neutrophiles suite à leurs interactions, amplifiant leur recrutement au site d'un dommage vasculaire par angioplastie.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu vérifier l'impact des sélectines dans la resténose post-angioplastie. Même si des modèles expérimentaux ont surtout utilisé l'endommagement par cathéter ballon d'artères saines, la dilatation d'artères pathologiques est cliniquement plus pertinente et pourrait se traduire par différentes interactions cellulaires. Nous avons donc tout d'abord caractérisé un modèle de dommage répété par angioplastie chez le porc, particulièrement

en ce qui concerne la relation entre l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles, l'étendue de la formation du néointima et l'expression de P-sélectine. Dans ce modèle, une angioplastie est pratiquée aux mêmes sites 1 mois après l'angioplastie initiale. Tout comme à la suite d'une seule angioplastie, l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles à la paroi artérielle endommagée par angioplastie répétée s'accroît avec la sévérité du dommage. Alors que l'adhésion des plaquettes était similaire après une angioplastie unique ou répétée, l'adhésion des neutrophiles était significativement augmentée suite à une angioplastie répétée. De plus, un mois après une angioplastie, le néoendothélium exprimait de la P-sélectine; la production de néointima et l'adhésion des neutrophiles était plus importante après un dommage sévère que suite à un dommage léger. Ces résultats qui suggèrent la présence d'un processus inflammatoire persistant 1 mois après angioplastie, soulignent que les neutrophiles pourraient participer à la progression de la resténose post-angioplastie.

Pour évaluer l'impact des sélectines et des interactions plaquettes-neutrophiles dans la resténose, nous avons utilisé dans ce modèle d'angioplastie répétée un bloqueur spécifique de la P-sélectine, le rPSGL-Ig. Le rPSGL-Ig est une forme soluble recombinante chimérique du PSGL-1, ligand de haute affinité de la P-sélectine. Dans des expériences *in vitro*, nous avons démontré que l'activation des plaquettes par le passage sur une surface artérielle endommagée pendant 15 minutes en chambre de perfusion, se traduisait par l'expression de P-sélectine et par la formation de conjugués hétérotypiques plaquettes-neutrophiles, tel qu'évalué en double fluorescence par cytométrie en flux. L'ajout de rPSGL-Ig inhiba les interactions plaquettes-neutrophiles, le rPSGL-Ig se liant avec la P-sélectine exprimée par les plaquettes activées. L'utilisation du rPSGL-Ig (1 mg/kg intraveineux avant la seconde angioplastie) dans notre modèle d'angioplastie porcine répétée s'est traduite par une diminution significative de l'adhésion des plaquettes-Cr⁵¹ et des neutrophiles-In¹¹¹ 4 heures et à 1 semaine après un dommage sévère. Quatre semaines après l'angioplastie répétée, la lumière vasculaire résiduelle des segments sévèrement endommagés était de 63% plus importante chez les animaux traités avec le rPSGL-Ig. Cette différence était principalement liée à un remodelage vasculaire plutôt qu'à une diminution de la production du néointima suite à l'administration du rPSGL-Ig. Ces résultats indiquent que l'antagonisme de la P-sélectine par l'utilisation de rPSGL-Ig inhibe l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles au site d'un dommage artériel et réduit la resténose en permettant un remodelage vasculaire positif.

Globalement, ces expériences soulignent non seulement l'importance des sélectines, et plus particulièrement de la P-sélectine, dans les événements aigus suivant l'endommagement d'un néointima artériel, mais également dans la pathophysiologie de la resténose.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire	iii
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Liste des abréviations	xiii

Chapitre premier : Athérosclérose, angioplastie et resténose

1.1	L'athérosclérose.....	1
1.1.1	Lésion et pathophysiologie.....	1
1.1.2	Facteurs de risque.....	4
1.1.2.1	Facteurs de risque constitutifs.....	4
1.1.2.2	Facteurs de risque acquis.....	5
1.1.3	Angine et infarctus du myocarde.....	6
1.2	L'angioplastie.....	10
1.2.1	Généralités.....	10
1.2.2	Angioplastie carotidienne.....	11
1.2.3	Domage morphologique.....	12
1.2.4	Complications aiguës de l'angioplastie coronaire.....	14
1.3	La resténose.....	16
1.3.1	Généralités.....	16
1.3.2	Définitions.....	17
1.3.3	Facteurs prédictifs.....	18
1.3.3.1	Reliés au patient.....	18
1.3.3.2	Reliés à la lésion.....	19
1.3.3.3	Reliés à la procédure.....	19
1.3.4	Pathophysiologie.....	20
1.3.4.1	Le rappel élastique.....	20
1.3.4.2	Thrombus, leucocytes et endothélium.....	21
1.3.4.2.1	Le thrombus.....	21
1.3.4.2.2	Les cellules inflammatoires.....	24

1.3.4.2.3	L'endothélium.....	26
1.3.4.2.4	Facteurs de croissance.....	28
1.3.4.3	Implications des cellules musculaires lisses.....	30
1.3.4.3.1	Prolifération des cellules musculaires lisses.....	30
1.3.4.3.2	Migration des cellules musculaires lisses.....	31
1.3.4.3.3	Les cellules musculaires lisses et le néointima.....	33
1.3.4.4	Rôle de l'adventice.....	38
1.3.4.5	Remodelage vasculaire.....	39
1.3.4.5.1	Généralités.....	39
1.3.4.5.2	Mécanismes.....	42
1.3.5	Prévention de la resténose.....	45
1.3.5.1	Approches pharmacologiques.....	45
1.3.5.1.1	Anti-plaquettaires.....	45
1.3.5.1.2	Anti-coagulants.....	46
1.3.5.1.3	Anti-inflammatoires.....	47
1.3.5.1.4	Anti-prolifératifs.....	48
1.3.5.1.5	Hypolipémiants.....	49
1.3.5.2	Approches mécaniques.....	49
1.3.6	Modèles expérimentaux.....	52
1.3.6.1	Rongeurs et Lagomorphes.....	52
1.3.6.1.1	Le rat.....	52
1.3.6.1.2	La souris.....	53
1.3.6.1.3	Le lapin.....	55
1.3.6.2	Carnivores et Omnivores.....	57
1.3.6.2.1	Le chien.....	57
1.3.6.2.2	Les primates.....	58
1.3.6.2.3	Le porc.....	59
1.3.7	Divergences entre les résultats cliniques et expérimentaux.....	63
1.3.7.1	Facteurs reliés aux modèles expérimentaux.....	63
1.3.7.1.1	Types d'artères utilisées.....	64
1.3.7.1.2	Type et sévérité du dommage vasculaire.....	65
1.3.7.1.3	Thrombus et cellules musculaires lisses.....	65
1.3.7.2	Analyses et objectifs.....	65

1.3.7.3 Protocoles expérimentaux et cliniques.....	66
--	----

Chapitre Deuxième : Interaction plaquettes-neutrophiles et molécules d'adhésion

2.1	Généralités.....	69
2.1.1	Les neutrophiles.....	69
2.1.2	Les plaquettes.....	72
2.2.	Interactions plaquettes-neutrophiles.....	74
2.2.1.	Métabolisme transcellulaire.....	74
2.2.2.	Activation et recrutement.....	76
2.3	Molécules d'adhésion et leur ligands.....	78
2.3.1.	Intégrines.....	78
2.3.1.1.	Intégrines β_1 des neutrophiles.....	79
2.3.1.2.	Intégrines β_2 des neutrophiles.....	80
2.3.1.2.1.	Mac-1.....	81
2.3.1.2.2.	LFA-1.....	82
2.3.1.2.3.	p150,95.....	82
2.3.1.3.	Intégrine β_1 des plaquettes.....	83
2.3.1.4.	Intégrines β_3 des plaquettes.....	83
2.3.1.4.1.	$\alpha_{IIb}\beta_3$	83
2.3.1.4.2.	$\alpha_v\beta_3$	85
2.3.2.	Sélectines.....	85
2.3.2.1.	Généralités.....	85
2.3.2.2.	P-sélectine.....	86
2.3.2.3.	L-sélectine.....	88
2.3.2.4.	E-sélectine.....	89
2.4.	Implications des molécules d'adhésion dans les interactions plaquettes-neutrophiles.....	91
2.4.1.	Liaison P-sélectine/PSGL-1.....	91
2.4.2.	Liaison via des intégrines.....	92
2.4.3.	Autres mécanismes possibles.....	93
2.4.3.1.	Thrombospondine.....	93
2.4.3.2.	ICAM-2/LFA-1.....	94

2.4.3.3. Récepteurs Fc γ	94
2.5. Sélectines et intégrines dans l'adhésion et l'agrégation	95
2.5.1. Adhésion des neutrophiles à l'endothélium	95
2.5.1.1. Le roulement	95
2.5.1.2. L'adhésion ferme	97
2.5.1.3. La transmigration des neutrophiles	99
2.5.2. Agrégation des neutrophiles	100
2.5.3. Adhésion des plaquettes à la matrice extracellulaire	100
2.6. Importance des sélectines comme cible thérapeutique	102
2.6.1. Analogues du sLe ^x	102
2.6.2. La fucoïdine	103
2.6.3. Le PSGL-1 soluble	104

Chapitre Troisième : Contributions originales

3.1. Inhibition of platelet-neutrophil interactions by fucoidan reduces adhesion and vasoconstriction after acute arterial injury by angioplasty in pigs	106
3.2. Relationship between platelets and neutrophil adhesion and neointimal growth after repeat arterial wall injury induced by angioplasty in pigs	132
3.3. Platelet activation and binding to neutrophils following perfusion over intact and damaged arterial surfaces: Importance of P-Selectin and PSGL-1	165
3.4. rPSGL-Ig reduces restenosis via inhibition of platelet-neutrophil adhesion after double angioplasty in swine	193
Discussion	226
Bibliographie	235

LISTE DES TABLEAUX

Première étude

Tableau 1 Paramètres hématologiques et hémodynamiques après traitement ou non avec le rPSGL-Ig.....	125
Tableau 2 Caractéristiques morphologiques des artères après traitement ou non avec le rPSGL-Ig.....	126

Deuxième étude

Tableau 1 Paramètres hématologiques et hémodynamiques dans les modèles aigu et chronique.....	155
Tableau 2 Caractéristiques morphologiques des artères dans les modèles aigu et chronique.....	156
Tableau 3 Paramètres histomorphométriques 4 semaines après angioplastie.....	157

Quatrième étude

Tableau 1 Caractéristiques morphologiques des artères 1 heure, 4 heures, 1 semaines et 4 semaines après angioplastie répétée et traitement ou non avec le rPSGL-Ig.....	218
Tableau 2 Paramètres histomorphométriques de segments artériels sévèrement endommagés 4 semaines après angioplastie répétée et traitement ou non avec le rPSGL-Ig.....	219

LISTE DES FIGURES

Première étude

- Figure 1** Déposition des plaquettes sur des segments intacts, légèrement ou sévèrement endommagés après traitement ou non avec la fucoïdine128
- Figure 2** Adhésion des neutrophiles sur des segments intacts, légèrement ou sévèrement endommagés après traitement ou non avec la fucoïdine129
- Figure 3** Effets de la fucoïdine sur la déposition plaquettaire à la média artérielle en chambre de perfusion, en présence ou non de neutrophiles130
- Figure 4** Effets de la fucoïdine sur l'adhésion des neutrophiles à la média artérielle en chambre de perfusion, en présence ou non de plaquettes131

Deuxième étude

- Figure 1** Design expérimental après angioplastie simple ou répétée.....158
- Figure 2** Sections histologiques après endommagement sévère suite à une angioplastie simple (A) ou répétée (B).....159
- Figure 3** Adhésion des plaquettes à des segments artériels intacts, légèrement ou sévèrement endommagés après angioplastie simple ou répétée.....160
- Figure 4** Adhésion des neutrophiles à des segments artériels intacts, légèrement ou sévèrement endommagés après angioplastie simple ou répétée.....161
- Figure 5** Adhésion des neutrophiles à des segments artériels intacts, légèrement ou sévèrement endommagés 4 semaines après angioplastie.....162
- Figure 6** Adhésion des plaquettes à des segments artériels intacts, légèrement ou sévèrement endommagés 4 semaines après angioplastie.....163
Encart: Corrélation entre l'adhésion des plaquettes et la surface du néointima 4 semaines après dommage sévère par angioplastie.
- Figure 7** Morphologie microscopique et expression de la P-sélectine par le néoendothélium 4 semaines après angioplastie.....164

Troisième étude

- Figure 1** Expression de la P-sélectine, de CD41 et de CD61 par des plaquettes isolées avant et après activation par la thrombine.....187
- Figure 2** Expression de la P-sélectine par des plaquettes avant et suivant perfusion sur des surfaces artérielles intactes ou endommagées.....188
- Figure 3** Courbe dose/réponse de l'effet du rPSGL-Ig, d'un anticorps anti P-sélectine et d'un anticorps anti PSGL-1 sur la liaison plaquettes/neutrophiles.....189
- Figure 4** Expression de la fluorescence reliée aux plaquettes par les neutrophiles avant et après perfusion sur des surfaces artérielles endommagées ainsi que l'effet du rPSGL-Ig, d'un anticorps anti P-selectine et d'un anticorps anti PSGL-1 sur cette liaison.....190
- Figure 5** Expression de la P-sélectine et de la liaison du rPSGL-Ig suite à l'activation de plaquettes par la thrombine en présence de concentration croissante de rPSGL-Ig.....191
- Figure 6** Corrélation entre la liaison du rPSGL-Ig aux plaquettes et l'inhibition de la liaison entre les plaquettes et les neutrophiles.....192

Quatrième étude

- Figure 1** Design expérimental.....220
- Figure 2** Adhésion des plaquettes aux segments artériels sévèrement endommagés 1 heure et 4 heure (A) et 1 semaines et 4 semaines (B) après angioplastie répétée et traitement ou non avec le rPSGL-Ig.....221
- Figure 3** Adhésion des neutrophiles aux segments artériels sévèrement endommagés 1 heure et 4 heures (A) et 1 semaines et 4 semaines (B) après angioplastie répétée et traitement ou non avec le rPSGL-Ig.....222

Figure 4 Corrélation entre la sténose vasculaire et la surface délimitée par EEL, normalisée par rapport à un segment de référence (A), et la surface néointimale (B) 4 semaines après angioplastie répétée.....	223
Figure 5 Surface délimitée par EEL, normalisée par rapport à un segment de référence (A), et surface de la lumière vasculaire résiduelle (B), 1 et 4 semaines après angioplastie répétée et traitement ou non avec le rPSGL-Ig.....	224
Figure 6 Morphologie microscopique et détermination immunohistochimique de l'expression de la lectine et de la P-sélectine par le néoendothélium semaines après angioplastie répétée et traitement ou non avec le rPSGL-Ig.....	225

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- ADN : Acide déoxyribonucléique
- ADP : Adénosine diphosphate
- AGE : Produits de glycosylation terminale (*advanced glycosylation end products*)
- AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
- ARN : Acide ribonucléique
- Atm : atmosphère
- bFGF : Facteur de croissance basique des fibroblastes
- COX-1 : Cyclooxygénase inductible
- EGF : Facteur de croissance épidermique
- ESL-1 : E-sélectine ligand-1
- FGF : Facteur de croissance des fibroblastes
- fMLP : formyl-méthyl-leucyl-phénylalanine
- Gp : Glycoprotéine
- GTP : Guanosine triphosphate
- HDL : Lipoprotéine de haute densité (*high density lipoprotein*)
- LDL : Lipoprotéine de faible densité (*low density lipoprotein*)
- MAPk : Protéines kinases activées par facteurs mitogéniques (*mitogen activated protein kinases*)
- MCP-1 : Protéine chimiotactique des monocytes
- HBD : Domaine de liaison à l'héparine
- ICAM : Molécule d'adhésion intercellulaire
- IL-1, IL-8 : Interleukine-1, -8
- LAD : Déficience pour l'adhésion des leucocytes
- LPS : Lipopolysaccharide
- LT : Leucotriène
- NfκB : Facteur de transcription nucléaire κB
- NO : Monoxyde d'azote
- NOS : Enzyme de synthèse du monoxyde d'azote
- PAF : Facteur de l'activation plaquettaire
- PAI-1 : Inhibiteur de l'activateur du plasminogène
- PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes
- PF4 : Facteur plaquettaire 4

PSGL-1 : P-sélectine glycoprotéine ligand-1

QCA : Angiographie coronaire quantitative (*quantitative coronary angiography*)

RGD : arginine-glycine-asparagine

RLO : Radicaux libres dérivés de l'oxygène

sLe^a, sLe^x : Sialyl Lewis a ou x

TNF : Facteur de nécrose tumorale α

VCAM-1 : Molécule d'adhésion des cellules vasculaires -1 (*vascular cell adhesion molecule-1*)

VEGF : Facteur de croissance endothélial vasculaire (*Vascular endothelial growth factor*)

VLA : Antigène tardif (*Very late antigen*)

À MADELEINE.....

CHAPITRE I : ATHÉROSCLÉROSE, ANGIOPLASTIE ET RESTÉNOSE

Avant de traiter de l'angioplastie, modalité thérapeutique utilisée pour rétablir le flot sanguin lors d'occlusion vasculaire, et de la resténose, complication chronique majeure de l'angioplastie, voyons tout d'abord l'athérosclérose qui est la principale cause d'occlusion vasculaire coronaire.

1.1 L'athérosclérose

L'athérosclérose est une des pathologies les plus fréquentes du système cardiovasculaire étant responsable d'environ 50 % des mortalités dans la plupart des sociétés industrialisées. L'athérosclérose affecte principalement les artères élastiques, telles l'aorte et les carotides, de même que les artères musculaires de moyenne et de grande dimension, par exemple artères coronaires et poplitées. Les principales complications de l'athérosclérose coronaire, suite à une diminution de la vascularisation, sont l'angine de poitrine et l'infarctus du myocarde. L'angioplastie coronaire permet de rétablir une vascularisation plus appropriée du muscle cardiaque. Voyons tout d'abord la lésion athérosclérotique et ses principales conséquences.

1.1.1 Lésion et pathophysiologie

La lésion athérosclérotique est progressive et évolutive. Elle débute par des foyers lipidiques qui coalescent éventuellement en une strie lipidique affectant principalement certains sites plus susceptibles dans le système artériel, sites où on retrouve une distorsion du flot et où les forces de cisaillement sont fluctuantes (embranchements artériels, courbes prononcées, ostia, par exemple, de l'aorte abdominale, des artères coronaires et carotidiennes), suggérant un rôle pour des facteurs hémodynamiques dans le développement de cette lésion. ¹ La strie lipidique est principalement composée de macrophages, ayant migrés dans l'intima à travers un endothélium normal morphologiquement mais dysfonctionnel, avec un nombre variable de lymphocytes. Ces macrophages, gorgés de lipides, cholestérol et LDL-oxydé, apparaissent spumeux (*foam cells*). Un pool extracellulaire de lipides, peu important à ce stade, est également présent.

La strie lipidique est observée dans la majorité des humains en bas âge et ne progresse pas nécessairement vers une lésion plus complexe.² Elle est située dans l'intima de l'artère et n'interfère pas avec la structure normale de l'artère.

Toutefois, la strie lipidique peut évoluer et se transformer en plaque athérosclérotique.³ La plaque athérosclérotique est une lésion souvent excentrique et faisant protusion dans la lumière vasculaire. Elle est composée d'une couche de tissu fibreux dense avec quelques leucocytes et des cellules musculaires lisses, formant une capsule fibreuse recouvrant une zone plus cellulaire, principalement près des limites latérales de la plaque. Cette zone cellulaire est composée de macrophages, de cellules musculaires lisses et de lymphocytes dans un tissu conjonctif plus ou moins dense. Un centre nécro-lipidique composé de lipides extracellulaires (cholestérol), de cellules spumeuses, de débris cellulaires et de thrombi plus ou moins organisés avec présence possible de zones calcifiées sont également des constituants de la plaque athérosclérotique. On peut aussi noter une néovascularisation plus ou moins importante en périphérie de la lésion et envahissant parfois la plaque. Cette néovascularisation peut contribuer au recrutement de cellules inflammatoires et à la formation de thrombus et d'hémorragies intraplaques.

La lésion athérosclérotique a fait l'objet d'une classification morphologique en 6 phases tenant compte de l'évolution clinique.³ Brièvement, les phases I à III correspondent à des stades dans l'évolution de la strie lipidique, différant selon leur proportion de lipides, de macrophages et de cellules musculaires lisses et selon la présence de lipides intracellulaires ou extracellulaires. Les stades IV à VI reflètent la composition plus complexe et la progression parfois plus rapide de la plaque athérosclérotique jusqu'à la rupture d'une plaque avec formation d'un thrombus mural et d'occlusion vasculaire (stade VI). La morphologie et la complexité de la plaque déterminent sa susceptibilité à la rupture, une plaque excentrique et relativement riche en lipides extracellulaires avec une mince capsule fibreuse étant particulièrement vulnérable.^{3,4} La présence de cellules inflammatoires, plus particulièrement de macrophages, en nombre accru est également associée à une plus grande vulnérabilité de la plaque.^{3,5} Les macrophages peuvent contribuer à la résorption de la capsule fibreuse et à son amincissement par leur génération et activation de métalloprotéases, capables de digérer divers constituants de la matrice extracellulaire,⁶ facilitant ainsi la rupture de la plaque face aux forces hémodynamiques.

Toutefois, une diminution de la formation de la capsule fibreuse via la synthèse de matrice extracellulaire par les cellules musculaires lisses présentes dans la plaque est probablement également nécessaire pour favoriser une rupture de la plaque et causer un épisode aigu d'angine instable ou d'infarctus du myocarde.⁷ D'ailleurs, une prévalence élevée de cellules inflammatoires a été récemment rapportée dans la capsule fibreuse et les régions déclives de plaques athérosclérotiques stables.⁸

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour tenter d'expliquer le développement de la lésion athérosclérotique.^{2,9-12} L'hypothèse la plus reconnue à ce jour est celle émise par Ross.^{2,13,14} Cette hypothèse, dite "response-to-injury", suggère qu'une altération fonctionnelle de l'endothélium (un dommage morphologique apparent n'est pas nécessaire) augmente le potentiel adhésif de l'endothélium, notamment en augmentant l'expression de certaines molécules d'adhésion¹⁵⁻¹⁸ résultant en une adhésion de monocytes et de lymphocytes migrant par la suite dans l'intima en réponse à des facteurs chémoattractants produits par les cellules endothéliales, macrophages et cellules musculaires lisses.^{2,13,14} La vasodilatation endothélium-dépendante des artères coronaires observée à la suite de stimulation par un flot laminaire et les forces de cisaillement, l'acétylcholine ou la sérotonine est secondaire à la production de monoxyde d'azote (NO) par l'endothélium.¹⁹ Le NO est également capable d'inhiber l'adhésion plaquettaire et le recrutement des monocytes. D'un point de vue fonctionnel, une réduction importante de la vasorelaxation endothélium-dépendante est observée dans les artères athérosclérotiques, probablement consécutive à une réduction de la production/activité de NO.¹⁹⁻²³ Une modification de la perméabilité de l'endothélium et/ou de ses propriétés antithrombotiques peut permettre aux lipoprotéines un meilleur accès à la paroi artérielle. L'oxydation des lipoprotéines dans la paroi artérielle se traduit par une génération accrue de radicaux libres dérivés de l'oxygène (RLO) qui diminue la disponibilité de NO.²⁰ D'ailleurs, un flot non laminaire et de faibles forces de cisaillement contribuent également à diminuer la production de NO par l'endothélium.¹ Cette dysfonction endothéliale favorisera l'adhésion de plaquettes et de monocytes au site de la lésion suite à l'expression accrue de certaines molécules d'adhésion, notamment VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) impliquées dans l'adhésion des monocytes à l'endothélium.^{16,24} Les interactions entre les monocytes, lymphocytes,

plaquettes et les cellules endothéliales se traduisent par la présence de médiateurs inflammatoires, par exemple, l'interleukine-1 (IL-1) et le facteur de nécrose tumorale (TNF), et de facteurs de croissance, comme le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et le facteur de croissance basique des fibroblastes (bFGF). La migration et la prolifération des cellules musculaires lisses sont subséquentes à l'exposition des cellules musculaires lisses de la média (et de cellules musculaires lisses déjà présentes dans l'intima) à ces facteurs de croissances. Les cellules musculaires lisses prolifèrent dans l'intima et produisent une matrice extracellulaire riche en protéoglycans et collagène contribuant également à la formation de la capsule fibreuse recouvrant la plaque. ² L'athérosclérose peut donc être considérée comme une réponse inflammatoire chronique fibroproliférative de la paroi artérielle face à divers agresseurs (toxiques, métaboliques, infectieux, ^{25,26} ox-LDL) où une dysfonction endothéliale joue un rôle important dans son développement. ¹⁴

1.1.2 Facteurs de risques

La prévalence et la sévérité de la maladie athérosclérotique est tributaire d'un ensemble de facteurs de risque favorisant ou précipitant l'apparition de maladie ischémique du myocarde. La présence et la persistance de plus d'un de ces facteurs de risques sont associées à une progression plus rapide et à une plus grande sévérité de la lésion athérosclérotique. ²⁷ Parmi ceux-ci, mentionnons d'abord des facteurs dits constitutifs, soit l'âge, le sexe et une prédisposition génétique.

1.1.2.1 Facteurs de risques constitutifs

L'âge est un facteur de risque important, non seulement parce que l'athérosclérose est une pathologie progressive évoluant dans le temps dont la lésion initiale se retrouve dès l'enfance, mais également parce que la vasodilatation d'origine endothéliale, médiée par la production de NO, diminue avec l'âge, suggérant une forme de dysfonction endothéliale. ²⁸

L'ischémie du myocarde, secondaire à une lésion athérosclérotique, est également rencontrée plus fréquemment chez les hommes que chez les femmes. Toutefois, la

fréquence de cet événement devient progressivement similaire après la ménopause, suggérant un effet protecteur de l'estrogène qui favoriserait la vasorelaxation endothélium-dépendante. ²⁸

Plusieurs types d'anomalies génétiques provoquant une hyperlipoprotéïnémie sont décrits, favorisant, par exemple, un taux élevé de LDL circulants, contribuant ainsi au développement, parfois accéléré, de la lésion athérosclérotique. ²⁹ Une concentration sanguine élevée de lipoprotéine (a) -lp(a)-, une forme de LDL contenant la glycoprotéine (a), est également associée à une augmentation du risque de maladies associées à l'athérosclérose. Lp(a), dont la glycoprotéine (a) présente une certaine homologie avec le plasminogène, est capable d'interférer avec la formation de plasmine et a donc un effet prothrombotique en plus de stimuler, in vitro, la prolifération des cellules musculaires lisses. ³⁰

1.1.2.2 Facteurs de risques acquis

Parmi les plus importants facteurs de risques acquis, on note l'hyperlipidémie, le diabète, l'hypertension artérielle, l'homocystéïnémie, le tabagisme et l'obésité.

Un taux plasmatique élevé de cholestérol est également possible suite à une diète riche en cholestérol et en acides gras saturés. L'hyperlipidémie, plus particulièrement l'hypercholestérolémie, est reconnue comme un facteur de risque très important. L'augmentation des LDLs plasmatiques est associée à une augmentation du risque de maladies reliées à l'athérosclérose alors qu'un taux sanguin élevé de lipoprotéine de haute densité (HDL), impliquée dans le transport du cholestérol des tissus vers le foie, est associé à une diminution du risque d'infarctus du myocarde. ³¹

Le diabète mellitus est associé avec une forme accélérée de maladies reliées à l'athérosclérose. La formation de produits de glycosylation terminale de protéines (AGEs) pourrait contribuer à l'accélération des lésions athérosclérotiques observées chez les patients diabétiques. ³² Ces AGEs sont produits suite à une glycosylation nonenzymatique prolongée de protéines, le glucose formant des liens chimiques avec des groupement amines de protéines qui seront réarrangés, modifiant de façon irréversible ces protéines. Ces AGEs ont de nombreuses propriétés néfastes : 1) accumulation dans les parois vasculaires avec rétention de lipoprotéines et d'albumine, 2) augmentation de la

production d'éléments de la matrice extracellulaire par les cellules musculaires lisses et 3) phagocytose par le récepteur "scavenger" des macrophages.

L'hypertension artérielle est un facteur de risque important accélérant le développement de la lésion athérosclérotique.¹⁴ Une concentration sanguine élevée d'angiotensine II est souvent observée chez les patients atteints d'hypertension artérielle. L'angiotensine II est capable de contribuer au développement de la lésion athérosclérotique en stimulant, entre autres, la production de facteurs de croissance par les cellules musculaires lisses³³ de même que leur production de lipooxygénase, participant ainsi à l'oxydation des LDLs.³¹

Un taux sérique élevé d'homocystéine est associé à une plus grande incidence de maladies vasculaires.³⁴ Cet acide aminé, produit durant le métabolisme de la méthionine, pourrait causer une dysfonction endothéliale, en stimulant la formation de RLO par l'endothélium et en diminuant son expression de thrombomoduline, favorisant ainsi une activité endothéliale prothrombotique.^{35,36} De plus, des études *in vitro* suggèrent que l'homocystéine induit la synthèse de collagène par les cellules musculaires lisses.³⁷

L'usage de la cigarette est relié directement à une fréquence plus élevée d'infarctus du myocarde. L'obésité, principalement à cause de la présence d'hypertension, de diabète et d'hyperlipidémie, le manque d'exercice et le stress sont également des facteurs de risques associés à l'athérosclérose.

En somme, plusieurs facteurs de risque sont associés directement ou indirectement au développement de la lésion athérosclérotique et à ses principales conséquences (infarctus du myocarde ou cérébral). Certains facteurs de risque contribuent à la manifestation de signes cliniques, en partie en augmentant le nombre de plaques athérosclérotiques pouvant potentiellement progresser vers une lésion symptomatique, ce qui est notamment le cas de la cigarette, de l'hyperlipidémie, de l'hypertension et du diabète.

1.1.3 Angine et infarctus du myocarde

La plaque athérosclérotique cause une obstruction variable du flot sanguin qui n'est pas toujours détectable cliniquement. Elle peut toutefois, suite à des fissures intimaux et

au développement d'un thrombus mural plus ou moins important, évoluer vers des situations cliniques comme de l'angine ou un infarctus du myocarde. ³⁸

L'angine de poitrine (angina pectoris) est une des manifestations cliniques de la maladie athérosclérotique coronarienne. Elle est caractérisée par l'apparition souvent récurrente de douleurs rétrosternales ou précordiales. Ces épisodes sont associés à des périodes transitoires d'ischémie myocardique causées par une augmentation de la demande d'oxygénation myocardique et/ou par une diminution de la perfusion myocardique reliée à la présence de la lésion athérosclérotique. L'angine dite stable sera observée lors d'une demande accrue d'oxygénation myocardique, par exemple suite à un stress ou à un effort physique important, en présence d'une réduction partielle de la perfusion coronaire par une lésion athérosclérotique. L'angine instable réfère à des épisodes de douleur dont la durée et la fréquence peuvent s'accroître, faisant suite à des efforts de moins en moins importants, voire même au repos. Dans la plupart des cas, l'angine instable est induite par une rupture et/ou une érosion d'une plaque athérosclérotique avec formation d'un thrombus mural de taille variable et possiblement d'un vasospasme. ^{3,39,40} Selon certains facteurs comme la taille de la rupture, le degré de sténose de la lésion initiale, l'intensité des stimuli thrombogéniques et de l'activation plaquettaire, la rupture peut être sans conséquence ou conduire à un thrombus partiellement ou totalement occlusif. ⁴¹

Si le thrombus devient occlusif, une réduction du flot artériel à un niveau auquel l'apport en oxygène est insuffisant face à la demande métabolique du myocarde peut se développer : c'est l'infarctus du myocarde. Si l'ischémie persiste (au delà de 20-40 minutes chez l'homme), les dommages cellulaires deviennent irréversibles et il y a nécrose de coagulation des myocardiocytes. ⁴² La nécrose du myocarde progresse, dans la zone vascularisée par l'artère affectée (zone à risque), de la région subendocardique, qui est la zone la moins bien perfusée, vers la région subépicardique. Cette progression dépend de facteurs tels: la localisation, la sévérité et la durée de l'obstruction artérielle, la présence d'une vascularisation collatérale (permettant de suppléer, du moins partiellement, au besoin en oxygène du myocarde) et la présence de vasospasme. ³ La reperfusion du myocarde, suite à la dissolution du thrombus obstruant la lumière artérielle, permet l'arrêt de la progression de la nécrose dans le myocarde. Toutefois, la reperfusion

s'accompagne également de dommages tissulaires accrus et d'un influx important de cellules inflammatoires, principalement des neutrophiles.

La lésion de reperfusion peut être divisée en quatre composants, soit 1) les dommages léthaux directs aux cardiomyocytes 2) le dommage vasculaire, caractérisé par une diminution du flot sanguin secondaire à un dommage vasculaire, à la thrombose ou à l'oblitération de la lumière vasculaire par des neutrophiles et/ou plaquettes lors de la reperfusion accompagnée d'une diminution de la vasodilatation endothélium-dépendante ("no-reflow"), 3) un délai dans le retour d'une contractilité normale de certains cardiomyocytes ("myocardial stunning") après rétablissement du flot sanguin et finalement 4) certaines arythmies (fibrillation ventriculaire, tachycardie ventriculaire) sont parfois observées lors de la reperfusion. ⁴³

Les neutrophiles représentent une source très importante de radicaux libres dérivés de l'oxygène (RLO). La production de RLO, combinée à la diminution de la glutathione peroxydase (antioxydant intracellulaire) lors de l'ischémie, serait centrale dans la formation des lésions de reperfusion entraînant, entre autres, la peroxydation des phospholipides membranaires et la neutralisation du NO endothélial (effet provasoconstricteur). Les neutrophiles activés produisent également de la myéloperoxydase (contenu dans les granules azurophiles) qui catalyse à partir du peroxyde d'hydrogène et d'ions chlorés la formation d'acide hypochlorique (HOCl) capable d'oxyder les protéines et les lipides. ⁴⁴ En plus de la génération de RLO, les neutrophiles peuvent contribuer à la lésion de reperfusion par leur libération de protéases contenues dans leurs granules, par exemple, l'élastase, protéase à sérine, et de métalloprotéases, par exemple la collagénase et la gélatinase. ⁴⁵ Les neutrophiles activés libèrent également des médiateurs inflammatoires ayant un impact sur le développement de la lésion. La production de leucotriènes (LTs), principalement LTB₄ par les neutrophiles activés via l'action de la 5-lipooxygénase sur l'acide arachidonique et la production du facteur de l'activation plaquettaire (PAF) via l'action de la phospholipase A₂ et d'une acétyltransférase sont particulièrement importantes. ⁴⁶ La génération de LTB₄ et PAF, puissants agents chimotactiques et activateurs des neutrophiles, peut permettre une amplification des lésions et une augmentation de la perméabilité vasculaire. ⁴⁷ Le PAF, de même que des leucotriènes produites par les neutrophiles (LTC₄, LTD₄, LTE₄)

sont également capables de produire une vasoconstriction. L'importance des neutrophiles dans la lésion de reperfusion a été démontrée dans des études *in vivo* où l'inhibition de l'adhésion des leucocytes par l'action d'anticorps monoclonaux dirigés contre des molécules d'adhésions et l'utilisation d'animaux neutropéniques a permis de réduire la taille de l'infarctus. ⁴⁷⁻⁵³ Tel que suggéré par les résultats de Rousseau et coll. dans un modèle d'ischémie-reperfusion chez le chien, les plaquettes participent aussi à la lésion de reperfusion. ⁵⁴ En effet, les plaquettes, par leur génération de dérivés de l'acide arachidonique (thromboxane A₂ (TxA₂), leucotriènes, acide 12-hydroperoxy-eicosatétraénoïque (12-HPETE)) et de substances contenues dans leurs granules (PDGF, facteur plaquettaire 4) agissent comme éléments chimotactiques et/ou activateurs des neutrophiles. Les plaquettes peuvent aussi participer directement à la lésion de reperfusion via le TxA₂, puissant vasoconstricteur, et par leur relâchement de protéases neutres, capables d'activer la cascade du complément résultant en la production de C3a et de C5a pouvant diminuer la contractilité du myocarde. ⁴⁷ La production *in vitro* de cytokines comme l'IL-1, IL-8 et MCP-1 par des leucocytes est également rapportée suite à leur adhésion avec des plaquettes fixées et activées (thrombine) et a été associée à la formation de conjugués plaquettes-leucocytes chez des patients après reperfusion. ⁵⁵ Ces cytokines peuvent contribuer à aggraver la lésion en activant les leucocytes, en participant à leur recrutement et en affectant également l'endothélium vasculaire, notamment en stimulant son expression de molécules d'adhésions et d'autres cytokines (IL-6). ⁵⁶⁻⁵⁸ Les conjugués plaquettes-neutrophiles peuvent également participer au phénomène de "no reflow" en obstruant la lumière vasculaire de la microcirculation. La formation de conjugués circulants plaquettes-neutrophiles associée à une activation plaquettaire et neutrophilique est observée également chez des patients souffrant d'angine instable ou après une angioplastie coronaire, suggérant l'importance des interactions plaquettes-neutrophiles dans ces pathologies. ^{55,59-61}

1.2 L'angioplastie

1.2.1 Généralités

L'angioplastie par ballonnet est une des techniques de revascularisation les plus utilisées mondialement dans les cas d'obstructions vasculaires. Il se pratique environ 1 million d'angioplasties par année de par le monde.⁶² On considèrera une angioplastie comme réussie si elle se traduit par une réduction de la sténose vasculaire (<50%), sans occurrence post-intervention d'infarctus du myocarde, de mortalité ou de besoin urgent de réintervention.⁶³ Chez les patients démontrant de l'angine stable mais avec une sténose marquée d'une artère coronaire, une réduction de l'incidence des épisodes d'angine dans les six mois suivants fut observée chez les patients ayant subi une angioplastie par opposition à un traitement médical.⁶⁴ Une réduction de l'incidence de mortalité, d'infarctus et d'accident cérébro-vasculaire fut également notée 30 jours suivant l'utilisation de l'angioplastie comme traitement primaire de cas aigus d'infarctus du myocarde, comparée à l'utilisation d'un traitement médical (agent thrombolytique).⁶⁵ Ce bénéfice relatif de l'angioplastie comparée à l'approche médicale est maintenu 2 ans après l'intervention initiale.⁶⁶ Plusieurs études cliniques ont comparé l'angioplastie et le pontage coronarien comme mode de revascularisation chez des patients démontrant de l'angine stable ou instable et avec une lésion sténotique affectant un ou plusieurs vaisseaux coronariens. En général, il n'y a pas de différence notable dans l'incidence de mortalité ou la fréquence d'infarctus du myocarde dans une période variant d'un an à 5 ans suivant l'intervention. Même si l'angioplastie requiert des procédures de revascularisation plus fréquentes, son coût plus faible que la procédure chirurgicale et une réhabilitation plus rapide pour le patient en font une alternative intéressante à la chirurgie.^{64,67} L'utilisation de prothèses endovasculaires (stents) pourrait diminuer le besoin de revascularisation post-angioplastie en diminuant la fréquence de resténose,⁶⁴ complication chronique majeure de l'angioplastie, sans augmenter, du moins à court terme, tel que suggéré dans l'étude PAMI, l'incidence d'infarctus du myocarde, d'accident cérébro-vasculaire ou de mortalité.⁶⁸

Dotter et Judkins, en 1964, ont présenté la technique de l'angioplastie transluminale utilisant, sur un système coaxial, des cathéters de plus en plus gros de façon à améliorer le

flot artériel dans des artères périphériques artériosclérotiques. ⁶⁹ En 1974, Gruentzig modifie le système de cathéter de Dotter et développe un cathéter avec une double lumière et à son extrémité un ballonnet distensible. C'est d'ailleurs en 1977, en utilisant une version miniaturisée de son cathéter ballon périphérique que Gruentzig pratique la première angioplastie coronaire transluminale percutanée chez un patient. ⁷⁰ Par la suite, une amélioration constante de l'équipement utilisé et le développement de nouveaux instruments, dont un filament guide mobile par Simpson en 1981, ⁷¹ se traduit par une augmentation notable du pourcentage de succès immédiat de cette procédure, d'environ 70 % à la fin des années 1970 à plus de 90% aujourd'hui. ⁷² De la même façon, les indications de l'angioplastie coronarienne ont évoluées avec le perfectionnement de la technique. Naguère limitée au patient présentant de l'angine stable avec une lésion sténotique proximale, simple, concentrique et noncalcifiée, l'angioplastie est maintenant pratiquée chez des patients démontrant de l'angine instable ou en phase aiguë d'un infarctus du myocarde et présentant une lésion multitronculaire, concentrique ou excentrique, proximale ou distale. ⁷³ La mise au point de nouveaux instruments, comme les prothèses endovasculaires, et l'utilisation de nouveaux médicaments, comme les antiagrégants plaquettaires, ne sont pas étrangers à cette multiplication et diversification de l'utilisation de l'angioplastie percutanée transluminale coronaire.

1.2.2 Angioplastie carotidienne

L'angioplastie est également utilisée pour rétablir un flot sanguin déficient dans des artères périphériques, par exemple, les artères rénales, fémorales et carotidiennes. Une sténose des artères carotidiennes suite à une lésion athérosclérotique est la cause d'environ 25% des cas d'accidents cérébro-vasculaires qui affectent environ 500,000 personnes par année aux Etats-Unis. L'endartérectomie, qui consiste à enlever chirurgicalement la portion affectée de l'intima de l'artère, est la technique de choix utilisée comme traitement de cette condition. Plus particulièrement dans les cas d'occlusion sévère (>70%) des artères carotidiennes, une réduction des épisodes d'accidents cérébro-vasculaires est observée chez les patients symptomatiques (signes cliniques neurologiques) soumis à une endartérectomie lorsque comparée à l'approche médicale. ⁷⁴ L'endartérectomie serait

également souhaitable dans le cas de patients asymptomatiques mais démontrant une occlusion de plus de 60%.⁷⁵ Toutefois, l'endartérectomie présente certains désavantages, par exemple d'être limitée aux lésions affectant la portion cervicale de la carotide, de présenter une incidence plus élevée de complications et de mortalités chez les patients souffrant également de maladie coronaire et l'apparition parfois d'une paralysie subséquente du nerf facial.⁷⁶ Kerber et coll.⁷⁷ utilisèrent pour la première fois en 1980 l'angioplastie percutanée transluminale pour le traitement de la sténose de la région proximale d'une artère carotide commune pendant qu'une endartérectomie était pratiquée pour une sténose plus distale. Toutefois, le risque anticipé d'embolisations et d'accidents cérébro-vasculaires retarderont une utilisation plus répandue de cette approche. Au cours des années subséquentes, l'angioplastie est surtout utilisée essentiellement dans les cas ne permettant pas une approche chirurgicale.⁷⁸ Toutefois, chez des patients souffrant soit de resténose carotidienne suite à une endartérectomie ou présentant un risque chirurgical important, l'angioplastie combinée à l'utilisation de prothèses endovasculaires serait une approche curative efficace et présentant relativement peu de complications neurologiques et cardiaques.^{76,79,80} Une étude récente suggère que, chez des patients symptomatiques démontrant une sténose carotidienne, l'angioplastie ou l'approche chirurgicale sont équivalentes en terme d'efficacité et présentent une incidence comparable d'accidents cérébro-vasculaires ou de mortalité dans les 30 jours suivant la procédure.⁸¹ Il sera intéressant de voir si cette équivalence en terme d'efficacité et de complications se maintient à plus long terme.

1.2.3 Dommages morphologiques

L'angioplastie produit deux types de dommages à la paroi artérielle, soit une destruction focale de l'endothélium artériel suite au passage du guide et du ballon alors que la dilatation du ballon cause une compression de la lésion athérosclérotique et de la paroi artérielle. Cela se traduit souvent par une dissection plus ou moins prononcée de la paroi artérielle,⁸² souvent à la jonction latérale entre une plaque athérosclérotique excentrique et la paroi artérielle dépourvue de plaque, avec formation d'un thrombus mural de taille variable. Une distribution inégale des forces de tension exercées par la

dilatation, la plaque athérosclérotique étant peu compressible, est probablement à l'origine de cette localisation des dissections observées après l'angioplastie. ⁸³

L'importance du thrombus est en relation avec la taille et la profondeur de la dissection de même qu'avec le matériel nouvellement exposé au flot sanguin. Alors qu'une lésion superficielle n'exposant que la matrice subendothéliale sans envahir la média ne se traduit généralement que par la formation d'une monocouche de plaquettes, une lésion se prolongeant dans la média présente un thrombus mural de taille variable. ⁸⁴⁻⁸⁶ L'exposition de la média, et plus particulièrement du collagène fibrillaire de type I, du centre lipidique de la plaque athérosclérotique et la génération de facteur tissulaire (TF) contribuent à une plus grande thrombogénicité des lésions plus profondes. ^{87,88} Les plaquettes activées relâchent plusieurs substances telles TxA₂, fibrinogène, PDGF, sérotonine, ADP, contribuant à la formation du thrombus et à la vasoconstriction observées post-angioplastie. ^{86,89} L'activation plaquettaire post-angioplastie, telle qu'évaluée par l'expression de P-sélectine et de GpIIb/IIIa activée, ne se limite pas au site de l'angioplastie, des plaquettes activées circulantes et des microparticules plaquettaires circulantes étant également notées. ⁹⁰ Ces microparticules, formées par exocytose, démontrent une activité procoagulante, notamment par l'expression à leur surface de phospholipides membranaires chargés négativement et par leur activité Va et Xa. ⁹¹ Elles peuvent donc déclencher la cascade de la coagulation à distance dans la circulation coronaire et favoriser la formation d'une occlusion vasculaire. Cette possibilité est confirmée par l'observation que ces microparticules plaquettaires sont capables d'adhérer à la matrice subendothéliale via une interaction entre des composants de la matrice extracellulaire et la GpIIb/IIIa. ⁹² Une adhésion accrue de neutrophiles, activés après l'angioplastie, ^{59,93-96} est également observée au site d'une lésion profonde suite à l'angioplastie. ⁹⁷ Alors que l'adhésion plaquettaire suite à une lésion profonde par angioplastie est indépendante des neutrophiles, l'adhésion des neutrophiles est largement dépendante de la présence de plaquettes. ⁹⁸⁻¹⁰¹ Les neutrophiles peuvent relâcher plusieurs médiateurs tel des RLO, des dérivés de l'acide arachidonique et des enzymes protéolytiques ayant un impact sur la réactivité artérielle en plus de moduler l'activation plaquettaire. ¹⁰²⁻¹⁰⁴ Ces interactions plaquettes-neutrophiles et la paroi artérielle sont

facilitées par des molécules d'adhésion, principalement de la famille des sélectines, intégrines et immunoglobulines (voir Chapitre 2). Par la suite, la formation d'un tissu néointimal, principalement par des cellules musculaires lisses ayant migrées dans l'intima et une réendothélialisation de la région affectée à partir de cellules endothéliales des berges saines permettront une réparation de la lésion causée par l'angioplastie. ⁸³

Certaines caractéristiques morphologiques des lésions sténotiques coronariennes soumises à l'angioplastie s'accompagnent d'une incidence plus élevée de complications ou d'angioplasties non-réussies: longueur de la lésion (>20 mm), angulation prononcée de la lésion qui sera associée à une dissection plus prononcée post-angioplastie, présence d'un thrombus, présence de calcification, sténose quasi-totale (>95%) ou occlusion chronique (suite à l'organisation d'un ou plusieurs thrombus nonocclusif(s) à la surface de la plaque athérosclérotique) restreignant singulièrement le passage du cathéter ballon. ^{72,105} Parmi les facteurs ci-haut mentionnés, la présence d'un thrombus est probablement le facteur prédictif le plus important d'une complication de l'angioplastie, ¹⁰⁶ plus particulièrement d'une occlusion aiguë ou d'un infarctus du myocarde. ¹⁰⁷

1.2.4 Complications aiguës de l'angioplastie coronaire

La principale complication aiguë de l'angioplastie coronaire est l'occlusion coronaire pouvant conduire à l'infarctus du myocarde ou à un décès. La fréquence de l'occlusion aiguë, d'infarctus du myocarde ou de décès varie entre 5 à 9% des cas d'angioplastie. ¹⁰⁸⁻¹¹⁰ L'occlusion aiguë d'une artère coronaire desservant une région importante du muscle myocardique est la principale cause de mortalité suite à l'angioplastie. ⁶³ Plusieurs mécanismes peuvent conduire à l'occlusion d'une artère post-angioplastie. Dans environ 55% des cas, une thrombose et/ou une dissection avec formation d'un flap intimal seraient identifiées. ¹¹⁰ L'utilisation d'agents antiagrégants plaquettaires (diminuant la taille du thrombus) et/ou de prothèses endovasculaires (limitant les dissections) en conjonction avec l'angioplastie a permis de réduire l'incidence de complications aiguës post-angioplastie. ^{68,111-113} Une hémorragie dans la plaque athérosclérotique ainsi qu'une vasoconstriction artérielle sont des exemples de mécanismes pouvant également contribuer à l'occlusion aiguë de l'artère. ¹⁰⁶

Suite à la formation du thrombus, une augmentation du tonus vasomoteur de la région distale au thrombus est observée. En effet, la vasodilatation endothélium-dépendante, en réponse à des médiateurs comme l'acétylcholine, la sérotonine et la thrombine est diminuée, voire renversée, ^{114,115} suggérant une dysfonction de l'endothélium distal. Une diminution de la production de NO endothélial ou son catabolisme plus accéléré serait une manifestation importante de cette dysfonction. ^{20,116} D'ailleurs, l'administration de donneurs de NO dans un modèle expérimental d'angioplastie a permis de diminuer la vasoconstriction distale, en plus de réduire l'adhésion des neutrophiles à la paroi artérielle endommagée. ^{117,118} Cette dysfonction endothéliale est associée à la présence de leucocytes adhérant à la surface d'un endothélium discontinu exprimant une molécule d'adhésion, la P-sélectine (voir chapitre 2). ¹¹⁵ L'expression par les leucocytes activés d'une β 2-intégrine (Mac-1) interagissant avec ICAM-1 exprimée par les cellules endothéliales serait également impliquée dans l'adhésion neutrophilique à l'endothélium distal permettant l'apparition d'une vasoconstriction dépendante des neutrophiles. ¹¹⁹ Cela suggère qu'après une angioplastie, le thrombus, ou des substances provenant du thrombus peuvent causer des dommages morphologiques et fonctionnels à l'endothélium distal favorisant l'adhésion des leucocytes. D'ailleurs, une relation entre l'adhésion des plaquettes au site endommagé par angioplastie et le degré de vasoconstriction fut démontrée. ¹²⁰ Toutefois, même si une augmentation de l'adhésion des plaquettes se traduit par une augmentation de la vasoconstriction, une inhibition de l'adhésion plaquettaire ne se traduit pas par une abolition totale de la vasoconstriction. ^{98,120} Comme mentionné précédemment, une lésion profonde par angioplastie se traduit par une adhésion accrue de plaquettes et de neutrophiles et l'apparition d'une vasoconstriction distale plus prononcée. Tel que suggéré par Merhi et coll., bien que l'adhésion plaquettaire post-angioplastie n'est pas influencée significativement par la présence d'une neutropénie, on note toutefois une diminution marquée de la vasoconstriction distale, suggérant une contribution importante des neutrophiles dans la modulation de la réponse vasomotrice. ¹⁰⁰ L'inhibition importante de la vasoconstriction et de l'adhésion neutrophilique et plaquettaire observées post-angioplastie suite à l'utilisation lors d'un modèle expérimental aigu d'angioplastie carotidienne, d'un inhibiteur de la 5-lipooxygénase (enzyme présent dans les neutrophiles mais non dans les plaquettes)

souligne l'importance des neutrophiles et des interaction plaquettes-neutrophiles dans la réponse artérielle aiguë post-angioplastie. ¹²¹

1.3 La Resténose

1.3.1 Généralités

La resténose demeure une complication importante de l'angioplastie et des procédures similaires affectant de 10 à 50 % des patients. Le taux de resténose après angioplastie est proche de 40% alors qu'il est plutôt d'environ 20% après la mise en place d'une prothèse endovasculaire. ¹²² Les coûts additionnels de traitement engendrés par la resténose sont estimés à environ 1.5 milliard de dollars, aux Etats-Unis seulement. ¹²³ Le risque de développer une lésion resténotique se manifeste surtout dans les 6 premiers mois suivant une procédure réussie d'angioplastie. ^{124,125} En fait, la lésion resténotique se développe surtout entre le premier et le troisième mois après l'angioplastie. ¹²⁶ La progression de la lésion resténotique passé ce stade est plutôt rare, en fait, dans plus de 90% des cas, l'absence de resténose observée 6 mois après l'angioplastie coronaire était maintenue entre 2 et 4 ans plus tard. ¹²⁷ En fait, des études cliniques récentes rapportent, chez des patients soumis à une angioplastie coronaire puis évalués par angiographie coronaire 6 mois et jusqu'à 5 ans plus tard, une réduction significative de la sévérité de la sténose dans le temps. ^{128,129} Cette régression fut également observée chez des patients après pose de prothèses endovasculaires coronariennes, ¹³⁰ suggérant qu'une réduction du tissu néointimal est à l'origine de cette diminution de la lésion resténotique. Une modification dans la composition de la matrice extracellulaire du tissu néointimal, à l'origine plutôt riche en protéoglycans, substances hydrophiles, vers une plus grande proportion de collagène pourrait être à l'origine de ce phénomène. ¹³¹ L'apparition de signes cliniques cardiaques, principalement une récurrence d'angine, plus de 6 mois après l'intervention initiale est surtout associée à la progression d'une lésion athérosclérotique affectant un autre endroit dans le système artériel coronarien. ¹²²

1.3.2 Définitions

Il existe plusieurs définitions de la resténose. La resténose histologique se définit par les mécanismes cellulaires oeuvrant dans le vaisseau tel qu'observé par examen microscopique. La resténose angiographique est celle qui peut être mesurée par inspection de film angiographique à un site donné; la resténose clinique réfère à l'apparition de signes cliniques (angine, infarctus du myocarde) reliés à la resténose et nécessitant une intervention pour revasculariser de nouveau l'artère affectée. Bien que l'évaluation angiographique permet une meilleure estimation de l'évolution de la lésion resténotique que l'évaluation clinique, elle ne reflète pas nécessairement fidèlement les mécanismes pathophysiologiques ayant cours dans la resténose. En effet, l'angiographie ne démontre que la silhouette de la lumière vasculaire dans laquelle a été introduit un liquide de contraste. Tel que suggéré par Glacov,¹³² un remodelage vasculaire positif peut permettre que jusqu'à 40% de la surface de la lumière vasculaire soit occupée par une lésion avant qu'une réduction de la lumière vasculaire puisse être détectée. De plus, il existe de nombreuses définitions angiographiques de la resténose.¹³³ Une des plus utilisées est l'apparition d'une sténose à 6 mois responsable d'une diminution d'au moins 50% du diamètre de la lumière de l'artère; cette définition est associée à un taux de resténose post-angioplastie d'environ 38%.¹²² La plupart des analyses angiographiques s'effectuent à l'aide d'une approche informatisée où un algorithme permet de calculer, à partir d'un segment de référence (normal), le pourcentage de sténose et d'autres indices de variation de la lumière vasculaire (*QCA-Quantitative Coronary Angiography*). Toutefois, l'apparition d'une lésion athérosclérotique ou d'un phénomène de remodelage dans le segment de référence peut influencer le résultat de l'évaluation angiographique de la resténose.^{134,135} L'utilisation de l'échographie endocoronaire permet une meilleure estimation de l'évolution de la lésion resténotique car elle tient compte des dimensions interne et externe du vaisseau; elle a confirmé l'importance du remodelage vasculaire dans la resténose post-angioplastie (voir section 1.3.4.5).^{135,136} L'évaluation angiographique de la resténose, particulièrement par QCA, demeure cependant une technique très utilisée dans les études expérimentales et cliniques pour estimer le taux de resténose post-angioplastie.

1.3.3 Facteurs prédictifs

Quelques facteurs seulement sont associés de façon constante avec une plus grande incidence de resténose. On peut classer ces facteurs en trois catégories, soit les facteurs reliés 1) au patient 2) à la lésion et 3) à la procédure. 122,137,138

1.3.3.1 Reliés au patient

La présence d'angine instable, particulièrement d'une lésion relativement récente (moins de 6 mois) avant la procédure d'angioplastie se traduit par une augmentation notable du risque de développer une resténose. 138,139 La morphologie particulière de la lésion d'angine instable, caractérisée par un ou des thrombus plus ou moins organisé(s) en surface d'une plaque athérosclérotique instable peut expliquer, du moins partiellement, cette augmentation du taux de resténose. La présence d'un thrombus faisant saillie dans la lumière vasculaire au site d'une angioplastie est associée à une lumière vasculaire résiduelle plus réduite et à une plus grande fréquence de resténose. 140 Le thrombus présent avant la procédure d'angioplastie peut amplifier la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses en servant de réservoir de substances mitogéniques. De plus, une accumulation de cellules inflammatoires, souvent observées dans les plaques instables, 141,142 peut contribuer, par le relâchement de cytokines et de facteurs de croissance, à stimuler la formation du tissu néointimal.

La présence de diabète chez le patient est associée à un plus grand risque de resténose post-angioplastie, possiblement à cause du développement d'une dysfonction endothéliale et d'une propension accrue à la formation de thrombus observée chez les patients atteints de diabète. 143-145 La dysfonction endothéliale est caractérisée par une diminution de la production de prostacycline et de NO, favorisant l'apparition de vasospasme, l'adhésion et l'agrégation plaquettaire. L'hypersensibilité des plaquettes de patients hyperglycémiques face à divers agonistes, un taux plasmatique élevé de fibrinogène et de facteur VII, une diminution de l'activité plasmatique de l'antithrombine III et une diminution de l'activité fibrinolytique plasmatique, suite à une augmentation de l'activité de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1), favorisent la formation du thrombus suite au

dommage vasculaire. ¹⁴⁶ L'hyperglycémie serait également capable de moduler l'expression de facteurs de croissance et/ou de leurs récepteurs par les cellules musculaires lisses de même que la composition de la matrice extracellulaire produite par les cellules musculaires lisses. ¹⁴⁶ Bien qu'une intensification de l'hyperplasie néointimale fut présentée comme mécanisme principal sous-jacent au développement de la resténose chez les patients diabétiques, ¹⁴⁷ un remodelage vasculaire négatif pourrait également contribuer à la resténose post-angioplastie chez les diabétiques.

1.3.3.2 Reliés à la lésion

Cinq facteurs reliés à la lésion ou au vaisseau sont associés à un taux plus élevé de resténose. ^{122,148} Un diamètre accru du vaisseau avant l'angioplastie se traduit par une diminution du taux de resténose. La localisation de la lésion est également importante, une lésion se situant dans l'artère interventriculaire proximale descendante étant associée avec un taux plus élevé de resténose. Un pourcentage initial élevé de sténose avant l'angioplastie est aussi associé avec un taux plus élevé de resténose. Enfin, l'angioplastie d'occlusions vasculaires totales se traduit par un faible taux de succès de la procédure et par un pourcentage de resténose élevé (près de 50%), particulièrement pour les occlusions chroniques. La longueur de la lésion fut aussi rapportée comme facteur pouvant influencer le taux de resténose; une lésion plus longue (> 10 mm) étant associée avec un pourcentage de resténose plus important. ¹³⁹

1.3.3.3 Reliés à la procédure

Le diamètre de la lumière résiduelle après l'angioplastie est un facteur prédictif important de la resténose. Une faible sténose résiduelle immédiatement après l'angioplastie est associée avec un faible taux de resténose. ^{139,148} Cette relation entre la sténose résiduelle, mesurée angiographiquement ou par échographie endovasculaire et la resténose est également valable pour d'autres modes d'intervention tels la pose de stent et l'athérectomie directionnelle. ¹⁴⁹

1.3.4 Pathophysiologie

La resténose post-angioplastie est une pathologie multifactorielle et complexe où divers facteurs comme le degré de dommage causé par l'angioplastie, les caractéristiques intrinsèques de la lésion artérielle requérant l'angioplastie et la réponse de l'artère face au dommage causé modulent en fait le développement de la lésion resténotique.

Les principaux mécanismes pathophysiologiques impliqués dans la resténose sont la formation d'un tissu néointimal et le remodelage géométrique du vaisseau. Essentiellement déterminée sur la base d'études expérimentales chez le rat et le porc et sur des analyses pathologiques et angiographiques de patients, la séquence d'évènements suivant une angioplastie artérielle comprend: le rappel élastique (*recoil*), la formation rapide d'un thrombus souvent riche en plaquettes, l'activation/migration des cellules musculaires lisses de la média conduisant ultimement à la formation d'un tissu néointimal.¹⁵⁰⁻¹⁵⁵ Cette séquence d'évènements est similaire à la réparation tissulaire suite à un dommage tissulaire.^{131,155} En effet, la première phase débute dans les minutes après le dommage vasculaire et se poursuit environ 10 jours. Cette réponse initiale est caractérisée par la présence d'un thrombus, de cellules inflammatoires et le relâchement de facteurs de croissance. La seconde phase, dite de granulation, débute vers le troisième jour et persiste environ 1 mois. Des cellules musculaires lisses prolifèrent et sécrètent une matrice riche en protéoglycans et collagène. Le remodelage de la matrice extracellulaire, qui débute dans la deuxième semaine, se poursuit pour quelques mois et implique essentiellement la formation et la dégradation de protéoglycans composant la matrice extracellulaire du néointima.

Voyons donc plus en détail chacune de ces étapes et leur contribution potentielle à la resténose.

1.3.4.1 Le rappel élastique

La dilatation de l'artère par le cathéter ballon se traduit par un gain dans le diamètre de la lumière vasculaire. Toutefois, une perte rapide d'une fraction pouvant aller jusqu'à 50% de ce gain est fréquemment observée dans les minutes suivant l'angioplastie.¹⁵⁶ Cette perte serait consécutive au phénomène de rappel élastique, tributaire des propriétés élastiques de la paroi artérielle. Ce phénomène serait plus fréquent dans le cas

de lésions athérosclérotiques excentriques où la fraction saine de la paroi artérielle, plus particulièrement étirée, serait responsable du rappel élastique. ^{157,158} Une corrélation positive fut d'ailleurs démontrée par Ardissino et coll. ¹⁵⁹ entre l'importance du rappel élastique et la resténose angiographique évaluée chez des patients de 8 à 12 mois après l'angioplastie. Ce phénomène pourrait donc contribuer indirectement au développement de la resténose en diminuant le diamètre de la lumière vasculaire post-angioplastie, augmentant la sténose résiduelle, facteur prédisposant à la resténose. ¹³⁹ L'utilisation de prothèses endovasculaires permet de prévenir le phénomène de rappel élastique. ¹⁵¹

1.3.4.2 Thrombus, leucocytes et endothélium

L'angioplastie cause un dommage vasculaire qui peut se limiter à des fractures de la plaque athérosclérotique ou se compliquer par des déchirures, souvent au point de jonction entre la plaque et la portion saine de la paroi artérielle. Ces déchirures peuvent se prolonger dans la média et parfois conduire à la formation d'une projection intimale dans la lumière vasculaire. ^{83,153}

1.3.4.2.1 Le thrombus

La dénudation endothéliale avec exposition du tissu sous-endothélial, du contenu de la plaque athérosclérotique, riche en facteur tissulaire, et de la média au flot sanguin de même que des variations des forces hémodynamiques favorisent la formation d'un thrombus. Les plaquettes adhèrent rapidement à la paroi artérielle endommagée, principalement par des interactions via leur glycoprotéines GpIb-IX-V et diverses intégrines β_1 et β_2 (voir Chapitre 2). Le niveau d'adhésion des plaquettes est proportionnel au degré de dommage causé par l'angioplastie. ⁸⁴⁻⁸⁶ L'adhésion des plaquettes est suivie de leur activation et de la sécrétion de nombreux médiateurs soit contenus dans leurs granules denses (ADP, sérotonine, calcium) et α (fibrinogène, fibronectine, thrombospondine, facteur V, PDGF, TGF- β , par exemple) ou produits *de novo* (TxA₂). ¹⁶⁰ Ces substances vont contribuer à l'activation d'autres plaquettes et à leur agrégation, via des interactions entre l'intégrine GpIIb/IIIa des plaquettes et du fibrinogène, amenant la formation du thrombus. Le PDGF est un stimulus puissant pour la migration des cellules musculaires de la média et aussi un facteur chimiotactique pour les leucocytes.

Les plaquettes et les leucocytes relâchent une endoglycosidase qui clive l'héparan sulfate à la surface des cellules endothéliales et musculaires lisses, favorisant l'action de facteurs de croissance comme le PDGF et le FGF sur ces cellules. ¹⁵²

L'activation de la cascade de la coagulation suite au dommage vasculaire et au relâchement de facteur tissulaire en collaboration avec les plaquettes présentes au site du dommage se traduit par la génération de thrombine et de fibrine. ¹⁶¹ La thrombine est une protéase à sérine produite par le foie et circulant sous la forme de prothrombine qui sera activée par le complexe Xa-Va localisé à la surface des plaquettes activées au site du dommage artériel. Tel que démontré par Ghigliotti et coll., ¹⁶² la production de thrombine par le complexe des facteurs de la coagulation Xa-Va au site d'un dommage artériel chez le lapin se produit dans les minutes suivant l'angioplastie et se poursuit jusqu'à 96 heures suivant le dommage vasculaire. Cette activation de la thrombine serait dépendante des plaquettes, localisant la formation de thrombine au site du dommage vasculaire. Une fois formée, la thrombine peut se lier à la fibrine ou à des éléments de la matrice extracellulaire de la paroi artérielle, conservant son activité catalytique mais étant protégée de l'action inhibitrice de l'antithrombine III. La thrombine, en plus de son domaine protéolytique, démontre deux autres sites fonctionnels (l'exosite-1 et -2). ^{161,163,164} L'exosite-1 est impliqué, par son affinité pour les sites anioniques, dans la liaison de la thrombine avec le fibrinogène, la fibrine, l'hirudine et le récepteur de la thrombine, PAR-1 (*Protease activated receptor-1*, Récepteur activé par protéase-1). L'exosite-2 correspond à une région nécessaire pour la liaison de l'héparine avec la molécule de thrombine, potentialisant l'inactivation de la thrombine par l'antithrombine III. La thrombine catalyse la transformation du fibrinogène en fibrine et sa polymérisation par le facteur XIII. Elle contribue aussi à activer le facteur V, amplifiant ainsi l'activation de la cascade de la coagulation et donc sa propre synthèse. ¹⁶¹ Non seulement la thrombine permet la formation de fibrine, qui contribue à stabiliser le thrombus, mais elle est également un des principaux activateurs des plaquettes. Elle peut aussi activer les leucocytes et l'endothélium conduisant à l'expression de certaines molécules d'adhésion endothéliales, comme la P-sélectine et ICAM-1 et à une plus grande adhésion leucocytaire. ¹⁶³ L'activation leucocytaire s'accompagne également de leur production de facteur tissulaire, potentialisant le déclenchement de la cascade de la coagulation.

165,166 La thrombine démontre également des propriétés de chémoattractants pour les leucocytes. L'expression du récepteur de la thrombine a également été observé dans des neutrophiles et monocytes activés après angioplastie. 167 L'action de la thrombine sur les cellules musculaires lisses se traduit par une prolifération accrue de ces dernières et potentialise l'action d'autres facteurs de croissance. 167 Alors que l'endothélium et l'adventice d'une artère normale de rat n'expriment que faiblement le récepteur de la thrombine, une augmentation de l'ARN messager pour ce récepteur est observée dans la média dès quelques heures après endommagement artériel par cathéter ballon et est particulièrement associée avec la prolifération des cellules musculaires lisses. 167,168 Les diverses actions de la thrombine sont tributaires d'une interaction particulière avec son récepteur, PAR-1. Ce récepteur est constitué d'une seule chaîne polypeptidique qui traverse à 7 reprises la membrane cytoplasmique et dont l'extrémité carboxy-terminale est intracellulaire et l'extrémité amino-terminale est extracellulaire. 163 Suite à une liaison entre la région amino-terminale du récepteur et l'exosite de la thrombine, la thrombine, via son site catalytique va cliver la région amino-terminale de ce récepteur entre les acides aminés Arginine⁴¹ et Sérine⁴², libérant un fragment peptidique et exposant un nouveau site peptidique actif sur le récepteur. 169 Ce site actif, dont la séquence des six derniers acides aminés serait particulièrement importante pour son activité, interagit avec une région extracellulaire du récepteur, déclenchant une activation intracellulaire via l'action de protéines G. Les mécanismes de l'activation intracellulaire suivant l'action de la thrombine sont très complexes et font appel, notamment, à l'activation de la voie de la phospholipase C, de l'adényl cyclase et de la tyrosine kinase, selon le(s) type(s) de protéine(s) G impliquée(s). 163,170 Par son implication dans la formation du thrombus et son action sur l'activation et la prolifération cellulaire, la thrombine joue un rôle potentiellement important dans la pathophysiologie de la resténose. Des inhibiteurs spécifiques de la thrombine, comme l'hirudine et la bivaluridine ont réduit, tant dans un modèle d'angioplastie d'artères normales 171 ou athérosclérotiques 172,173 de lapin que dans un modèle d'angioplastie coronaire chez le porc, 174 la prolifération néointimale conduisant à une réduction de la resténose. Toutefois, cette réduction de la resténose n'est pas observée lors d'études cliniques; 175,176 l'inhibition de la thrombine seule ne serait pas suffisante pour réduire la resténose post-angioplastie.

1.3.4.2.2 Cellules inflammatoires

Suite au dommage vasculaire, le thrombus et la paroi artérielle endommagée sont rapidement infiltrés par des cellules inflammatoires, principalement des neutrophiles et des monocytes.¹⁷⁷⁻¹⁷⁹ Tel que suggéré par Mehri et coll. dans un modèle d'angioplastie carotidienne chez le porc,^{97,98} l'adhésion des neutrophiles à la paroi artérielle suite à l'angioplastie est largement dépendante des plaquettes et du degré de dommage vasculaire. Plusieurs études ont rapporté une activation leucocytaire après angioplastie chez l'homme.^{59,93-96} Cette activation leucocytaire est souvent en parallèle avec une activation plaquettaire. En effet, Neumann et coll.,⁹⁵ dans du sang de patients provenant de prélèvements proximaux et distaux au site d'angioplastie coronaire et Serrano et coll.,⁹⁴ dans du sang de patients prélevés avant et après une angioplastie coronaire, démontrent une augmentation de l'expression de l'intégrine Mac-1 des neutrophiles après angioplastie ainsi qu'une augmentation de l'expression⁹⁴ ou de la fonction⁹⁵ du récepteur au fibrinogène des plaquettes, l'intégrine GpIIb/IIIa. L'adhésion des neutrophiles à des éléments de la matrice extracellulaire comme le fibrinogène, la fibronectine, le collagène et la laminine, phénomène principalement dépendant des intégrines β_2 du neutrophile, module également l'activation neutrophilique, augmentant la capacité de phagocytose et la formation de RLO et de chémokines.^{180,181} L'adhésion de neutrophiles à du fibrinogène et de la fibrine via leur intégrine β_2 Mac-1 se traduit aussi par une augmentation de la synthèse d'IL-1 et d'IL-8 par les neutrophiles, pouvant contribuer au recrutement et à l'activation de neutrophiles et d'autres types cellulaires (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses).¹⁸² Cette activation leucocytaire pourrait également être secondaire à l'expression de cytokines, comme l'IL-1 et le TNF, et de substances chémoattractives, tel l'IL-8, chémokine spécifique pour les leucocytes polymorphonucléaires, et MCP-1, spécifique pour les mononucléaires, par les cellules musculaires lisses, cellules endothéliales et leucocytes résidants dans la paroi vasculaire. L'activation des leucocytes se traduit par leur relâchement d'enzymes protéolytiques comme la cathepsine G et l'élastase, la production de chémokines, de cytokines, de RLO, de PAF et de dérivés de l'acide arachidonique, comme la leucotriène B₄ permettant d'amplifier la formation du thrombus et le dommage tissulaire. L'adhésion de neutrophiles aux plaquettes présentes

dans le thrombus est associée à la production par les leucocytes de facteur tissulaire, potentialisant la formation de fibrine et de thrombine. ¹⁸³ Les neutrophiles peuvent également recruter des plaquettes lors de leur migration dans le thrombus vers la paroi artérielle. ¹⁸⁴ Les interactions plaquettes-neutrophiles contribuent à la modulation et à la localisation d'évènements thrombotiques et inflammatoires par des mécanismes permettant une collaboration mutuelle de leurs métabolismes intracellulaires, une activation et un recrutement accentués de ces cellules (voir chapitre 2). ¹⁰²⁻¹⁰⁴ Tel que démontré *in vitro* ¹⁸⁵ et *in vivo*, ¹⁷⁷ les leucocytes, probablement par leur génération de RLO ¹⁸⁶ peuvent aussi stimuler la migration des cellules musculaires lisses dans l'intima résultant éventuellement dans la formation d'un tissu néointimal. ¹⁷⁷ Les cellules inflammatoires, notamment par leur production de cytokines, comme le TNF et l'IL-1, de chémokines, comme l'IL-8 et le MCP-1 et de facteur de croissance, comme le PDGF, participent donc à une cascade de réactions d'activation pouvant amplifier et soutenir l'activation des cellules musculaires lisses initiée par l'angioplastie et la production éventuelle du tissu néointimal. ^{187,188} D'ailleurs, une augmentation de l'expression du TNF et de l'IL-1 est rapportée dans le néointima de lésions resténotiques prélevées par athérectomie. ¹⁸⁹ L'administration soutenue d'un anticorps monoclonal contre l'intégrine leucocytaire Mac-1 a permis, dans un modèle d'angioplastie d'artères iliaques chez le lapin, de réduire le recrutement des leucocytes dans la paroi artérielle endommagée et de diminuer de plus de 50% la production de tissu néointimal 14 jours après l'intervention. ¹⁹⁰ L'utilisation prolongée d'un inhibiteur des sélectines, molécules d'adhésion impliquées dans les étapes initiales de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium et aux plaquettes, a permis de réduire l'hyperplasie néointimale et la présence de cellules inflammatoires dans le néointima 4 semaines après l'intervention lors d'un modèle d'angioplastie carotidienne chez le lapin. ¹⁹¹ Ces résultats suggèrent que la réduction de l'adhésion et de l'infiltration des leucocytes serait potentiellement bénéfique en clinique dans la prévention de la resténose. D'ailleurs, l'importance des neutrophiles dans la resténose fut récemment mise en évidence par l'étude de Inoue et coll. chez des patients souffrant d'angine stable et soumis à une angioplastie coronaire. ¹⁹² Leurs résultats suggèrent que l'activation des neutrophiles suite à l'angioplastie, tel que déterminée par l'augmentation de l'expression de l'intégrine Mac-1 et la diminution de l'expression de la

L-sélectine dans les heures suivantes, serait associée à un plus grand risque de resténose.

192

1.3.4.2.3 L'endothélium

L'endothélium normal remplit plusieurs fonctions physiologiques, notamment 1) le maintien d'une barrière perméable sélective entre le sang et la paroi artérielle, 2) la participation dans le maintien du tonus vasculaire par la production de vasodilatateurs (facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium, NO et prostacycline) ou vasoconstricteur (endothéline), 3) le maintien d'une surface nonthrombogénique, résultat de l'équilibre entre la production de substances prothrombotiques (vWf, facteur tissulaire, inhibiteur de l'activateur du plasminogène, PAI-1) et antithrombotiques (thrombomoduline, activateur du plasminogène, prostacycline, NO, héparan sulfate, ecto-ADPase) 4) la production d'éléments de la matrice extracellulaire (collagène, protéoglycans, laminine) et 5) la production de diverses cytokines (IL-1, IL-6, IL-8), facteurs de croissance (PDGF, bFGF, TGF- β) et molécules d'adhésion (sélectines, VCAM-1, ICAM-1).^{2,193-195} La perte de l'endothélium suite à l'angioplastie a également un impact important dans le développement de la resténose. En effet, en plus de favoriser la formation du thrombus par l'exposition du tissu sous-endothélial, la perte de facteurs normalement synthétisés par l'endothélium, comme le NO, est particulièrement importante. En effet, le NO en plus de son rôle dans la vasorelaxation dépendante de l'endothélium, présente des propriétés inhibitrices sur l'adhésion et l'agrégation plaquettaire, sur la prolifération des cellules musculaires lisses et sur l'expression de cytokines, comme l'IL-6 et l'IL-8 et de molécules d'adhésion par l'endothélium, notamment l'ICAM-1 et la P-sélectine, diminuant l'adhésion des neutrophiles sur l'endothélium.¹⁹⁶⁻¹⁹⁸ Cet effet inhibiteur du NO sur l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium serait également relié à l'inactivation par le NO des RLO et de leurs production par les neutrophiles.^{196,199} La régénération endothéliale, qui débute dès les premières heures suivant le dommage, s'effectue à partir de la prolifération et migration des cellules endothéliales bordant la zone endommagée, en réponse à des facteurs de croissance comme le VEGF et le bFGF.²⁰⁰ Le processus de réendothélialisation, qui sera terminé quelques semaines plus tard, ne se traduira pas nécessairement par une réendothélialisation totale dans le cas d'un dommage extensif. La réendothélialisation permet toutefois un certain contrôle sur l'importance de l'hyperplasie

néointimale, cette dernière étant proportionnelle à la vitesse et à l'étendue de la réendothélialisation. ²⁰¹ L'endothélium régénéré présente des caractéristiques morphologiques différentes d'un endothélium normal: cellules endothéliales non alignées dans le sens du flux sanguin, de taille irrégulière et de forme polygonale avec protrusion du cytoplasme dans la lumière vasculaire. ²⁰¹ Certaines fonctions de l'endothélium nouvellement formé (néoendothélium) sont également anormales, démontrant entre autres une diminution de la vasorelaxation endothélium-dépendante. ^{201,202} Cette dysfonction endothéliale serait consécutive à une diminution de la production de NO par le néoendothélium, ^{196,203} favorisant aussi l'adhésion leucocytaire, l'agrégation plaquettaire et la prolifération des cellules musculaires lisses. ²⁰⁴ L'administration prolongée de la L-arginine, un précurseur de NO, dans un modèle de déendothélialisation artérielle chez le lapin a permis de réduire la prolifération néointimale 4 semaines après l'intervention. ²⁰⁵ Le transfert local du gène de l'enzyme de la synthèse du NO (NOS) dans la paroi d'artères carotides de rat, suite à leur déendothélialisation par ballonnet, a résulté en une diminution de la prolifération des cellules musculaires lisses et de la formation du néointima 2 semaines après le dommage. ²⁰⁶ Ces résultats illustrent l'importance du NO dans les événements conduisant à la formation du néointima.

Bien que comme mentionné précédemment, l'hyperplasie néointimale est tributaire de la réendothélialisation, la sévérité du dommage influence aussi la formation du néointima. Un dommage relativement focal mais profond dans la paroi artérielle se traduira par une hyperplasie intimale prononcée, même si la réendothélialisation est rapidement complétée. ¹⁵⁴ En fait, il est observé que les lésions vasculaires les plus complexes (longues, fortement occluses) soumises à l'angioplastie sont celles démontrant le plus de resténose, probablement suite au dommage plus important nécessaire à la revascularisation par la procédure d'angioplastie. ^{139,207-209}

L'importance directe de la phase thrombotique est limitée principalement aux premières semaines après le dommage. Du matériel thrombotique est retrouvé dans environ 25% des lésions récentes datant de moins d'un mois après l'angioplastie chez l'humain. ¹³¹ Tel que démontré par Steele et coll. dans un modèle d'angioplastie chez le porc, ⁸⁶ la thrombogénicité de la paroi artérielle persiste pour environ 2 semaines après l'angioplastie. Alors que l'accumulation de plaquettes dans le thrombus est surtout

observée dans les premières heures suivant le dommage, ^{84,86,210} le relâchement graduel de thrombine comprise dans le thrombus serait responsable de la thrombogénicité dans les jours suivants. ²¹¹ L'importance de la formation du tissu néointimal serait également reliée à la taille du thrombus mural, le thrombus représentant une matrice facilitant la migration des cellules musculaires lisses. ¹⁵⁰ L'infiltration de leucocytes et le développement d'une réaction inflammatoire contribuent à amplifier le dommage vasculaire et la réponse tissulaire subséquente. Le thrombus peut donc constituer un réservoir de substances mitogéniques et chémoattractives ayant un impact sur la prolifération cellulaire et servir également de matrice, de support favorisant l'invasion des cellules musculaires lisses. Une conséquence importante de la phase thrombo-inflammatoire est la génération de facteurs de croissance, comme la thrombine, le PDGF et le bFGF qui ont des impacts majeurs sur les cellules musculaires lisses.

1.3.4.2.4 Facteurs de croissance

Le PDGF est une glycoprotéine contenue dans les granules α des plaquettes mais aussi sécrétée par les cellules endothéliales, macrophages et cellules musculaires lisses. ²¹² Le PDGF est formé de deux chaînes, A et B liées par un lien disulfure. La combinaison de ces chaînes permet la formation possible de trois isomères: AA, AB et BB. L'expression de ces isomères est dépendante de l'espèce animale et du type cellulaire. Le PDGF-AB est l'isomère le plus abondant dans les plaquettes humaines, alors que l'isomère BB est le plus souvent rencontré dans les plaquettes de rat. L'expression de PDGF-AA est observée dans les cellules musculaires lisses après dommage artériel ou stimulation par l'IL-1, le TNF, l'angiotensine II ou la thrombine. ²¹³ Le récepteur du PDGF est une protéine transmembranaire qui, lorsqu'activée par la liaison avec le PDGF, agit comme une protéine kinase spécifique à la tyrosine déclenchant une séquence complexe d'activation intracellulaire. ^{213,214} Ce récepteur est aussi composé de l'association de deux sous-types, α et β ($\alpha\alpha$, $\beta\beta$, ou $\alpha\beta$) qui démontrent une affinité différente pour les dimères du PDGF. Le récepteur α ne peut se lier qu'au PDGF-A, alors que le récepteur β peut se lier à l'une ou l'autre des chaînes de PDGF. Le PDGF-AA ne peut donc se lier qu'au récepteur $\alpha\alpha$, alors que le PDGF-BB peut se lier au récepteurs $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ ou $\beta\beta$. Alors que les cellules musculaires lisses de la paroi artérielle intacte

n'expriment pas de récepteur α , l'expression de ce sous-type de récepteur est augmentée après un dommage vasculaire, probablement suite à l'action du bFGF et de la thrombine. 213

La demie-vie en circulation du PDGF est très brève, moins de deux minutes. L'action du PDGF sur ses cellules cibles dépend donc d'une production locale agissant de façon paracrine ou autocrine. Le PDGF en plus d'être un vasoconstricteur, est chémoattractif pour les monocytes et les neutrophiles. 212,214,215 Le PDGF est capable d'induire la prolifération des cellules musculaires lisses et des fibroblastes, en collaboration avec le facteur de croissance insulino-1(IGF-1). 216,217 Le PDGF peut aussi induire le chémoattractisme des fibroblastes et cellules musculaires lisses, stimulant également leur synthèse de matrice extracellulaire et de collagénase. 212,213 L'action du PDGF sur les cellules musculaires lisses se traduit aussi par la libération d'un facteur chémoattractif pour les monocytes (MCP-1). 214

Le facteur de croissance basique des fibroblastes (bFGF) est un facteur de croissance produit par plusieurs types cellulaires dont les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et macrophages. 218 Les étapes de la sécrétion du bFGF sont mal connues, mais un pool intracellulaire de bFGF préformé est présent, du moins dans les cellules musculaires lisses. Le bFGF dans le milieu extracellulaire se lie avec les protéoglycans riches en héparan sulfate, constituant une réserve extracellulaire de bFGF. 188,218 Le bFGF se lie à des récepteurs transmembranaires démontrant aussi une activité tyrosine kinase. Ces récepteurs sont exprimés par les cellules endothéliales, cellules musculaires lisses et fibroblastes. En plus d'être capable d'induire la formation de nouveaux capillaires (action angiogénique), le bFGF stimule la prolifération des fibroblastes et cellules musculaires lisses. Il stimule aussi la prolifération des cellules endothéliales, permettant une accélération de la réendothélialisation. 219,220

Par l'intermédiaire de seconds messagers, l'action des facteurs de croissance aboutit à l'activation d'oncogènes nucléaires, stimulant la synthèse d'ADN, et à la division cellulaire. Les oncogènes c-myc, c-fos et c-myb contrôlent la prolifération et la différenciation cellulaire. 221,222 L'administration locale d'oligonucléotides anti-c-myc a réduit la formation du néointima après angioplastie coronaire chez le porc, 223 suggérant l'importance de ces oncogènes dans la régulation de la formation du néointima.

1.3.4.3 Implications des cellules musculaires lisses

Tel que démontré dans le modèle de dommage vasculaire par déendothélialisation chez le rat, on peut discerner trois phases dans la réponse des cellules musculaires lisses. ²²⁴ La première étape consiste en l'activation et la prolifération des cellules musculaires lisses de la média, observée dans les 48 heures suivant le dommage. L'activation des cellules musculaires lisses, suite à l'action de facteurs mécaniques, de cytokines ou de facteurs de croissance se traduit par un changement de phénotype. D'un phénotype contractile (cytosquelette bien développé, peu d'organelles cytoplasmiques, positivité à la desmine et au vimentin) les cellules musculaires lisses activées passent à un phénotype synthétique (peu de myofilaments, présence accrue de mitochondries, ribosomes et appareil de Golgi, perte de la positivité à la desmine). ²²⁵ L'activation des cellules musculaires lisses entraîne aussi leur production de cytokines, comme l'IL-1 et TNF et de chémokines comme MCP-1 et l'IL-8, ^{56,226} participant ainsi à une cascade de réactions d'activation cellulaire impliquant notamment d'autres cellules musculaires lisses, des cellules endothéliales, fibroblastes et les leucocytes.

1.3.4.3.1. Prolifération des cellules musculaires lisses

La prolifération des cellules musculaires lisses est observée dans les 24 heures après le dommage. ²¹⁶ Le bFGF serait particulièrement important pour cette prolifération initiale des cellules musculaires lisses, le dommage causé aux cellules musculaires lisses libérant le bFGF préformé présent dans les cellules musculaires lisses. ^{220,227} L'action d'héparitinases (relâchées par les plaquettes et les leucocytes) sur le bFGF présent dans la matrice extracellulaire lié aux protéoglycans riches en héparan sulfate augmente peu de temps après un dommage vasculaire la concentration de bFGF disponible dans la paroi artérielle. ¹⁸⁸ L'administration systémique de bFGF suivant un dommage vasculaire par angioplastie chez le lapin s'est traduite, 4 semaines après le dommage, par une réendothélialisation plus extensive mais aussi par une amélioration significative de la vasorelaxation endothélium-dépendante, ²¹⁹ probablement suite à une production de NO. Cela peut expliquer pourquoi l'administration prolongée de bFGF après dommage vasculaire dans des modèles de dénudation artérielle chez le chien ²²⁸ et le lapin ²¹⁹ ne

se traduit pas par une augmentation de la production de néointima, l'effet total du bFGF étant tributaire de l'action antiproliférative du néoendothélium. La thrombine formée au site du dommage vasculaire, contribue aussi à la prolifération des cellules musculaires lisses. Bien que le PDGF soit capable de stimuler la prolifération des cellules musculaires lisses *in vitro*, l'utilisation d'anticorps anti-PDGF n'affecte pas la prolifération des cellules musculaires lisses de la média. ²²⁹

1.3.4.3.2 Migration des cellules musculaires lisses

La deuxième phase consiste en la migration des cellules musculaires lisses de la média vers l'intima, principalement sous l'influence du PDGF. ^{151,230} Dès 4 jours après déendothélialisation artérielle chez le rat, des cellules musculaires lisses de la média pénètrent l'intima. ²¹⁶ Pour arriver dans l'intima, les cellules musculaires doivent traverser la matrice extracellulaire de la média, composée de laminine, élastine, collagène et protéoglycans, puis la lame élastique interne de l'artère. La migration des cellules musculaires lisses est facilitée par des interactions entre des intégrines qui se lient avec une séquence particulière (RGD- arginine, glycine, asparagine) retrouvée dans certains éléments de la matrice extracellulaire. Alors que les intégrines de type β_1 seraient particulièrement importantes dans l'adhésion des cellules musculaires lisses à des éléments de la matrice extracellulaire (fibronectine, vitronectine, ostéopontin, laminine), ^{231,232} l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, bien que capable également de supporter l'adhésion des cellules musculaires lisses, est impliquée aussi dans leur migration à la surface d'éléments de la matrice extracellulaire, comme l'ostéopontin et la vitronectine. ²³¹⁻²³³ L'administration locale d'un peptide mimétique de la séquence RGD (GpenGRGDSPCA), suite à une angioplastie de l'artère carotidienne chez le lapin, a permis de réduire de façon significative la production du tissu néointimal 2 semaines après le dommage. ²³⁴ Une réduction de la formation du néointima fut aussi observée suite à l'administration prolongée d'un autre peptide contenant une région RGD, G4120, après angioplastie d'artères carotidiennes chez le hamster. ²³⁵ L'utilisation d'un antagoniste sélectif de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, XJ735, dans un modèle d'angioplastie coronaire avec prothèses endovasculaires chez le porc se traduisit par une diminution d'environ 40% de la surface vasculaire occupée par le néointima 28 jours après l'intervention. ²³⁶ Ces résultats

soulignent l'importance des interactions entre les intégrines des cellules musculaires lisses et la matrice extracellulaire dans le développement de la resténose.

La migration des cellules musculaires lisses est également facilitée par l'action de certains enzymes, comme la plasmine ou les protéases à sérine des neutrophiles (cathepsine G et élastase), capables de dégrader la matrice extracellulaire.²³⁷ Les métalloprotéases (MMPs) sont des endoprotéases zinc- et calcium-dépendants produites principalement par les cellules musculaires lisses, mais aussi par plusieurs types cellulaires dont les cellules endothéliales et les leucocytes.⁶ La plupart sont relâchées dans la matrice extracellulaire et synthétisées sous la forme de zymogène requérant une activation de type protéolytique par divers enzymes (comme la plasmine, la cathepsine G et l'élastase des leucocytes) ou sont présentes dans la membrane cellulaire (MT-MMPs).²³⁸ Les MMPs, qui regroupent plusieurs enzymes, comme la collagénase (MMP-1), gélatinase (MMP-2 et MMP-9) et stromélysine (MMP-3) sont capables de dégrader plusieurs éléments de la matrice extracellulaire. L'activité des MMPs peut être régulée à trois niveaux: 1) par l'augmentation de la transcription des gènes pour MMP-1, 3 et 9, suite à une stimulation de cellules musculaires lisses *in vitro* par l'IL-1 ou le TNF- α .²³⁹ 2) par l'activation des MMPs et 3) par l'augmentation de la production d'inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMP), suite à l'action de TGF- β ou de cytokines, contribuant à restreindre la dégradation de la matrice extracellulaire.²⁴⁰ Les MMPs peuvent être activées soit indirectement, via l'augmentation de l'expression par les cellules musculaires lisses (stimulées par l'IL-1 ou le TNF- α) d'un activateur du plasminogène (urokinasePA), la plasmine, générée par l'action de uPA sur le plasminogène, étant capable d'activer les zymogènes (proMMP-1, 3 et 9); soit directement, par exemple, par la thrombine qui active proMMP-2. Les cellules musculaires lisses expriment de façon constitutive MMP-2, TIMP-1 et TIMP-2. La stimulation des cellules musculaires lisses par des cytokines, comme l'IL-1, conduit à leur expression de MMP-1, -3 et -9.²³⁷ La production de MMP-9 et MMP-2 serait augmentée dans la paroi artérielle suite à un dommage endothélial chez le rat²⁴¹ alors que la présence de MMP-9, -1 et -3 actives a été décrite dans des plaques athérosclérotiques chez l'homme.²⁴² L'importance des MMPs dans la migration des cellules musculaires lisses est soulignée dans un modèle expérimental *in vitro* chez le primate où l'utilisation

d'anticorps dirigés contre MMP-2 et MMP-9 a réduit la migration de cellules musculaires lisses. ²⁴³

1.3.4.3.3 Les cellules musculaires lisses et le néointima

La troisième phase implique la prolifération des cellules musculaires lisses dans l'intima et leur production subséquente d'une matrice extracellulaire. La prolifération des cellules musculaires lisses dans l'intima se poursuit pour environ 2 semaines, la production de la matrice extracellulaire étant responsable du volume additionnel pour éventuellement constituer l'essentiel du tissu néointimal. ^{188,244} Contrairement à la prolifération initiale dans la média, la prolifération observée dans l'intima ne serait pas reliée à l'action du bFGF mais plutôt à l'effet du PDGF. Ce PDGF serait probablement sécrété par une sous-population de cellules musculaires lisses du néointima exprimant du PDGF-BB. ²⁴⁵

Cette matrice extracellulaire, initialement riche en protéoglycans, plus particulièrement en versican et en hyaluronan, deviendra de plus en plus riche en collagène. Voyons brièvement les principaux constituants de la matrice extracellulaire, soit les protéoglycans, le collagène, l'élastine et les glycoprotéines.

1.3.4.3.3.1 Les protéoglycans

Les protéoglycans comportent une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycans attachées à un squelette de glycoprotéine. Ces molécules hydrophiles sont responsables de la viscoélasticité de la matrice extracellulaire. Le hyaluronan est un glycosaminoglycan hydrophile capable d'une grande rétention d'eau et formant une matrice extracellulaire lâche favorisant la migration cellulaire. La présence de hyaluronan dans le néointima, formé suite à une dénudation endothéliale de l'artère carotidienne chez le rat, est maximale 7 jours après le dommage et est associée à la prolifération de cellules musculaires lisses. ²⁴⁶ L'examen immunohistochimique de tissu néointimal obtenu par athérectomie de patients resténotiques a permis de démontrer que la présence de hyaluronan était inversement proportionnelle à la densité de collagène de type I et III, le hyaluronan étant retrouvé plus particulièrement dans la matrice extracellulaire immature. ²⁴⁶ Par contre, la maturation de la matrice extracellulaire est associée à un remplacement

du hyaluronan par d'autres protéoglycans, comme le biglycan, et par du collagène. Le biglycan est un protéoglycan retrouvé en association avec le collagène de type I et III dans la matrice extracellulaire en maturation. Alors que la synthèse de biglycan et de collagène est stimulée par le TGF- β ^{247,248}, le biglycan peut lier et neutraliser l'action du TGF- β ^{248,249}, offrant un mécanisme possible de régulation de la formation de la matrice extracellulaire.

1.3.4.3.2 Le collagène et l'élastine

Le collagène est une protéine comportant une triple hélice de chaînes polypeptidiques; plusieurs types de collagène existent dont six sont retrouvés dans les vaisseaux sanguins (I, III, IV, V, VI, VIII). ^{250,251} Alors que les collagènes de type I et III sont des collagènes de type fibrillaire, assemblés en faisceaux entrecroisés de fibrilles, et représentent la majorité du collagène total de la paroi vasculaire, les collagènes de type IV, V et VI sont dits amorphes et retrouvés en association avec les collagènes fibrillaires ou dans les membranes basales (IV et VIII). ²⁵¹ Suite à un dommage vasculaire par angioplastie répétée chez le porc ²⁵² ou le lapin ²⁵³, une augmentation progressive de la synthèse de collagène de type I ²⁵², de type III et d'élastine ²⁵³ est rapportée. Les collagènes de types I et III constituent à terme l'essentiel de la matrice extracellulaire du néointima. Cette matrice collagénique sera progressivement restructurée, réarrangée de façon à former des faisceaux fibrillaires plus importants, contribuant à augmenter la résistance aux forces de tension.

L'élastine est composée d'une protéine (tropoélastine) hydrophobe et d'une glycoprotéine hydrophile. L'élastine est disposée en couches parallèles interreliées entre elles et disposées de façon concentriques dans la paroi vasculaire. Des peptides dérivés de l'élastine, suite à sa dégradation enzymatique, sont chémoattractants pour les neutrophiles, contribuant à un recrutement soutenu de leucocytes après un dommage vasculaire. ²⁵⁴

1.3.4.3.3 Les glycoprotéines

Les glycoprotéines sont une famille de molécules capables de se lier à d'autres composants de la matrice extracellulaire et aux membranes cellulaires, via leur domaine RGD et des interactions avec certaines intégrines cellulaires. La fibronectine, dont il

existe plusieurs formes, est composée de deux sous-unités polypeptidiques similaires liées à leur extrémité carboxy-terminale par deux ponts disulfures. Synthétisée par les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et les leucocytes, elle est aussi comprise dans les granules α des plaquettes. 180,255 Une forme soluble de fibronectine existe dans le plasma et une forme insoluble à la surface des cellules des tissus conjonctifs et vasculaires. La fibronectine, en interagissant avec le collagène et les protéoglycans, contribue à l'organisation tridimensionnelle de la matrice extracellulaire. La fibronectine favorise la modulation du phénotype des cellules musculaires lisses ainsi que leur migration. 256,257 Elle stimule aussi la chémotaxie des leucocytes 180 et leur activité phagocytaire. 255 Suite à une dénudation endothéliale chez le rat, une augmentation rapide de la production de l'ARN messager de la fibronectine, se poursuivant jusqu'à une semaine après le dommage, est observée en parallèle avec une augmentation de l'ARN messager du TGF- β . 258 Une analyse immunohistochimique comparative de tissus provenant de patients démontrant une lésion athérosclérotique ou resténotique et prélevés par athérectomie démontre une expression accrue de fibronectine et de TNF dans les lésions resténotiques, soulignant le rôle potentiel de la fibronectine et de la réaction inflammatoire dans la resténose. 189

La thrombospondine, dont plusieurs formes existent, est une glycoprotéine trimérique composée de trois chaînes de glycoprotéines unies par des liens disulfures. En plus d'être synthétisée par les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales, la thrombospondine est retrouvée dans les granules α des plaquettes. La thrombospondine, présente dans la paroi artérielle normale, favoriserait la migration des cellules musculaires lisses et est capable de lier et d'activer le TGF- β . 259 Une augmentation rapide de la production de thrombospondine par les cellules musculaires lisses est observée suite à un dommage vasculaire chez le rat. 258

L'ostéopontin est une petite glycoprotéine renfermant des domaines RGD capables de supporter l'adhésion des cellules endothéliales et musculaires lisses via des interactions avec leurs intégrines $\alpha_v\beta_3$. Plusieurs types cellulaires peuvent synthétiser de l'ostéopontin, notamment les cellules endothéliales, musculaires lisses et les macrophages. L'ostéopontin est aussi chémotactique pour les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les leucocytes. L'ostéopontin, qui n'est pas retrouvé dans la paroi

artérielle normale, est exprimé dans le néointima suite à un dommage vasculaire chez le rat et le porc et dans des tissus provenant de lésions resténotiques prélevés par athérectomie chez des patients. ^{236,260} La synthèse d'ostéopontin par les cellules musculaires lisses coïncide avec leur migration dans le néointima, suggérant que l'ostéopontin pourrait faciliter leur migration vers l'intima via une interaction avec leur intégrine $\alpha_v\beta_3$.

1.3.4.3.3.4 Le TGF- β

La synthèse de la matrice extracellulaire par les cellules musculaires lisses présentes dans l'intima serait sous contrôle de facteurs de croissance, dont le facteur de croissance transformant de type β (TGF- β). Le TGF- β est une protéine dimérique présente dans les granules α des plaquettes et qui peut être produite aussi par plusieurs types cellulaires, dont les leucocytes, fibroblastes, cellules musculaires lisses et cellules endothéliales. ²⁶¹ Le TGF- β est sécrété sous une forme inactive nécessitant une activation de type protéolytique, par exemple par la plasmine. ²³⁷ Le TGF- β est capable de chimotaxie envers les mononucléaires et neutrophiles. ²⁴⁸ Le TGF- β stimule sa production autocrine par les cellules musculaires lisses et favorise l'apparition du phénotype synthétique. ^{248,262} Ce facteur de croissance est impliqué dans la régulation de la prolifération et de la migration des cellules musculaires lisses et stimule leur production de matrice extracellulaire. Bien que le TGF- β est présenté comme un inhibiteur de la prolifération et de la migration des cellules musculaires lisses, certaines études *in vitro* rapportent une stimulation de la prolifération de cellules musculaires lisses provenant de lésions athérosclérotiques humaines suite à l'action du TGF- β . ^{262,263} Tel que rapporté par Battegay et coll. dans une étude *in vitro*, ²⁶³ une faible concentration de TGF- β stimule la prolifération de cellules musculaires lisses alors qu'une concentration plus élevée produit un effet inhibiteur. La réponse proliférative serait reliée non pas à l'action directe du TGF- β mais ferait plutôt suite à une stimulation autocrine de PDGF-AA par les cellules musculaires lisses après leur exposition à de faibles concentrations de TGF- β , alors que la perte de cette réponse proliférative serait consécutive à une diminution de l'expression du récepteur pour le PDGF-AA. ²⁶³ La concentration de TGF-

β serait donc un facteur déterminant dans la réponse proliférative des cellules musculaires lisses suite à leur exposition à ce facteur de croissance. Une diminution marquée par ces cellules musculaires lisses de l'expression du récepteur de type II du TGF- β , qui serait particulièrement associé avec une réponse inhibitrice, pourrait également expliquer ce phénomène. ²⁶²

L'importance du TGF- β comme modulateur de la production de la matrice extracellulaire est confirmée par 1) l'expression d'ARN messager de TGF- β par des cellules musculaires lisses porcines avant leur prolifération et leur synthèse de matrice extracellulaire suite à un dommage artériel par déendothélialisation; ²⁶⁴ 2) la réduction de la production de la synthèse de protéoglycans, suite à l'ajout d'un anticorps anti-TGF- β dans le milieu de culture, par des cellules musculaires lisses de rat provenant de lésion sténotiques ²⁶⁵ et par 3) la stimulation de la synthèse du collagène et de protéoglycans par les cellules musculaires lisses suite au transfert d'un plasmide contenant un gène codant pour TGF- β dans la paroi d'artères normales porcines. ²⁶⁶ Le TGF- β stimule aussi la production d'inhibiteur tissulaire des métalloprotéases, favorisant la formation de la matrice extracellulaire au détriment de sa dégradation. ²³⁷

1.3.4.3.3.5 Évolution du néointima

Une dégradation contrôlée de la matrice extracellulaire par des enzymes comme la plasmine et les MMPs est nécessaire pour permettre la modulation des composants de cette matrice. Toutefois, tel que rapporté par Guarda et coll., ²⁵² une augmentation de la production de collagène de type I en parallèle avec une diminution de l'activité des MMPs est observée dans le tissu néointimal 6 semaines après une angioplastie coronaire répétée chez le porc. Des résultats similaires sont obtenus chez l'humain. En effet, une analyse histologique et biochimique comparative de tissus provenant de lésions resténotiques, athérosclérotiques ou d'artères normales de patients a démontrée une augmentation de la production de collagène et de protéoglycans en combinaison avec une diminution de l'activité des MMPs dans les tissus provenant de lésions resténotiques par rapport aux tissus athérosclérotiques ou normaux. ²⁶⁷ Cela suggère que le développement d'une lésion resténotique pourrait dépendre à la fois de la production exagérée d'une matrice extracellulaire et d'une diminution de sa dégradation.

La maturation de la matrice extracellulaire se déroule en parallèle avec une diminution de la prolifération des cellules musculaires et avec la réendothélialisation du néointima. Les cellules endothéliales recouvrant le néointima contribuent à l'arrêt de l'hyperplasie néointimale par leur production de NO, mais aussi par leur synthèse d'héparan sulfate relâché dans la matrice extracellulaire. L'héparan sulfate peut contribuer au contrôle de l'hyperplasie néointimale: 1) par une action directe sur les cellules musculaires lisses, interférant avec l'entrée et la progression de cellules dans le cycle de division cellulaire, 153,268 2) par une liaison avec des facteurs de croissance, comme le PDGF et le bFGF, diminuant leur disponibilité pour les cellules musculaires lisses; 269,270 3) en favorisant la dédifférentiation des cellules musculaires lisses exprimant le phénotype synthétique vers le phénotype contractile 271 et 4) en modulant la composition de la matrice extracellulaire, diminuant la formation de collagène et d'élastine. 272

La matrice extracellulaire est donc un tissu complexe dont la composition et la production varient dans le temps, modulant, en conjonction avec les mécanismes régissant sa dégradation, l'apparition de resténose. La migration des cellules musculaires lisses qui envahissent le thrombus riche en plaquettes, fibrine et fibronectine, se poursuit par l'organisation du thrombus et l'apparition d'un néointima. Des éléments du néointima, comme le hyaluronan et le versican vont progressivement être remplacés à leur tour par de plus en plus de collagène avec diminution progressive de la cellularité du néointima et retour éventuel des cellules musculaires lisses vers un phénotype contractile.

1.3.4.4 Rôle de l'adventice

Récemment, les myofibroblastes de l'adventice ont été également proposés comme type cellulaire pouvant conduire à la formation du tissu néointimal. 273,274 En effet, des manipulations de l'adventice artériel se traduisirent, dans des modèles expérimentaux, par la formation d'un néointima suggérant l'implication de l'adventice dans la réparation tissulaire suite à un dommage vasculaire. 177,275,276 De plus, tel que démontré par Shi et coll. 277 et par Scott et coll. 278 dans un modèle coronaire porcin de dommage vasculaire par angioplastie, une activation des fibroblastes de l'adventice est observée tôt après le dommage. Cette activation a pour conséquence une différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (acquisition de myofilaments d'actine) et est suivie de la

prolifération et de la migration de certains myofibroblastes vers l'intima. Ces myofibroblastes sont capables de synthèse de collagène²⁷⁹ et vont produire une matrice extracellulaire riche en collagène dans l'adventice, tel qu'observée environ 1 mois après le dommage par angioplastie. Un dommage sévère causé à la paroi artérielle, exposant la média et l'adventice au flot sanguin, serait associé à une plus grande prolifération de myofibroblastes de l'adventice et la formation d'un tissu néointimal plus abondant.^{273,277} L'exposition des cellules adventitielles à la thrombine, à des cytokines, comme l'IL-1 et le TNF,²⁸⁰ et à des facteurs de croissance pourrait contribuer à stimuler leur prolifération.²⁷⁴ Une expression autocrine de TGF- β par les fibroblastes, observée tôt dans l'adventice suite au dommage vasculaire, serait associée à leur différenciation en myofibroblastes.²⁸¹ L'implication des myofibroblastes dans la pathophysiologie de la resténose n'est pas sans parallèle avec le rôle important que les myofibroblastes occupent dans la guérison suite à un dommage tissulaire non vasculaire. Bien que l'adventice, particulièrement dans le cas de lésion vasculaire profonde, pourrait contribuer à la formation du néointima, sa contribution à la pathophysiologie de la resténose est toutefois principalement reliée au développement du remodelage vasculaire.

1.3.4.5 Remodelage vasculaire

1.3.4.5.1 Généralités

Jusqu'à récemment, la formation d'un tissu néointimal était considérée comme primordiale dans la resténose post-angioplastie.^{150,160,282-285} En effet, l'observation de zones d'hyperplasie néointimale dans des fragments de tissus obtenus par athérectomie directionnelle de lésions resténotiques^{286,287} et l'étude post-mortem d'artères coronaires resténotiques de patients ayant subi une angioplastie^{131,158} ont souligné l'importance du néointima dans ce processus. C'est donc avec comme objectif l'inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses et de la formation du néointima qu'ont été élaborées la plupart des stratégies de traitement préventif de la resténose.

Toutefois, ces observations essentiellement morphologiques furent contredites par une étude subséquente s'attardant à quantifier la prolifération cellulaire dans des tissus prélevés par athérectomie provenant de patients souffrant de resténose coronaire.²⁸⁸

L'analyse immunohistochimique de ces tissus par détection de l'antigène nucléaire des cellules prolifératives (PCNA) a démontré que les tissus resténotiques humains ne démontraient que peu ou pas de prolifération cellulaire sans égard à la période de temps écoulée entre l'intervention initiale et la collecte des tissus. De plus, comme l'intima coronaire humain contient déjà des cellules musculaires lisses,²⁸⁹ l'importance des deux premières phases du développement du néointima (la prolifération initiale dans la média et la migration vers l'intima) dans la resténose post-angioplastie chez l'humain est incertaine. L'échec de la plupart des composés pharmacologiques, qui étaient essentiellement dirigés contre les étapes de la formation du néointima, dans la prévention de la resténose en clinique suggère aussi que d'autres mécanismes contribuent au développement de la resténose.

A cet égard, des études expérimentales récentes rapportent que la formation d'un tissu néointimal n'explique que partiellement l'apparition de resténose, la resténose étant plutôt consécutive à un remodelage géométrique de la paroi vasculaire.²⁹⁰⁻²⁹⁸ Le remodelage géométrique du vaisseau réfère à un changement dans la dimension du vaisseau. Ce changement est habituellement évalué sur la base de variation dans la surface délimitée par la lame élastique externe de l'artère. Le remodelage peut donc être favorable (compensateur) permettant de compenser, du moins partiellement, la diminution de la lumière vasculaire causée par le néointima ou défavorable (constricteur) quand une artère présentant un tissu néointimal ne change pas de dimension ou encore se contracte, amenant une réduction de la lumière vasculaire.²⁹⁹ En fait, la présence et la croissance d'un tissu néointimal est compensée par des changements dans la taille du vaisseau et dans la dimension de la lumière vasculaire. Cela n'est pas sans rappeler l'hypothèse mise de l'avant par Glacov et coll.¹³² qui stipule qu'une augmentation de volume d'une plaque athérosclérotique, jusqu'à ce qu'elle occupe environ 40% de la surface délimitée par la lame élastique interne, est compensée par une augmentation de la taille du vaisseau permettant de maintenir la dimension de la lumière vasculaire. Le phénomène de remodelage est donc une manifestation morphologique faisant potentiellement appel aux mécanismes régissant la croissance, la migration et la mort cellulaire, la vasomotricité ainsi que la formation et la dégradation de la matrice extracellulaire.³⁰⁰

Tel que décrit par Kakuta et coll.,²⁹⁰ une dilatation compensatoire de la surface délimitée par la lame élastique interne de l'artère 4 semaines après angioplastie d'artères iliaques de lapins athérosclérotiques limiterait l'effet réducteur de la présence du néointima sur la lumière vasculaire, prévenant l'apparition de resténose. Lafont et coll.,²⁹⁷ utilisant un modèle d'angioplastie de l'artère fémorale précédée d'une dessiccation endothéliale chez le lapin hypercholestérolémique, rapportent la présence, 4 semaines après l'angioplastie, d'une constriction de la paroi artérielle au site de lésions resténotiques. Cette constriction, définie comme une diminution de la surface délimitée par la lame élastique externe par rapport à un segment de référence, mais non la surface du tissu néointimal, était associée avec la diminution de la lumière vasculaire, suggérant que le remodelage vasculaire et non pas la production du néointima est le principal mécanisme sous-jacent au développement de la resténose. Dans une étude subséquente, ils démontrent aussi que la présence d'un accroissement de la surface totale du vaisseau, par rapport à un segment de référence, est capable de compenser, jusqu'à un certain point, la présence d'un néointima et donc de limiter l'apparition de resténose.²⁹¹ Des résultats similaires furent obtenus dans un modèle d'angioplastie de l'artère fémorale chez le lapin,²⁹⁴ d'angioplastie de l'artère iliaque chez le primate hypercholestérolémique³⁰¹ et d'artères coronaires chez le porc normal²⁹⁵ et hypercholestérolémique.²⁹⁴ En fait, dans tous les modèles expérimentaux usuels de resténose, excepté le rat, la resténose post-angioplastie n'est pas reliée principalement à la formation d'un néointima mais plutôt à un remodelage contracteur et/ou à une absence de remodelage compensateur.³⁰²

L'utilisation de l'échographie endovasculaire a permis de mettre en évidence l'importance du remodelage chez les patients atteints de resténose post-angioplastie. Luo et coll.³⁰³ ont comparé des paramètres morphologiques obtenus par échographie endovasculaire de patients démontrant ou non une resténose environ 7 mois après angioplastie coronaire. Leurs résultats démontrent qu'une réduction de la surface totale de l'artère, observée chez les patients resténotiques mais non chez les patients normaux, est responsable d'environ 80% de la diminution de la lumière vasculaire. Des résultats similaires furent obtenus dans des études par échographie endovasculaire de patients atteints de resténose après angioplastie coronaire.^{136,304} Ces résultats échographiques furent confirmés par des études post-mortem histomorphométriques d'artères coronaires

de patients ayant subi une angioplastie quelques mois auparavant.^{305,306} En effet, la surface occupée par le néointima, telle qu'évaluée dans des sections transversales d'artères coronaires, n'était pas reliée à la présence de resténose, définie par une lumière vasculaire < 50% par rapport à un segment de référence. Toutefois, la surface totale du vaisseau, circonscrite par la lame élastique externe et corrigée par rapport à un segment de référence, était significativement plus réduite dans les segments resténotiques. Un tissu fibreux dense fut observé dans l'adventice, suggérant qu'une constriction adventitielle est à l'origine de la diminution de la surface totale du vaisseau.³⁰⁶

1.3.4.5.2 Mécanismes

Les mécanismes sous-jacents au remodelage sont mal connus. Le remodelage constrictif (négatif) implique probablement des mécanismes et médiateurs à l'oeuvre dans la production et la maturation de la matrice extracellulaire. La matrice extracellulaire riche en collagène, produite par des myofibroblastes adventitiels sous l'influence du TGF- β , se transformera progressivement en un tissu fibreux dense, compact et peu vascularisé. Les myofibroblastes peuvent réorganiser la matrice extracellulaire, via des interactions entre leurs intégrines, par exemple $\alpha_2\beta_1$ et le collagène, permettant une contraction et une diminution de volume du tissu fibreux.³⁰⁷ Cette fibrose adventitielle non seulement peut produire une compression périphérique du vaisseau, mais peut aussi empêcher l'élargissement de la surface délimitée par la lame élastique externe.³⁰⁵

Le remodelage positif pourrait être facilité par l'expression d'enzymes capables de dégrader la matrice extracellulaire, comme les métalloprotéases. Une dégradation accrue de la matrice extracellulaire pourrait faciliter une expansion abluminale de l'artère. En ce sens, les fibroblastes de l'adventice expriment MMP-2, TIMP-1 et TIMP-2 (inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases-1 et -2) dans les premiers jours suivant une angioplastie coronaire chez le porc. Cette expression de MMP-2 et de TIMP-1 et TIMP-2, qui n'est pas présente dans la paroi artérielle normale, diminue progressivement jusqu'à 14 jours après le dommage où elle revient au niveau basal.³⁰⁸ Les leucocytes représentent une autre source possible d'enzymes protéolytiques. L'inflammation adventitielle est une composante importante de la réponse vasculaire après endommagement.^{309,310} Suite à une déendothélialisation carotidienne chez le rat, le cathéter ballon étant introduit via

l'artère fémorale de façon à ne pas endommager directement l'adventice de la carotide, une infiltration de neutrophiles est observée dans les premières heures et jusqu'à trois jours suivant le dommage, associée à une expression rapide par l'endothélium des vasa vasorum de l'adventice des molécules d'adhésion P-sélectine et ICAM-1.³¹¹ Par la suite, l'expression du facteur chimiotactique MCP-1 par les fibroblastes adventitiels et des molécules d'adhésion VCAM-1, P-sélectine et E-sélectine par l'endothélium des vasa vasorum de l'adventice, favorisent l'apparition de macrophages qui persistent jusqu'à environ 1 semaine dans l'adventice. L'expression de molécules d'adhésion endothéliales (E-sélectine, VCAM-1 et ICAM-1) associées avec une infiltration leucocytaire est également observée dans la néovasculature de la plaque athérosclérotique et de l'adventice d'artères coronaires du cœur explanté de patients soumis à une transplantation cardiaque.³¹⁰ Tel que rapporté par Pels et coll.,³¹² alors que l'adventice d'une artère coronaire normale est relativement acellulaire et peu développé, une prolifération rapide de la néovascularisation adventitielle est observée suite à une angioplastie coronaire chez le porc, associée à un épaissement de l'adventice.²⁹² Une régression progressive de la néovascularisation adventitielle est associée à une déposition de collagène dans l'adventice et développement d'un remodelage constrictif.^{292,312} Ces résultats suggèrent que la néovasculature formée dans la paroi artérielle est une voie d'accès importante pour les leucocytes et est impliquée dans le remodelage vasculaire. La production de RLO par les leucocytes, en neutralisant le NO endothélial, pourrait contribuer à diminuer la possibilité d'un remodelage positif médié par l'endothélium. La présence d'une inflammation adventitielle peut soit faciliter l'expansion de l'artère, par la génération et l'activation de métalloprotéases ou via une production locale amplifiée de cytokines pro-inflammatoires (comme l'IL-1 et le TNF), soit conduire à une plus grande activation de fibroblastes adventitiels, à une expression accrue de TGF- β dans l'adventitia et à une augmentation de la synthèse du collagène par les myofibroblastes de l'adventice conduisant à une constriction possible de l'artère. Une étude clinique récente rapporte que l'administration de probucol, un agent hypolipémiant et antioxydant, 1 mois avant et pour 6 mois après une angioplastie coronaire s'est traduite par une diminution de la resténose en favorisant un accroissement de la surface totale de l'artère.^{313,314} Comme le probucol est aussi un inhibiteur spécifique de la sécrétion d'IL-1³¹⁵, une diminution de la

réaction inflammatoire, de l'activation des myofibroblastes et de la fibrose adventitielle peut donc avoir contribué à ce résultat positif. Toutefois, le rôle des cellules inflammatoires dans le remodelage vasculaire reste encore à préciser.

Des changements fonctionnels peuvent aussi contribuer au remodelage. Le remodelage vasculaire est un processus actif permettant une adaptation de la paroi artérielle face à des changements hémodynamiques chroniques.³¹⁶ La force de cisaillement est proportionnelle au débit sanguin et inversement proportionnelle au cube du rayon de la lumière vasculaire. Une augmentation des forces de cisaillements se traduira par une vasorelaxation de la paroi artérielle de façon à augmenter le rayon de la lumière vasculaire, maintenant les forces de cisaillement à un niveau plus ou moins constant. Cette vasorelaxation est dépendante de la présence d'un endothélium fonctionnel capable de libérer du NO,^{317,318} probablement suite à une augmentation de l'expression de la NOS endothéliale.³¹⁹ Cette vasodilatation s'accompagne d'une augmentation de la tension pariétale qui est secondairement compensée par un épaissement de la paroi, de façon à maintenir les forces de cisaillement et de tension près de leurs valeurs d'équilibre. Une dysfonction endothéliale, caractérisée par une diminution de la production de NO, est observée suite à l'angioplastie.^{201,203} Cela pourrait contribuer à diminuer le remodelage positif qui devrait être observé suite à l'augmentation du flot sanguin produit par l'angioplastie. Toutefois, l'administration prolongée de L-arginine (précurseur de NO) ou de L-NAME (inhibiteur de la NOS) à des lapins hypercholestérolémiques suite à une angioplastie des artères iliaques ne se traduit pas par une différence dans la lumière vasculaire, 4 semaines après l'angioplastie.³²⁰ Bien qu'une augmentation de la production du tissu néointimal fut notée suite à l'administration de L-NAME, une augmentation dans la surface totale du vaisseau a permis de maintenir une lumière vasculaire similaire à des animaux contrôles. De plus, les artères iliaques des lapins recevant de la L-arginine ont présenté une lumière vasculaire comparable, en dépit d'une réduction de la production du tissu néointimal. L'absence de remodelage compensateur chez ces derniers peut partiellement expliquer ce phénomène. Ces résultats illustrent bien la relation complexe entre la production du néointima et le remodelage vasculaire, l'accroissement du néointima pouvant stimuler, jusqu'à un certain point, un remodelage positif.²⁹¹

La resténose post-angioplastie est donc une pathologie multifactorielle et complexe dont la manifestation morphologique serait le fruit d'un remodelage de la paroi vasculaire en réponse au dommage causé par l'angioplastie et à la formation d'un tissu néointimal. Voyons donc maintenant certaines modalités thérapeutiques utilisées dans la prévention de la resténose.

1.3.5 Prévention de la resténose

On peut diviser les approches thérapeutiques en deux grandes catégories, à savoir les approches pharmacologiques et les approches mécaniques.

1.3.5.1 Approches pharmacologiques

De nombreux composés pharmacologiques ont fait l'objet de tests dans le but de vérifier leur efficacité à prévenir la resténose. Malgré des résultats expérimentaux encourageants, la plupart des essais cliniques se sont traduits par un résultat négatif. On peut les classer selon les catégories suivantes: 1) anti-plaquettaires, 2) anticoagulants, 3) anti-inflammatoires 4) anti-prolifératifs et 5) hypolipémiants. Voyons succinctement chacune de ces catégories.

1.3.5.1.1 Anti-plaquettaires

Étant donné le rôle fondamental des plaquettes dans la genèse du thrombus formé après un dommage artériel et leur implications dans la pathophysiologie de la resténose, de nombreux antagonistes plaquettaires furent l'objet d'études expérimentales et cliniques. L'utilisation de l'aspirine, qui inhibe la cyclooxygénase de type 1 des plaquettes réduisant ainsi leur production de thromboxane A₂ (activateur des plaquettes et puissant vasoconstricteur),³²¹ bien que diminuant le risque de complications aiguës post-angioplastie, ne se traduit pas par une réduction significative du taux de resténose.¹²³ Des inhibiteurs plus spécifiques de la thromboxane A₂ ou d'autres agents antiplaquettaires, comme la ticlopidine, qui interfère avec l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP, utilisés seul ou en combinaison avec l'aspirine, ne semblent pas être efficace pour prévenir la resténose.^{123,154} L'agrégation plaquettaire, qui est centrale dans la formation du thrombus, est médiée par l'intégrine GpIIb/IIIa des plaquettes activées via

un pont de fibrinogène ou de facteur de von Willebrand (vWf). Les inhibiteurs de l'intégrine GpIIb/IIIa interfèrent avec l'agrégation plaquettaire en occupant le site de liaison du fibrinogène. La nature de ces inhibiteurs diffère grandement. L'abciximab (Reopro), premier inhibiteur mis au point, est un fragment d'anticorps chimérique dirigé contre un épitope de la sous-unité IIIa de l'intégrine GpIIb/IIIa et qui démontre également une certaine affinité pour d'autres intégrines.³²² De par sa taille, il n'interfère pas seulement avec la région impliquée dans la liaison avec le fibrinogène ou le vWf,³²³ mais recouvre une grande région de l'intégrine GpIIb/IIIa activée. L'abciximab est maintenant utilisé couramment en prévention des complications ischémiques post-angioplastie.³²⁴ D'autres inhibiteurs de l'intégrine GpIIb/IIIa ont aussi été développés. Parmi ceux-ci, mentionnons l'eptifabide (Integrilin), un antagoniste peptidique compétitif de la liaison entre le fibrinogène et l'intégrine GpIIb/IIIa de même que des inhibiteurs mimétiques nonpeptidiques, le lamifiban et le tirofiban (Aggrastat). Le bénéfice potentiel d'inhibiteurs de l'intégrine GpIIb/IIIa a été vérifié dans de nombreuses études cliniques.¹¹¹ Encore une fois, bien que ces composés se soient avérés efficaces pour réduire l'incidence d'occlusion vasculaire aiguë, de mortalité et d'infarctus du myocarde après angioplastie, ils n'ont pas diminué de façon significative, excepté chez les patients diabétiques,^{325,326} le besoin de revascularisation 6 mois post-angioplastie.^{111,113,123,324}

1.3.5.1.2 Anticoagulants

La génération de thrombine, produite par la cascade de la coagulation, est également de première importance dans les événements survenant suite à un dommage vasculaire. Malgré les multiples effets connus de la thrombine et des résultats expérimentaux suggérant un effet antiprolifératif,^{154,327,328} des inhibiteurs de la thrombine, comme l'héparine, utilisé couramment pour réduire les complications aiguës post-angioplastie et dont l'action antithrombine dépend de l'antithrombine III, des héparines de bas poids moléculaire ou des inhibiteurs plus directs de la thrombine, comme l'hirudine et la bivalirudine ne se sont pas avérés efficaces chez l'humain en prévention de la resténose.^{123,176,329} Toutefois, tel que suggéré par les travaux de Gallo et coll.,²¹¹ une administration prolongée (2 semaines) de l'hirudine suite à une angioplastie coronaire

chez le porc permit de réduire d'environ 40% la diminution de la surface de la lumière vasculaire 4 semaines après l'intervention. Le bénéfice d'une administration prolongée d'hirudine est également souligné par Thome et coll. dans un modèle d'angioplastie d'artères athérosclérotiques chez le lapin.³³⁰ L'administration prolongée permettrait à l'hirudine de neutraliser la thrombine comprise dans le thrombus (protégée de l'action de l'antithrombine III et de l'hirudine) et relâchée progressivement par la suite. L'efficacité clinique d'une administration prolongée d'hirudine dans la prévention de la resténose reste à démontrer.

1.3.5.1.3 Agents anti-inflammatoires

Comme une réparation tissulaire exagérée après un dommage, tel qu'observé parfois lors d'une lésion cutanée, et la resténose partagent certains éléments pathophysiologiques, certains se sont intéressés au rôle possible d'agents anti-inflammatoires dans la prévention de la resténose. Alors que les corticostéroïdes n'ont pas démontré d'efficacité dans la prévention de la resténose chez l'humain, des anti-inflammatoires nonstéroïdiens, comme l'ibuprofène et le tranilast, qui sont capables de réduire l'activation des leucocytes et des fibroblastes, ont démontré des résultats cliniques préliminaires (3 mois) encourageants.¹⁵³ Bien que l'efficacité de ces agents anti-inflammatoires à plus long terme reste à confirmer, cela suggère l'importance des réactions inflammatoires dans le développement de la resténose. Une autre approche consiste à cibler les molécules d'adhésion des leucocytes et de l'endothélium nécessaires pour permettre l'adhésion et l'infiltration des leucocytes, phénomènes observés après un dommage tissulaire. Une réduction de la formation du tissu néointimal fut obtenue dans un modèle expérimental d'angioplastie¹⁹⁰ et dans un modèle de dommage vasculaire et de sténose,³³¹ suite à l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre une intégrine β_2 des leucocytes (Mac-1). L'utilisation d'un bloqueur des sélectines dans un modèle d'angioplastie chez le lapin permis de réduire l'hyperplasie néointimale 4 semaines après l'intervention, suggérant l'importance des sélectines dans la resténose.¹⁹¹ D'ailleurs, une étude de Kumar et coll.,³³² utilisant un modèle de dommage vasculaire par ligature de l'artère carotidienne chez la souris déficiente en P-sélectine, rapporte une réduction marquée de la production de tissu néointimal associée à une diminution des leucocytes au

sein du néointima chez la souris déficiente en P-sélectine. Récemment, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la P-sélectine dans un modèle expérimental de dommage artériel chez le rat, a réduit l'infiltration de leucocytes et la production du néointima, tel qu'évalué 14 jours après le dommage.³³³ Ces résultats confirment l'importance des sélectines, et plus particulièrement de la P-sélectine, dans la réparation tissulaire après dommage vasculaire. Le bénéfice potentiel de thérapie dirigée contre les molécules d'adhésion ou leurs récepteurs dans la pathophysiologie de la resténose reste toutefois à confirmer chez l'humain.

1.3.5.1.4 Agents anti-prolifératifs

De nombreux facteurs de croissance sont potentiellement impliqués dans la resténose. Parmi ceux-ci, le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) est particulièrement important en ce qui concerne la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses de la média vasculaire.^{213,214} Le trapidil, un inhibiteur du PDGF a produit une diminution significative de la formation du néointima dans des modèles expérimentaux de dommages vasculaires chez le rat et le lapin.^{334,335} Ces résultats semblent se confirmer chez l'humain où les résultats d'une étude clinique démontrent une diminution d'environ 40% de la resténose suite à l'administration quotidienne de trapidil.³³⁶

L'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) fut également considérée pour la prévention de la resténose. En effet, dans un modèle de dommage artériel chez le rat, une augmentation de l'expression de l'ACE fut notée dans le tissu néointimal formé tel qu'évalué 14 jours suite à l'intervention.³³⁷ L'ACE est responsable de la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II. L'angiotensine II, un puissant vasoconstricteur, favorise aussi la croissance et la migration des cellules musculaires lisses, probablement via une augmentation de la synthèse de l'ADN de certains facteurs de croissance (PDGF, TGF).^{153,338} L'ACE peut également inactiver la bradykinine, vasodilatateur qui stimule également le relâchement de NO par l'endothélium, le NO pouvant, entre autres, diminuer l'agrégation plaquettaire et la prolifération des cellules musculaires lisses. L'inhibition de L'ACE, en réduisant la formation locale d'angiotensine II et en augmentant le niveau de bradykinine offre donc un potentiel intéressant pour

prévenir la resténose. L'utilisation de cilazapril, un inhibiteur de l'ACE, diminue la formation du tissu néointimal suite à un dommage artériel chez le rat. ³³⁹ Un effet similaire des inhibiteurs de l'ACE ne fut cependant pas observé dans des modèles porcins d'angioplasties carotidienne et coronaire. ^{340,341} D'ailleurs, des études cliniques récentes ne démontrent pas de réduction de la resténose suite à l'administration d'inhibiteurs de l'ACE. ^{342,343}

1.3.5.1.5 Hypolipémiants

Le 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) reductase est un enzyme déterminant dans la synthèse du cholestérol. Malgré une réduction de la formation du néointima dans un modèle expérimental de dommage vasculaire, ³⁴⁴ l'utilisation d'inhibiteur de HMG-CoA reductase, comme le lovastatin, dans des études cliniques ne se traduit pas par une diminution notable de la resténose post-angioplastie. Le probucol, en plus d'être un agent hypolipémiant, démontre également des propriétés antioxydantes pouvant contribuer à préserver la fonction endothéliale et à limiter l'activation des leucocytes, des cellules musculaires lisses et des métalloprotéases. Des études expérimentales d'angioplastie chez le lapin hypercholestérolémique ³⁴⁵ et chez le porc ³⁴⁶ suggèrent que l'administration de probucol s'accompagne d'une réduction de la prolifération néointimale. Une étude clinique récente rapporte que le probucol est efficace pour réduire la resténose post-angioplastie; ³¹⁴ le mécanisme sous-jacent ne serait pas une diminution de la formation du tissu néointimal mais plutôt un remodelage vasculaire positif accru. ³¹³

La diversité des agents pharmacologiques utilisés illustre bien la complexité de la pathophysiologie de la resténose. Une approche plurithérapeutique pourrait peut-être permettre de mieux prévenir la resténose post-angioplastie.

1.3.5.2 Approches mécaniques

Le traitement par redilatation d'une lésion resténotique, bien que procurant une revascularisation immédiate satisfaisante avec peu de complications à court terme, demeure tributaire d'une incidence de resténose comparable à la dilatation initiale. ^{347,348} De nombreuses techniques ont été mises au point comme alternative à

l'angioplastie en coupant, brûlant ou retirant le tissu faisant protusion dans la lumière vasculaire. ³⁴⁹ Parmi celles-ci, mentionnons l'athérectomie directionnelle et l'athérectomie rotative. L'athérectomie directionnelle a comme objectif, à partir d'un cathéter à l'extrémité duquel on retrouve une lame tranchante tournant à haute vitesse, de couper le tissu faisant protusion dans la lumière vasculaire. Quant à elle, l'athérectomie rotative utilise une fraise recouverte de pointes de diamant et tournant à très haute vitesse (environ 180,000 rpm). L'athérectomie rotative est principalement utilisée dans les cas d'occlusions sévères par des lésions calcifiées ou fibrosées. ³⁴⁹ Toutefois, ces techniques n'ont pas eu l'impact escompté sur la resténose. ¹²⁵ Les prothèses endovasculaires (stents) sont des tubes fenestrés composés d'un enchevêtrement de filaments de métal dont le design et la composition peuvent varier. Habituellement, les stents sont déployés en place via un cathéter ballon. L'utilisation de stent a permis de réduire le recours à la chirurgie d'urgence dans les cas d'occlusion vasculaire aiguë survenant lors de la procédure d'angioplastie, souvent secondaire au développement d'une dissection ou à l'extrusion d'une plaque athérosclérotique. ⁶² Une occlusion thrombotique du stent conduisant souvent à un infarctus du myocarde est observé dans quelques cas. L'activation plaquettaire suite à la pose du stent plutôt que l'activation de la cascade de la coagulation semble être associée à un plus grand risque de thrombose intra-stent. ³⁵⁰ Un déploiement optimal du stent ainsi que l'utilisation d'agents antiplaquettaires, tels l'aspirine et la ticlopidine ont permis de réduire la fréquence des occlusions intra-stent et des infarctus du myocarde subséquents. ^{62,351,352} Chez les patients souffrant d'angine ^{353,354} ou d'infarctus du myocarde, ³⁵⁵ il s'agit de la seule approche mécanique à ce jour à s'être avérée efficace pour réduire la fréquence des lésions resténotiques par rapport à l'angioplastie. En fait, l'utilisation d'un stent a permis une réduction d'environ 25 à 30% du taux de resténose à 6 mois post-intervention, réduction qui est toujours maintenue, même 5 ans après l'intervention initiale. ³⁵⁶ Toutefois, l'implantation d'une prothèse endovasculaire reste encore associée à un taux de resténose d'environ 20% à 6 mois après l'intervention, ³⁴⁸ ce qui est non négligeable étant donné l'utilisation fréquente des stents. ⁶² Comme la pose d'un stent empêche le développement du rappel élastique et du remodelage, la resténose intra-stent serait essentiellement le fait d'une hyperplasie néointimale importante. En effet, on note que les tissus provenant de lésions resténotiques

intra-stent et prélevés par athérectomie chez l'humain se composent essentiellement d'une matrice extracellulaire et de cellules musculaires lisses, ³⁵⁷ confirmant les observations préalables effectuées dans des modèles expérimentaux de resténose. ^{358,359} Tel que décrit par Hoffmann et coll., ³⁶⁰ la resténose intra-stent est associée au développement d'un tissu néointimal qui tend à se distribuer uniformément à l'intérieur du stent et non à un phénomène de remodelage tel qu'observé après angioplastie. Cette production de tissu néointimal et le degré de sténose subséquent seraient reliés au degré de dommage tissulaire consécutif au déploiement du stent. ^{358,359,361} De plus, tel que démontré par Kornowski et coll. dans un modèle coronaire porcin, ³⁶² la sévérité de la réaction inflammatoire induite par le stent, évaluée 4 semaines après l'intervention, serait également déterminante en modulant la production du néointima.

Une approche mécanique a surtout été utilisée comme modalité thérapeutique dans les cas de resténose intra-stent. Alors que la redilatation par ballonnet se traduit par une récurrence élevée de la resténose, particulièrement dans les lésions diffuses, ³⁶³ le traitement d'une lésion resténotique intra-stent par athérectomie rotative permettrait de maintenir une lumière vasculaire plus grande et de diminuer le taux de resténose clinique 6 mois après l'intervention. ^{364,365} Ces résultats préliminaires en faveur de l'athérectomie rotative demeurent toutefois à être confirmés chez un plus grand nombre de patients. L'implantation d'un stent à l'intérieur d'un stent a également été proposé comme moyen de traiter la resténose intra-stent. Cependant, cette approche ne semble pas être plus efficace que l'angioplastie, nécessitant dans les mois suivants une revascularisation dans plus de 30% des cas. ³⁶⁶ L'irradiation locale intrac coronaire serait une autre technique pouvant permettre de diminuer la resténose intra-stent. L'exposition de vaisseaux coronaires, avant ou après la pose d'un stent, à des isotopes radioactifs ou la pose d'un stent radioactifs ont produit dans des modèles expérimentaux une réduction de la prolifération néointimale et de la resténose. ³⁶⁷⁻³⁶⁹ Bien que des résultats préliminaires chez l'humain confirment l'efficacité potentielle de cette approche dans le traitement de la resténose, ³⁷⁰ plusieurs questions, comme le choix de l'isotope, de la dose et les effets à long terme de la radioactivité demeurent sans réponse. L'utilisation d'agents pharmacologiques ciblant l'hyperplasie néointimale et/ou la réaction inflammatoire couplés à leur administration locale directement au site de la lésion

artérielle pourrait être une avenue intéressante pour de nombreux composés inefficace dans la prévention de la resténose post-angioplastie. ^{329,371}

En somme, la discordance entre les modèles expérimentaux et les résultats cliniques s'explique, du moins partiellement, par les éléments de réponse suivants: dosage inapproprié, absence fréquente de prétraitement dans les études cliniques, mécanisme physiopathologique différent. En effet, dans la majorité des modèles expérimentaux, l'effet bénéfique des composés se traduisait principalement par une diminution de l'hyperplasie néo-intimale ou de la formation du thrombus alors que le remodelage vasculaire est le principal mécanisme de resténose post-angioplastie chez l'humain. Avant d'analyser plus à fond les raisons de cette discordance, voyons les divers modèles expérimentaux les plus utilisés dans l'étude de la resténose.

1.3.6 Modèles expérimentaux de la resténose

1.3.6.1 Rongeurs et lagomorphes

1.3.6.1.1 Le rat

Le rat est un des premiers modèles expérimentaux utilisés pour étudier l'athérosclérose et par la suite pour étudier la resténose. L'artère carotidienne est le vaisseau le plus souvent employé.

Le dommage vasculaire est pratiqué de deux façons, à savoir par dessiccation de la carotide après son exposition chirurgicale ³⁷² ou par dénudation endothéliale à l'aide d'un cathéter ballon. ²⁸⁵ Une déposition plaquettaire apparaît rapidement au site endommagé avec production d'un tissu néointimal très riche en cellules musculaires lisses dans les 2 à 3 semaines suivant le dommage. La prolifération des cellules musculaires lisses de la média dans les 3 premiers jours suivie de la migration de certaines de ces cellules vers l'intima, jusqu'à 14 jours suivant le dommage, puis de la prolifération de cellules musculaires lisses intimes, observée de 7 à 30 jours après le dommage, sont responsables de la formation du néointima. ³⁷³ La réendothélialisation est terminée environ 30 jours après le dommage et est parfois incomplète, suite à une déendothélialisation extensive. ³⁷⁴

Les principaux avantages de cet animal sont : le faible coût d'achat et d'entretien permettant l'utilisation d'un grand nombre de sujets, sa carotide commune est dépourvue d'embranchement sur une portion relativement longue ³⁷³, diminuant l'impact de variations des forces hémodynamiques. De plus, ce modèle requiert peu d'équipement et la lésion sténotique se développe rapidement après le dommage. Enfin, de nombreux anticorps monoclonaux et sondes moléculaires sont disponibles facilitant l'étude de mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse tissulaire suite à un dommage vasculaire. Toutefois, des différences importantes avec la condition clinique existent. Tout d'abord, le rat n'est pas un animal susceptible de développer des lésions athérosclérotiques; ³⁷⁴ dans ce modèle, des artères saines, qui sont essentiellement dépourvues de vasa vasorum chez le rat, ³⁷⁵ sont utilisées. Deuxièmement, le passage du cathéter ne produit pas de fracture de la lame élastique interne ou de dommage pénétrant la média. ³⁷⁶ Finalement, la lésion produite ne reflète pas fidèlement la lésion resténotique observée en clinique, notamment dans l'absence de remodelage chez le rat.

302

Le modèle de rat est principalement employé dans l'étude de la prolifération/migration des cellules musculaires lisses de la média. D'ailleurs, ce modèle a permis d'établir l'importance des plaquettes et du PDGF comme stimulus de la prolifération et migration des cellules musculaires lisses. ^{229,230}

1.3.6.1.2 La souris

L'utilisation de la souris comme modèle de resténose est relativement récente. Plusieurs types de dommages vasculaires ont été utilisés dans les modèles murins de resténose. Premièrement, la rotation d'un petit filin métallique est pratiquée dans la lumière vasculaire aortique. ³⁷⁷ Une déposition plaquettaire limitée est observée avec formation subséquente d'un tissu néointimal de taille variable en fonction du degré de dommage vasculaire causé.

Deuxièmement, un courant électrique est appliqué en région périvasculaire et se déploie à travers la paroi artérielle de l'artère fémorale exposée chirurgicalement. ³⁷⁸ Cela produit un dommage transmural avec dénudation endothéliale et destruction de la plupart des cellules musculaires lisses de la média et des fibroblastes de l'adventice. Un

thrombus mural riche en plaquettes et fibrine se forme rapidement avec infiltration de leucocytes et organisation éventuelle du thrombus. Des cellules musculaires lisses provenant des régions adjacentes nonaffectées migrent vers la région endommagée; environ 3 semaines après le dommage, relativement peu de néointima est formé. Toutefois, la sténose produite par cette lésion est plus importante que celle observée après dommage artériel intraluminal mécanique. Un accroissement de la taille de l'artère soumise à un courant électrique (évaluée par la surface délimitée par la lame élastique externe) est également noté, suggérant un remodelage positif dans les artères endommagées par courant électrique.³⁷⁸

Finalement, un autre type de dommage est produit par la ligature unilatérale de la carotide près de sa bifurcation.³⁷⁹ Ce modèle tire partie de la relation existante entre le débit sanguin, les forces de cisaillement et le développement de remodelage vasculaire positif. La ligature de la carotide commune près de la bifurcation de l'artère carotidienne interrompt le flot sanguin, l'artère demeurant toutefois exposée aux pulsations artérielles. L'endothélium n'est pas dénudé et, excepté pour une zone restreinte à l'endroit de la ligature, il n'y a pas formation de thrombus. Par contre, une perméabilité accentuée de l'endothélium avec détachement partiel de cellules endothéliales du tissu sous-endothélial permet la déposition de plaquettes et de globules rouges dans l'intima. Environ 2 jours après la ligature, une réduction importante du nombre de cellules musculaires lisses de la média, lorsque comparée à une artère contrôle, est compensée par une prolifération subséquente de ces cellules. Une infiltration leucocytaire, particulièrement dans l'adventice et la média, est notée jusqu'à 2 semaines plus tard. Quatre semaines après le dommage, une réduction d'environ 80% de la surface de la lumière vasculaire est observée. Cette réduction fait suite à la formation d'un tissu néointimal riche en cellules musculaires lisses et à la constriction de l'artère, la circonférence de la lame élastique externe (EEL) étant réduite d'environ 25%. Ce modèle offre la possibilité d'identifier des molécules contribuant au remodelage vasculaire en utilisant des souris porteuses d'altérations génétiques ou exprimant des transgènes ciblant des molécules d'intérêt. En ce sens, on observe, 4 semaines après le dommage chez des souris déficientes (*knockout*) pour le gène de la P-sélectine, une réduction d'environ 76% de la production du tissu néointimal mais une circonférence similaire de la EEL.³³² Cela se traduit par une lumière vasculaire accrue de 26% dans les souris déficiente en P-sélectine par rapport à

des souris normales. Une absence de leucocytes dans la paroi artérielle fut aussi notée dans les souris déficientes en P-sélectine tout au long du développement du néointima. Cela illustre bien l'importance de la P-sélectine et des leucocytes dans les processus impliqués dans la formation du néointima.

Un avantage indéniable du modèle murin, sans compter l'existence de nombreux anticorps et sondes diverses, est la possibilité de manipulations génétiques produisant des souches déficientes en un gène d'intérêt ou exprimant un transgène. Cela permet l'observation à un niveau moléculaire, cellulaire et tissulaire de l'effet d'une telle manipulation dans le cadre d'un modèle expérimental. Par contre, le système artériel de la souris diffère de celui des autres espèces couramment utilisées comme modèle de resténose.³⁸⁰ En effet, l'artère de la souris est de très petite dimension, sa lumière mesure environ 300 microns de diamètre; elle ne comporte que très peu de couches de cellules musculaires lisses, environ 2 ou 3 dans la média et ne comporte pas de vasa vasorum. De plus, dans la majorité des cas, des artères saines sont utilisées et le développement de la lésion artérielle après dommage vasculaire dans les divers modèles ne reflète pas ce qui est observé en clinique (absence de formation de thrombus et/ou de dénudation endothéliale et/ou de tissu néointimal riche en matrice extracellulaire et/ou de remodelage vasculaire).

1.3.6.1.3 Le lapin

Contrairement aux modèles expérimentaux précédents, le lapin est principalement utilisé dans des modèles avec dommages répétés permettant d'obtenir une resténose postangioplastie. Il est également possible d'utiliser une approche endoluminale par cathéter. Le lapin est susceptible de développer de l'hypercholestérolémie et des lésions vasculaires rappelant l'athérosclérose lorsque soumis à une diète riche en cholestérol et lipides.

Un des modèles les plus employés consiste, dans un premier temps, à soumettre les lapins à une diète hypercholestérolémique renfermant environ 1-2% de cholestérol et 6-7% d'huile végétale et permettant d'atteindre un niveau très élevé de cholestérol sanguin (1000-2000 mg/dL). Un premier dommage est produit à l'artère iliaque (d'autres artères sont également utilisées) soit par dessiccation de l'endothélium ou par utilisation d'un cathéter ballon. De 3 à 6 semaines plus tard, une lésion concentrique composée

principalement de cellules spumeuses infiltrant la média et l'intima est présente et amène un degré de sténose variable de la lumière vasculaire. Une angioplastie de cette lésion est alors pratiquée consistant en quelques cycles où le ballon est maintenu gonflé pour environ 1 minute à une pression de 5-10 atm. Ce deuxième dommage est plus sévère que le premier, produisant souvent une rupture de la lame élastique interne avec dissection de la média et formation d'un thrombus mural de taille variable selon la sévérité du dommage causé par l'angioplastie.⁸⁴ Environ 4 semaines plus tard, une resténose de la lumière artérielle est observée consécutive à la formation d'un tissu néointimal comportant une matrice extracellulaire abondante et de nombreuses cellules spumeuses gorgées de lipides. Récemment, plusieurs études ont rapporté qu'un remodelage vasculaire positif inadéquat ou qu'un remodelage constrictif était principalement responsable de la resténose dans ce modèle.^{134,253,290,291,296,297} Ce modèle est largement utilisé entre autres pour étudier le rôle des plaquettes, de facteurs de croissance, de l'endothélium et des molécules d'adhésion dans la pathophysiologie de la resténose.^{190,191,219,320,334,381-383}

Outre le coût d'achat et d'entretien relativement modeste des lapins et leur manipulation aisée, ce modèle permet de développer une resténose où la formation d'un néointima et le remodelage seraient impliqués dans son développement. Toutefois, ce modèle diffère de la situation clinique par l'abondance de cellules spumeuses présentes tant dans la lésion athérosclérotique soumise à l'angioplastie que dans le néointima formé par la suite. Le processus expérimental amenant à la formation de la lésion resténotique est complexe dans ce modèle de dommages répétés et le rôle de chacune des étapes est mal connu. Par exemple, Barry et coll.³²⁷ ont étudié ce modèle avec ou sans dessiccation endothéliale initiale, une diète hypercholestérolémique étant donnée aux lapins soumis à une angioplastie de l'artère fémorale puis sacrifiés 28 jours plus tard. Autant la surface de la lumière vasculaire résiduelle que la composition du néointima (cellules spumeuses et cellules musculaires lisses) était similaire avec ou sans dessiccation endothéliale initiale, suggérant que le dommage endothélial initial n'est peut-être pas essentiel au développement de la lésion sténotique dans ce modèle.

Finalement, la pose d'une prothèse périvasculaire associée ou non à une diète hypercholestérolémique chez le lapin est aussi employée pour étudier la formation du tissu néointimal.^{276,384-386} Brièvement, une prothèse périvasculaire, habituellement en

silicone ou en polyéthylène, est placée autour de la carotide commune exposée chirurgicalement, sans provoquer de constriction de l'artère. Dans les heures suivantes, une dénudation endothéliale multifocale est observée avec infiltration de leucocytes, principalement de polymorphonucléaires, tout d'abord en région sous-endothéliale puis à travers la paroi artérielle. Cette infiltration leucocytaire n'était plus visible 7 jours après le dommage. Par la suite, une prolifération de cellules musculaires lisses de la média, notée dès 12 heures après l'intervention, est suivie de l'apparition de cellules musculaires lisses dans la région sous-endothéliale, associées à la production éventuelle d'une matrice extracellulaire riche en collagène.³⁸⁶ Environ 2 semaines après l'intervention, un tissu néointimal concentrique est formé. Si l'animal est soumis à une diète hypercholestérolémique, des cellules spumeuses seront observées dans la média et le tissu néointimal. L'administration d'un anticorps dirigé contre une intégrine β_2 des neutrophiles suite à la pose d'une prothèse périvasculaire, s'est traduite par une diminution marquée de la présence de neutrophiles dans la paroi artérielle sans effet sur la formation du tissu intimal.³⁸⁴ L'infiltration de polymorphonucléaires ne serait donc pas essentiel pour la formation du tissu intimal dans ce modèle.

En résumé, ces modèles expérimentaux chez les rongeurs et le lapin ne reproduisent pas fidèlement les paramètres morphologiques observés chez l'humain avant l'intervention.³⁸⁷ Les instruments utilisés pour créer le dommage vasculaire, de même que la méthode employée pour évaluer la présence de resténose diffèrent de la situation clinique.

1.3.6.2 Carnivores et omnivores

1.3.6.2.1 Le chien

Le chien est un animal très utilisé en recherches cardiovasculaires, principalement dans l'étude de l'infarctus du myocarde et de la contribution des plaquettes à l'occlusion coronaire aiguë.^{387,388} La facilité relative avec laquelle on peut le manipuler et avoir accès au système vasculaire en font un bon candidat expérimental. De plus, les artères coronaires de chien sont d'une dimension similaire aux artères coronaires humaines.³⁷⁴ Cependant, cet animal carnivore ne développe pas d'athérosclérose que ce soit spontanément ou suite à l'exposition à une diète hypercholestérolémique. L'athérosclérose

canine est rapportée essentiellement chez des chiens souffrant d'hypothyroïdisme ou de diabète mellitus, ou suite à une thyroïdectomie expérimentale associée à une diète riche en cholestérol. Même dans ces cas, la lésion vasculaire athérosclérotique, qui n'affecte que tardivement les artères coronaires, est principalement située dans la média et constituée de cellules spumeuses gorgées de lipides.

Bien que les artères carotidiennes, iliaques, rénales ou coronaires ont été employées pour étudier l'impact de nouveaux instruments d'intervention sur le système cardiovasculaire, peu d'études expérimentales chez le chien se sont attardées à la pathophysiologie de la resténose.³⁸⁷ Suite à un dommage vasculaire, induit par angioplastie ou par la pose de prothèses endovasculaires, relativement peu de thrombus est observé, probablement à cause de la grande activité du système fibrinolytique canin.³⁸⁹ La prolifération néointimale est plutôt limitée, n'est pas reliée au degré de dommage causé³⁹⁰ et ne conduit que rarement à une réduction significative de la lumière vasculaire. Le tissu néointimal formé est relativement peu cellulaire et contient des cellules musculaires lisses et des fibroblastes dans une matrice de collagène.³⁷⁶

1.3.6.2.2 Les primates

Parmi les animaux utilisés en laboratoire, les primates présentent la morphologie se rapprochant le plus de l'humain. Plusieurs espèces de primates sont susceptibles, à des degrés divers, de développer des lésions athérosclérotiques, habituellement suite à l'introduction d'une diète enrichie en cholestérol et lipides.³⁹¹ Par exemple, le singe rhésus (*Macaca mulatta*) qui est l'espèce de singe la plus utilisée en recherches, développe de façon spontanée ou associée à une diète hypercholestérolémique, des lésions athérosclérotiques dans l'aorte, les artères carotides, iliaques et coronaires.³⁷⁴ Autant dans leur développement que dans leur morphologie, ces lésions sont très similaires aux lésions humaines. Relativement peu d'études expérimentales de la resténose chez le primate ont été rapportées, la majorité d'entre elles utilisant des artères périphériques.^{301,392-396} Les mécanismes postulés sous-jacent à la resténose post-angioplastie chez le primate semblent être similaires à ceux observés en clinique. En effet, suite à l'angioplastie d'artères iliaques chez le singe cynomolgus athérosclérotique, un thrombus mural, souvent restreint, et des fractures de la plaque athérosclérotique et de la portion

saine de l'artère avec dissection se prolongeant dans la média sont observés.³⁰¹ Une prolifération des cellules musculaires lisses de la média est présente surtout de 4 à 7 jours après le dommage. Un tissu néointimal est observé dès le quatorzième jour post-angioplastie, probablement suite à la migration des cellules musculaires lisses sous l'influence du PDGF³⁹³ et la formation d'une matrice extracellulaire riche en protéoglycans et collagène.³⁰¹ Une augmentation de la surface vasculaire délimitée par la lame élastique externe fut notée 28 jours après le dommage, augmentation plus importante dans les artères présentant le plus de tissu néointimal, suggérant un remodelage compensateur dans ces artères. D'ailleurs dans une étude subséquente, Mondy et coll.³⁹⁴ ont confirmé le rôle du remodelage dans le modèle expérimental de resténose post-angioplastie chez le primate athérosclérotique, une augmentation de la surface totale de l'artère mais non de la surface du néointima étant associée à un accroissement de la surface de la lumière vasculaire résiduelle. Toutefois, une différence potentiellement importante entre ce modèle et la condition clinique doit être mentionnée. Une sténose vasculaire ne se développe que rarement dans les premières années suivant l'introduction de la diète athérosclérotique.³⁹⁷ Moins de 10% des animaux développent des sténoses significatives dans les artères iliaques ou coronaires dans les 3 premières années suivant le début de la diète athérosclérotique.³⁹⁵ Donc, la diminution de la lumière vasculaire notée dans ce modèle n'est pas vraiment une resténose, mais plutôt une perte du gain de la lumière obtenue tout de suite après l'angioplastie.³⁹⁴ De plus, le coût très élevé d'achat et de maintien des primates, le temps requis pour le développement des lésions athérosclérotiques, la difficulté de manipulation de ces animaux et le risque de transmission de zoonoses en font un animal dont l'utilisation est plutôt restreinte comme modèle expérimental de resténose.

1.3.6.2.3 Le Porc

Le porc est une des espèces animales dont la morphologie et la physiologie cardiovasculaire sont le plus similaires à l'humain. Sa taille permet l'utilisation d'équipement standard utilisé en clinique, tant l'équipement d'intervention, par exemple, cathéters ballon, prothèses endovasculaires, que d'analyse, comme l'échographie endovasculaire. L'activation des plaquettes porcines suite à divers agonistes est similaires

à ce qui est observé chez l'humain. ³⁹⁸ La morphologie des neutrophiles porcins est semblable aux neutrophiles humains; bien que des différences quantitatives existent, les enzymes cytoplasmiques présents dans les neutrophiles humains sont également retrouvés chez le porc. ³⁹⁹ Le diamètre des artères coronaires porcines est analogue à celui des artères coronaires humaines et tout comme l'humain la vascularisation myocardique collatérale chez le porc est peu développée. Le porc est également susceptible de développer des lésions athérosclérotiques soit de façon spontanée (après plusieurs années) ou suite à l'administration d'une diète hypercholestérolémique. Le développement de cette lésion, du passage d'une strie lipidique à une plaque athérosclérotique avec calcification, sa distribution et la morphologie de ces lésions sont semblables à l'humain. ^{374,400} Suite à une diète riche en cholestérol et lipides, les porcs présentent un profil lipidique sanguin similaire à celui observé en clinique, avec une augmentation marquée du cholestérol sanguin, du taux de LDL et avec diminution du ratio HDL/LDL. ³⁷⁶ Bien que l'achat de jeunes porcelets est relativement peu dispendieux, leur croissance rapide en limite habituellement l'usage à des études de courte durée. ^{374,376} Toutefois, l'emploi de race miniature, comme le Yucatan, a facilité l'utilisation, dans des études de plus longue durée, de porcs démontrant des lésions athérosclérotiques dans des artères coronaires ou périphériques. ^{293,294,400,401} Un désavantage potentiel du porc est une propension à la thrombose plus importante que l'humain, probablement reliée à un taux de plasminogène circulant plus faible. ³⁸⁹

Autant les artères périphériques que les artères coronaires ont fait l'objet d'intervention dans le but d'étudier soit les mécanismes impliqués dans la réponse d'une paroi artérielle endommagée, soit l'efficacité de composés, de nouvelles prothèses endovasculaires ou d'appareils d'intervention, comme le laser, dans la prévention de la resténose.

Les artères carotides porcines ont principalement été utilisées dans le cadre d'études ayant pour objet la thrombose artérielle et les événements aigus post-angioplastie; quelques études se sont attardées à la resténose post-angioplastie. Habituellement via une artériotomie fémorale, après ponction ou dissection, un cathéter ballon de 7 ou 8F est avancé de façon rétrograde dans l'aorte, sous contrôle angiographique, jusqu'à l'endroit désiré dans les carotides communes. ⁸⁶ Dans la plupart des cas, les carotides sont

soumises à une série de cinq dilatations d'une durée de 30 secondes, entrecoupées de pauses d'une minute, à une pression d'environ 6 atm (selon le ballon utilisé). Suite à cette procédure, une lésion souvent excentrique est produite, un thrombus mural riche en plaquettes et parfois occlusif se forme rapidement, l'importance de ce thrombus est fonction de la sévérité du dommage causé par l'angioplastie.⁸⁵ Une vasoconstriction proximale et distale à la région dilatée est également notée,¹²⁰ vasoconstriction dont l'intensité est fonction du degré de dommage causé et de l'importance de l'adhésion plaquettaire et neutrophilique.^{97,98,100,120} Quoique les neutrophiles peuvent adhérer directement à la paroi artérielle endommagée, l'adhésion des neutrophiles à la paroi artérielle endommagée est largement dépendante de la présence de plaquettes^{97,98} et est modulée par les forces de cisaillement.⁹⁹ Tel que démontré par Merhi et coll.,¹⁰⁰ bien que la déposition plaquettaire suite à un dommage sévère n'est pas significativement influencée par une diminution importante des neutrophiles, la vasoconstriction distale est réduite d'environ 40%, confirmant le rôle des neutrophiles dans la modulation de la vasoconstriction aiguë post-angioplastie. Ces études démontrent que non seulement la déposition plaquettaire, mais également l'adhésion des neutrophiles et la vasoconstriction distale sont proportionnelles au degré de dommage causé par l'angioplastie. La formation d'un tissu néointimal, suite à la prolifération, migration des cellules musculaires lisses dans l'intima et le thrombus et leur formation subséquente d'une matrice extracellulaire riche en collagène et protéoglycans, est notée dès 14 jours suivant le dommage⁸⁶ pour atteindre un maximum vers 28 jours post-angioplastie.⁴⁰² La production de ce tissu néointimal est dépendante de la sévérité du dommage causé, un endommagement superficiel, qui ne pénètre pas la média, ne stimule que très peu la formation d'un néointima. La réendothélialisation de la lésion carotidienne s'effectue par les cellules endothéliales en bordure de la lésion et est largement complétée dès 21 jours après l'angioplastie.⁴⁰² Toutefois, ce modèle produit un dommage unique à des artères saines. La réponse vasculaire, en terme d'adhésion des plaquettes, des neutrophiles et de formation du néointima, d'une artère carotide athérosclérotique ou pathologique suite à une angioplastie pourrait être différente et demeure à déterminer.

D'autres artères périphériques ont également été utilisées, notamment les artères iliaques et fémorales, particulièrement chez le miniporc athérosclérotique.

293,294,400,401 Contrairement au modèle carotidien, ce modèle est un modèle de dommages répétés. De façon similaire au modèle expérimental de lapin hypercholestérolémique, ces porcs sont soumis à une diète riche en cholestérol et en lipides; environ 2 semaines plus tard, une dénudation endothéliale des artères fémorales et/ou iliaques est pratiquée à l'aide d'un cathéter ballon d'environ 5 ou 6F placé dans le système vasculaire via une artériotomie carotidienne puis avancé, sous contrôle angiographique, de façon antérograde dans l'aorte jusqu'à l'endroit désiré. Au moins 4 semaines plus tard, une angioplastie est pratiquée au même endroit et les animaux sont sacrifiés environ 6 semaines plus tard. Ce modèle permet le développement de lésions sténotiques athérosclérotiques complexes très similaires aux lésions humaines. Suite à l'angioplastie, à la fois la production d'un tissu néointimal et un remodelage négatif contribuent à la resténose,²⁹⁴ le remodelage étant le mécanisme le plus important dans ce modèle.²⁹³

L'artère coronaire porcine a été largement employée pour étudier l'impact de composés pharmacologiques dans la prévention de la resténose ou dans le développement de nouveaux appareils d'intervention. 211,277,280,358,359,403-410 Habituellement, ce modèle n'implique pas de diète hypercholestérolémique et consiste en une angioplastie d'artères coronaires saines.³⁰² Brièvement, via une artériotomie carotidienne ou fémorale, un cathéter ballon est avancé sous contrôle angiographique jusqu'à l'endroit désiré dans les artères coronaires. Un dommage vasculaire est causé par angioplastie avec ou sans pose de prothèses endovasculaires (stents). Ces deux méthodes se traduisent, environ 28 jours après le dommage, par la production d'un néointima abondant dont la composition est similaire à l'humain.³⁵⁸ Autant suite à une angioplastie, qui produit un dommage souvent excentrique, qu'après la pose d'un stent, dont chaque mèche produit un dommage focal, la production du néointima est proportionnelle au degré de dommage causé par l'intervention.^{358,411} Récemment, un modèle de dommage répété à l'artère coronaire par angioplastie a été rapporté.⁴¹² Bien qu'un dommage répété dans la coronaire ne semble pas se traduire par une production de néointima plus substantielle que suite à une simple angioplastie, la lésion observée est plus concentrique, se rapprochant du type de lésion observé après la pose d'un stent.

Des études récentes ont également suggéré qu'un remodelage vasculaire constrictif, principalement d'origine adventitielle, est un mécanisme important de la réduction de la lumière vasculaire observée dans les artères coronaires porcines suite à l'angioplastie. 277,295,308,413 Toutefois, l'importance du remodelage vasculaire dans la resténose coronaire post-angioplastie reste à confirmer; une étude récente suggère que le remodelage vasculaire constrictif n'est pas impliqué dans le développement de resténose, suite à l'angioplastie d'artères coronaires porcines préalablement endommagées. 292

En somme, le modèle porcin a surtout été utilisé pour l'introduction de stratégies destinées à inhiber la prolifération/migration des cellules musculaires lisses ou de nouvelles procédures/équipements d'angioplastie. 302 Par ses avantages pratiques et sa similitude morphologique et physiologique avec l'humain, le porc est un des modèles expérimentaux le mieux adapté à l'étude de pathologies cardiovasculaires.

1.3.7 Divergence entre les résultats cliniques et expérimentaux

Plusieurs modèles expérimentaux ont donc été employés dans le cadre d'études soit de la prévention ou de mécanismes impliqués dans la resténose. Bien que plusieurs agents pharmacologiques soient efficaces pour réduire la prolifération/migration des cellules musculaires lisses chez des modèles expérimentaux, la grande majorité de ces agents se sont avérés inefficaces en clinique pour prévenir l'apparition de resténose. On peut regrouper les facteurs pouvant potentiellement expliquer cette divergence en diverses catégories reliées : 1) aux modèles expérimentaux; 2) à l'analyse des résultats et 3) à des différences de protocole entre les modèles expérimentaux et les études cliniques.

1.3.7.1 Facteurs reliés aux modèles expérimentaux

Des différences importantes sont évidentes en terme de production du tissu néointimal et de réponse face à diverses thérapies entre ces modèles expérimentaux. Parmi les facteurs pouvant expliquer ces différences, mentionnons l'utilisation d'artères élastiques vs musculaires, des degrés de dommage différents et une implication variable du thrombus, des cellules musculaires lisses, de la formation de la matrice extracellulaire et de facteurs de croissance entre les divers modèles.

1.3.7.1.1 Type d'artères utilisées

Tout d'abord, l'anatomie artérielle diffère selon les espèces. Premièrement, l'intima artérielle humaine présente un épaissement multifocal associé à la présence de cellules musculaires lisses dans des artères comme l'aorte, les artères carotides, fémorales, iliaques et rénales. Ces cellules musculaires lisses sont disposées longitudinalement dans une matrice de collagène et d'élastine. Ces épaissements, surtout observés aux bifurcations artérielles, représentent une adaptation du vaisseau à des fluctuations des forces hémodynamiques.³⁷³ Parmi les espèces animales ci-haut mentionnées, seul le porc et le primate sont susceptibles de développer des lésions intimaux comparables. L'absence de lésions artérielles athérosclérotiques préalables à l'angioplastie dans certains modèles expérimentaux est un autre facteur pouvant avoir un impact dans le développement de la resténose. L'aorte et les artères périphériques, comme les artères carotides et iliaques, sont des artères dont la paroi comporte plus d'élastine et moins de cellules musculaires lisses que des artères musculaires, comme les coronaires et les fémorales.³⁷⁴ Étant donné le rôle des cellules musculaires lisses dans la formation du tissu néointimal, cela est possible que des artères musculaires produisent plus de néointima que des artères élastiques. D'ailleurs, tel que rapporté par Badimon et coll.,⁴⁰⁸ la sténose vasculaire de même que l'adhésion des plaquettes 1 heure après le dommage étaient plus importantes suite à une angioplastie d'artères coronaires que d'artères carotidiennes chez le porc. Cette sténose vasculaire accrue observée dans les artères coronaires fut associée à une production plus substantielle de néointima. Toutefois, ils ne font pas mention de la présence ou non de remodelage vasculaire dans les artères carotidiennes ou coronaires étudiées. De plus, cette étude réfère à des artères saines. La réponse des artères carotidiennes athérosclérotiques ou pathologiques après une angioplastie pourrait être différente. D'ailleurs, une étude récente souligne que la production de tissu néointimal, suite à une angioplastie d'artères carotidiennes préalablement endommagées 14 jours auparavant par dénudation endothéliale, était plus abondante qu'après un seul dommage vasculaire.⁴¹⁴ De plus, la prolifération des cellules musculaires lisses observées à la suite de l'angioplastie était principalement limitée au tissu néointimal présent, et non pas dans la média, et était associée à l'infiltration de cellules inflammatoires dans le néointima.⁴¹⁴

1.3.7.1.2 Type et sévérité du dommage vasculaire

Le type et la sévérité du dommage artériel causé varient grandement entre les divers modèles expérimentaux. Par exemple, le dommage vasculaire produit dans l'artère coronaire de porc ou dans l'artère fémorale/iliaque de lapin est souvent profond avec dissection de la média. Ce type de dommage, similaire à ce qui est observé en clinique, est suivi d'une production relativement abondante de néointima. Par contre, dans le modèle expérimental de rat, une déendothélialisation est pratiquée, laissant intacte la lame élastique interne et la média avec très peu de formation de néointima. Sachant l'importance de la fracture de la lame élastique interne et de la sévérité du dommage dans la formation du néointima, cela pourrait expliquer la variation dans la production de néointima selon les modèles expérimentaux.

1.3.7.1.3 Importance relative du thrombus et des cellules musculaires lisses

Alors qu'une mince couche de plaquettes est généralement observée suite à une déendothélialisation de la carotide de rat, un thrombus riche en plaquettes se développe chez le lapin. Un thrombus mural parfois occlusif, riche en plaquettes mais aussi en fibrine est la norme suite à une angioplastie d'artères périphériques ou coronaires porcines. Cette variation pourrait être secondaire à des différences interspèces dans le potentiel fibrinolytique.³⁸⁹ Étant donné le rôle du thrombus non seulement comme matrice qui sera envahie par des leucocytes et cellules musculaires lisses, mais aussi comme réservoir de facteurs de croissance et de substances mitogéniques, une différence dans le volume de thrombus produit peut donc avoir un impact sur le développement de la lésion resténotique. Les divers modèles expérimentaux discutés démontrent aussi une implication variable des cellules musculaires lisses. Alors que la prolifération des cellules musculaires lisses de la média est importante et très bien décrite chez le rat, cette phase proliférative semble être moins présente chez le porc et l'humain.⁴¹⁵

1.3.7.2 Analyse et objectifs

Bien que la resténose dans les études cliniques est principalement définie sur la base de critères angiographiques, l'analyse quantitative de sections histologiques est généralement le critère retenu dans les études expérimentales. Dans certains cas, cette

différence peut expliquer, du moins en partie, l'absence de bénéfice en clinique d'une drogue jugée efficace dans un modèle expérimental. Par exemple, alors que l'utilisation de cilazapril (un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine) chez le rat se traduit par une inhibition d'environ 80% de la production du néointima (lorsqu'exprimée en fonction de la surface de la média), la réduction réelle n'est que d'environ 0.09 mm, ce qui est en dessous du seuil de détection angiographique.¹²⁴ De plus, les études expérimentales utilisant des artères saines, par exemple le modèle expérimental de rat, mesurent une réduction de la lumière vasculaire par rapport à la dimension initiale, suite à la formation d'un néointima.²⁸⁹ On évalue donc une sténose, ce qui est différent de la situation clinique où la resténose est souvent définie comme une perte de plus de 50% du gain initial de la lumière vasculaire, gain produit par l'angioplastie d'un vaisseau présentant déjà une sténose (la plupart du temps reliée à une plaque athérosclérotique). Bien que ces études ont permis de mieux comprendre les mécanismes cellulaires impliqués suite à un dommage vasculaire, la sténose observée dans plusieurs modèles expérimentaux est donc un concept différent de la resténose clinique. Cela souligne, à mon sens, l'importance, de façon à se rapprocher de la situation clinique, d'utiliser dans les modèles expérimentaux de resténose, à défaut d'artères athérosclérotiques, des artères ayant déjà subies un dommage vasculaire et présentant un tissu néointimal.

Plusieurs études expérimentales de la resténose ne réfèrent pas à des segments de référence lors de l'évaluation de la lumière vasculaire résiduelle, contrairement à ce qui est fait en clinique. De plus, certaines n'ont pas tenu compte de la surface totale du vaisseau dans leur évaluation de l'impact du composé d'intérêt sur l'apparition de resténose, sous-estimant l'impact du remodelage vasculaire.³⁰² Finalement, la période de suivi entre l'intervention et l'évaluation de la resténose est souvent d'environ 1 mois dans les modèles expérimentaux alors qu'en clinique elle est plutôt de 4 à 6 mois. Prolonger cette période se traduirait peut-être par une perte de l'effet bénéfique de certains composés noté dans les modèles expérimentaux.¹⁵³

1.3.7.3 Différences entre protocoles expérimentaux et cliniques

Tel que rapporté par Currier et coll.,⁴¹⁶ la dose actuelle de la drogue administrée au patient est souvent beaucoup plus faible que la dose efficace évaluée dans les modèles

expérimentaux. Par exemple, la dose la plus élevée de cilazapril utilisée chez les patients en prévention de la resténose était d'environ 20 mg/jour soit environ 0.29 mg/kg/jour, pour un patient de 70 kg. ^{342,343} Comme la dose efficace chez le rat était de 10 mg/kg/jour, la dose clinique ne représentait donc que 2.5% de la dose expérimentale. De plus, alors que dans plusieurs études animales la drogue est administrée avant l'intervention (parfois plusieurs jours avant), un tel prétraitement n'est pas souvent effectué en clinique. ⁴¹⁷ Un prétraitement est potentiellement important pour permettre d'atteindre un niveau plasmatique de drogue permettant d'exercer son effet. ¹⁵⁴ Par exemple, une étude clinique récente (portant sur un nombre restreint de patients), rapporte que l'administration quotidienne de cilazapril, débutée 7 jours avant l'intervention et poursuivie jusqu'à 6 mois post-angioplastie, s'est traduite par une réduction d'environ 40% du taux de resténose. ⁴¹⁸ La durée du traitement peut aussi être insuffisante dans les études cliniques, par exemple dans le cas d'antithrombotiques comme l'hirudine. ²¹¹

Jusqu'à récemment, la formation du tissu néointimal était considérée comme centrale au développement de la resténose. Plusieurs composés dirigés contre la prolifération/migration des cellules musculaires lisses ont donc fait l'objet d'études expérimentales et cliniques. Comme mentionné précédemment, le remodelage vasculaire chez l'homme est aussi sinon plus déterminant que le néointima dans l'apparition de la resténose. Dans tous les modèles expérimentaux, excepté le rat, la resténose post-angioplastie ne serait pas reliée principalement à la formation du néointima, mais plutôt à un remodelage constrictif et/ou une absence de remodelage positif. ³⁰²

En résumé, divers modèles animaux ont été employés dans le cadre d'études reliées à la resténose post-angioplastie. Alors que la valeur prédictive en clinique des études effectuées chez les rongeurs et le lapin est faible, les études utilisant des animaux de plus grande taille, particulièrement le porc, permettent de mieux prévoir les résultats observés en clinique. Bien que des modèles de rongeurs, particulièrement modifiés génétiquement, puissent être fort utile dans l'étude de mécanismes spécifiques, le porc est le modèle animal qui, autant pour des considérations d'ordres pratiques que pathophysiologiques, est le plus approprié pour étudier le développement de la resténose post-angioplastie. ³⁸⁷

L'angioplastie est une approche de revascularisation utilisée fréquemment dans les cas d'occlusions vasculaires dont la principale cause sous-jacente est l'athérosclérose. Outre une occlusion aiguë, une des principales limites de l'angioplastie demeure un pourcentage élevé de resténose se développant dans les semaines et mois après l'intervention. La resténose est une pathologie complexe et multifactorielle où les plaquettes, les leucocytes et la paroi artérielle interagissent dans le temps, ces interactions se traduisant par la formation d'un tissu néointimal et l'apparition ou non de resténose. Plusieurs modèles expérimentaux ont été utilisés pour tenter de définir les mécanismes sous-jacents au développement de la resténose ou pour vérifier l'efficacité de traitements pharmacologiques. Toutefois, très peu de composés ayant démontré une efficacité dans des modèles animaux ont démontré une efficacité similaire chez l'humain. Une des raisons pouvant expliquer cette divergence est l'utilisation de modèles animaux présentant des différences significatives avec la lésion retrouvée chez l'humain.

Dans le prochain chapitre, nous verrons les interactions plaquettes-neutrophiles et les molécules d'adhésion pouvant permettre ces interactions.

CHAPITRE II : INTERACTIONS PLAQUETTES-NEUTROPHILES ET MOLECULES D'ADHESION

2.1 Généralités

2.1.1 Les neutrophiles

Les neutrophiles sont habituellement le premier type de leucocyte présent aux sites d'inflammation aiguë. Produit à partir de cellules souches myéloïdes de la moelle osseuse, le neutrophile, une fois les diverses étapes de sa maturation complétée, est relâché en circulation environ 6 jours plus tard. Sa demie-vie en circulation est courte, d'environ de 6 à 8 heures; après avoir migré dans des tissus, le neutrophile ne peut revenir dans la circulation sanguine. Le neutrophile est une cellule d'environ 10 à 12 microns de diamètre avec un noyau polylobulé et un cytoplasme abondant riche en granules mais relativement pauvre en organelles. Les granules des neutrophiles sont classifiés selon leur positivité à la peroxidase. Les granules peroxidase-positif (granules azurophiles ou primaires) contiennent plusieurs protéases et hydrolases dont la myéloperoxidase, des cathepsines, du lysozyme et de l'élastase. Les granules peroxidase-négatif sont subdivisés en granules spécifiques (secondaires) selon la présence de lactoferrine et en granules tertiaires, riches en gélatinase mais non en lactoferrine.⁴¹⁹ L'activation d'un neutrophile se traduit par une polarisation de sa morphologie, avec apparition d'un uropode, de lamellipodes (pour la migration) et de pseudopodes (pour la phagocytose) de même que par des changements biochimiques, dont la dégranulation, la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène (RLO) et la sécrétion de médiateurs néoformés (leucotriènes, PAF et TxA_2). La fonction principale des neutrophiles dans l'inflammation est de phagocyter et détruire les envahisseurs microbiens par leurs enzymes protéolytiques et par des radicaux libres dérivés de l'oxygène, et de participer à la production de facteurs chémotactiques. Alors que les granules azurophiles facilitent plutôt la digestion du matériel phagocyté par les neutrophiles, les granules peroxidase-négatif sont des granules de sécrétion qui jouent un rôle important dans l'initiation de la réaction inflammatoire.⁴¹⁹ En fait, en plus d'être des réservoirs d'enzymes protéolytiques ou d'agents bactéricides, ces granules sont également des réservoirs de protéines membranaires qui sont incorporées dans la membrane plasmatique du neutrophile lors de la fusion des granules avec cette membrane et de

l'exocytose. De plus, le cytoplasme du neutrophile renferme également des vésicules de sécrétion. Probablement formées par endocytose, les vésicules de sécrétion ne contiennent que du plasma. Par contre, leur membrane est riche en récepteurs et protéines transmembranaires, comme des intégrines, entre autres Mac-1.⁴²⁰

Le neutrophile peut être activé suite à son adhésion à divers substrats, principalement via une intégrine β_2 , ou suite à l'action de divers médiateurs.⁴²¹⁻⁴²³ Plusieurs substances peuvent activer le neutrophile, par exemples des cytokines (IL-1, TNF, IL-8), des leucotriènes (LTB_4), des dérivés du complément (C3a, C5a), du PAF, des LDLs oxydés, et des peptides d'origine bactérienne (fMLP, lipopolysaccharide).⁴²⁴ Le PAF est un phospholipide biologiquement actif élaboré à partir de lyso-PAF, produit par l'action de la phospholipase A_2 , converti en PAF par une acétyl transférase.⁴⁶ Plusieurs types cellulaires peuvent synthétiser du PAF, notamment les plaquettes, les neutrophiles, les macrophages et les cellules endothéliales. En plus d'être un agoniste puissant des plaquettes, le PAF est capable d'activer les neutrophiles, stimulant leur chémotaxis, leur expression de molécules d'adhésion, leur agrégation de même que la libération d'enzymes protéolytiques et la production de RLO.⁴²⁵⁻⁴²⁷ L'action microbicide des neutrophiles est tributaire d'un système dépendant de l'oxygène et d'enzymes protéolytiques dont l'action est indépendante de l'oxygène. Suite à l'activation du neutrophile et à la phagocytose, sa consommation d'oxygène est fortement augmentée, l'activation de l'enzyme NADPH oxydase (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) présente dans la membrane plasmique, se traduit par l'oxydation du NADPH cytoplasmique en NADP^+ , générant deux molécules de superoxyde (O_2^-) se transformant en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par dismutation.⁴⁵ Le peroxyde d'hydrogène peut être transformé, en présence d'éléments métalliques, en radical hydroxyl via la réaction de Fenton. La génération de RLO est dépendante aussi des granules peroxidase-négatifs dont la membrane renferme un cytochrome, constituant de la NADPH oxydase, et des granules azurophiles, leur myéloperoxidase catalysant à partir de peroxyde d'hydrogène et d'ions chlorés, la formation d'acide hypochlorique (HOCL), puissant oxydant et bactéricide.⁴⁴ Ces RLO, lorsque relâchés dans le milieu extracellulaire, bien qu'ayant une demie-vie très courte, peuvent de façon non-spécifique altérer les tissus environnants par la dégradation de certaines protéines comme des protéoglycans et du collagène. Leur interaction avec les

lipides membranaires se traduit par la peroxydation de ces lipides, amenant une perte de l'intégrité de la membrane, une diminution de l'activité enzymatique et éventuellement une lyse cellulaire.

Les RLO peuvent également contribuer au recrutement des neutrophiles via l'activation du complément ainsi que par l'induction de l'expression de P-sélectine et de la production de PAF retrouvés à la surface des cellules endothéliales.

Les granules des neutrophiles renferment plusieurs enzymes protéolytiques dont la cathepsine G et l'élastase, protéinases à sérine contenues dans les granules azurophiles, et des métalloprotéases, la collagénase, présente dans les granules secondaires et la gélatinase, contenue principalement dans les granules tertiaires. Ces protéases sont capables de dégrader divers éléments de la matrice extracellulaire, dont le collagène, l'élastine, la fibronectine et des protéoglycans. Lors de contact étroits entre les neutrophiles et les plaquettes, protégeant ces enzymes des antiprotéases plasmatiques, ^{104,428} la cathepsine G est un agoniste puissant des plaquettes. ^{429,430} L'élastase, en activant directement la GpIIb/IIIa des plaquettes, potentialise l'agrégation plaquettaire induite par la cathepsine G. ⁴³¹ Bien que les métalloprotéases soient libérées sous une forme inactive, l'élastase et les RLO des neutrophiles peuvent les activer, soulignant la coopération existant entre les enzymes protéolytiques et le métabolisme oxydatif du neutrophile. De plus, les neutrophiles activés libèrent des médiateurs inflammatoires dérivés des phospholipides membranaires ayant un impact sur le développement de la lésion tissulaire. ⁴³² La production de leucotriènes, principalement LTB_4 par les neutrophiles activés via l'action de la 5-lipooxygénase sur l'acide arachidonique et la production de PAF, via l'action de la phospholipase A_2 et d'une acétyltransférase, sont particulièrement importantes. ⁴⁶ La génération de LTB_4 et PAF, puissants agents chimotactiques et activateurs des neutrophiles, peut permettre une amplification des lésions et une augmentation de la perméabilité vasculaire. ⁴⁷ Le PAF, de même que des leucotriènes produites par les neutrophiles (LTC_4 , LTD_4 , LTE_4) sont également capables de produire une vasoconstriction.

Les neutrophiles sont responsables d'une grande partie du dommage tissulaire observé suite à la reperfusion de tissus ischémiques, par exemple lors d'infarctus du myocarde.

Suite à un dommage artériel par angioplastie, les neutrophiles sont retrouvés dans le thrombus où ils peuvent interagir avec les plaquettes et moduler la réponse vasculaire.

2.1.2 Les plaquettes

Les plaquettes des mammifères sont des fragments cytoplasmiques de mégakaryocytes produits par des cellules souches de la lignée hématopoïétique. Dans la plupart des espèces animales, les plaquettes peuvent être produites en 4 jours. Suite à leur relâchement dans la circulation sanguine, elles pourront y circuler pour environ 9 jours, selon leur utilisation. Les plaquettes nonactivées sont des cellules discoïdes d'environ 2 à 4 microns de diamètre chez la plupart des espèces animales. La zone périphérique de la plaquette contient la membrane externe, le système canaliculaire et la couche externe de glycocalix (formé par les régions extracellulaires des glycoprotéines plaquettaires).⁴³³ La membrane externe de la plaquette, dans la plupart des espèces animales, comporte des pores qui communiquent avec un système canaliculaire (excepté chez le bovin) dérivé du mégakaryocyte. Le cytoplasme de la plaquette contient un cytosquelette fibrillaire contractile composé de microfilaments et de microtubules permettant de maintenir la forme de la plaquette, mais aussi responsable du changement de forme et de la contraction des plaquettes. Le cytoplasme plaquettaire renferme également du glycogène et des organelles comme des mitochondries, un système tubulaire dense, responsable du stockage de calcium, des lysosomes, riches en hydrolases acides et divers types de granules. On retrouve dans les plaquettes deux principaux types de granules, à savoir les granules α et les granules denses. Les granules denses renferment de l'ADP, de l'ATP, de la sérotonine, de l'épinéphrine, de l'histamine et du calcium ionisé. Quant à eux, les granules α contiennent plusieurs substances, dont le facteur de von Willebrand (vWf), le fibrinogène, la fibronectine, le facteur V, le facteur de croissance transformant- β (TGF- β), le facteur plaquettaire 4, la thrombospondine et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF). On retrouve également dans la membrane des granules α , de la P-sélectine et certaines intégrines, comme GpIIb/IIIa et GpIb.^{434,435} L'intégrine GpIIb/IIIa est également présente dans la membrane du système canaliculaire. Récemment, la présence de P-sélectine et de GpIIb/IIIa dans la membrane des granules denses a été rapportée.^{436,437} Suite à son activation par des médiateurs solubles ou par

des éléments de la paroi vasculaire, la morphologie de la plaquette se modifie, devenant plus sphérique, hérissée de projections cytoplasmiques; le cytosquelette de microtubules et de microfilaments est important pour permettre le changement de forme et le mouvement centripète des granules. Les granules de sécrétion sont concentrés au centre de la plaquette et se fusionnent avec les membranes du système canaliculaire, permettant la sécrétion de leur contenu vers le milieu extracellulaire. Des médiateurs relâchés ou produits par les plaquettes favorisent l'activation d'autres plaquettes, l'agrégation plaquettaire et influencent le tonus vasculaire. L'activation plaquettaire se traduit aussi par l'expression de molécules d'adhésion à la surface des plaquettes, comme la P-sélectine, et l'augmentation de l'expression et changement de conformation d'intégrines, particulièrement de l'intégrine β_3 , GpIIb/IIIa (voir section molécules d'adhésion) favorisant le contact avec d'autres types cellulaires comme les leucocytes. Suite à un dommage vasculaire, le collagène, particulièrement de type fibrillaire (comme le collagène I et III) et la thrombine sont les principaux activateurs des plaquettes. 170,438 La sécrétion subséquente de médiateurs contenus dans les granules, comme l'ADP, et la synthèse de TxA_2 et de facteur activateur des plaquettes (PAF) va contribuer à amplifier l'activation et l'agrégation plaquettaire conduisant à la formation éventuelle d'un thrombus mural. 439,440 La présence de thrombine, produite par la cascade de la coagulation, amplifie aussi l'agrégation par le recrutement d'autres molécules de GpIIb/IIIa. De plus, la thrombospondine libérée par les plaquettes et la thrombine, qui convertit le fibrinogène en fibrine, va contribuer à stabiliser le thrombus. Contrairement à des agonistes comme le collagène et la thrombine, l'ADP est stocké dans les granules denses des plaquettes. C'est un agoniste important des plaquettes, particulièrement pour faciliter la propagation de l'agrégation plaquettaire. Il induit une augmentation rapide de la teneur intracellulaire en calcium ionisé, initialement via une augmentation de l'influx de calcium extracellulaire mais aussi suite à la mobilisation du calcium intracellulaire contenu dans le système tubulaire dense 441,442 L'ADP induit également une augmentation de la liaison au fibrinogène de la plaquette via l'intégrine GpIIb/IIIa, suite à une modification de sa conformation, et le relâchement additionnel d'ADP par les plaquettes favorisant la propagation de l'activation et de l'agrégation plaquettaire. La thromboxane A_2 (TxA_2) est issue du métabolisme de l'acide arachidonique et est rapidement produite lors de l'activation plaquettaire. Suite à l'action d'une phospholipase,

de l'acide arachidonique est libéré des phospholipides membranaires. L'acide arachidonique est ensuite soumis à diverses oxygénases dont des cyclooxygénases. L'action de la cyclooxygénase (COX-1 dans les plaquettes) se traduit par la formation éventuelle de prostaglandine H₂; cette dernière est métabolisée en TxA₂ par la thromboxane A₂ synthétase plaquettaire.⁴⁴³ Composé ayant une demie-vie très courte (quelques secondes), la TxA₂ est donc néoformée par les plaquettes suite à leur activation. En plus d'être un agoniste puissant des plaquettes, capable de stimuler l'activation, la sécrétion et l'agrégation, elle est aussi un vasoconstricteur important.

La formation d'un thrombus mural, parfois occlusif, suite à l'agrégation plaquettaire et à la formation de fibrine par la cascade de la coagulation est centrale dans les complications de pathologies cardiovasculaires courantes, comme l'athérosclérose.

2.2 Interactions plaquettes-neutrophiles

L'angioplastie, modalité thérapeutique utilisée fréquemment dans les cas d'occlusions vasculaires, produit souvent une lésion vasculaire profonde avec formation d'un thrombus riche en plaquettes, infiltration de neutrophiles et apparition d'un vasospasme. L'adhésion des plaquettes et des neutrophiles, bien que nécessaire pour promouvoir l'homéostasie vasculaire, peut aussi contribuer au développement de conditions pathologiques, comme la thrombose, le vasospasme et la resténose. D'ailleurs, des interactions entre les plaquettes et les leucocytes sont impliquées dans diverses pathologies cardiovasculaires.^{60,61,89,444} Ces interactions physiques et métaboliques entre les plaquettes et les neutrophiles contribuent à la modulation et à la localisation d'événements thrombotiques et inflammatoires par des mécanismes permettant une activation et une collaboration mutuelle de leurs métabolismes intracellulaires.

2.2.1 Le métabolisme transcellulaire

L'acide arachidonique membranaire peut être métabolisé par la voie de synthèse de la 5-lipooxygénase en acide hydroperoxyeicosatétraénoïque (HPETE), précurseur des leucotriènes. LTA₄ (leucotriène A₄) est d'abord générée puis est soit hydrolysée en LTB₄ ou conjuguée avec la glutathione (via la glutathione-S-transférase) produisant ainsi LTC₄. LTB₄ est un facteur chémoattractif puissant pour les leucocytes, stimulant

également leur agrégation, leur production de superoxyde et leur adhésion puis diapédèse à travers l'endothélium. ⁴⁴⁵ La LTC₄ et ses dérivés, LTD₄ et LTE₄, sont capables d'induire de la vasoconstriction, avec augmentation de la perméabilité vasculaire et bronchoconstriction. Les plaquettes ne possèdent pas de 5-lipooxygénase et ne peuvent donc pas produire de LTA₄. Toutefois, on note, lorsque des plaquettes dont l'acide arachidonique est radioactif sont mises en présence de neutrophiles stimulés, une production de LTB₄ radioactive, soulignant le transfert de l'acide arachidonique des plaquettes vers les neutrophiles ⁸⁹. Les neutrophiles peuvent également produire du LTB₄ à partir du 12-HETE produit par les plaquettes (via leur 12-lipooxygénase). ⁴⁴⁶ Ce transfert de dérivés de l'acide arachidonique est toutefois bidirectionnel, les plaquettes, possédant l'enzyme glutathione-S-transférase, étant capables de produire de la LTC₄ ou du lipoxin A₄ et B₄ (à partir de leur 12-lipooxygénase) en métabolisant la LTA₄ générée par les neutrophiles. ^{104,428} Le lipoxin A₄ est capable d'inhiber la chémotaxie des neutrophiles et de diminuer leur adhésion aux cellules endothéliales, via une diminution de l'expression endothéliale de la P-sélectine. ⁴⁴⁷ Les neutrophiles peuvent également contribuer à amplifier la production de thromboxane A₂ des plaquettes (via la cyclooxygénase) en générant de l'acide arachidonique libre. ⁴⁴⁸ En plus de stimuler l'agrégation des plaquettes et la vasoconstriction, TxA₂ est capable d'amener une augmentation de l'adhésion des neutrophiles en stimulant une augmentation de l'expression des intégrines β_2 à leur surface. ⁴⁴⁹ Une coopération existe également entre les plaquettes et les neutrophiles pour la production de PAF; une production accrue de PAF est observée lorsque les deux types cellulaires sont activés, par rapport à la production d'une ou l'autre des populations cellulaires activées, et serait associée au transfert de lyso-PAF des plaquettes vers les neutrophiles, le transformant en PAF. ⁴⁵⁰ Le PAF, en plus d'être un vasoconstricteur, a de nombreuses propriétés proinflammatoires dont notamment d'être un facteur chémotactique et activateur pour les leucocytes (stimulant leur dégranulation et leur production de RLO), de même que d'activer également les plaquettes. Cette collaboration entre les plaquettes et les neutrophiles permet donc une production accrue de leucotriènes et de dérivés de l'acide arachidonique.

2.2.2 Activation et recrutement

Les plaquettes et les neutrophiles peuvent également moduler leur niveau d'activation réciproque. Par exemple, il fut remarqué, dans une suspension mixte de plaquettes et de neutrophiles activés par un activateur spécifique des neutrophiles (fMLP), une activation marquée des plaquettes, effet présent également lorsqu'un surnageant de neutrophiles activés était mélangé avec des plaquettes.⁴²⁹ Cette activation fut reliée à l'action de protéases à sérine, la cathepsine G et l'élastase, contenues dans des granules azurophiles positifs à la peroxydase des neutrophiles.¹⁰⁴ La cathepsine G est capable d'activer directement les plaquettes, tel que défini par leurs dégranulations et agrégations. L'activation des plaquettes par la cathepsine G entraîne une augmentation concentration-dépendante de la teneur intracellulaire en calcium, secondaire à l'ouverture de canaux calciques et non au relâchement des réserves intracellulaires.¹⁰⁴ La cathepsine G peut également modifier de façon protéolytique certaines glycoprotéines de surface des plaquettes, notamment la GpIb, et peut également cliver la région N-terminale du récepteur plaquettaire à la thrombine à deux sites différents, en position Phe₅₅-Trp₅₆ et après l'arginine₄₁ (similaire à l'action de la thrombine). La cathepsine G peut également amplifier l'interaction plaquettes-neutrophiles en transformant par clivage protéolytique le peptide d'activation du tissu conjonctif II (CTAPII), sécrété par les plaquettes, en peptide d'activation des neutrophiles (NAP-2), puissant chémoattractant pour les neutrophiles.⁴⁵¹ Quant à elle, l'élastase est capable, à une concentration relativement faible de ces protéases, de potentialiser l'action de la cathepsine G alors qu'une concentration élevée peut avoir un effet inhibiteur.⁴²⁹ Du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène produit par le neutrophile activé peuvent également activer les plaquettes.⁴⁴⁶ Par contre, les neutrophiles nonactivés sont capables de limiter l'activation et l'agrégation plaquettaire. En effet, une production de NO par ces neutrophiles nonactivés semble diminuer l'activation des plaquettes suite à leur activation par la thrombine, effet inhibiteur des neutrophiles qui est potentialisé par la présence d'aspirine.^{452,453} L'ajout d'un anticorps contre la P-sélectine potentialise cette diminution de l'activation plaquettaire, soulignant le fait que cet effet inhibiteur des neutrophiles ne dépend pas d'un contact étroit entre les neutrophiles nonactivés et les plaquettes activées.

Les plaquettes lors de leur activation vont relâcher plusieurs substances contenues dans leurs granules α pouvant influencer les neutrophiles. Par exemple, le PDGF est capable d'agir comme chémoattractant envers les neutrophiles et les monocytes. Le facteur plaquettaire cationique 4 (PF4) est aussi un chémoattractant (plutôt faible) pour les neutrophiles et est également capable de stimuler le relâchement d'élastase des neutrophiles. Les plaquettes peuvent également libérer des chémokines ⁴⁵⁴ et des protéases neutres capables d'activer la cascade du complément avec formation, entre autres, de C5a, médiateur chémotactique et activateur pour les leucocytes. La production *in vitro* de cytokines, comme l'IL-1, IL-8 et MCP-1, par des leucocytes est également rapportée suite à leur adhésion avec des plaquettes fixées et activées (thrombine) et a été associée à la formation de conjugués plaquettes-leucocytes chez des patients après reperfusion. ⁵⁵ La production de ces cytokines peut contribuer à aggraver une lésion vasculaire en activant les leucocytes, en participant à leur recrutement (IL-8 pour les neutrophiles et MCP-1 pour les monocytes) et en affectant également l'endothélium vasculaire, notamment en stimulant son expression de molécules d'adhésions et d'autres cytokines (IL-6). La production de facteur tissulaire, initiant la cascade de la coagulation par la voie extrinsèque, a été rapportée par des leucocytes suite à leur liaison avec des cellules exprimant de la P-sélectine. ^{183,455} Une étude *in vitro* récente suggère que les leucocytes transfèrent du facteur tissulaire vers les plaquettes, permettant la propagation du thrombus par les plaquettes. ⁴⁵⁶ Ce transfert serait dépendant de la présence de P-sélectine et d'un ligand à ce jour non identifié du facteur tissulaire à la surface des plaquettes.

Ces interactions plaquettes-neutrophiles sont favorisées par un contact étroit entre les plaquettes et les neutrophiles ^{428,430} créant un microenvironnement protégeant les protéases des neutrophiles de l'action des antiprotéases plasmatiques. Ce microenvironnement favorise également le métabolisme transcellulaire des dérivés de l'acide arachidonique. ⁴²⁸ En effet, un anticorps dirigé contre la P-sélectine a diminué la formation d'aggrégats hétérotypiques plaquettes-neutrophiles et la formation de TxA_2 et de LTC_4 dans une suspension de plaquettes et de neutrophiles activés au fMLP. ⁴²⁸ Cette interaction adhésive entre les plaquettes et les neutrophiles est dépendante principalement, mais non exclusivement, de la P-sélectine exprimée à la surface des plaquettes activées

liant le PSGL-1 à la surface des neutrophiles. Cette liaison, responsable du roulement initial des neutrophiles sur une surface de plaquettes^{457,458} et du recrutement de leucocytes dans le thrombus,¹⁸³ entraîne l'activation du neutrophile.⁴⁵⁹ Cette activation est potentialisée par la présence de PAF à la surface des plaquettes⁴⁶⁰ puis l'expression accrue de l'intégrine Mac-1 des neutrophiles assure ainsi une adhésion plus ferme.⁴⁴⁴ Un pont de fibrinogène entre l'intégrine GpIIb/IIIa des plaquettes activées et Mac-1 des neutrophiles est un autre mécanisme contribuant à cette adhésion plaquettes-neutrophiles.⁴⁶¹

Voyons donc les molécules d'adhésion impliquées dans ces interactions plaquettes-neutrophiles, plus particulièrement les sélectines et les intégrines.

2.3 Molécules d'adhésion et leur ligands

2.3.1 Intégrines

Les intégrines sont des molécules d'adhésion glycoprotéiques hétérodimériques constituées de deux sous-unités distinctes α et β unies par des liens non covalents; une sous-unité α peut se lier à plusieurs sous-unités β .^{462,463} Un nombre toujours croissant de sous-unités α et β sont identifiées donnant lieu à une possibilité de plus de 100 intégrines.⁴⁶³⁻⁴⁶⁵ Les intégrines sont constituées d'un large domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique. Elles sont capables, suite à une liaison avec leur ligand, d'induire une signalisation se traduisant par des changements intracellulaires. Les ligands des intégrines sont variés, soit des protéines plasmatiques, des éléments de la matrice extracellulaire ou d'autres molécules d'adhésion; une intégrine peut reconnaître plus d'un ligand. Les intégrines sont subdivisées en plusieurs classes selon leur sous-unité β .^{462,463,466} Les intégrines β_1 , ou very late antigen (VLA), se retrouvent chez plusieurs types cellulaires et sont principalement responsable d'interactions avec la matrice extracellulaire. Les intégrines β_2 , exprimées uniquement par les leucocytes, sont impliquées dans des interactions cellulaires principalement hétérotypiques et dans des liaisons avec la matrice extracellulaire. Les intégrines β_3 regroupent l'intégrine $\alpha_{2b}\beta_3$ (GpIIb/IIIa) des plaquettes et l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, exprimée par les plaquettes et autres types cellulaires, comme les cellules endothéliales et

les cellules musculaires lisses, mais non les leucocytes. Alors que la GpIIb/IIIa est responsable de l'agrégation plaquettaire, $\alpha_v\beta_3$ est impliquée dans des interactions avec divers éléments de la matrice extracellulaire (vitronectine, fibrinogène, fibronectine, thrombospondine). Les intégrines des familles β_4 à β_8 sont peu caractérisées. 462,463,467

2.3.1.1 Intégrines β_1 des neutrophiles

Les intégrines β_1 des neutrophiles sont principalement impliquées dans des interactions avec des éléments de la matrice extracellulaire.

Jusqu'à relativement récemment, l'existence même des intégrines β_1 à la surface des neutrophiles était contestée. Toutefois, des études de cytométrie en flux, de RIA (*radioimmunoassay*), d'adhésion statique sur plaque et d'immunoprécipitation ont démontré la présence d'intégrines $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_6\beta_1$ à la surface des neutrophiles. 468-471 Contrairement aux intégrines β_2 , l'activation des neutrophiles ne semble pas résulter en une augmentation significative de l'expression des intégrines β_1 , mais seulement en une augmentation de leur affinité pour leur ligand, probablement suite à un changement de conformation. 471 L'intégrine $\alpha_6\beta_1$ semble être l'intégrine β_1 responsable de l'adhésion des neutrophiles à la laminine. La laminine, élément de la matrice extracellulaire et des lames basales, est une glycoprotéine composée de trois chaînes polypeptidiques α , β et γ liées par des ponts disulfides et résultant en une structure asymétrique. Plusieurs sites différents sur la molécule de laminine peuvent être impliqués dans les liaisons entre la laminine et des cellules ou autres éléments de la matrice extracellulaire. 472 En effet, Bohnsack et coll. ont démontré, après avoir bloqué la sous-unité β_2 avec des anticorps, qu'une partie de l'adhésion des neutrophiles activés à la laminine était due à l'intégrine $\alpha_6\beta_1$. 473 Toutefois, cette intégrine n'est présente qu'à une faible densité à la surface des neutrophiles et son expression n'est pas augmentée suite à l'activation des neutrophiles par divers agonistes. 471 Par contre, l'activation des neutrophiles et la présence de magnésium sont nécessaires pour permettre sa liaison avec la laminine; le changement de conformation de cette intégrine étant dépendant de la portion cytoplasmique de la sous-unité α . 474 La liaison entre la laminine et le neutrophile stimule ce dernier, favorisant la phagocytose et la formation de RLO. 475 Cette liaison

peut également contribuer à moduler la réponse du neutrophile à d'autres agonistes, par exemple, en augmentant la consommation d'oxygène et la formation de RLO par le neutrophile (*priming*).⁴⁷⁶

Une adhésion des neutrophiles humains à la fibronectine (via la reconnaissance d'un site RGD) dépendante de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ (VLA-5) et de la présence de magnésium dans le milieu réactionnel a été démontrée dans une étude d'adhésion statique en plaque couplée à de la cytométrie en flux.^{468,470} La démonstration de cette adhésion requiert cependant l'utilisation d'un anticorps bloquant la sous-unité β_2 , la plus grande partie de l'adhésion à la fibronectine des neutrophiles activés étant β_2 -dépendante (probablement Mac-1).^{468,469} Les neutrophiles exprimeraient également l'intégrine $\alpha_4\beta_1$, notamment suite à leur transmigration dans la matrice extracellulaire. Toutefois, bien qu'elle semble être impliquée dans l'adhésion des neutrophiles avec la fibronectine en condition statique,⁴⁶⁹ cette liaison ne s'effectue pas en condition de flot, même à des forces de cisaillement relativement faibles (2 dynes/cm²).⁴⁷⁷ Le principal ligand de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ demeure une molécule d'adhésion de la famille des immunoglobulines exprimées par les cellules endothéliales, fibroblastes, cellules musculaires et certains leucocytes, VCAM-1 (*Vascular cell adhesion molecule-1*). Les molécules d'adhésion de la famille des immunoglobulines sont composées d'une seule chaîne de glycoprotéine, elle-même renfermant dans sa portion extracellulaire plusieurs répétitions de domaines, dont la structure est semblable à celle d'immunoglobulines, reliées par des ponts disulfures.⁴⁷⁸ L'expression de VCAM-1 est induite par l'action de cytokines comme TNF et IL-1 et par l'administration d'une diète hypercholestérolémique.^{17,383,479} La liaison entre $\alpha_4\beta_1$ et VCAM-1 est particulièrement impliquée dans l'adhésion ferme entre des leucocytes mononucléaires et l'endothélium. L'expression de VCAM-1 a été rapportée par l'endothélium et par des cellules musculaires lisses de lésions athérosclérotiques ainsi que par le néoendothélium recouvrant des lésions vasculaires produites par angioplastie.^{17,309,381,480}

2.3.1.2 Intégrines β_2 des neutrophiles

La famille des intégrines β_2 , seulement exprimée par les leucocytes, comprend $\alpha_L\beta_2$ (LFA-1), $\alpha_M\beta_2$ (Mac-1) et $\alpha_X\beta_2$ (p150,95). Alors que LFA-1 est retrouvée à la

surface de tous les leucocytes, Mac-1 et p150,95 ne sont exprimées que par les granulocytes, macrophages et lymphocytes NK. Les intégrines β_2 sont associées étroitement avec le cytosquelette cellulaire. Suivant l'activation cellulaire, la formation d'amas ponctuels de récepteurs, par concentration des intégrines à certains endroits de la membrane cellulaire, favorise l'interaction de ces intégrines avec leur ligands. Également suite à l'activation, une mobilisation d'un pool intracellulaire de Mac-1 et p150,95, contenu dans les granules secondaire et tertiaire, ^{420,462,481,482} est observée en plus de changements de conformation de la région extracellulaire caractéristique des intégrines activées. ⁴⁸³ Ce changement de conformation augmente l'affinité des intégrines pour leur ligands. ^{462,463}

2.3.1.2.1 Mac-1

Mac-1 est l'intégrine la plus abondante à la surface des neutrophiles. Cette intégrine est impliquée dans le recrutement des neutrophiles aux sites d'inflammations aiguës, étant responsable de médier l'adhésion ferme des neutrophiles suite à leur roulement sur l'endothélium vasculaire. Cette interaction avec l'endothélium est possible par l'intermédiaire d'une autre molécule d'adhésion exprimée par les cellules endothéliales, ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), un membre de la famille des immunoglobulines, dont l'expression constitutive peut être augmentée suite à l'activation des cellules endothéliales. ⁴⁸⁴ La liaison de Mac-1 avec ses autres ligands, dont le fibrinogène, le facteur X et C3bi, pourrait faciliter le recrutement des neutrophiles dans le thrombus et à la surface vasculaire endommagée. ⁴⁸⁵⁻⁴⁸⁷ L'importance des intégrines β_2 dans l'adhésion des neutrophiles à la matrice extracellulaire fut surtout démontrée dans des études statiques *in vitro* où l'utilisation d'anticorps spécifiques contre la sous-unité β_2 permettait une réduction substantielle de l'adhésion de neutrophiles activés à la laminine et à divers éléments de la matrice extracellulaire ^{468,470}. De plus, l'adhésion des neutrophiles à la matrice extracellulaire est diminuée chez des patients déficients en β_2 (LAD). ⁴⁷¹ Le fibrinogène est une protéine plasmatique produite principalement par le foie et dont la production est augmentée lors de réactions inflammatoires. ⁴⁸⁸ Il est retrouvé également dans les granules α des plaquettes. Le fibrinogène est un substrat essentiel de la formation de la fibrine et du thrombus. On retrouvera donc du fibrinogène à la surface de la matrice extracellulaire lors de dommage vasculaire par angioplastie.

L'adhésion des neutrophiles activés au fibrinogène est médiée par des intégrines β_2 .⁴⁸⁹ En effet, dans des neutrophiles activés par phorbol ester, l'intégrine Mac-1 reconnaît des fragments plasmatiques du domaine D du fibrinogène de 30 kDa, fragments produits par protéolyse du fibrinogène par la plasmine.⁴⁸⁵ La séquence d'acides aminés impliquée, Glycine¹⁹⁰-Valine²⁰², serait située dans la région carboxy-terminale de la chaîne γ du fibrinogène et n'impliquerait pas une séquence RGD.^{486,489} Toutefois, lorsque des neutrophiles sont activés avec du facteur tumoral nécrosant (TNF), l'adhésion de ces neutrophiles est maintenant principalement le résultat de l'intégrine p150,95 qui lie une séquence du côté NH_2 terminal de la chaîne $\text{A}\alpha$ du fibrinogène.⁴⁹⁰ L'implication différentielle des intégrines β_2 selon l'agoniste utilisé souligne une redondance possible des mécanismes permettant *in vivo* l'adhésion des neutrophiles à la matrice extracellulaire.

2.3.1.2.2 Intégrine LFA-1

Cette intégrine β_2 fut surtout étudiée dans le contexte du recrutement et de la recirculation des lymphocytes.^{484,491,492} Ses ligands endothéliaux sont des membres de la famille des immunoglobulines, ICAM-1 et ICAM-2. Alors que l'expression d'ICAM-1 peut être induite par l'action de cytokines, l'expression d'ICAM-2 est constitutive et n'est pas augmentée suite à l'activation des cellules endothéliales. Les plaquettes expriment aussi ICAM-2 à leur surface,⁴⁹³ ICAM-2 pouvant participer à la liaison plaquettes-neutrophiles. LFA-1 est aussi capable d'interaction avec ICAM-3 via un site de liaison distinct du lien avec ICAM-2.⁴⁹⁴ ICAM-3 est exprimée à la surface des leucocytes non activés^{495,496} mais non des cellules endothéliales. Une interaction leucocytaire homotypique via une liaison LFA-1/ICAM-3 a été postulée dans le cas de réactions immunitaires impliquant des lymphocytes.^{495,496}

2.3.1.2.3 Intégrine p150,95

Le principal ligand de cette intégrine, exprimée surtout sur les granulocytes, macrophages et monocytes, est C3bi. C3bi est un fragment dérivé de la cascade du complément. L'interaction entre des intégrines β_2 comme Mac-1 et p150,95, avec C3bi est associée au phénomène d'opsonisation, facilitant la phagocytose de microorganismes par les neutrophiles et macrophages. Outre des liaisons avec le fibrinogène, p150,95 serait

aussi impliquée dans une liaison entre des mononucléaires et des cellules endothéliales activées, toutefois, le ligand endothélial n'est pas encore identifié. 490,497

2.3.1.3 Intégrines β_1 des plaquettes

Les intégrines β_1 des plaquettes permettent l'adhésion des plaquettes à la matrice extracellulaire sous-endothéliale. Exprimées de façon constitutive, elles ne requièrent pas l'activation de la plaquette pour être capables de lier leur ligands. Parmi les intégrines β_1 plaquettaires, l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ est la principale intégrine impliquée dans l'adhésion au collagène. 498,499 Les plaquettes peuvent aussi interagir avec la fibronectine et la laminine via leurs intégrines $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_6\beta_1$. 500,501

2.3.1.4 Intégrine β_3 des plaquettes

2.3.1.4.1 Intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GpIIb/IIIa) représente environ 1-2 % du total des protéines plaquettaires; une plaquette humaine contient environ 50,000 complexes de GpIIb/IIIa. 502 Cette intégrine est retrouvée dans la membrane des granules α du système canaliculaire et à la surface des plaquettes. 503 Elle est impliquée dans des interactions cellulaires homotypiques (agrégation plaquettaire) ou hétérotypiques, lors d'interactions avec des leucocytes ou dans des interactions avec des éléments de la matrice extracellulaire.

L'intégrine GpIIb/IIIa est constituée de deux sous-unités, α et β dont leur association dépend de la présence de calcium dans le milieu. 504,505 La sous-unité α , d'environ 140 kDa, est composée de deux chaînes peptidiques reliées par un pont disulfure, soit une chaîne de 125 kDa et une petite chaîne de 25 kDa. Cette dernière contient le domaine transmembranaire et la courte région cytoplasmique. 462,502 Le domaine extracellulaire de la chaîne α comporte 4 sites de liaisons au calcium ainsi qu'un site de liaison pour la chaîne γ du fibrinogène, liaison centrale au processus de l'agrégation plaquettaire. 506,507 La sous-unité β , d'environ 105 kDa, est composée d'une seule chaîne qui contient un domaine extracellulaire comportant des régions riches

en cystéine, déterminant dans la liaison avec les ligands, ⁵⁰⁸ un domaine transmembranaire et une courte séquence cytoplasmique. ⁵⁰⁹ La région extracellulaire de la chaîne β est capable, dans certaines conditions, de liaison avec du facteur de von Willebrand (vWf) ou du fibrinogène, fibronectine, collagène et vitronectine, via des interactions avec un site RGD présent sur ces ligands. ^{504,510,511} La liaison de GpIIb/IIIa avec ses ligands est dépendante de l'activation plaquettaire. ^{462,503,504} En effet, alors que nonactivée elle n'est capable que de liaison avec du fibrinogène non soluble, l'activation de cette intégrine se traduit par un changement de conformation de l'intégrine permettant sa liaison avec du fibrinogène soluble et d'autres ligands. ^{512,513} Les mécanismes intracellulaires de l'activation de l'intégrine GpIIb/IIIa sont complexes; cette activation serait consécutive à l'action de la phospholipase C qui métabolise le phosphatidylinositol en diacylglycérol et inositoltriphosphate; ⁵¹⁴⁻⁵¹⁶ de la protéine kinase C et de la phosphorylation de ses substrats ainsi que du GTP, via une petite protéine G. ^{421,515,517} Suite à la liaison de la GpIIb/IIIa activée et du fibrinogène, liaison qui est dépendante du calcium, une série d'événements se produisent favorisant l'activation plaquettaire et l'agrégation. Au niveau de l'intégrine GpIIb/IIIa elle-même, la liaison avec un ligand peut entraîner, suite à un changement de conformation, l'apparition de nouveaux sites de liaison (ligand induced binding site) qui auraient un rôle à jouer dans l'agrégation plaquettaire. ^{510,518,519} La phosphorylation/déphosphorylation de certains résidus dans la séquence cytoplasmique de la sous-unité β et l'association des domaines cytoplasmiques avec certains éléments intracellulaires sont rapportées comme mécanismes impliqués dans l'induction de signaux intracellulaires. ^{421,510,520,521} Des modifications plaquettaires intracellulaires sont aussi observées, notamment une réorganisation du cytosquelette plaquettaire, une augmentation du pH intracellulaire et de la teneur en calcium, une activation du métabolisme des phospholipides et de tyrosines kinases et de sérine/thréonine kinases, comme la protéine kinase C. ^{504,515,522,523} Cela va contribuer à une réponse secondaire des plaquettes via l'activation d'autres intégrines GpIIb/IIIa et à la sécrétion et dégranulation plaquettaire, favorisant une seconde vague d'agrégation. ⁵⁰⁴

L'agrégation plaquettaire est consécutive à la formation de ponts de fibrinogène (ou de vWf) entre des plaquettes via l'interaction avec des intégrines GpIIb/IIIa activées. Les conditions hémodynamiques locales favorisent un ou l'autre de ses ligands de l'adhésion et de l'agrégation. Par exemple, en présence de forces de cisaillement élevées (rencontrées, par exemple, dans les artères sténotiques), l'intégrine GpIIb/IIIa est importante pour permettre l'adhésion des plaquettes à la matrice extracellulaire, principalement via des interactions avec le vWf. 506,524,525 Le vWf est aussi le ligand privilégié pour l'agrégation plaquettaire dans de telles conditions hémodynamiques, probablement suite à une liaison d'un site RGD avec la sous-unité β_3 . 526 La thrombospondine peut également favoriser l'agrégation plaquettaire, en stabilisant le thrombus via des interactions avec des intégrines plaquettaires (GpIIb/IIIa et $\alpha_2\beta_1$). 527,528

Ces interactions permettent de localiser les plaquettes aux sites de dommage vasculaire et de les activer permettant le déroulement de l'hémostase.

2.3.1.4.2 Intégrine $\alpha_v\beta_3$

Outre l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GpIIb/IIIa), les plaquettes comportent également l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Cette intégrine, retrouvée dans plusieurs types cellulaires, n'est toutefois présente qu'en nombre très restreint à la surface des plaquettes. 529

2.3.2 Sélectines

2.3.2.1 Généralités

La famille des sélectines, identifiée en 1989, comprend trois membres, soit la P-sélectine (CD62P), la E-sélectine (CD62E) et la L-sélectine (CD62L). 530 La structure de ces glycoprotéines membranaires est caractérisée par un domaine lectine NH_2 terminal responsable de liaison dépendante du calcium, un domaine semblable au facteur de croissance épidermique (EGF), un domaine composé d'un nombre variable (2 pour la L-, 6 pour la E- et 9 pour la P-sélectine) de régions consensus similaires à celles observées chez des protéines pouvant se lier au complément (SCR), ainsi qu'un domaine transmembranaire et une courte séquence cytoplasmique. Alors que le domaine lectine est

responsable de l'interaction directe avec les différents ligands, les domaines SCR et EGF seraient importants pour maintenir une structure appropriée, permettant la présentation du domaine lectine dans une conformation adéquate. ⁵³¹ L'homologie du domaine lectine entre les 3 sélectines n'est qu'environ 50%, suggérant l'existence de ligands spécifiques à chacune des sélectines. ⁵³¹

Les sélectines sont capables de liaisons avec des polysaccharides complexes, fucosylés et/ou sialylés, comme le sialyl Lewis^x (sLe^x) ⁵³²⁻⁵³⁴ qu'on retrouve à la surface des leucocytes. ^{533,535} Les sélectines sont également aptes à lier le sialyl Lewis^a (sLe^a), qui n'est pas présent à la surface des leucocytes mais plutôt noté à la surface de cellules cancéreuses; l'interaction entre des sélectines et le sLe^a peut favoriser le développement de métastases. ^{536,537} Toutefois, les liaisons des sélectines avec ces polysaccharides demeurent de faible affinité, ayant une valeur de K_d (constante de dissociation à l'équilibre) de l'ordre du millimolaire. ^{532,538} Des glycoprotéines associées aux polysaccharides ont récemment été identifiées comme ligands des sélectines. Il est possible que la présence de glycoprotéine modifie et stabilise la conformation de la portion polysaccharide, ⁵³⁹ localise et concentre le ligand dans la membrane cytoplasmique, par exemple la présence de PSGL-1 au niveau des microvillosités des leucocytes. De plus, cela pourrait permettre la transmission d'un signal intracellulaire suite à la liaison avec une sélectine. ^{55,540}

2.3.2.2 P-sélectine

La P-sélectine, d'un poids moléculaire d'environ 140 kDa, est retrouvée dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales et dans les granules α des plaquettes. Suite à une activation de ces cellules, la P-sélectine est exprimée rapidement à leur surface, son expression maximale est notée entre 5-10 minutes suivant la stimulation. Cette expression n'est que transitoire, la P-sélectine est réinternalisée et dirigée soit vers des lysosomes, où elle sera dégradée, soit vers des granules de sécrétion. ⁵⁴¹⁻⁵⁴⁴ Ce mécanisme pourrait permettre à une plaquette de recycler la P-sélectine exprimée suite à une première stimulation. Des modifications complexes de la portion cytoplasmique de la P-sélectine (phosphorylation de certains résidus sérine, thréonine et tyrosine) ^{543,545} sont impliquées dans l'expression et le recyclage de la P-sélectine. Une expression tardive de

P-sélectine est également possible par les cellules endothéliales, la transcription du gène de la P-sélectine étant stimulée par divers agonistes endothéliaux, comme le LPS, TNF et IL-1 via l'action de NfκB, facteur stimulant la transcription. La synthèse *de novo* de P-sélectine se traduit par son expression dans les 2 à 4 heures suivant la stimulation. 531,546,547

Le ligand principal de la P-sélectine est le PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1). Cette glycoprotéine homodimérique, de la famille des sialomucines, comporte deux sous-unités de 120 kDa reliées entre elles par un pont disulfure près de la surface du leucocyte. 548 Le PSGL-1 est exprimé de façon constitutive et est principalement retrouvé à la surface des microvillosités des neutrophiles et leucocytes. 457 Toutefois, en regard de sa liaison avec la P-sélectine, le PSGL-1 ne serait fonctionnel que sur les granulocytes et certaines sous-classes de lymphocytes. 549 Au nombre d'environ 10-20,000 sites par neutrophile, le PSGL-1 représente moins de 0.01% des protéines des neutrophiles. 550,551 Elle comporte une région N-terminale renfermant trois sites potentiels de sulfation de la tyrosine. Cette région serait critique pour la liaison avec la P- et la L-sélectine. En effet, l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre un épitope comprenant ces sites de tyrosine prévient le roulement et l'adhésion de leucocytes à des surfaces de P- ou de L-sélectine. 457,552-554 Le remplacement, par mutagenèse dirigée, de ces résidus tyrosine de la région N-terminale par des résidus phénylalanine se traduit par l'inhibition de la liaison du PSGL-1 à la P-sélectine. 555 De plus, le traitement des neutrophiles avec de la mocarhagine, une métalloprotéase dérivée du venin de cobra, retranche les 10 derniers acides aminés de la région N-terminale du PSGL-1, supprimant sa liaison avec la P-sélectine. 556 La sulfation d'au moins un de ces sites de même que la O-glycosylation d'un résidu tyrosine est requise pour permettre la liaison avec la P-sélectine. 557-559 La dimérisation du PSGL-1 serait également nécessaire pour la reconnaissance optimale de la P-sélectine. 560 Le domaine extracellulaire du PSGL-1 comporte également plusieurs régions consensus contenant des branches de polylectosamines comportant des sLe^x. Toutefois, la digestion du PSGL-1 par la sialidase, qui enlève les sLe^x, ne diminue pas sa capacité à lier la P-sélectine. 561. Suite à la liaison entre le PSGL-1 et la P-sélectine, des modifications intracellulaires sont notées dans le leucocyte, notamment une augmentation rapide de la phosphorylation de résidus tyrosine

sur certaines protéines intracytoplasmiques^{562,563}, dont certaines ont une affinité avec les MAPk (*mitogen activated protein kinases*)⁵⁴⁰ se traduisant par l'activation d'intégrines Mac-1 du neutrophiles.⁵⁶⁴ La liaison entre le PSGL-1 et une forme recombinante de P-sélectine se traduit par une augmentation de l'adhésion ferme de neutrophiles de souris, mais non de neutrophiles d'origine humaine, à une surface de ICAM-1, via une augmentation de l'expression d'intégrines β_2 des neutrophiles.⁵⁶⁵ Cette discordance de résultats entre les neutrophiles humains et de souris souligne que la liaison entre la P-sélectine et le PSGL-1 des neutrophiles ne serait pas suffisante chez l'humain pour amener une activation de ces intégrines.^{566,567} D'autres modifications cellulaires suite à la liaison de la P-sélectine et du PSGL-1 ont déjà été mentionnées dans la section traitant des interactions plaquettes-neutrophiles.

2.3.2.3 L-sélectine

La L-sélectine est exprimée de façon constitutive à la surface des leucocytes, excepté certaines classes de lymphocytes.⁵⁶⁸ Suite à une activation cellulaire, la teneur membranaire en L-sélectine est fortement réduite, réduction engendrée par un clivage protéolytique, dans le domaine extracellulaire près de la membrane cellulaire.⁵⁶⁹ La L-sélectine semble être particulièrement localisée à la surface des microvillosités des leucocytes, probablement suite à des interactions entre le cytosquelette du leucocyte et la portion cytoplasmique de la L-sélectine.^{570,571} Cette localisation pourrait faciliter l'interaction de cette sélectine avec ses ligands; d'ailleurs des cellules transfectées avec de la L-sélectine distribuées aléatoirement ne sont pas aussi efficaces pour soutenir le roulement cellulaire.⁵⁷⁰

Trois ligands glycoprotéiques endothéliaux de la L-sélectine ont été identifiés à ce jour : Glycam-1, CD34 et spg200. Ces glycoprotéines comportent des polysaccharides complexes sulfatés, fucosylés et/ou sialylés permettant la liaison avec la L-sélectine. Ces glycoprotéines comportent un épitope reconnu par un anticorps monoclonal, MECA-79.^{531,572}

Glycam-1, d'un poids de 50 kDa, est exprimé principalement par les cellules endothéliales des veinules post-capillaires de la région corticale des ganglions lymphatiques (HEV-high endothelial venules). Ce ligand ne comporte pas de région

transmembraire ^{573,574} et est donc sécrété par les cellules endothéliales, une partie pouvant toutefois être associée à la surface endothéliale. ⁵⁶⁸ Ce ligand pourrait moduler la recirculation des lymphocytes en inhibant leur adhésion aux cellules HEV. ⁵⁶⁸

CD34 est une sialomucine transmembranaire d'un poids de 90 kDa exprimée de façon constitutive à la surface des cellules endothéliales et par des cellules souches hématopoïétiques. Son efficacité en terme de ligand dépend de modifications posttranscriptionnelles, notamment aux niveaux de la glycosylation et de la sulfation. ⁵⁶⁸ Fait intéressant, une stimulation des cellules endothéliales par des cytokines, comme l'IL-1 et TNF, amène une diminution de l'expression de CD34, ^{575,576} suggérant que ce ligand est surtout impliqué dans les interactions entre les leucocytes et l'endothélium non activé. D'ailleurs, CD34 ne serait responsable qu'environ 50% des liaisons entre la L-sélectine et ses ligands endothéliaux dans les veinules de ganglions lymphatiques. ^{573,577}

Spg200 pourrait être le ligand endothélial principal de la L-sélectine. Des souris modifiées génétiquement et déficientes en Glycam-1 et CD34 présentent une augmentation marquée de l'expression de spg200. ⁵³¹ Son importance reste toutefois à confirmer.

La L-sélectine pourrait également lier la P-et la E-sélectine endothéliales ⁵⁷⁸ ainsi que le PSGL-1 des leucocytes via ses épitopes de sLe^x. ^{579,580} Toutefois, une étude *in vitro* utilisant des cellules n'exprimant pas de PSGL-1 démontre que ces cellules peuvent, en condition de flot, supporter le roulement de cellules exprimant la L-sélectine, mais non de cellules exprimant la P-sélectine. ⁵⁷⁹ Le ligand principal de la L-sélectine tant à la surface des cellules endothéliales que des leucocytes reste à déterminer.

La liaison de la L-sélectine et de son ligand leucocytaire produit une activation transitoire du leucocyte caractérisée par une augmentation du calcium intracellulaire, un changement de forme du leucocyte, une augmentation de la teneur membranaire en Mac-1 et une augmentation de la production de RLO. ⁵⁸¹⁻⁵⁸³ Suite à cette interaction, le neutrophile est aussi plus susceptible à l'activation par d'autres agonistes (*priming*). ^{584,585}

2.3.2.4 E-sélectine

La E-sélectine est retrouvée exclusivement dans les cellules endothéliales; son expression n'est pas constitutive mais est induite suite à l'activation des cellules endothéliales par des stimuli inflammatoires (IL-1, TNF, LPS) au niveau de la transcription, sous contrôle du NfκB. ^{530,586-588} Cette expression requiert une synthèse *de novo* de E-sélectine; on retrouve donc de la E-sélectine à la surface des cellules endothéliales environ de 3 à 6 heures suivant l'activation. ^{531,589} Même en présence d'une stimulation soutenue pour quelques heures des cellules endothéliales par du TNF, le niveau de E-sélectine exprimée à la surface de ces cellules revient au niveau basal, la E-sélectine est rapidement recaptée et dégradée dans des lysosomes; ⁵⁶⁸ de plus son ARN messager a une courte demie-vie. ^{542,590} Toutefois, suite à une stimulation chronique, comme dans un milieu inflammatoire, une expression chronique de la E-sélectine est rapportée. ^{591,592}

La L-sélectine, via ses épitopes de sLe^x pourrait servir de ligand leucocytaire pour la E-sélectine (et la P-sélectine). Tel que démontré par Picker et coll., ⁵⁷⁸ un anticorps dirigé contre la L-sélectine permet de diminuer d'environ 70% l'adhésion des neutrophiles sur des cellules transfectées avec de la E- et de la P-sélectine. La E-sélectine peut aussi lier le PSGL-1, toutefois cette liaison est de faible affinité, environ 50 fois plus faible que la liaison avec la P-sélectine ^{559,561} et impliquerait un site de liaison distinct de la P-sélectine. ⁵⁹³ ESL-1 (E-selectin ligand-1) est le ligand de haute affinité de la E-sélectine. ⁵⁹⁴ Ce ligand, identifié à la surface de cellules myéloïdes et de leucocytes de souris, est surtout retrouvé à la surface des microvillosités des leucocytes, dont les neutrophiles. ⁵⁹⁵ La capacité de ESL-1 à lier la E-sélectine, liaison dépendante du calcium, est déterminée par son degré de fucosylation (via l'action de la fucosyltransférase III). ⁵⁹⁵ Contrairement au PSGL-1, le ESL-1 ne renferme pas de sites de O-glycosylation, mais plutôt des sites de N-glycosylation. ⁵⁹⁶ Le ESL-1 ne semble pas être capable de liaison avec la P-sélectine ou avec la L-sélectine, démontrant sa spécificité pour la E-sélectine. ⁵⁹⁶ La liaison de la E-sélectine avec son ligand leucocytaire, dont le ESL-1, se traduit à la fois par l'activation

des leucocytes, notamment par l'augmentation de l'expression de Mac-1⁵⁹⁷ et par la rétraction des cellules endothéliales.⁵⁹⁸ Cela confirme l'association de la E-sélectine avec le cytosquelette de la cellule endothéliale d'une part et pourrait, d'autre part, contribuer à faciliter la diapédèse des leucocytes à travers l'endothélium.

2.4 Implications des molécules d'adhésion dans les interactions plaquettes/neutrophiles

2.4.1. Liaison via P-sélectine/PSGL-1

La liaison des plaquettes et des neutrophiles nécessite l'activation préalable des plaquettes.^{599,600} Démontré initialement par Jungi et coll.,⁶⁰⁰ plusieurs études *in vitro* en conditions statiques ou en conditions de flots ont par la suite souligné l'importance de l'interaction entre la P-sélectine plaquettaire et le PSGL-1 des neutrophiles dans le roulement et l'adhésion des neutrophiles aux plaquettes.^{101,444,458,460,599,601-603} Les plaquettes activées au site d'un dommage artériel peuvent recruter des leucocytes dans le thrombus,^{101,183} les leucocytes contribuant à amplifier l'activation plaquettaire et la déposition de fibrine.¹⁸³ Les plaquettes peuvent également supporter la migration des leucocytes à travers une couche de plaquettes vers la paroi vasculaire.⁶⁰² La liaison plaquette-neutrophile serait modulée par l'état de l'activation du neutrophile, l'activation du neutrophile amenant une redistribution et une diminution de la teneur plasmatique en PSGL-1^{567,604,605} et par la présence de monoxyde d'azote (NO). En effet, dans une étude *in vitro*, un dérivé biologiquement actif du NO a inhibé de façon concentration-dépendante l'expression de P-sélectine et de GpIIb/IIIa induite par la thrombine et un analogue de TxA₂.⁶⁰⁶ L'utilisation d'un donneur de NO, le nitroprusside de sodium, a également réduit l'adhésion de plaquettes stimulées à la thrombine aux neutrophiles.⁶⁰⁷ De plus, l'administration d'un donneur de NO, le SIN-1, a permis de réduire l'adhésion de plaquettes et de neutrophiles aux sites de dommage vasculaire par angioplastie chez le porc.¹¹⁷ En conditions de flots, les liens entre la P-sélectine plaquettaire et le PSGL-1

des neutrophiles permettent le roulement des neutrophiles sur les plaquettes ^{458,603} suite à la formation et la dissociation rapide de ces liens; ^{608,609} cette liaison ne peut supporter la formation d'une adhésion ferme. L'adhésion ferme de neutrophiles à une surface de plaquettes serait dépendante de liaisons médiées par des intégrines. ^{444,461,602,603}

2.4.2 Liaison via des intégrines

L'activation des leucocytes, directement par les plaquettes ou via un métabolisme transcellulaire, amène également l'activation des intégrines β_2 leucocytaires avec un changement de conformation et une augmentation de l'affinité de l'intégrine pour son ligand. La stimulation d'une suspension de plaquettes et de neutrophiles par de la thrombine et du fMLP se traduit par une plus grande formation de liaisons entre des neutrophiles et des plaquettes comparativement à la stimulation d'un seul type cellulaire. ⁴⁴⁴ L'ajout de fMLP comme activateur des neutrophiles dans la suspension cellulaire mixte produit, comparé à l'utilisation de la thrombine, une augmentation des neutrophiles liant des plaquettes. L'utilisation d'anticorps bloquant la P-sélectine et Mac-1 permet une diminution plus marquée des liaisons plaquettes-neutrophiles qu'avec l'utilisation simple d'un ou l'autre des anticorps. ⁴⁴⁴ L'adhésion des plaquettes aux neutrophiles dépend donc de la P-sélectine et de l'intégrine Mac-1, quand les cellules sont activées. Le ligand plaquettaire de cette intégrine n'est pas encore identifié. Toutefois, il serait possible qu'un pont de fibrinogène, exogène ou provenant des granules α des plaquettes après activation, relie les plaquettes aux neutrophiles via une interaction entre l'intégrine GpIIb/IIIa activée des plaquettes et l'intégrine Mac-1 des neutrophiles. ^{444,490,610}

Donc, le recrutement de neutrophiles par des plaquettes activées adhérees à la matrice extracellulaire est dépendant, dans un premier temps, de l'interaction entre la P-sélectine des plaquettes et le PSGL-1 des neutrophiles permettant l'approche du neutrophile et son roulement. L'interaction entre la P-sélectine et le PSGL-1 se traduit aussi par l'activation du neutrophile. ⁵⁶² Cette adhésion permet également, dans un mécanisme juxtacrine, l'action du PAF produit par les plaquettes qui peut activer les neutrophiles. Cette activation contribue au développement d'une adhésion ferme entre les plaquettes et les

neutrophiles via principalement Mac-1 ⁴⁶⁰, sa stabilisation dépendant du recrutement de nouvelles molécules de cette intégrine provenant du pool intracellulaire des neutrophiles. ^{602,611} Le fibrinogène peut agir comme ligand à la fois de Mac-1 des neutrophiles et de l'intégrine GpIIb/IIIa des plaquettes, tel que démontré par Weber et coll. dans une étude d'adhésion *in vitro* en condition de flot variable ⁴⁶¹.

2.4.3 Autres mécanismes possibles de liaisons plaquettes/neutrophiles

2.4.3.1 La thrombospondine

La thrombospondine est une glycoprotéine trimérique d'environ 450 kDa, retrouvée essentiellement dans les granules α des plaquettes, mais qui est synthétisée également par les cellules endothéliales, cellules musculaires lisses et fibroblastes; elle est donc présente dans la matrice extracellulaire. ⁵²⁷ Se retrouvant à la surface des plaquettes activées, elle participe à la stabilisation de l'agrégation plaquettaire, notamment par la formation de liens avec le fibrinogène ⁶¹². Plusieurs récepteurs plaquettaires pourraient reconnaître la thrombospondine, notamment la GpIV (CD36), $\alpha_2\beta_1$, GpIIb/IIIa et $\alpha_v\beta_3$, via la reconnaissance d'un site RGD. ^{528,613,614} L'adhésion de plaquettes à une surface de thrombospondine est dépendante du niveau des forces de cisaillement, étant optimale à des forces de cisaillement de l'ordre de $300-1600 \text{ s}^{-1}$. ⁵²⁷ La thrombospondine est capable de médier une liaison plaquettes-monocytes via la glycoprotéine GP IV (CD36) des monocytes et des plaquettes. ⁶¹³ Les neutrophiles peuvent également lier la thrombospondine, via deux récepteurs différents sur les neutrophiles activés ou non, un liant la région N-terminale de la thrombospondine (via son site HBD) et l'autre se liant avec la région C-terminale. L'activation des neutrophiles par le fMLP entraîne une augmentation marquée de l'expression de ces récepteurs. Cette liaison ne serait pas dépendante de la reconnaissance d'un site RGD par les neutrophiles. ⁶¹⁵ La liaison de la thrombospondine avec les neutrophiles potentialise leur production de RLO après activation avec le fMLP et peut également moduler leur adhésion. La thrombospondine pourrait donc contribuer à la stabilisation de la liaison plaquettes-neutrophiles.

2.4.3.2 Liaison via ICAM-2/LFA-1

Les plaquettes expriment de façon constitutive ICAM-2 à leur surface.⁴⁹³ L'utilisation d'un anticorps dirigé contre LFA-1 ou contre ICAM-2 a permis de réduire l'adhésion de plaquettes à la surface de lymphocytes T exprimant LFA-1.⁴⁹³ ICAM-2 des plaquettes pourrait donc être impliqué dans une liaison avec LFA-1 exprimé par les neutrophiles.

2.4.3.3 Liaison via les récepteurs Fcγ

Les récepteurs Fcγ sont une famille de récepteurs qui reconnaissent la portion Fc des anticorps de type IgG.^{616,617} Les plaquettes expriment seulement le récepteur FcγRII alors que les neutrophiles expriment de façon constitutive FcRI, FcRIIa, FcRIIc et FcRIIb.^{616,618} Lorsque l'agrégation des plaquettes ou des neutrophiles est induite par des anticorps, les récepteurs Fcγ sont impliqués dans ces réactions d'agréations. En effet, l'utilisation d'anticorps dirigés contre le récepteur FcγRIIa a permis d'inhiber l'agrégation plaquettaire induite par des anticorps anti-héparine.⁶¹⁹ Des anticorps dirigés contre les récepteurs FcγRII et FcγRIII inhibent l'agrégation des neutrophiles activés par des complexes d'anticorps IgG.⁶²⁰ L'utilisation d'un anticorps dirigé contre FcγRIII ou contre l'intégrine GpIIb/IIIa des plaquettes a réduit la liaison des neutrophiles aux plaquettes, soulignant le rôle potentiel des récepteurs Fcγ dans les interactions plaquettes/neutrophiles.⁶²¹

L'importance relative de ces autres mécanismes de liaison dans les interactions plaquettes/neutrophiles reste toutefois à déterminer.

2.5 Sélectines et intégrines dans l'adhésion et l'agrégation

2.5.1 Adhésion des neutrophiles sur l'endothélium

Le recrutement des leucocytes de l'espace vasculaire vers un site inflammatoire a fait l'objet de nombreuses études. Ce processus, dont les étapes se déroulent en séquence et non en parallèle, débute par le roulement (*rolling*), principalement sous dépendance des sélectines, suivie de l'adhésion ferme, dépendant de l'action d'intégrines, et de la diapédèse avec extravasation vers le milieu extravasculaire, facilitée par des intégrines et certaines autres molécules d'adhésion dont PECAM (platelet-endothelial cell adhesion molecule). Voyons donc brièvement l'importance des sélectines et des intégrines dans ce processus.

2.5.1.1 Le roulement

Le roulement comme tel d'un neutrophile est fonction de conditions minimales de flot (force de cisaillement supérieure à 0.5 dyn/cm^2) permettant la dissociation de liens entre le neutrophile et la paroi et également d'un taux similaire de formation et de dissociation des liaisons neutrophiles/paroi vasculaire. Donc, alors que des liens se créent à l'avant du leucocyte, des liens se libèrent à l'arrière, amenant, en condition de flot, un phénomène de roulement.⁶²² La vitesse du roulement des neutrophiles serait dépendante des sélectines impliquées.

La L-sélectine, exprimée par les leucocytes non activés, est impliquée dans les liaisons initiales entre les leucocytes et l'endothélium. Suite à l'activation de l'endothélium et l'expression rapide de P-sélectine endothéliale, la L- et la P-sélectine contribuent au roulement des leucocytes.⁶²³ La L-sélectine permet une vitesse de roulement supérieure aux autres sélectines, les liaisons neutrophiles-endothélium médiées par la L-sélectine permettraient la capture et le ralentissement des neutrophiles⁴²³ de façon à ce que les liaisons via la P- et la E-sélectine, produisant un roulement plus lent, puissent s'établir et ainsi contribuer à l'arrêt éventuel du neutrophile.^{464,624} L'importance de la L-sélectine a été démontrée dans plusieurs études *in vitro* qui, soit en utilisant des anticorps pour

bloquer la liaison entre la L-sélectine et ses ligands endothéliaux ou en stimulant la perte de la L-sélectine par les neutrophiles (*shedding*) ont produit une réduction du roulement des neutrophiles. ⁶²⁵⁻⁶²⁷ Des études *in vivo*, employant des polysaccharides interférant avec les liaisons des sélectines avec leur ligands, ^{628,629} de la L-sélectine soluble ⁶³⁰ ou des anticorps dirigés contre la L-sélectine ^{631,632} se sont traduits par une diminution du roulement des leucocytes ^{628,629,631} ainsi qu'une réduction de la taille de l'infarctus myocardique post-ischémie, ⁶³² lésion reliée à l'infiltration de neutrophiles dans le myocarde.

La P-sélectine endothéliale est aussi capable de supporter la capture et le roulement des neutrophiles via des interactions avec le PSGL-1 des leucocytes. ^{608,633} Suite à son expression par les cellules endothéliales, elle est la principale responsable du roulement des leucocytes, ⁴²³ le roulement étant surtout dépendant de la L-sélectine par la suite. ^{631,634} L'importance de la P-sélectine dans ce processus fut suggérée dans une étude *in vitro*, où l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre le PSGL-1 réduisit l'adhésion de neutrophiles à une surface de P-sélectine. ⁴⁵⁷ L'adhésion de neutrophiles à des veinules mésentériques fut également réduite par l'utilisation de cet anticorps anti-PSGL-1 chez le chat. ⁵⁵¹ L'utilisation d'un anticorps anti-P-sélectine dans un modèle expérimental d'ischémie-reperfusion du myocarde chez le lapin permit de diminuer la taille de l'infarctus. ⁶³⁵ L'importance de la présence de L- et de P-sélectine dans le recrutement des leucocytes lors de réactions inflammatoires aiguës fut soulignée par l'utilisation de souris modifiées génétiquement. En effet, dans le modèle murin d'inflammation de la cavité péritonéale, des souris déficientes (*knockout*) en P- ou en L-sélectine présentent un retard d'environ 2 à 4 heures dans l'entrée des leucocytes dans la cavité péritonéale. ^{636,637} L'absence des deux sélectines entraîne une inhibition quasi totale du recrutement des leucocytes. ⁶³⁸⁻⁶⁴⁰

La E-sélectine ne semble pas être critique pour permettre le roulement. En effet, de par le temps requis pour son expression (environ 4 heures), elle ne peut participer au recrutement aigu des leucocytes. De plus, des anticorps bloquant la E-sélectine ne diminuent le roulement que si des anticorps dirigés contre la P-sélectine sont également présents. ^{641,642} Des souris déficientes (*knockout*) en E-sélectine seulement ne

démontrent pas de réduction du recrutement des leucocytes, sauf suite à l'utilisation d'un anticorps anti P-sélectine. ^{423,643} De façon analogue, le roulement des leucocytes dans les veinules mésentériques de souris déficiente (*knockout*) en P-sélectine est totalement aboli par l'utilisation d'un anticorps anti E-sélectine. ⁶⁴⁴ D'ailleurs des souris déficientes (*knockout*) en P- et E-sélectine présentent une neutrophilie importante et développent des infections cutanées parfois léthales. ⁶⁴⁵ Ces souris démontrent un roulement et recrutement des leucocytes fortement diminué dans divers modèles d'inflammations cutanées et abdominales. ^{639,640,646} Cela souligne la redondance des mécanismes permettant le roulement et le recrutement des leucocytes lors de réactions inflammatoires. Toutefois, bien qu'une diminution du roulement des leucocytes n'est pas observée chez des souris déficientes en E-sélectine, une réduction de l'adhésion ferme des leucocytes est notée. ⁶⁴⁷ La E-sélectine pourrait donc contribuer à amplifier et à soutenir le recrutement des leucocytes lors d'inflammation, ⁶⁴¹ possiblement via une augmentation de l'expression d'intégrines β_2 des leucocytes. ⁵⁹⁷

Les leucocytes, et particulièrement les neutrophiles, sont également capables de rouler sur une surface de plaquettes activées qui recouvrent une surface vasculaire endommagée. Ce roulement sur des plaquettes activées est médié par des liaisons entre la P-sélectine plaquettaire et le PSGL-1 et/ou la L-sélectine des neutrophiles ^{458,567,604} et est un mécanisme majeur du recrutement des neutrophiles suite à un dommage vasculaire. ⁶⁴⁸ D'ailleurs, l'adhésion de neutrophiles aux plaquettes recouvrant une surface artérielle endommagée a été réduite par l'utilisation d'un anticorps anti P-sélectine. ^{183,648,649}

Le roulement de neutrophiles sur des neutrophiles déjà adhérents à un endothélium ou à une surface de plaquettes a aussi été décrit. Cela impliquerait des interactions entre le PSGL-1 des neutrophiles adhérents et la L-sélectine des neutrophiles circulants. ^{650,651} Ce mécanisme pourrait également contribuer à la capture et au recrutement de neutrophiles lors de dommages vasculaires.

2.5.1.2 Adhésion ferme

Le roulement des neutrophiles permet un contact étroit et prolongé avec la surface endothéliale; ce roulement peut être suivi de leur activation et de leur adhésion ferme.

Cette adhésion est dépendante des intégrines, particulièrement une intégrine β_2 , Mac-1^{652,653} via une liaison avec ICAM-1 exprimée par les cellules endothéliales.⁴⁸⁴

L'activation des neutrophiles peut se produire soit suite à un signal intracellulaire dépendant de l'adhésion et/ou suite à l'action de médiateurs. La liaison entre le PSGL-1 et une forme recombinante de P-sélectine se traduit par une augmentation de l'adhésion ferme des neutrophiles de souris, mais non d'origine humaine, à une surface de ICAM-1, via une augmentation de l'expression d'intégrines β_2 des neutrophiles.⁵⁶⁵ Cette discordance de résultats entre les neutrophiles humains et de souris souligne que la liaison entre la P-sélectine et le PSGL-1 des neutrophiles ne serait pas suffisante chez l'humain pour amener une activation de ces intégrines β_2 .^{566,567} L'activation du neutrophile se traduit par un changement de conformation du leucocyte, avec bipolarisation éventuelle de la cellule présentant un uropode et un pseudopode, ainsi qu'une redistribution du PSGL-1 vers l'uropode, pouvant faciliter l'arrêt du roulement,⁶⁰⁵ L'activation se traduit aussi par un clivage de la L-sélectine et une augmentation de la teneur membranaire en intégrines β_2 , particulièrement Mac-1 et p150,95 ainsi qu'une modification de la conformation des intégrines β_2 , augmentant l'affinité pour leurs ligands.

On a déjà mentionné dans une section précédente l'activation des neutrophiles suite à leur interaction avec des plaquettes via une liaison P-sélectine/PSGL-1. De plus, la liaison entre la L-sélectine et son ligand endothélial participe à l'activation des neutrophiles. En effet, Crockett-Torabi et coll. remarquent qu'un anticorps dirigé contre la L-sélectine amène une augmentation de la teneur membranaire en Mac-1 et la production de RLO par les neutrophiles.⁴²² Tel que démontré par Gopalan et coll., l'utilisation d'anticorps dirigés contre la L-sélectine, à des forces de cisaillement entre 400 et 800 s^{-1} , réduit l'adhésion des neutrophiles à une surface d'ICAM-1.⁶⁵⁴ Cela suggère qu'au-delà d'un certain seuil de conditions de flot, le roulement des leucocytes est critique pour permettre leur adhésion ferme subséquente et que la L-sélectine est importante dans ce processus, à la fois comme ligand adhésif, mais aussi comme activateur des leucocytes.

L'activation des leucocytes est aussi consécutive à l'action de substances activatrices et/ou chémoattractives produites par les cellules endothéliales. Par exemple, l'IL-8 et le PAF sont retrouvées à la surface des cellules endothéliales activées.⁶⁵⁵ L'IL-8 est une puissante chémokine pour les neutrophiles, capable aussi de les activer, se traduisant entre

autres, par un changement de conformation des intégrines LFA-1 et Mac-1 et d'une augmentation de la teneur membranaire en Mac-1. 423

L'adhésion ferme des neutrophiles est dépendante principalement de liaisons entre Mac-1 et LFA-1 et leur ligand endothélial principal, ICAM-1 (LFA-1 peut aussi se lier à ICAM-2). L'importance des intégrines β_2 dans l'adhésion ferme des neutrophiles est soulignée chez les patients atteints de LAD-1, où une déficience innée en intégrine β_2 se traduit par un taux circulant élevé de neutrophiles mais un recrutement extravasculaire réduit, favorisant l'apparition d'infections bactériennes récurrentes. 656 De plus, des souris dont l'expression d'intégrine β_2 est réduite par modification génétique, démontrent une adhésion et un recrutement de neutrophiles aux sites inflammatoires fortement diminués. 657

Comme mentionné précédemment, les neutrophiles sont capables de rouler sur une surface de plaquettes adhérant à une paroi artérielle endommagée. 603 L'arrêt de ce roulement est dépendant de l'activation des intégrines Mac-1 déjà exprimées à la surface des neutrophiles activés. La stabilisation de cette adhésion est dépendante de la génération de nouvelles molécules d'intégrine Mac-1 recrutées du pool intracellulaire suite à l'activation des neutrophiles. 602,611 Le ligand plaquettaire de Mac-1 pourrait être le fibrinogène, qui par l'entremise de l'intégrine GpIIb/IIIa activée, peut former un pont entre les neutrophiles et les plaquettes. 611 La production de PAF par les plaquettes activées peut activer les neutrophiles amenant une activation de leurs intégrines β_2 et la consolidation subséquente des liens plaquettes-neutrophiles. 460 Cette activation juxtacrine des neutrophiles est similaire au mécanisme d'activation des leucocytes par la production de PAF par l'endothélium activé. 449

2.5.1.3 Transmigration des neutrophiles

La transmigration des leucocytes vers le milieu extracellulaire est largement effectuée par leur passage dans les jonctions intercellulaires. Cette diapédèse est dépendante d'interactions entre des intégrines β_2 des neutrophiles et ICAM-1 des cellules endothéliales et également d'interactions homotypiques entre des molécules de PECAM-1, exprimées par les leucocytes et les cellules endothéliales. L'utilisation d'anticorps

dirigés contre LFA-1, Mac-1, ICAM-1 ⁶⁵⁸ ou contre PECAM-1 ^{659,660} a permis d'inhiber *in vitro* ou *in vivo* ⁶⁵⁹ la transmigration de leucocytes.

2.5.2 Agrégation des neutrophiles

Les sélectines et les intégrines sont également impliquées dans l'agrégation des neutrophiles. Deux étapes dans ce processus ont été décrites. D'abord, une première phase de contact qui serait dépendante d'une liaison entre la L-sélectine et le PSGL-1. ^{661,662} D'ailleurs, des anticorps dirigés contre la L-sélectine peuvent réduire l'agrégation des neutrophiles. ⁶⁵¹ Cette première phase est suivie d'une consolidation des liens entre les neutrophiles par les intégrines β_2 activées. ⁶⁶³⁻⁶⁶⁵ Simon et coll., ⁶⁶⁶ en utilisant des neutrophiles provenant de patients atteints de LAD-1 et des neutrophiles normaux ont démontré que l'agrégation neutrophilique reposait sur la présence de L-sélectine à la surface des neutrophiles déficients en intégrines β_2 et d'intégrines β_2 activées à la surface des neutrophiles normaux.

2.5.3 Adhésion plaquettaire à la matrice extracellulaire

L'adhésion des plaquettes à la paroi vasculaire endommagée est secondaire à l'exposition d'éléments retrouvés dans le tissu sous-endothélial, principalement le facteur de von Willebrand (vWf) et le collagène. Le vWf est une glycoprotéine composée de plusieurs répétitions d'isomères qui est retrouvée dans les granules α des plaquettes et les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales. Chaque isomère contient plusieurs domaines différents disposés dans une séquence spécifique. ⁶⁶⁷ Le vWf, produit par les cellules endothéliales, adsorbé du plasma ou relâché par les plaquettes activées ⁶⁶⁸, permet l'interaction des plaquettes à la matrice subendothéliale par l'entremise de la glycoprotéine GpIb-IX-V qui reconnaît le domaine A1 du vWf. ^{440,498} La glycoprotéine GpIb-IX-V est un complexe formé de 4 glycoprotéines transmembranaires riches en leucine. ⁶⁶⁹ La GpIb est composée d'une chaîne α d'environ 135 kDa et d'une chaîne β d'environ 25 kDa unies par un lien disulfure près de la surface extracellulaire. La région extracellulaire de la chaîne α contient une répétition de 7 séquences riches en leucine ainsi qu'une région riche en tyrosine. La queue cytoplasmique de la chaîne α est associée avec le cytosquelette plaquettaire via des protéines se liant à l'actine (actin binding protein).

^{667,670,671} La région extracellulaire de la chaîne β , plus courte, contient une séquence riche en leucine, sa queue cytoplasmique renferme des sites de phosphorylation pour une protéine kinase dépendante de l'AMPc. ⁶⁶⁷ La structure de la GpIX est similaire à celle de Gp1b β , exceptée une queue cytoplasmique plus restreinte. GpV, dont la portion extracellulaire contient 15 séquences riche en leucine, complète ce complexe. La présence de GpV, Gp1b β et Gp1b α est requise pour stabiliser le complexe. ⁶⁷² Ces glycoprotéines seraient disposées de façon à ce que deux molécules de Gp1b α , dont les portions extracellulaires convergent vers l'intérieur pour former une région globulaire, sont disposées de chaque côté d'une unité de GpV. Les Gp1b α sont elles-mêmes flanquées de Gp1b β et de GpIX. ⁶⁶⁷

Une séquence située dans la portion extracellulaire de Gp1b α près de la région N-terminale contient les sites de liaison avec le vWf. En plus de se lier avec le vWf, le complexe Gp1b-IX-V peut aussi servir de récepteur pour la thrombine, via une interaction avec Gp1b α . Cela pourrait favoriser soit une activation directe de la plaquette via un signal intracellulaire médié par Gp1b-IX-V ou faciliter l'activation de la plaquette via l'interaction de la thrombine avec son récepteur plaquettaire de plus grande affinité, PAR-1. ⁶⁶⁷

Les plaquettes ainsi localisées au site de dommage vasculaire peuvent interagir, par exemple, avec le collagène via leur intégrine $\alpha_2\beta_1$ (constitutivement active) et leur glycoprotéine GPVI. ^{498,673} Elles peuvent interagir également avec la fibronectine et la laminine via leurs intégrines $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_6\beta_1$. Ces interactions, par l'entremise d'un signal intracellulaire, principalement dans le cas de $\alpha_2\beta_1$ et du complexe Gp1b-IX-V via l'entremise d'influx calcique et de tyrosine kinases, ⁶⁷⁴⁻⁶⁷⁶ vont activer les plaquettes. Cela va résulter en l'activation de l'intégrine GpIIb/IIIa déjà exprimée à sa surface et, dépendant de la nature de l'activation, amener la mobilisation d'un pool intracellulaire d'intégrines GpIIb/IIIa présentes à la surface du système canaliculaire des plaquettes (OCS) et dans la membrane des granules α . ⁵¹⁶ Cette intégrine une fois activée, en présence de forces élevées de cisaillement, produit une adhésion ferme des plaquettes à la matrice extracellulaire, entre autres via des liens irréversibles avec la séquence RGD retrouvée dans le domaine C1 du vWf. ^{440,524} L'activation des plaquettes se traduit aussi

par un changement de forme de la plaquette (formation de projections épineuses de taille variable) et, selon l'agoniste, du relâchement de divers médiateurs contenus dans ses granules ou néoformés. En condition de flot et de forces de cisaillement élevées, le ralentissement préalable des plaquettes par d'autres intégrines ou glycoprotéines est nécessaire pour permettre à la GpIIb/IIIa d'établir ses liens avec le vWf ou des éléments de la matrice extracellulaire. ^{673,677-680} Comme mentionnée précédemment, la GpIIb/IIIa est également responsable de l'agrégation plaquettaire, principalement par l'entremise de liens avec les chaînes γ de la molécule de fibrinogène. ^{524,681}

2.6 Importance des sélectines comme cible thérapeutique

Étant donné l'implication des sélectines dans divers processus biologiques d'importance, comme les interactions plaquettes-leucocytes et l'adhésion leucocytaire, des composés pouvant interférer avec la liaison entre ces molécules d'adhésion et leur ligands furent utilisés dans le cadre de divers modèles de pathologies cardiovasculaires, principalement d'ischémie-reperfusion. Voyons brièvement quelques-uns de ces composés.

2.6.1 Analogues du sLe^x

Des analogues du sLe^x ont été utilisés dans des modèles d'ischémie-reperfusion chez le chien et le lapin. L'efficacité de ces analogues est variable, dépendant à la fois du composé et de l'espèce étudiée et probablement aussi de la faible affinité de liaison du sLe^x. Alors que l'utilisation du GM1380 permet de réduire la taille de l'infarctus du myocarde chez le lapin, ⁶⁸² l'emploi du CY1503 ne démontre pas chez cette espèce d'effet bénéfique dans un modèle d'ischémie-reperfusion. ⁶⁸³ Toutefois, le CY1503, dans des modèles d'ischémie-reperfusion chez le chien, ⁶⁸⁴ le chat ⁶⁸⁵ et le rat ⁶⁸⁶ a permis de réduire l'infiltration de neutrophiles et la taille de l'infarctus. Récemment, l'efficacité du CY1503 fut vérifiée dans un modèle aigu d'angioplastie carotidienne chez le porc. ⁶⁸⁷ Une diminution d'environ 60% de l'adhésion des neutrophiles à la paroi artérielle endommagée fut observée, sans effet sur l'adhésion des plaquettes. Une étude *in vitro* avec perfusion de plaquettes et/ou de neutrophiles en présence ou non de CY1503

confirma que la réduction de l'adhésion neutrophilique sur une paroi artérielle endommagée était dépendante de la présence de plaquettes. Étant donné l'importance des plaquettes dans le recrutement des neutrophiles^{97,98} via une liaison P-sélectine/PSGL-1, ces résultats soulignent l'importance des sélectines et des interactions plaquettes-neutrophiles dans les événements aigus post-angioplastie.

2.6.2 La fucoïdine

La fucoïdine est un polysaccharide complexe fucosylé extrait de l'algue *Fucus vesiculosus*.⁶⁸⁸ Elle est essentiellement constituée d'un squelette de chaînes de fucose auquel s'ajoute des branches latérales de fucose avec un nombre variable de groupements sulfate.⁶⁸⁹ La taille et le degré de sulfation ont un impact sur les propriétés de la fucoïdine; les chaînes les plus courtes et les plus riches en groupement sulfate présentent le plus de propriétés anticoagulantes.⁶⁹⁰⁻⁶⁹² La fucoïdine est capable d'interférer, de façon similaire à un analogue du sLe^x, avec le roulement des leucocytes sur une surface endothéliale, tel qu'observé dans des veinules mésentériques.^{629,693} L'utilisation de fucoïdine dans un modèle d'ischémie-reperfusion chez le rat⁶⁹⁴ et l'agneau,⁶⁹⁵ s'est traduite par une diminution de la taille de l'infarctus. Une réduction de l'extravasation des neutrophiles fut aussi notée suite à l'emploi de fucoïdine dans des modèles de méningite⁶⁹⁶ et d'inflammation pulmonaire⁶⁹⁷ chez le lapin. Ces résultats soulignent l'importance des sélectines dans le recrutement des leucocytes, notamment des neutrophiles, aux sites d'inflammations.

La fucoïdine serait également capable de réduire la coagulabilité du sang en diminuant la formation de fibrine. Cet effet pourrait être secondaire soit à une augmentation de l'action de l'antithrombine III et/ou du cofacteur de l'héparine (*heparine cofactor II*), diminuant l'action de la thrombine et la formation de fibrine.⁶⁹⁸⁻⁷⁰⁰ Tel que suggéré par Grauffel et coll.,⁷⁰¹ on ne peut aussi exclure la possibilité d'un effet direct de la fucoïdine interférant avec la formation de fibrine à partir du fibrinogène. En plus de diminuer la formation du thrombus, la fucoïdine démontre aussi une propriété profibrinolytique qui serait reliée à une diminution de l'activité de PAI-1,⁶⁹⁹ à une diminution de l'inhibition de la plasmine par l' α_2 -antiplasmine^{691,699} et à une

augmentation de la conversion du plasminogène en plasmine par l'activateur tissulaire du plasminogène ou par l'urokinase ^{691,699,702}

2.6.3 PSGL-1 soluble

Bien que les analogues du sLe^x et des polysaccharides comme la fucoïdine ont permis de confirmer l'importance des sélectines, ces composés ne sont pas très spécifiques. Tel que mentionné précédemment, le PSGL-1 est le principal ligand leucocytaire de la P-sélectine; il est aussi capable de liaison, mais de moindre affinité avec la L- et la E-sélectine. ⁷⁰³ L'administration de PSGL-1 soluble dans des modèles expérimentaux d'ischémie-reperfusion et de transplantation rénale chez le rat a permis de diminuer l'infiltration de neutrophiles et de prévenir les dommages tissulaires. ^{686,704}

Le rPSGL-Ig est une forme recombinante chimérique soluble de PSGL-1. Il comprend les 47 premiers acides aminés de la région N-terminale du domaine extracellulaire du PSGL-1 de souris fusionnés à la région charnière d'un anticorps IgG1 humain. ⁷⁰⁵ Des mutations dans la portion immunoglobuline du rPSGL-Ig en réduisent la liaison avec les récepteurs Fcγ ⁷⁰⁶ et prolongent sa demie-vie plasmatique. L'administration de rPSGL-Ig dans des modèles expérimentaux d'ischémie-reperfusion myocardique ⁷⁰⁷ et mésentérique ⁷⁰⁸ a permis de diminuer le recrutement de neutrophiles et les dommages tissulaires subséquents. Ce composé fut aussi employé lors de transplantations hépatiques, ⁷⁰⁹ diminuant les dommages tissulaires associés à l'ischémie-reperfusion. Ces résultats soulignent l'importance du PSGL-1 dans le recrutement des neutrophiles via une interaction avec la P-sélectine endothéliale. Un effet profibrinolytique du rPSGL-Ig a également été noté dans un modèle expérimental de thrombose artérielle chez le porc ⁷⁰⁵ et chez le rat ⁷¹⁰. Bien que l'efficacité du rPSGL-Ig fut démontré dans de nombreux modèles d'ischémie-reperfusion, à ce jour le bénéfice potentiel de son utilisation dans des modèles expérimentaux d'angioplastie reste à évaluer.

Relativement peu d'études se sont attardées au rôle des sélectines et à l'efficacité de bloqueurs des sélectines dans les événements aigus suite à un endommagement vasculaire par angioplastie. L'implication des sélectines et des interactions plaquettes-neutrophiles dans le développement de la resténose post-angioplastie, principale complication chronique de l'angioplastie, est très peu étudiée. Nous avons donc voulu, dans un premier

temps, confirmer l'importance des sélectines dans un modèle aigu d'angioplastie carotidienne chez le porc. Par la suite, de façon à se rapprocher de la situation clinique, développer et caractériser un modèle de dommage répété par angioplastie carotidienne chez le porc, particulièrement en ce qui a trait à l'adhésion plaquettaire et neutrophilique de même qu'au développement de la resténose. Finalement, en utilisant ce modèle chronique, vérifier l'impact d'un bloqueur spécifique du PSGL-1, le rPSGL-Ig, sur les interactions des plaquettes et des neutrophiles avec la paroi artérielle endommagée et sur le développement de la resténose post-angioplastie.

CHAPÎTRE TROIS : CONTRIBUTIONS ORIGINALES

3.1 Inhibition of Platelet-Neutrophil Interactions by Fucoidan Reduces Adhesion and Vasoconstriction After Acute Arterial Injury by Angioplasty in Pigs

Résumé :

Les molécules d'adhésion de la famille des sélectines contribuent largement aux interactions des leucocytes et des plaquettes au site d'un dommage vasculaire. Ces interactions augmentent les réactions inflammatoires ainsi que la formation de thrombi lors de la réponse vasculaire suite à l'endommagement. La présente étude analyse les effets d'un bloqueur des sélectines, la fucoïdine, sur les interactions des plaquettes et des neutrophiles suite à un endommagement artériel créé par angioplastie chez le porc. La déposition de plaquettes-Cr⁵¹ ainsi que l'adhésion de neutrophiles-In¹¹¹ a été mesurée sur des segments artériels carotidiens intacts, légèrement ou sévèrement endommagés. Les dommages ont été produits par gonflement d'un cathéter-ballon chez 7 porcs témoins (saline) et 11 porcs traités (I.V.; 1 mg/kg, n=6, 5 mg/kg, n=5). Dans le groupe témoin, la déposition plaquettaire ($\times 10^6/\text{cm}^2$) a été dépendante de la sévérité de la lésion. En effet, elle s'est accrue significativement ($P < 0.05$) de 0.06 ± 0.06 sur l'endothélium intact à 3.8 ± 0.6 sur des lésions légères, puis à 33.6 ± 4.9 sur des lésions sévères. Le traitement à la fucoïdine à 1 mg/kg n'a eu aucun effet significatif sur la déposition plaquettaire. Cependant, le traitement à 5 mg/kg a réduit la déposition plaquettaire sur les lésions sévères de 73%. Le niveau d'adhésion neutrophilique ($\times 10^3/\text{cm}^2$) a également été influencé par la sévérité de la lésion ($P < 0.05$) augmentant dans le groupe témoin de 8.8 ± 2.5 sur l'endothélium intact à 226.6 ± 45.5 sur des lésions légères à 397.4 ± 61.3 sur des lésions sévères. Une fois de plus, le traitement à 1 mg/kg n'a eu aucun effet, mais le traitement à 5 mg/kg a réduit l'adhésion des neutrophiles de 92% et de 84% sur les segments avec lésions légères et sévères, respectivement. De plus, la fucoïdine a induit une réduction de 51% de la réponse vasoconstrictrice au site de lésion vasculaire. La fucoïdine n'a pas démontré d'effet significatif sur l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP de même que sur le temps de coagulation activée (ACT). Lors d'études de perfusion avec des suspensions purifiées de plaquettes et de neutrophiles, nous avons observé que la fucoïdine inhibe l'adhésion de chaque type cellulaire aux surfaces

endommagées. Cette inhibition est encore plus marquée lors de la perfusion de suspensions mixtes indiquant que la fucoidine interfère avec les interactions plaquettes-neutrophiles. Cette étude souligne l'importance des sélectines lors des réactions pathophysiologiques impliquant les interactions plaquettes-neutrophiles suivant un dommage vasculaire artériel.

**Inhibition of Platelet-Neutrophil Interactions by Fucoidan Reduces
Adhesion and Vasoconstriction After Acute Arterial Injury by
Angioplasty in Pigs**

Patrick Chauvet, Jean-Guy Bienvenu, Jean-François Théorêt, Jean-Gilles Latour,
and Yahye Merhi

*Laboratory of Experimental Pathology, Montreal Heart Institute and the University of
Montreal, Montreal, Quebec, Canada*

Running title: Fucoidan and Platelet-Neutrophil Interactions.

Article publié: Journal of Cardiovascular Pharmacology 34: 597-603. 1999

Address correspondence and reprint requests to Dr. Yahye Merhi, Ph.D., at Laboratory of Experimental Pathology, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street East, Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8.

Phone: [REDACTED] Fax: (514) 376-1355, e-mail: [REDACTED]

Summary: The selectin family of cell adhesion molecules contributes to the interactions of leucocytes and platelets at the site of vascular injury. Such interactions enhance inflammatory reactions and thrombus formation during the arterial response to injury. In this study, we investigated the effects of a selectin inhibitor (Fucoidan) on platelet and neutrophil interactions following arterial injury produced by angioplasty in pigs. ^{51}Cr -platelet deposition and ^{111}In -neutrophil adhesion were quantified on intact, mildly, and deeply injured carotid arterial segments, produced by balloon dilation in control (saline, $n = 7$) and Fucoidan-treated (I.V.; 1 mg/kg, $n = 6$; 5 mg/kg, $n = 5$) pigs. In the control group, platelet deposition ($\times 10^6/\text{cm}^2$) was influenced by the severity of injury and increased significantly ($p < 0.05$) from 0.06 ± 0.06 on intact endothelium to 3.8 ± 0.6 and 33.6 ± 4.9 on mildly and deeply injured segments, respectively. Fucoidan, 1 mg/kg, had no significant effect, although doses of 5 mg/kg reduced platelet deposition by 73% on deeply injured segments. The level of neutrophil adhesion ($\times 10^3/\text{cm}^2$) was also influenced by the severity of injury: it increased in the control group from 8.8 ± 2.5 on intact endothelium to 226.6 ± 45.5 and 397.4 ± 61.3 on mildly and deeply injured arterial segments, respectively ($p < 0.05$). Again, 1 mg/kg Fucoidan had no effect, although doses of 5 mg/kg reduced neutrophil adhesion by 92% and by 84% on mildly and deeply injured segments, respectively. The effects of Fucoidan were associated with a 51% decrease in the vasoconstrictive response at the site of arterial injury. However, Fucoidan had no significant effect on either platelet aggregation or activated clotting time (ACT). In vitro perfusion experiments, Fucoidan inhibited both isolated platelet, and neutrophil, adhesion to damaged arterial surfaces. This inhibition was more pronounced in experiments using mixed cell preparations, indicating that Fucoidan interferes with platelet and neutrophil interactions. These results highlight the importance of selectins in the acute physiopathological reactions related to platelet-neutrophil interactions following arterial injury.

Key Words: Platelets–Neutrophils–Fucoidan–Selectins–Angioplasty.

The arterial response to injury involves many pathophysiological reactions that can lead to clinical complications such as thrombosis, vasospasm, and restenosis. Platelets and leucocytes, normally responsible for maintaining vascular homeostasis, are implicated in the major reactions that lead to these pathological states (1-3). After balloon angioplasty, the subendothelial matrix is exposed to flowing blood and circulating platelets are activated by contact with the thrombogenic surface. The ensuing response is influenced by a variety of local conditions, including shear forces, the severity of the lesion, as well as platelet- and neutrophil-derived products. Cell adhesion molecules are responsible for physical interactions leading to activation and adhesion of platelets and neutrophils to the matrix (4). Under pathological conditions, excess activation and adhesion of platelets and neutrophils may cause acute occlusive thrombosis, vasoconstriction, and further vascular injury through the release of damaging products such as O₂-radicals and proteolytic enzymes (5). Previous studies have shown that P-selectin, present in the α -granules and expressed on the surface of activated platelets (6), may increase interactions between platelets and neutrophils at the site of arterial damage (7-9), a critical step in the evolution of the vascular lesion (10-12). This adhesive interaction appears to be mediated by platelet P-selectin and neutrophil surface Sialyl Lewis^X. Indeed, we have shown that an analog of Sialyl Lewis^X can successfully inhibit neutrophil recruitment by adherent and activated platelets, at the site of deep arterial injury, in a porcine model of carotid angioplasty (13).

Fucoidan, a α 1-3-linked fucosylated polysaccharide extracted from the marine algae *Fucus vesiculolus* (14), has been extensively used as a selectin blocker. In fact, Fucoidan's molecular structure seems to be a close analog of natural ligands recognized by the selectins, such as Sialyl Lewis^X (15); in addition, various studies have shown that Fucoidan can block L and P-selectins in vitro (15-17) as well as in vivo (18-20). Research on Fucoidan has focused mainly on inhibiting leukocyte rolling on endothelial cells. Leukocyte rolling is essential for adhesion and subsequent migration. Fucoidan was accordingly found to interfere with the inflammatory response (19,20), to inhibit intimal hyperplasia in rats subjected to balloon-catheter injury (21) and to protect against ischemia and reperfusion (22-24). Furthermore, Fucoidan was found to inhibit Factor Xa-induced thrombosis in rabbits (25) and to possess anticoagulant and fibrinolytic activities

(26-29). However, Fucoidan has never been used in an acute model of arterial injury, where selectins may play an active role in the onset of vascular pathologies (1,3,30).

Our hypothesis is that selectin-mediated interactions between platelets and neutrophils increase their activation and adhesion at the site of arterial injury and are implicated in thrombosis and the associated vascular responses after angioplasty. This study therefore focused on inhibiting acute platelet-neutrophil interactions mediated by selectins, and the associated vasoconstrictive response, at the site of carotid arterial injury induced by balloon angioplasty in pigs.

METHODS

Animal preparation

Eighteen normal cross-bred Yorkshire pigs of either sex were prepared as previously described (12,31), in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care regulations. The animals were sedated by I.M. injection of 20 mg/kg ketamine (Rogarsetic, Rogar/STB Inc., Montreal, Quebec, Canada) and 3 mg/kg azaperone (Stresnil, Janssen Pharmaceuticals, Mississauga, Ontario, Canada). 50 ml of blood were sampled from the right jugular vein and anticoagulated with 1:5 acid-citrate-dextrose (ACD) for platelet and neutrophil isolation and radiolabeling. Pigs were intubated, ventilated mechanically with O₂ (30-35%) and medical air (65-70%), and maintained under anesthesia with 0.5-1% halothane (Fluothane, Ayerst, Montreal, Quebec, Canada). The right femoral artery and vein were cannulated. Heart rate, arterial blood pressure, and body temperature were continuously recorded and hematological parameters determined in each group.

Platelet and neutrophil isolation and radiolabeling

Platelet and neutrophil isolation and radiolabeling were performed as described previously (12,31). In brief, ACD-anticoagulated blood was centrifuged 15 min at 500 g. Platelet-rich plasma (PRP) was collected, from which platelets were obtained at 1200 g. Platelet-poor plasma (PPP) was saved. Platelets were resuspended in HBSS-Hepes EDTA (Hank's balanced salt solution with 0.15 g/l ethyl diamine tetracetic acid (EDTA), pH: 6.5) and incubated for 40 min with 300 μ ci of ⁵¹Cr (Amersham International, UK) at room

temperature. After a final centrifugation to remove unbound ^{51}Cr , platelets were resuspended in 5 ml of PPP and reinjected into the pig.

After PRP removal during platelet isolation, leucocytes were obtained from the same blood by sedimentation with 4% dextran and washed in HBSS-Hepes citrated buffer (3.8 g/l sodium citrate, pH: 7.4). Neutrophils were isolated on a Ficoll-Paque gradient, 30 min at 400 g. Red blood cells were lysed, and the neutrophils resuspended in HBSS-Hepes-citrate. They were then incubated with 250 μCi of ^{111}In Oxine solution (Amersham International, UK) for 15 min, centrifuged, resuspended in 5 ml PPP, and reinjected.

Treatment and carotid angioplasty procedure

One hour after platelet and neutrophil reinjections, animals received at random an IV infusion of either Fucoidan (1 mg/kg or 5 mg/kg, Sigma, US) or saline, at a rate of 1 ml/min for 20 min. Ten min after injection, the pigs were given (100 IU/kg heparin I.V) and allowed to rest for 5 min prior to angioplasty procedure. An 8F guiding catheter was introduced into the femoral artery, guided under fluoroscopic control to the left common carotid artery, and replaced by a 7F balloon dilation catheter (size : 8 mm \times 3 cm, Meditech Inc., US). The balloon was positioned between the fourth and fifth cervical vertebrae and inflated five times, to 6 atmospheres for 30 sec, with 60-sec intervals between inflations. The procedure was then repeated for the right common carotid artery. In order to measure local vasoconstrictive responses and the balloon-to-artery ratio, angiograms of each of the common carotid arteries were taken before, during, and after dilation (12,31,32).

At the end of the dilation procedure, approximately 30 min after angioplasty, the carotid arteries were perfusion-fixed *in situ* as previously described (11-13). The common carotid arteries were then excised, cleaned, and divided into nondilated segments (selected distally to the injured area) and dilated segments (3 from the site of injury); each was approximately 1 cm in size. Next, each segment was measured for internal surface area and processed through a gamma-counter to determine ^{111}In -neutrophil and ^{51}Cr -platelet radioactivity. Total platelet and neutrophil adhesion levels were deduced by comparison with the radioactivity of reference blood samples of known platelet and neutrophil content, as detailed previously (33,34).

Histological and morphometric analyses

Stained Movat-tissue sections were prepared from representative sections of each segment in order to determine the severity of injury. Nondilated segments were also checked for the absence of injury. Mild injury occurs when the internal elastic lamina is exposed to the arterial lumen in the absence of endothelium. Deep arterial injury occurs when the internal elastic lamina is ruptured and the subjacent media exposed. The type of injury as well as the inner circumference and length of the ruptured sections of the internal elastic lamina were determined with the use of a Sony DXC-970 MD color camera mounted on a Leitz Wetzlar microscope, linked to a Power Macintosh computer loaded with Scion Image 1.60 imaging software. The ratio of fracture length to internal circumference was calculated to correct for vessel size, as described previously (35).

Hematologic and hemodynamic monitoring

Heart rate and blood pressure were monitored throughout all experiments. Blood samples were collected in EDTA vacutainer tubes for the determination of hematologic parameters using a T-890 cell counter (Coulter Corporation, FL, US). The activated clotting time (ACT) was determined on 2 ml of fresh venous blood collected in FTCA 510 Hemochron tubes and coagulated in an Hemochron 801 (Technidyne, NJ, US). For platelet aggregation, 500 μ l of freshly drawn venous blood were heparinized (5 U/ml), diluted with 490 μ l saline, and activated with 10 μ l ADP (10 μ M). Platelet aggregation was determined in a whole blood aggregometer (Chrono-Log 560-VS, PA, US) and expressed in ohms after 5 min of activation.

In vitro isolated platelet and neutrophil adhesion assays

To further examine the importance of the selectin-mediated platelet-neutrophil interactions on platelet and neutrophil adhesion, we performed in vitro assays using isolated platelet and neutrophil suspensions. These suspensions were treated with the selectin inhibitor, and perfused over denuded arterial segments in Plexiglas perfusion chambers in a controlled environment, as described previously (12). Briefly, excised pig aortas are cleaned of all surrounding tissue and preserved at 4°C in Krebb's Ringer buffer. A section is cut transversely into a ring, which is then opened longitudinally. The media is exposed by peeling off the intima. The strip is then carefully cut into four segments that

fit into the four Plexiglas chambers. Two parallel sets of two chambers are connected with flexible tubing (R-1000 Tygon, Norton, US) and submerged in a circulating waterbath maintained at 37°C. Platelets and neutrophils are isolated and radiolabelled as described above but, finally, are resuspended in HBSS-Hepes buffer pH: 7.4 with calcium (0.14 g/l calcium chloride) and magnesium (0.1 g/l magnesium sulfate). Platelet ($250 \times 10^6/\text{ml}$) and/or neutrophil ($5 \times 10^6/\text{ml}$) suspensions are incubated (37°C, 5 min) with or without Fucoidan. They are then perfused for 5 min through the chambers, thereby allowing cells to come in contact with the media through a 1 cm \times 0.2 cm window. The system is connected to a peristaltic pump (model 7520-35, Cole Parmer Instrument Co., US), which maintains flow conditions of 10 ml/min. Platelet deposition ($\times 10^6/\text{cm}^2$) and neutrophil adhesion ($\times 10^3/\text{cm}^2$) are quantified in the gamma counter by comparison with 50 μl reference samples taken prior to perfusion.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. Student's paired and unpaired *t* tests were performed for intragroup and intergroup comparisons, respectively. One-way analysis of variance (ANOVA) was performed when appropriate. Differences were considered statistically significant at the 95% confidence level ($p < 0.05$).

RESULTS

Hematologic and hemodynamic parameters

As shown in Table 1, the hematological parameters of the animals -including platelets, leucocytes, and red blood cell counts, activated clotting time (ACT), and whole blood platelet aggregation in response to ADP- as well as the hemodynamic parameters were within the normal range for pigs and were not influenced significantly by either of the Fucoidan doses.

Characteristics of the arteries

As shown in Table 2, neither the diameter of the arteries before angioplasty nor the balloon/artery ratios differed among the groups. Also, the severity of the arterial damage, as indicated by the relative percentages of mildly and deeply injured segments and by the

fracture length/internal elastic lamina ratio in the case of deeply injured segments, was similar between groups. Interestingly, treatment with Fucoïdan 5 mg/kg reduced vasoconstriction of injured arteries from 36.3 ± 4.7 in the control group to 17.7 ± 3.4 ($p < 0.05$), corresponding to a 51% reduction. However, the arterial vasoconstriction was not modified by 1 mg/kg Fucoïdan when compared to the control group.

In vivo platelet and neutrophil adhesion

Fig. 1 shows platelet deposition on intact, mildly injured, and deeply injured carotid segments in control and treated pigs. In control animals, the level of platelet deposition ($\times 10^6/\text{cm}^2$) depended on the severity of injury, increasing from 0.06 ± 0.06 on intact endothelium, to 3.84 ± 0.59 on mildly injured segments, and to 33.61 ± 4.88 on deeply injured segments. While 1 mg/kg had no effect, 5 mg/kg Fucoïdan reduced platelet deposition by 73% on deeply injured arterial segments, going from 33.61 ± 4.88 to 8.75 ± 2.51 ($p < 0.05$). Neutrophil adhesion ($\times 10^3/\text{cm}^2$) also depended on the severity of injury; as shown in Fig. 2, it increased in control animals from 8.75 ± 2.45 on intact endothelium, to 226.56 ± 45.46 on mildly injured segments, to 397.4 ± 61.63 on deeply injured segments. Fucoïdan (5 mg/kg) reduced neutrophil adhesion on mildly injured segments by 92% (18.91 ± 4.43), and on deeply injured segments by 84% (65.04 ± 10.81). Again, Fucoïdan 1 mg/kg had no significant effect on neutrophil adhesion.

In vitro adhesion assays

In order to determine the direct effects of Fucoïdan on platelet and neutrophil interactions with the arterial media, adhesion assays were performed with isolated cells. As shown in Fig. 3, platelet deposition ($\times 10^6/\text{cm}^2$) increased ($p < 0.05$) with the presence of neutrophils from 2.49 ± 0.42 to 8.34 ± 1.26 . When platelets were perfused in the absence of neutrophils, Fucoïdan at 20 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ reduced platelet deposition by 50% and 75%, respectively. When platelets were perfused in the presence of neutrophils, platelet deposition was reduced by 71% and by 89%, respectively. As shown in fig. 4, neutrophil adhesion ($\times 10^3/\text{cm}^2$) to arterial media increased significantly in the presence of platelets as well, going from 26.56 ± 2.36 to 122.12 ± 17.37 . In addition, Fucoïdan at both dosages (20 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inhibited neutrophil adhesion in the presence and

absence of platelets. However, when neutrophils were perfused alone, Fucoïdan reduced ($p < 0.05$) adhesion by 30-40%. When neutrophils were perfused with platelets, Fucoïdan reduced neutrophil adhesion by 60-80%.

DISCUSSION

The arterial response to injury involves platelet deposition, via several adhesive proteins on the exposed arterial surface as well as cell adhesion molecules on platelets (36). Neutrophils may then roll and adhere to these platelets and take part in the inflammatory response (7-9,37). These reactions are closely influenced by the coagulation pathways, cellular mediators, the local flow conditions (38), and the nature of the arterial lesion. Under pathological conditions, dysregulation of hemostasis may lead to recruitment of large numbers of platelets and leucocytes at the site of arterial injury, thereby enhancing thrombus formation, vascular occlusion, vasospasm, and restenosis (1,2,4,39).

As demonstrated previously (11), and again in this study, vascular injury is associated with both platelet and neutrophil adhesion. The extent of neutrophil adhesion is influenced by platelets (33), which support the adhesion of neutrophils to damaged arterial surfaces in a concentration dependent manner (12). In addition, we have shown in perfusion experiments with isolated platelets and neutrophils that adhesion of both cell types is increased when they are perfused in mixed suspensions, stressing the importance of an interplay between platelets and neutrophils at the site of injury. Together, these findings indicate that platelets can modulate neutrophil adhesion on damaged arteries. This reaction involves cell-cell adhesive interactions that appear to be mediated by at least platelet P-selectin. In fact, P-selectin has been shown to mediate the binding of neutrophils to platelets in a vessel-wall injury model *in vitro* (8,37,40), in a thrombosis model *in vivo* (7), and after angioplasty (13). These observations are consistent with our present findings that Fucoïdan dramatically reduced both *in vitro* and *in vivo* platelet and neutrophil adhesion at the site of arterial injury.

Our *in vitro* perfusion experiments showed that isolated platelets can adhere to arterial media when perfused alone, but that their adhesion is increased in the presence of neutrophils. Platelet deposition to the subendothelial matrix mainly involves adhesive interactions of Von Willebrand Factor with platelet GPIb and GPIIb/IIIa (41) and of

collagen with GPIa/IIa (42). Activated adherent platelets may also be responsible for increased recruitment of other platelets, through aggregation mediated by platelet GPIIb/IIIa, fibrinogen (36), and thrombospondin (43,44). It has been reported that Fucoidan can bind to adhesive proteins such as laminin (45) and fibronectin (46), thereby reducing platelet deposition and thrombus growth by inhibiting aggregation mediated by thrombospondin (15,45). In addition, Fucoidan has anticoagulant and fibrinolytic properties, including potentiation of HCII (25,26,47), activation of plasminogen, and inhibition of α_2 -antiplasmin (27). However, since Fucoidan had no effect on ACT at the doses used in our study, its effects in our experiments appear unrelated to its potential anticoagulant properties.

The adhesion of neutrophils to adherent activated platelets mainly involves L-selectin, Sialyl Lewis^X, and PSGL-1 via binding to platelet P-selectin (48-50). These interactions slow neutrophil rolling, induce their activation, and allow their firm adhesion via β_2 integrin (Mac-1) (51), that integrin, in turn, also binds fibrinogen and platelet GPIIb/IIIa (8,9). In our study, the effect of Fucoidan on neutrophil adhesion appears to be linked to its capacity to block selectins. Previous studies have shown that Fucoidan can block L and P-selectins in vitro (15-17) as well as in vivo (18-20). Recently, we have observed in flow cytometry studies that Fucoidan inhibits the binding of activated platelets expressing P-selectin to neutrophils (unpublished observation). The findings of Patankar *et al.* (15) support this observation by demonstrating that Fucoidan seems to be a close structural analog of Sialyl Lewis^X, one of P-selectin ligand on neutrophils. This finding is also in agreement with our recent study (13) showing that a structural analog of Sialyl Lewis^X (CY-1503) inhibits neutrophil adhesion to platelets at the site of arterial injury. However, whereas CY-1503 was without any significant effect on platelet deposition, Fucoidan interfered with both platelet and neutrophil adhesion. These results may explain the greater effect observed with Fucoidan on both the adhesion and vasoconstrictive responses. It has been reported, moreover, that thrombospondin may contribute to platelet-leukocyte binding (52) and that Fucoidan may inhibit this binding by an interaction with thrombospondin (45). As well, our perfusion experiments have shown that Fucoidan inhibits the adhesion of isolated neutrophil in the absence of platelets. Perhaps, this effect is related to an inhibition of neutrophil-neutrophil interactions and adhesion via L-selectin (16,53). However, Fucoidan, in the presence of platelets,

completely inhibited neutrophil adhesion increase, thus indicating that Fucoidan's major effect is related to inhibition of neutrophil-platelet interactions through P-selectin.

Engagement of these cell adhesion molecules causes platelet and neutrophil activation through intracellular signaling pathways (54,55). Activated platelets and neutrophils release potent vasoactive substances such as thromboxane A₂, serotonin, PAF, leukotrienes, elastase, and O₂-radicals that increase vascular injury and vasoconstriction (5). Inhibition of neutrophil adhesion and interaction with platelets may reduce the release of these vasoactive substances and, thereby, the arterial vasoconstrictive response.

Platelet-neutrophil interactions at the site of vascular injury play an important role in the pathophysiology of thrombosis and the vasoconstrictive response. Furthermore, increased platelet and neutrophil activation and interactions have been reported in patients following angioplasty (56,57). Our study has shown that inhibition of this specific interaction by a selectin blocker, Fucoidan, can reduce platelet-neutrophil complex formation, platelet-neutrophil coactivation at the site of deep arterial injury, and both platelet and neutrophil adhesion to injured arterial surfaces. These adhesive interactions through selectins may well be a therapeutic target in our attempts to limit post-angioplasty complications such as acute thrombosis and vasospasm, thereby reducing chronic restenosis.

Acknowledgments: This work was supported by the Medical Research Council of Canada, The Heart and Stroke Foundation of Quebec, and the Fonds de la recherche en santé du Québec.

REFERENCES

1. Bazzoni G, Dejana E, Del Maschio A. Platelet-neutrophil interactions. Possible relevance in the pathogenesis of thrombosis and inflammation. *Haematologica* 1991;76:491-99.
2. Nash GB. Adhesion between neutrophils and platelets: a modulator of thrombotic and inflammatory events? *Thromb Res* 1994;74:S3-S11.
3. Bird MI, Foster MR, Priest R, Malhotra R. Selectins: physiological and pathophysiological roles. *Biochem Soc Trans* 1997;25:1199-206.
4. Jang Y, Lincoff AM, Plow EF, Topol EJ. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1994;24:1591-1601.
5. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320:365-76.
6. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* 1989;84:92-9.
7. Palabrica T, Lobb R, Furie BC, et al. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated *in vivo* by P-selectin on adherent platelets. *Nature* 1992;359:848-51.
8. Kuijper PHM, Gallardo Torres HI, Lammers JWJ, Sixma JJ, Koenderman L, Zwaginga JJ. Platelet and fibrin deposition at the damaged vessel wall: cooperative substrates for neutrophil adhesion under flow conditions. *Blood* 1997;89:166-75.
9. Weber C, Springer TA. Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to α IIb β 3 and stimulated by platelet-activating factor. *J Clin Invest* 1997;100:2085-93.
10. Merhi Y, Lacoste LL, Lam JYT. Neutrophil implications in platelet deposition and vasoconstriction after deep arterial injury by angioplasty in pigs. *Circulation* 1994;90:997-1002.
11. Merhi Y, Guidoin R, Provost P, Leung TK, Lam JYT. Increase of neutrophil adhesion and vasoconstriction with platelet deposition after deep arterial injury by angioplasty. *Am Heart J* 1995;129:445-51.

12. Merhi Y, Provost P, Guidoin R, Latour JG. Importance of platelets in neutrophil adhesion and vasoconstriction after deep carotid arterial injury by angioplasty in pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1185-91.
13. Merhi Y, Provost P, Chauvet P, Théorêt JF, Phillips ML, Latour JG. Selectin blockade reduces neutrophil interactions with platelets at the site of deep arterial injury by angioplasty in pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19 :372-377.
14. Springer GF, Wurzel HA, McNeal GM Jr., Ansell NJ, Doughty MF. Isolation of anticoagulant fractions from crude fucoidin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1957;94:404-9.
15. Patankar MS, Oehninger S, Barnett T, Williams RL, Clark GF. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. *J Biol Chem* 1993;268:21770-6.
16. Rochon YP, Simon SI, Lynam EB, Sklar LA. A role for lectin interactions during human neutrophil aggregation. *J Immunol* 1994;152:1385-93.
17. Hajela K, Kayestha R, Sumati. Carbohydrate induced modulation of cell membrane IV: Interaction with mucin and fucoidan totally immobilizes the human platelet membrane. *Indian J Biochem Biophys* 1996;33:308-10.
18. Lindbom L, Xie X, Raud J, Hedqvist P. Chemoattractant-induced firm adhesion of leucocytes to vascular endothelium *in vivo* is critically dependent on initial leukocyte rolling. *Acta Physiol Scand* 1992;146:415-21.
19. Granert C, Raud J, Xie X, Lindquist L, Lindbom L. Inhibition of leukocyte rolling with polysaccharide fucoidin prevents pleocytosis in experimental meningitis in the rabbit. *J Clin Invest* 1994;93:929-36.
20. Shimaoka M, Ikeda M, Iida T, Taenaka N, Yoshiya I, Honda T. Fucoidin, a potent inhibitor of leukocyte rolling, prevents neutrophil influx into phorbol-ester-induced inflammatory sites in rabbit lung. *Am J Resp Crit Care Med* 1996;153:307-11.
21. McCaffrey TA, Falcone DJ, Borth W, Brayton CF, Weksler BB. Fucoidan is a non-anticoagulant inhibitor of intimal hyperplasia. *Biochem Biophys Res Com* 1992;184:773-81.
22. Kubes P, Jutila M, Payne D. Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia/reperfusion. *J Clin Invest* 1995;95:2510-19.

23. Miura T, Nelson DP, Schermerhorn ML, et al. Blockade of selectin-mediated leukocyte adhesion improves postischemic function in lamb hearts. *Ann Thorac Surg* 1996;62:1295-300.
24. Omata M, Matsui N, Inomata N, Ohno T. Protective effects of polysaccharide fucoidin on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997;30:717-24.
25. Mauray S, Sternberg C, Theveniaux J, Millet J, Siquin C, Tapon-Bretonnière J, Fischer AM. Venous antithrombotic and anticoagulant activities of a fucoidan fraction. *Thromb Haemost* 1995;74:1280-5.
26. Church FC, Meade JB, Treanor RE, Whinna HC. Antithrombin activity of Fucoidan. *J Biol Chem* 1989;264:3618-23.
27. Soeda S, Sakaguchi S, Shimeno H, Nagamatsu A. Fibrinolytic and anticoagulant activities of highly sulfated fucoidan. *Biochem Pharmacol* 1992;43:1853-8.
28. Doctor VM, Hill C, Jackson GJ. Effect of fucoidan during activation of human plasminogen. *Thromb Res* 1995;79:237-47.
29. Minix R, Doctor VM. Interaction of fucoidan with proteases and inhibitors of coagulation and fibrinolysis. *Thromb Res* 1997;87:419-29.
30. Lorant DE, Topham MK, Whatley RE, McEver RP, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Inflammatory roles of P-selectin. *J Clin Invest* 1993;92:559-70.
31. Provost P, Borgeat P, Merhi Y. Platelets, neutrophils, and vasoconstriction after arterial injury by angioplasty in pigs: effects of MK-886, a leukotriene biosynthesis inhibitor. *Brit J Pharm* 1998;123:251-8.
32. Provost P, Merhi Y. BW755C, a dual lipoxigenase/cyclooxygenase inhibitor, reduces mural platelet and neutrophil deposition and vasoconstriction after angioplasty injury in pigs. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;277:17-21.
33. Merhi Y, Lam JYT, Lacoste LL, Latour JG, Guidoin R, Waters D. Effects of thrombocytopenia and shear rate on neutrophil and platelet deposition on endothelial and medial arterial surfaces. *Arterioscler Thromb* 1993;13:951-7.
34. Merhi Y, King M, Guidoin R. Acute thrombogenicity of intact and injured natural blood conduits versus synthetic conduits: neutrophil, platelet, and fibrin(ogen) adsorption under various shear-rate conditions. *J Biomed Mat Res* 1997a;34:477-85.

35. Provost P, Tremblay J, Merhi Y. The antiadhesive and antithrombotic effects of the nitric oxide donor SIN-1 are combined with a decreased vasoconstriction in a porcine model of balloon angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1806-12.
36. Ruggeri ZM. Mechanisms initiating platelet thrombus formation *Thromb Haemost* 1997;78:611-6.
37. Yeo EL, Sheppard JI, Feuerstein IA. Role of P-selectin and leukocyte activation in polymorphonuclear cell adhesion to surface adherent activated platelets under physiologic shear conditions (an injury vessel wall model). *Blood* 1994;83:2498-507.
38. Konstantopoulos K, McIntire LV. Effects of fluid dynamic forces on vascular cell adhesion. *J Clin Invest* 1997;100:S19-23.
39. Barron MK, Lake RS, Buda AJ, Tenaglia AN. Intimal hyperplasia after balloon injury is attenuated by blocking selectins. *Circulation* 1997;96:3587-92.
40. Kirchhofer D, Riederer MA, Baumgartner HR. Specific accumulation of circulating monocytes and polymorphonuclear leucocytes on platelet thrombi in a vascular injury model. *Blood* 1997;89:1270-8.
41. André P, Hainaud P, Bal dit Sollier C, Garfinkel LI, Caen JP, Drouet LO. Relative involvement of GPIb/IX-vWF axis and GPIIb/IIIa in thrombus growth at high shear rates in the guinea pig. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:919-24.
42. Saelman EUM, Nieuwenhuis HK, Hese KM, et al. Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa ($\alpha_2\beta_1$ -Integrin). *Blood* 1994;83:1244-50.
43. Agbanyo FR, Sixma JJ, de Groot PG, Languino LR, Plow EF. Thrombospondin-platelet interactions. *J Clin Invest* 1993;92:288-96.
44. Kowalska MA, Tuszynski GP. Interaction of thrombospondin with platelet glycoproteins GPI_a-II_a and GPII_b-III_a. *Biochem J* 1993;295:725-30.
45. Roberts DD, Rao CN, Liotta LA, Gralnick HR, Ginsberg V. Comparison of the specificities of laminin, thrombospondin, and von Willebrand factor for binding to sulfated glycolipids. *J Biol Chem* 1986;261:6872-7.

46. Burton-Wurster N, Zhang DW, Lust G. Accumulation of fibronectin in articular cartilage explants cultured with TGF β 1 and Fucoidan. *Arch Biochem Biophys* 1995;316:452-60.
47. Collic S, Fischer AM, Tapon-Brethaudiere J, Boisson C, Durand P, Jozefonvicz J. Anticoagulant properties of a fucoidan fraction. *Thromb Res* 1991;64:143-54.
48. Lo SK, Golenbock DT, Sass PM, Maskati A, Xu H, Silverstein RL. Engagement of the Lewis X antigen (CD15) results in monocyte activation. *Blood* 1997;89:307-14.
49. Borges E, Eytner R, Moll T, et al. The P-selectin glycoprotein ligand-1 is important for recruitment of neutrophils into inflamed mouse peritoneum. *Blood* 1997;90:1934-42.
50. Liu WJ, Ramachandran V, Kang J, Kishimoto TK, Cummings RD, McEver RP. Identification of N-terminal residues on P-selectin glycoprotein ligand-1 required for binding to P-selectin. *J Biol Chem* 1998;273:7078-87.
51. Brown KK, Henson PM, Maclouf J, Moyle M, Ely JA, Worthen GS. Neutrophil-platelet adhesion: relative roles of platelet P-selectin and neutrophil β_2 (CD18) integrins. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;18:100-10.
52. Silverstein RL, Nachman RL. Thrombospondin binds to monocytes- macrophages and mediates platelet-monocyte adhesion. *J Clin Invest* 1987;79:867-74.
53. Walcheck B, Moore KL, McEver RP, Kishimoto TK. Neutrophil-neutrophil interactions under hydrodynamic shear stress involve L-selectin and PSGL-1. *J Clin Invest* 1996;98:1081-7.
54. Crockett-Torabi E, Sulenbarger B, Smith CW, Fantone JC. Activation of human neutrophils through L-selectin and Mac-1 molecules. *J Immunol* 1995;154:2291-302.
55. Tsang YTM, Neelamegham S, Hu Y, Berg EL, Burns AR, Smith CW, Simon SI. Synergy between L-selectin signaling and chemotactic activation during neutrophil adhesion and transmigration. *J Immunol* 1997;159:4566-77.
56. Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Puchner G, Schömig A. Neutrophil and platelet activation at balloon-injured coronary artery plaque in patients undergoing angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:819-24.

57. Serrano CV Jr., Ramirez JAF, Venturinelli M, et al. Coronary angioplasty results in leukocyte and platelet activation with adhesion molecule expression. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:1276-83.

TABLE 1. Hematologic and hemodynamic parameters of the control and Fucoidan-treated groups

	Control Saline	Fucoidan 1 mg/kg	Fucoidan 5 mg/kg
Platelets ($\times 10^6/\text{ml}$)	332 \pm 37	338 \pm 23	296 \pm 26
Leucocytes ($\times 10^6/\text{ml}$)	17.7 \pm 6.5	10.2 \pm 1.6	9.0 \pm 1.5
Red blood cells ($\times 10^9/\text{ml}$)	4.9 \pm 0.1	4.5 \pm 0.2	4.6 \pm 0.2
Activated clotting time (s)	110 \pm 6	92 \pm 3	119 \pm 9
Platelet aggregation (ohms)	13.5 \pm 2.5	14.6 \pm 1.8	10.9 \pm 2.5
Heart rate (bpm)	128 \pm 15	121 \pm 19	109 \pm 11
Mean arterial BP (mm Hg)	58 \pm 2.1	63 \pm 3	55 \pm 4.7

TABLE 2. Characteristics of the animals and dilated arteries in the control and Fucoidan-treated groups

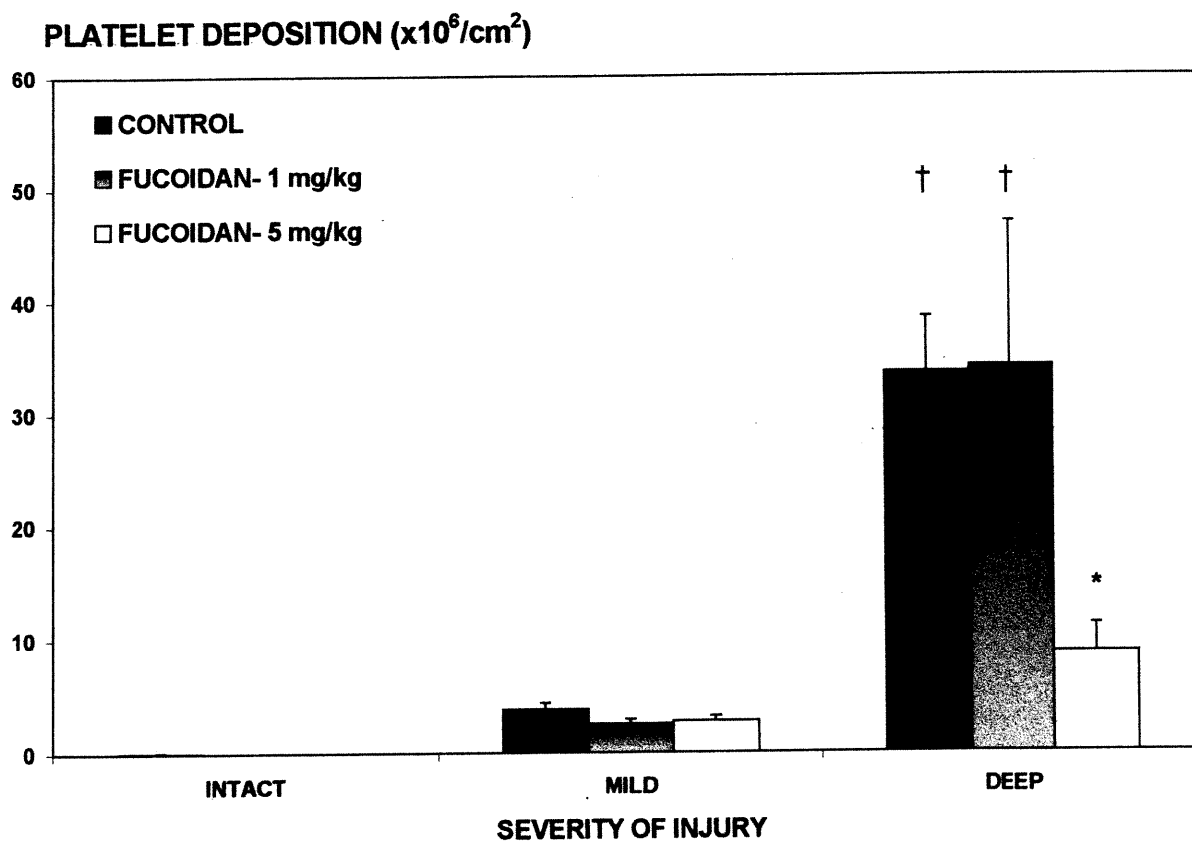
	Control	Fucoidan 1 mg/kg	Fucoidan 5 mg/kg
No. of animals	7	6	5
Weight (kg)	17.7 ± 1.1	18.9 ± 1.3	18.9 ± 1.8
No. arteries successfully dilated	14	11	10
Diameter of arteries before dilation (mm)	4.06 ± 0.09	4.08 ± 0.09	4.08 ± 0.14
Vasoconstriction (% reduction of diameter)	36.3 ± 4.6	24.8 ± 4.3	17.7 ± 3.2*
Balloon/artery ratio	1.12 ± 0.02	1.19 ± 0.04	1.16 ± 0.03
No. of mildly injured segments (%)	20 (48%)	21 (64%)	16 (55%)
No. of deeply injured segments (%)	22 (52%)	12 (36%)	14 (45%)
Circumference of internal elastic lamina (mm)	7.17 ± 0.35	6.7 ± 0.26	6.63 ± 0.51
Fracture length (mm)	1.0 ± 0.1	1.3 ± 0.2	0.8 ± 0.1
Fracture length/internal elastic lamina ratio (%)	13.7 ± 1.3	19.5 ± 2.7	13.3 ± 2.8

*p < 0.05 vs control

FIGURES LEGENDS

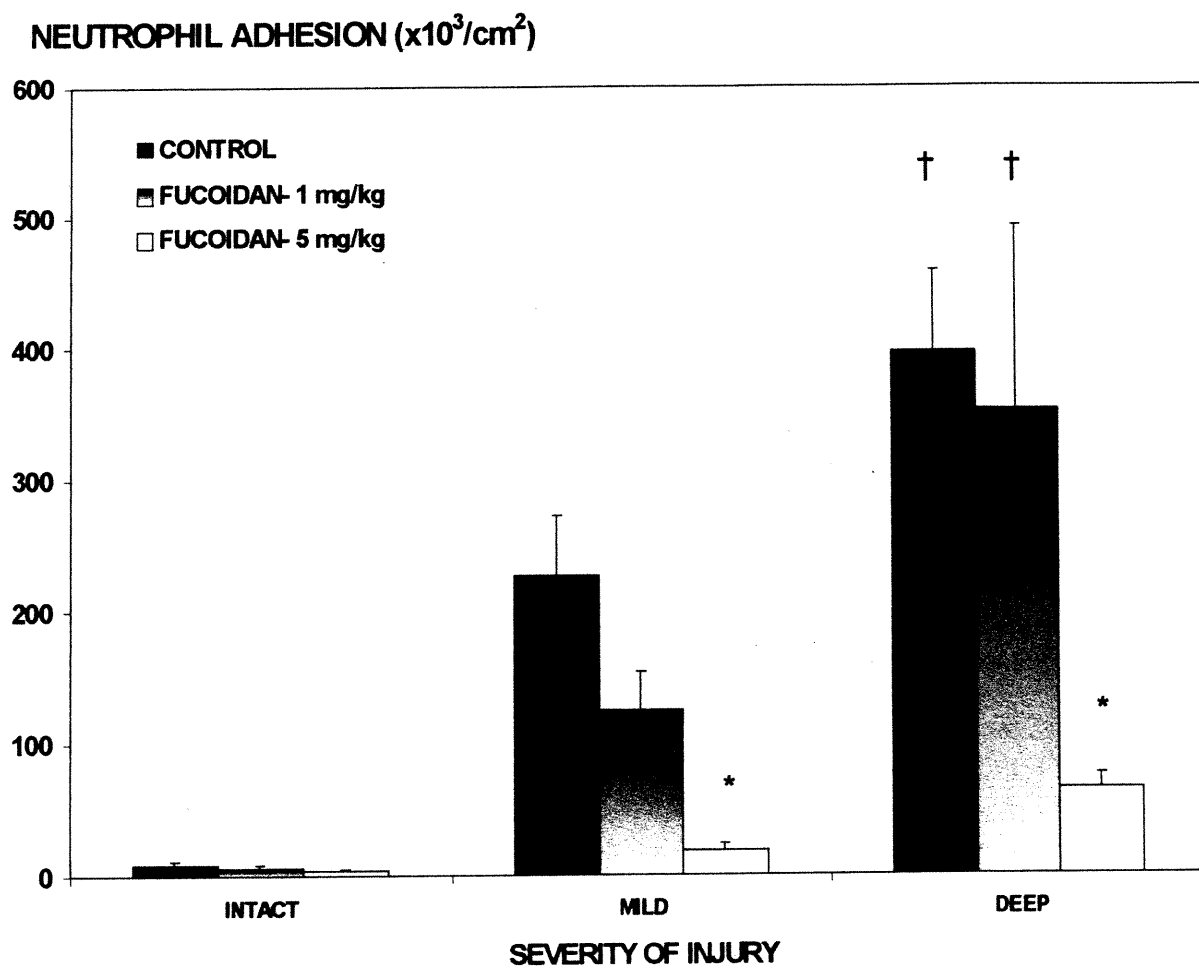
- Figure 1.** Platelet deposition to intact, mildly injured, and deeply injured arterial segments in control and Fucoïdan-treated groups. Platelet deposition increased with the severity of injury in the control group. Treatment with Fucoïdan 5 mg/kg reduced platelet deposition to deeply injured segments by 73%.
- Figure 2.** Neutrophil adhesion to intact, mildly injured, and deeply injured arterial segments in control and Fucoïdan-treated groups. Neutrophil adhesion increased with the severity of injury in the control group. Treatment with Fucoïdan 5 mg/kg reduced neutrophil adhesion to mildly injured segments by 92% and to deeply injured segments by 84%.
- Figure 3.** Effect of Fucoïdan on platelet deposition to arterial media in perfusion flow chambers, in the absence and presence of neutrophils. Both doses of Fucoïdan reduced platelet deposition to arterial media.
- Figure 4.** Effect of Fucoïdan on neutrophil adhesion to arterial media in perfusion flow chambers, in the absence and presence of platelets. Both doses of Fucoïdan reduced neutrophil adhesion to arterial media.

FIGURE 1



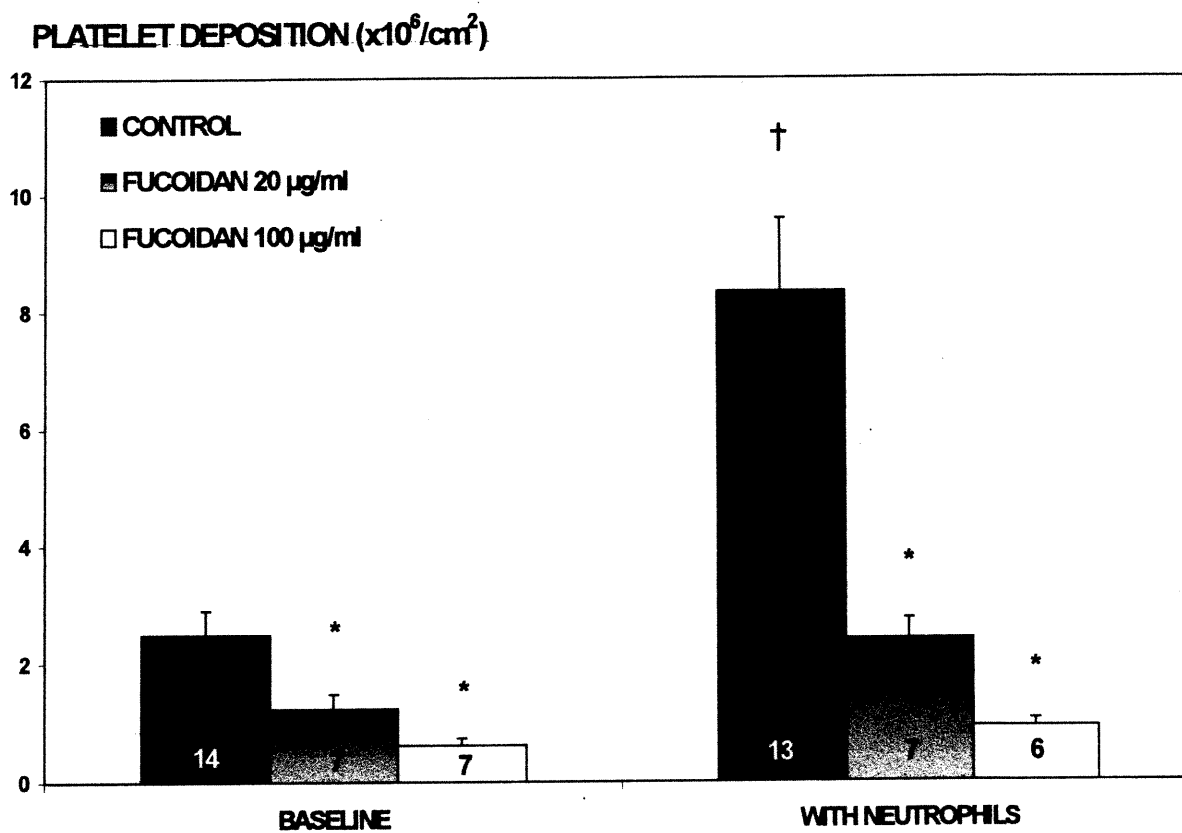
†P < .05 vs intact and mild; *P < .05 vs control

FIGURE 2



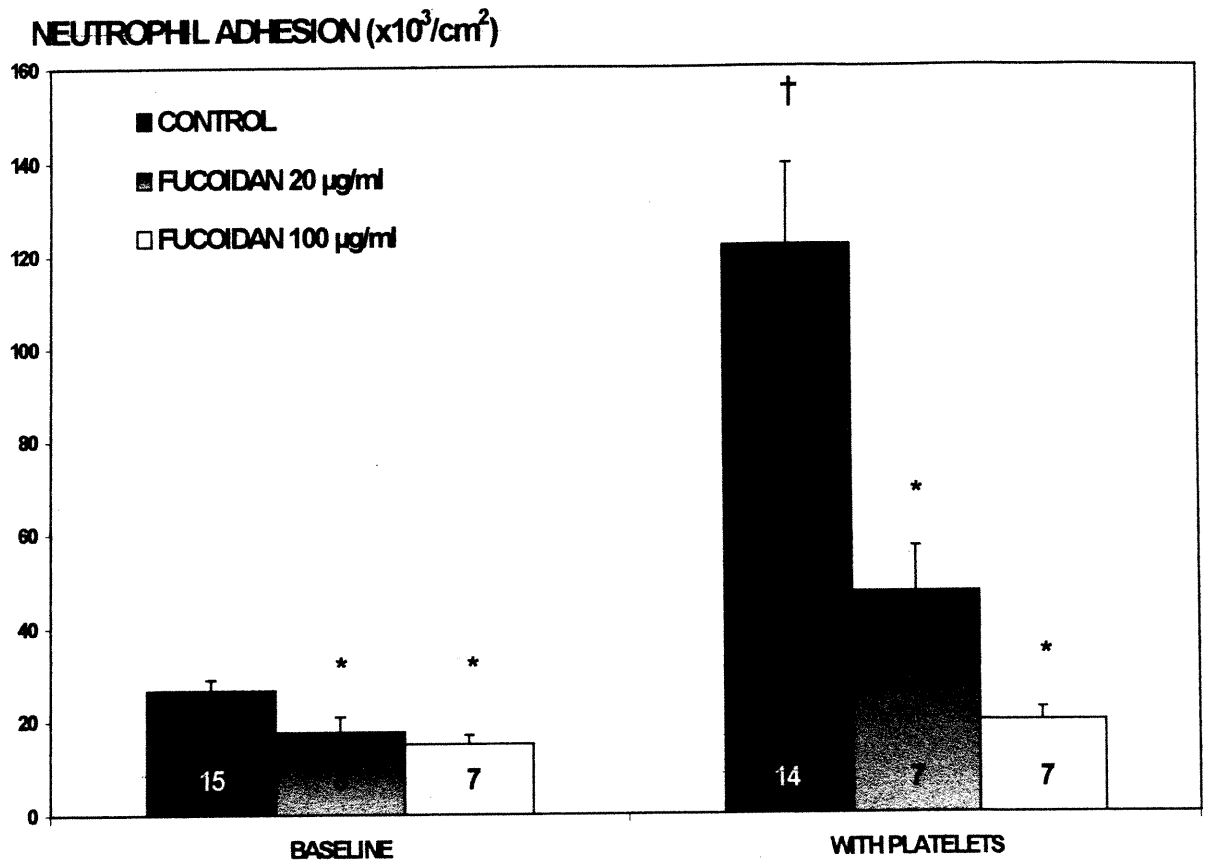
† $P < .05$ vs intact and mild; * $P < .05$ vs control

FIGURE 3



†P < .05 vs baseline; *P < .05 vs control

FIGURE 4



†P < .05 vs baseline; *P < .05 vs control

3.2 Relationship between platelets and neutrophil adhesion and neointimal growth after repeat arterial wall injury induced by angioplasty in pigs

Résumé

Les interactions des plaquettes et des neutrophiles avec la paroi artérielle endommagée peuvent contribuer à la resténose. Même si des modèles expérimentaux ont surtout utilisés l'endommagement par cathéter ballon d'artères saines, la dilatation d'artères pathologiques est cliniquement plus pertinente et pourrait se traduire par différentes interactions cellulaires. Cette étude a pour but d'analyser la relation entre l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles, l'étendue de la formation du néointima et l'expression de P-sélectine après dommage artériel répété. Dans le cadre d'un modèle aigu (simple angioplastie), 11 porcs ont été soumis à une dilatation carotidienne bilatérale et sacrifiés une heure plus tard. Dans un modèle chronique (angioplastie répétée), 19 porcs ont été soumis à une angioplastie carotidienne bilatérale. Un mois plus tard, 9 porcs ont subi une angioplastie similaire aux mêmes sites alors que 10 porcs ne furent pas redilatés mais plutôt utilisés pour étudier le néointima 1 mois post-angioplastie. Après une simple angioplastie, l'adhésion de plaquettes-Cr⁵¹ ($\times 10^6/\text{cm}^2$) s'est accrue significativement ($P < 0.05$) de 3.8 ± 0.6 , sur des segments légèrement endommagés, à 45.9 ± 6.5 sur des segments sévèrement endommagés. Des résultats statistiquement similaires sont observées après angioplastie répétée. Après une simple angioplastie, l'adhésion des neutrophiles-In¹¹¹ ($\times 10^3/\text{cm}^2$) a augmentée de 226.6 ± 45.5 sur des segments légèrement endommagés à 512.5 ± 70.3 sur des segments sévèrement endommagés ($P < 0.05$). Cependant, après angioplastie répétée, l'adhésion des neutrophiles était significativement accrue ($P < 0.05$) dans des segments légèrement (1289.05 ± 227.9) et sévèrement endommagés (2411.8 ± 333.9) par rapport à l'adhésion observée après une simple angioplastie. Un mois après angioplastie, le néoendothélium exprimait de la P-sélectine; la production de néointima et l'adhésion des neutrophiles était plus importante après un dommage sévère que suite à un dommage léger. Ces résultats qui suggèrent la présence d'un processus inflammatoire persistant 1 mois après angioplastie, soulignent que les neutrophiles pourraient participer à la progression de la resténose post-angioplastie.

Relationship between platelets and neutrophil adhesion and neointimal growth after repeat arterial wall injury induced by angioplasty in pigs

Jean-Guy Bienvenu ^a, Jean-François Tanguay ^b, Patrick Chauvet ^a, Yahye Merhi ^{a*}

^aLaboratory of Experimental Pathology, ^b Experimental Interventional Laboratory, Montreal Heart Institute, University of Montreal, Montreal, QC, CANADA

Short title: Repeated injury and neutrophil adhesion in pigs

Wordcount: 5,626

Accepted for publication: Journal of Vascular Research

* Tel.: [REDACTED]; fax: 1 (514) 376-1355; e-mail: [REDACTED]

Abstract

Platelet (PLT) and neutrophil (PMN) interactions with injured vascular wall may contribute to restenosis. Although animal models have mainly focused on balloon injury of intact arteries, dilation of pathological arteries is clinically more relevant and may elicit different cellular responses. This study aims to investigate the relationship between the adhesion of PLT and PMN, the extent of neointima formation and the expression of P-selectin after repeat arterial injury. In an acute single-injury model, eight pigs were subjected to bilateral balloon dilation of carotid arteries and sacrificed 1 h later. In a chronic model, 19 pigs were subjected to similar angioplasty procedures and allowed to recover for 1 month; then 9 pigs were redilated at the same previously injured sites (double injury) while the remaining 10 pigs were not redilated and used to investigate the extent and the adhesive properties of the neointima. After single injury, ^{51}Cr -PLT adhesion ($\times 10^6/\text{cm}^2$) increased significantly from 3.8 ± 0.6 to 45.9 ± 6.5 ($P < 0.05$) on mildly and deeply injured segments, respectively; these values were statistically similar to those observed after double injury. After single injury, ^{111}In -PMN adhesion ($\times 10^3/\text{cm}^2$) increased from 226.6 ± 45.5 to 512.5 ± 70.3 ($P < 0.05$) on mildly and deeply injured segments. However, after double injury, PMN adhesion was significantly higher ($P < 0.05$) on both mildly and deeply injured segments (1289.05 ± 227.9 and 2411.8 ± 333.9) than PMN adhesion observed after single injury. As well, the neo-endothelium expresses P-selectin at 1 month and neointimal growth was more abundant on deeply injured segments and was associated with more PMN adhesion than mildly injured segments. These results, which indicate ongoing proinflammatory processes 1 month post-angioplasty, suggest that PMNs may participate in the progression of restenosis.

Keywords: Neutrophils; Platelets; Neointima; Angioplasty; Repeated injury

Introduction

Since its clinical introduction nearly 20 years ago, percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA) has increased in popularity as a clinically effective method for improving blood flow through stenosed or occluded arteries. However, over the next 3 to 6 months, restenosis (recurrent stenosis) occurs in approximately 30% of patients, thereby constituting a significant limitation to the long-term success of this procedure [1-3]. A number of trials using drugs effective in animals for reducing restenosis have produced negative clinical results [4,5]. The complexity of the restenosis process, species particularities, and suboptimal drug dosing may partially explain these differences [6,7]. In addition, most experimental studies evaluating the pathophysiology of restenosis have used animal models in which the arteries were superficially injured or were free of previous atherosclerosis or other vascular insults. However, clinical PTCA frequently induces a more severe and deeper injury that would expose to the blood flow a neointima composed of a mixture of smooth muscles cells and inflammatory cells within an extracellular matrix. Cellular reactions and interactions can be quite different in the two settings [8-10].

Previous studies have demonstrated the importance of platelets and neutrophils in the response to arterial injury produced by angioplasty [11-16]. Briefly, the injured arterial luminal surface is rapidly covered with a layer of adherent platelets and leukocytes. Platelets and neutrophils adhere to the damaged arterial wall in proportion to the degree of injury [12]. Activated platelets release constituents, such as thromboxane A₂, fibrinogen, serotonin, and platelet-derived growth factor (PDGF), all of which promote mural thrombus formation, vasoconstriction, and restenosis [11,12,17,18]. As well, neutrophils are activated after PTCA [19-23] and released biologically active products such as oxygen-free radicals, vasoactive arachidonic acid metabolites, and proteolytic enzymes, while contributing to up- or down-regulation of platelet reactivity [14,24,25]. Most of these interactions are facilitated by cell adhesion molecules mainly members of the selectin, integrin and immunoglobulin families [26].

P-selectin is a cell adhesion glycoprotein of the selectin family, found in the Weibel-Palade bodies of the endothelial cells and in the alpha-granules of platelets [27]. It is rapidly

expressed at the cell surface within minutes after cellular activation [28,29]. P-selectin is involved in the initial rolling of leukocytes on the stimulated endothelium [30,31]. It interacts with carbohydrates and its principal ligand, P-selectin glycoprotein-1 (PSGL-1), on neutrophils and other leukocytes [32-34]. P-selectin is also necessary for platelet-leukocyte interactions [35-37] where it allows tethering of neutrophils by activated platelets [17,38,39].

Few data, however, exist regarding the interactions of platelets and neutrophils with damaged arterial wall after repeated injury. Therefore, we performed this study to investigate, in the carotid arteries of swine, after single or repeated injury by balloon dilation, the interactions of platelets and neutrophils with damaged arterial wall. We also sought to determine the relationship between the adhesion of platelets and neutrophils, the extent of neointima formation and the expression of P-selectin by the reendothelialized injured arterial wall.

Materials and methods

Animal preparation

We performed experiments on 27 normal cross-bred Yorkshire swine (mean weight: 20.6 ± 0.7 kg), prepared according to the Canadian Council on Animal Care regulation. The study design is summarized in Fig. 1. Animals were sedated with an intramuscular injection of ketamine (Rogarsetic, 15 mg/kg, Rogar/STB Inc.) and azaperone (Stresnil, 3 mg/kg, Janssen Pharmaceuticals). The pigs were intubated, mechanically ventilated with medical air and O₂, and anesthetized with 0.5% to 1% halothane (Fluothane, Ayerst), as previously described [12,13,40].

Arterial injury by angioplasty

As previously described, [12,13,40] intravenous heparin (100 U/kg) was given approximately 5 min before beginning the angioplasty procedure. The angioplasty procedures involved the following steps. First, through the right femoral artery, a 7F polyethylene balloon dilation catheter (size, 8 mm \times 3 cm, Meditech Inc., US) was positioned, under fluoroscopic control, into the left and right common carotid arteries, between the fourth and the fifth cervical vertebrae. Second, in each artery, five 30-sec inflations were performed at a pressure of 6 atm, with resting intervals of 60 sec between each inflation. Angiograms were obtained immediately before, during, and after dilation in order to determine the balloon/artery ratio.

As resumed in Fig. 1, animals were either sacrificed 1 h after the dilation procedure (acute, single-injury model, $n = 8$) or allowed to recover and kept for 4 weeks (chronic, repeated-injury model, $n = 19$). At 4 weeks, nine of these latter animals were subjected to a second angioplasty procedure at the same previously injured sites and sacrificed 1 h later, while 10 were sacrificed without redilation. In each animal, heart rate, blood pressure, and basal hematological parameters were determined. Platelet aggregation by impedance was measured in a whole-blood aggregometer (Chrono-Log 560-VS). Aggregation was induced in 500 μ l of heparinized (5 U/ml) blood, diluted with 490 μ l of saline and activated with 10

μl ADP (10 μM). Activated clotting time (ACT) was determined in the 2 ml blood samples collected in FTCA 510 Hemochron tubes and placed in an Hemochron 801 (Technidyne).

Isolation and labeling of neutrophils and platelets

On the day of sacrifice, autologous blood, collected in acid-citrate-dextrose (ratio 5:1) was used, for the isolation and radiolabelling of neutrophils and platelets with ^{111}In -indium-oxine and ^{51}Cr , respectively, as detailed elsewhere [12,13,40,41]. Briefly, a low-speed centrifugation yielded a bottom portion rich in red blood cells and in leukocytes and a platelet-rich plasma. Platelet suspension extracted from this plasma was then incubated with 300 μCi of ^{51}Cr (Amersham International) for 30 min. Next, the suspension was centrifuged to remove unbound ^{51}Cr , resuspended in platelet-poor plasma, and reinjected into the animal. Neutrophil isolation was performed with the bottom portion obtained after the first blood centrifugation. A leukocyte-rich suspension, obtained after red blood cells sedimentation with 4% dextran, was then layered on Ficoll-Paque (Pharmacia LKB) gradient and centrifuged for 30 min at 300 g to obtain a neutrophil-rich bottom. Next, contaminating red blood cells were lysed and neutrophils were incubated with 250 μCi of ^{111}In (Amersham International) for 15 min. Finally, the suspension was then centrifuged to remove unbound ^{111}In , resuspended in platelet-poor plasma, and reinjected into the animal.

Quantification of neutrophil and platelet adhesion

At the end of the experiments, we fixed the carotid arteries in situ, using an anterograde perfusion of a buffered formalin solution (Tissufix #2, Laboratoires Gilles Chaput). The fixed common carotid arteries were then removed and cleaned of all adventitial tissue. The dilated section as well as the proximal and distal nondilated areas were each divided into three segments. After length and internal surface measurements, these segments as well as reference blood samples were placed in a gamma counter equipped with a multinuclide analysis program for ^{111}In and ^{51}Cr radioactivity determination. The amount of neutrophils and platelets per square centimeter adhering to arterial segments was calculated from the segment's radioactivity, and the cellular count and radioactivity of a reference blood

sample, corrected for the luminal surface of the arterial segment, as described previously [40,42].

Histopathology

Representative transversal sections from each dilated segment, as well as from proximal and distal areas of all arteries, were stained with hematoxylin-phloxin-safran (HPS) and Movat's pentachrome; thus allowing for identification of the internal elastic lamina (IEL) and of the delimitation between the neointima and the media, as reported previously [43]. The degree of injury produced by angioplasty was determined by light microscopy. Whereas a mild injury was characterized by an exposed but not breached IEL, a deep injury was characterized by a breached IEL and a lacerated media. To evaluate the extent of the reendothelialization, we selected representative injured segments of nonredilated carotid arteries from five swine in the chronic model for a scanning electron microscopy (SEM) procedures.

Morphometry

We subjected all sections of the injured segments from nonredilated arteries in the chronic model to morphometric analysis, using computer-assisted histomorphometry and the NIH Image 1.60 imaging software. Measurements were made of the lengths of the external elastic lamina (EEL) and IEL, the surface areas within the EEL and IEL, and the neointimal and lumen areas. In sections where the IEL was breached or missing, the dimensions of the neointima overlying the intact IEL and in the area of medial repair were added together [44,45]. The medial area was calculated by the differential between the EEL and the IEL areas, while the percent luminal stenosis was calculated as follows: $\text{neointimal area}/(\text{neointimal area} + \text{lumen area}) \times 100$ [44].

Immunohistochemistry

We evaluated the presence of endothelial cells on the neointima of nonredilated segments in the chronic model, using peroxidase-labeled Dolichos biflorus lectin [46] (DBA, Sigma Chemical). Sections were incubated for 30 min at room temperature with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ solution

of DBA lectin in phosphate buffer saline (PBS). The color was developed using 0.05% 3,3'-diaminobenzidine and 0.03% hydrogen peroxide in PBS. Sections were then counterstained with Mayer's hematoxylin. In the aforementioned nonredilated arteries, we assessed the expression of P-selectin by the neoendothelium in paraffin-embedded sections, using a rabbit polyclonal antibody to human P-selectin (Pharmingen) that has been shown to cross-react with porcine P-selectin. After inactivation of endogenous peroxidase activity by incubation in a solution of methanol/hydrogen peroxide, and prevention of nonspecific protein binding by incubation in normal goat serum, arterial sections were exposed to the primary antibody and incubated with a secondary biotinylated antibody directed against rabbit IgG (goat anti-rabbit, Sigma). The avidin-biotin complex (ABC) immunoperoxidase technique was then employed and the reaction was developed and counterstained as described previously. The following immunohistochemistry controls were performed: (1) replacement of the primary antibody with normal goat serum or with nonspecific rabbit IgG; (2) examination of naïve carotid arteries; (3) examination of dilated carotid arteries; (4) and examination of segments distal to the injured areas. The degree of staining was graded, on a semi-quantitative scale, as follows: 0 = no staining; 1 = <25% section circumference positive; 2 = 25% to 50% section circumference positive; 3 = 50% to 75% section circumference positive; 4 = 75% to 100% section circumference positive; and 5 = 100% section circumference positive. Results were recorded as average score per segment.

Statistical analysis

Results are reported as mean \pm SEM. Intergroup differences were compared using the unpaired student's *t* test or, when applicable, the one-way ANOVA test with Bonferroni corrections for all comparisons. Ordinal data were compared using Kruskal-Wallis and Dunn's test for multiple comparisons. A *P* value of < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Animal characteristics

Swine from both acute and chronic models had similar initial body weight (17.64 ± 1.93 and 16.92 ± 0.36 , respectively). In addition, no significant differences were found in the terminal hematologic and hemodynamic parameters measured (Table 1). As seen in Table 2, which summarizes arterial characteristics in each group, the extent of injury was similar between groups. Figure 2 shows representative histological sections of deeply injured arteries from the acute and the chronic model.

Platelet and neutrophil adhesion after single and repeated injury

As illustrated in Fig. 3, platelet adhesion after either the single or repeated injury was significantly higher in the deeply injured arterial segments ($45.9 \pm 6.5 \times 10^6/\text{cm}^2$ and $32.8 \pm 9.3 \times 10^6/\text{cm}^2$, respectively) than in the mildly injured ($3.8 \pm 0.6 \times 10^6/\text{cm}^2$ and $4.6 \pm 1.0 \times 10^6/\text{cm}^2$) or intact segments ($0.08 \pm .06 \times 10^6/\text{cm}^2$ and $0.39 \pm 0.20 \times 10^6/\text{cm}^2$). However, the extent of platelet adhesion in the two models did not differ significantly. Neutrophil adhesion after either the single or repeated injury was significantly higher in deeply injured arterial segments, as compared to mildly injured or intact segments (Fig. 4). Moreover, compared to the acute model (single injury), neutrophil adhesion in the chronic model (repeated injury) was significantly higher for both mildly ($1289.1 \pm 227.9 \times 10^3/\text{cm}^2$ versus $226.6 \pm 45.5 \times 10^3/\text{cm}^2$) and deeply injured segments ($2411.8 \pm 333.9 \times 10^3/\text{cm}^2$ versus $512.5 \pm 70.3 \times 10^3/\text{cm}^2$).

Platelet and neutrophil adhesion on neointima of nonredilated arteries

Figs. 5 and 6 show neutrophil and platelet adhesion on intact arterial segments and on neointima following mild and deep injury 4 weeks after the first angioplasty. Neutrophil adhesion is significantly higher on the neointima of deeply injured segments ($32.9 \pm 4.8 \times 10^3/\text{cm}^2$) than in mildly injured or intact arterial segments ($7.5 \pm 0.8 \times 10^3/\text{cm}^2$ and $7.3 \pm 1.6 \times 10^3/\text{cm}^2$, respectively). Platelet adhesion is also higher on the neointima of deeply injured segments than in mildly injured or intact arterial segments. Both platelet and neutrophil adhesions were found to be correlated with the neointimal surface in deeply injured segments ($P < 0.001$, $r = 0.77$ and 0.83 , respectively).

Morphometric and immunohistochemical studies

The extent of neointima formation, reendothelialization, and P-selectin expression was assessed in 18 arteries, that were subjected to an angioplasty but were not redilated 4 weeks later. As shown in Table 3, there was significantly more neointimal surface in the deeply injured than the mildly injured segments. This neointima (Figure 7) is characterised by various amount of spindle-shaped cells and organised mural thrombus in a more or less extracellular matrix. This neointima was often eccentric in deeply injured segments; was correlated with the fracture length, as expressed as a percentage of IEL length ($r = 0.86$, $P < 0.01$); and was associated with a significantly higher vascular stenosis ($16.8 \pm 3.6\%$ versus $4.5 \pm 0.10\%$, after deep and mild injury, respectively). Surface analyses by SEM showed a neoendothelium covering the neointima (Fig. 7A). The densely packed endothelial cells, protruded into the lumen with a cuboidal to polygonal morphology, were mostly irregularly oriented. Staining for the lectin *Dichlorus biflorus* (DBA), showed that, by 4 weeks after the first angioplasty, almost complete reendothelialization had occurred on the injured arterial segments (Fig. 7C). Deeply injured segments, however, showed a less complete reendothelialization than mildly injured segments, with mean scores of 3.95 and 4.61, respectively ($P < 0.01$, Kruskal-Wallis and Dunn's tests). As well, whereas the endothelium of naïve carotid arteries showed no P-selectin or showed scant single cells expression of P-selectin, the redilated arteries were deendothelialized and showed a

platelet-rich mural thrombus with positive expression of P-selectin. In the mildly and deeply injured nonredilated arterial segments, multifocal expression of P-selectin by the neoendothelium (Fig. 7C) was observed with a mean score of 2.13 and 1.9, respectively.

Discussion

In this study, we investigated first the reactions of platelets and neutrophils post-angioplasty in a chronic porcine model involving repeated angioplasty to the carotid arteries, in comparison with an acute model involving single angioplasty; and second we assessed the relationship between these reactions and the extent of neointimal formation, P-selectin expression and reendothelialization.

In the chronic model (repeated injury), we showed that, as for the acute model after single injury, platelet and neutrophil adhesion was function of the severity of the injury. However, the level of platelet adhesion after the second angioplasty was similar to that observed after the first angioplasty, whereas neutrophil adhesion was much increased after the second angioplasty. We have previously shown that the level of platelet and neutrophil adhesion that occurs after angioplasty of normal arteries (single injury) is a function of the severity of injury [12,13,40,41]. After single injury, we have already shown that platelets can modulate neutrophil adhesion to damaged arteries [12], via a selectin dependent mechanism [40]. The importance of selectin in platelet binding to neutrophils was recently highlighted by many investigators showing that platelet P-selectin modulates neutrophil adhesion to surface-adherent platelets [37-39,47,48]. However, despite a similar level of platelet adhesion after single or repeated injury, neutrophil adhesion was significantly increased after the second injury. These results suggest that, after repeated angioplasty which involves dilation of newly formed neointima, a platelet-independent mechanism of neutrophil adhesion is also involved. This finding may be related to the presence of neointima that induces neutrophil activation followed by upregulation of neutrophil MAC-1 (CD11b/CD18). This concept is supported by many findings showing that neutrophil activation is enhanced following PTCA [19-23]. MAC-1 mediates the firm adhesion of neutrophils to endothelial ICAMs [49,50], and constitutes the principal integrin involved in

neutrophil adhesion to components of the extracellular matrix, such as collagen, fibronectin, fibrinogen, and laminin, present in neointimal tissue [49,51,52]. Activated neutrophils, in turn, may release various inflammatory mediators such as oxygen radicals, proteolytic enzymes, cytokines, chemokines, PAF, and leukotrienes that amplify the arterial response to injury and contribute further to neutrophil recruitment at the sites of injury [53]. In addition, neutrophils, through the release and activation of metalloproteases [54], participate in the degradation of the extracellular matrix leading to enhanced inflammatory reactions. These results, collectively, suggest that this increased neutrophil adhesion after the second angioplasty could be related to ongoing inflammatory reactions, during neointima formation in the restenotic process, 1 month after the first angioplasty.

In our study 4 weeks post-angioplasty, we observed a significantly more abundant neointimal tissue in deeply injured than in mildly injured arteries. This indicates, as mentioned by others [16,44,55], that neointimal production may be a function of the degree of arterial injury induced by angioplasty. This result is in agreement with observations made in human pathological samples where neointimal tissue was found to be more abundant at site of medial tears [56]. In addition, these arteries showed a nearly completed reendothelialization. These results are in agreement with previous reports indicating that reendothelialization following angioplasty in pig carotid arteries, as evaluated by immunohistochemistry using DBA lectin, can be largely achieved 21 days post-injury [45,57]. However, the extent of reendothelialization was significantly less important in deeply injured than in mildly injured arterial segments. On the other hand, neutrophil adhesion to this neoendothelium was more important in deeply injured arterial segments as compared to mildly injured segments, suggesting that severity of the injury, even 4 weeks after an angioplasty, could still influence the level of neutrophil adhesion to the arterial wall. Moreover, in these deeply injured arterial segments, neutrophil adhesion was found to be correlated with the extent of the neointima formation. These results suggest that the neoendothelium and/or neointima may exhibit an increased adhesion/attraction towards neutrophils.

Three distinct molecular signals regulate the emigration of neutrophils from the vasculature: selectin-carbohydrate, chemoattractant-receptor, and integrin-immunoglobulin family interactions; these signals act in sequence, not in parallel [58]. Selectins are involved in the initial transient interactions between leukocytes and endothelial cells [30,31]. P-selectin can participate in both inflammation and thrombogenesis following tissue injury [30,59,60] as it mediates leukocyte adhesion to both endothelial cells and platelets. In addition, P-selectin is involved in chronic inflammation and in the processes leading to cell proliferation associated with vascular remodelling [61]. In this regard, we evaluated the expression of P-selectin by the neoendothelium 4 weeks after angioplasty. Although P-selectin is not or weakly expressed by the naïve carotid artery endothelium, we noted its expression by the arterial neoendothelium in examined injured segments. This finding supports those reported in an immunohistochemical study of human atherosclerotic carotid and coronary arteries [62]. This suggests that the regenerating endothelium is functionally different from the normal arterial endothelium, which could partially explain the increased neutrophil adhesion. In addition to P-selectin, ICAM-1, whose expression was reported to be increased in regenerating endothelium following angioplasty [63] and which was coexpressed with P-selectin in endothelium covering atherosclerotic plaques [62], may participate in this phenomenon.

In summary, we showed that repeated dilation of damaged arteries produced a much increased neutrophil adhesion to the injured wall, as compared to single dilation of normal arteries, and demonstrated that the neointima exhibited an ongoing inflammatory process, 4 weeks after angioplasty. The use of damaged arteries rather than normal vessels in experimental angioplasty studies may result in a better understanding of the relative involvement of leukocytes, platelets, and the arterial wall in post-angioplasty events. Further studies are needed to ascertain the importance of the neutrophils in the restenotic process.

Acknowledgements

This research was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada, the Heart and Stroke Foundation of Canada, and by the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. We wish to thank Dominique Lauzier and Jean-François Théorêt for their excellent technical assistance.

References

- [1] Gottsauner-Wolf M, Moliterno DJ, Lincoff AM, Topol EJ. Restenosis - An open file. *Clin Cardiol* 1996;19:347-56.
- [2] Ryan TJ, Bauman WB, Kennedy JW, Kereiakes DJ, King III SB, McCallister BD, Smith SC, Ulliyot DJ. Guidelines for percutaneous transluminal coronary angioplasty. A report of the American Heart Association/American College of cardiology task force on assessment of diagnostic and therapeutic cardiovascular procedures (committee on percutaneous transluminal coronary angioplasty). *Circulation* 1993;88:2987-3007.
- [3] Fuster V, Falk E, Fallon JT, Badimon L, Chesebro JH, Badimon JJ. The three processes leading to post PTCA restenosis: Dependence on the lesion substrate. *Thromb Haemost* 1995;74:552-9.
- [4] Landzberg BR, Frishman WH, Lerrick K. Pathophysiology and pharmacological approaches for prevention of coronary artery restenosis following coronary artery balloon angioplasty and related procedures. *Prog Cardiovasc Dis* 1997;39:361-98.
- [5] Franklin SM, Faxon DP. Pharmacologic prevention of restenosis after coronary angioplasty: Review of the randomized clinical trials. *Coron Artery Dis* 1993;4:232-42.
- [6] Ferrell M, Fuster V, Gold HK, Chesebro JH. A dilemma for the 1990s. Choosing appropriate experimental animal models for the prevention of restenosis. *Circulation* 1992;85:1630-1.
- [7] Muller DW, Ellis SG, Topol EJ. Experimental models of coronary artery restenosis. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:418-32.
- [8] Capron L, Jarnet J, Heudes D, Joseph-Monrose D, Bruneval P. Repeated balloon injury of rat aorta. A model of neointima with attenuated inhibition by heparin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1649-56.
- [9] Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ERM. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 1995;77:445-65.
- [10] Barry WL, Wiegman PJ, Gimple LW, Gertz SD, Powers ER, Owens GK, Sarembock IJ. A new single-injury model of balloon angioplasty in cholesterol-fed rabbits: Beneficial effect of hirudin and comparison with double-injury model. *Lab Invest* 1997;77:109-16.

- [11] Steele PM, Chesebro JH, Stanson AW, Holmes DR, Dewanjee MK, Badimon L, Fuster V. Balloon angioplasty. Natural history of the pathophysiological response to injury in a pig model. *Circ Res* 1985;57:105-12.
- [12] Merhi Y, Provost P, Guidoin R, Latour JG. Importance of platelets in neutrophil adhesion and vasoconstriction after deep carotid arterial injury by angioplasty in pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1185-91.
- [13] Merhi Y, Lacoste L, Lam JYT. Neutrophil implications in platelet deposition and vasoconstriction after deep arterial injury by angioplasty in pigs. *Circulation* 1994;90:997-1002.
- [14] Nash GB. Adhesion between neutrophils and platelets: A modulator of thrombotic and inflammatory events? *Thromb Res* 1994;74:S3-11.
- [15] Lam JYT, Chesebro JH, Steele PM, Dewanjee MK, Badimon L, Fuster V. Deep arterial injury during experimental angioplasty: Relation to a positive indium-111-labeled platelet scintigram, quantitative platelet deposition and mural thrombosis. *J Am Coll Cardiol* 1986;8:1380-6.
- [16] Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, Holmes DR. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: Results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:267-74.
- [17] Faint RW. Platelet-neutrophil interactions: Their significance. *Blood Reviews* 1992;6:83-91.
- [18] Le Breton H, Plow EF, Topol EJ. Role of platelets in restenosis after percutaneous coronary revascularization. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:1643-51.
- [19] Mickelson JK, Lakkis NM, Villarreal-Levy G, Hughes BJ, Smith CW. Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: A mechanism for recurrent disease? *J Am Coll Cardiol* 1996;28:345-53.
- [20] Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Puchner G, Schömig A. Neutrophil and platelet activation at balloon-injured coronary artery plaque in patients undergoing angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:819-24.
- [21] Serrano CV, Ramires JAF, Venturinelli M, Arie S, D'Amico E, Zweier JL, Pileggi F, da Luz PL. Coronary angioplasty results in leukocyte and platelet activation with

- adhesion molecule expression. Evidence of inflammatory responses in coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:1276-83.
- [22] De Servi S, Mazzone A, Ricevuti G, Fioravanti A, Bramucci E, Angoli L, Stefano G, Specchia G. Granulocyte activation after coronary angioplasty in humans. *Circulation* 1990;82:140-6.
- [23] Ikeda H, Nakayama H, Oda T, Kuwano K, Yamaga A, Ueno T, Yoh M, Hiyamuta K, Koga Y, Toshima H. Neutrophil activation after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J* 1994;128:1091-8.
- [24] Cerletti C, Evangelista V, de Gaetano G. Platelet-polymorphonuclear leukocyte functional interactions: Role of adhesive molecules. *Haemostasis* 1996;26:20-7.
- [25] Marcus AJ, Safier LB. Thromboregulation: Multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB J* 1993;7:516-2.
- [26] Jang Y, Lincoff AM, Plow EF, Topol EJ. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1994;24:1591-1601.
- [27] McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet α -granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weible-Palade bodies. *J Clin Invest* 1989;84:92-9.
- [28] Hattori R, Hamilton KK, Fugate RD, McEver RP, Sims PJ. Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *J Biol Chem* 1989;264:7768-71.
- [29] Hamburger SA, McEver RP. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood* 1990;75:550-4.
- [30] Lorant DE, Topham MK, Whatley RE, McEver RP, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Inflammatory roles of P-selectin. *J Clin Invest* 1993;92:559-70.
- [31] Doré M, Korthuis RJ, Granger DN, Entman ML, Smith CW. P-selectin mediates spontaneous leukocyte rolling in vivo. *Blood* 1993;82:1308-16.
- [32] Kansas GS. Selectins and their ligands: Current concepts and controversies. *Blood* 1996;88:3259-87.
- [33] McEver RP, Cummings RD. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest* 1997;100:S97-103.

- [34] Norman KE, Moore KL, McEver RP, Ley K. Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood* 1995;86:4417-21.
- [35] Doré M. Platelet-leukocyte interactions. *Am Heart J* 1998;135:S146-51.
- [36] Brown KK, Henson PM, Maclouf J, Moyle M, Ely JA, Worthen GS. Neutrophil-platelet adhesion: Relative roles of platelet P-selectin and neutrophil b₂ (CD18) integrins. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;18:100-10.
- [37] Kuijper PHM, Gallardo Torres HI, van der Linden JAM, Lammers JWJ, Sixma JJ, Koenderman L, Zwaginga JJ. Platelet-dependent primary hemostasis promotes selectin-and integrin-mediated neutrophil adhesion to damaged endothelium under flow conditions. *Blood* 1996;87:3271-81.
- [38] Buttrum SM, Hatton R, Nash GB. Selectin-mediated rolling of neutrophils on immobilized platelets. *Blood* 1993;82:1165-74.
- [39] Ostrovsky L, King AJ, Bond S, Mitchell D, Lorant DE, Zimmerman GA, Larsen R, Niu XF, Kubes P. A juxtacrine mechanism for neutrophil adhesion on platelets involves platelet-activating factor and a selectin-dependent activation process. *Blood* 1998;91:3028-36.
- [40] Merhi Y, Provost P, Chauvet P, Théorêt J-F, Phillips ML, Latour JG. Selectin blockade reduces neutrophil interaction with platelets at the site of deep arterial injury by angioplasty in pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:372-7.
- [41] Merhi Y, Guidoin R, Provost P, Leung TK, Lam JYT. Increase of neutrophil adhesion and vasoconstriction with platelet deposition after deep arterial injury by angioplasty. *Am Heart J* 1995;129:445-51.
- [42] Merhi Y, Lam JYT, Lacoste LL, Latour JG, Guidoin R, Waters D. Effects of thrombocytopenia and shear rate on neutrophil and platelet deposition on endothelial and medial arterial surfaces. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1993;13:951-7.
- [43] Provost P, Tremblay J, Merhi Y. The antiadhesive and antithrombotic effects of the nitric oxide donor SIN-1 are combined with a decreased vasoconstriction in a porcine model of balloon angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1806-12.
- [44] Badimon JJ, Ortiz AF, Meyer B, Mailhac A, Fallon JT, Falk E, Badimon L, Chesebro JH, Fuster V. Different response to balloon angioplasty of carotid and coronary

arteries: Effects on acute platelet deposition and intimal thickening. *Atherosclerosis* 1998;140:307-14.

[45] Groves PH, Banning AP, Penny WJ, Lewis MJ, Cheadle HA, Newby AC. Kinetics of smooth muscle cell proliferation and intimal thickening in a pig carotid model of balloon injury. *Atherosclerosis* 1995;117:83-96.

[46] Roussel F, Dalion J. Lectins as markers of endothelial cells: Comparative study between human and animal cells. *Lab Anim* 1988;22:135-40.

[47] Yeo EL, Sheppard J-AI, Feuerstein IA. Role of P-selectin and leukocyte activation in polymorphonuclear cell adhesion to surface adherent activated platelets under physiologic shear conditions (an injury vessel wall model). *Blood* 1994;83:2498-2507.

[48] Diacovo TG, Roth SJ, Buccola JM, Bainton DF, Springer TA. Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the β_2 -integrin cd11b/cd18. *Blood* 1996;88:146-57.

[49] Diamond MS, Springer TA. A subpopulation of Mac-1 (CD11b/CD18) molecules mediates neutrophil adhesion to ICAM-1 and fibrinogen. *J Cell Biol* 1993;120:545-56.

[50] Gopalan PK, Smith CW, Lu H, Berg EL, McIntyre LV, Simon SI. Neutrophil CD18-dependent arrest on intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in shear flow can be activated through L-selectin. *J Immunol* 1997;158:367-75.

[51] Bohnsack JF. CD11/CD18-independent neutrophil adherence to laminin is mediated by the integrin VLA-6. *Blood* 1992;79:1545-52.

[52] Bohnsack JF, Zhou X-N. Divalent cation substitution reveals CD18- and very late antigen-dependent pathways that mediate human neutrophil adherence to fibronectin. *J Immunol* 1992;149:1340-7.

[53] Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320:365-76.

[54] Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res* 1995;77:863-8.

[55] Carter AJ, Laird JR, Farb A, Kufs W, Wortham DC, Virmani R. Morphologic characteristics of lesion formation and time course of smooth muscle cell proliferation in a porcine proliferative restenosis model. *J Am Coll Cardiol* 1994;24:1398-1405.

- [56] Nobuyoshi M, Kimura T, Ohishi H, Horiuchi H, Nosaka H, Hamasaki N, Yokoi H, Kim K. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: Pathologic observations in 20 patients. *J Am Coll Cardiol* 1991;17:433-9.
- [57] Giddings JC, Banning AP, Ralis H, Lewis MJ. Redistribution of von Willebrand factor in porcine carotid arteries after balloon angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1872-8.
- [58] Springer TA, Cybulsky MI. Traffic signals on endothelium for leukocytes in health, inflammation, and atherosclerosis. In: Fuster V, Ross R, and Topol EJ, editors. *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996:511-37.
- [59] Celi A, Pellegrini G, Lorenzet R, De Blasi A, Ready N, Furie BC, Furie B. P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8767-71.
- [60] Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM, Sajer SA, Furie B. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature* 1992;359:848-51.
- [61] Kumar A, Hoover JL, Simmons CA, Volkhard L, Shebuski RJ. Remodelling and neointimal formation in the carotid artery of normal and P-selectin-deficient mice. *Circulation* 1997;96:4333-42.
- [62] Johnson-Tidey RR, McGregor JL, Taylor PR, Poston RN. Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques. Coexpression with intercellular adhesion molecule-1. *Am J Pathol* 1994;144:952-61.
- [63] Tanaka H, Sukhova GK, Swanson SJ, Clinton SK, Ganz P, Cybulsky MI, Libby P. Sustained activation of vascular cells and leukocytes in the rabbit aorta after balloon injury. *Circulation* 1993;88:1788-1803.

Figure legends

- Figure 1 Schematic of experimental design in single-injury and repeated-injury angioplasty models. Hematological and hemodynamic (☆) parameters and angiographic measurements (+) determinations.
- Figure 2 Histological section of deeply injured arteries after single (A) or repeat (B) injury. Note the fracture of the internal elastic lamina and the presence of neointima (n) in the chronic repeat injury and thrombus (*) at the site of injury.
- Figure 3 Platelet adhesion to intact, mildly, and deeply injured arterial segments after single or repeated injury by angioplasty. Platelet adhesion increased with the severity of the injury but was of a similar level after single or repeated injury.
*: $P < 0.05$ versus Mild and Intact
- Figure 4 Neutrophil adhesion to intact, mildly, and deeply injured arterial segments after single or repeated injury by angioplasty. Neutrophil adhesion increased with the severity of the injury and was much higher after repeated injury.
*: $P < 0.05$ versus Mild and Intact; ¶: $P < 0.05$ versus Intact; †: $P < 0.05$ versus Single.
- Figure 5 Neutrophil adhesion to intact, mildly, and deeply injured arterial segments 4 weeks after injury by angioplasty. Neutrophil adhesion was still increased in deeply injured segments. Insert: Correlation between neutrophil adhesion and neointimal surface 4 weeks after deep injury. *: $P < 0.05$ versus Mild and Intact.
- Figure 6 Platelet adhesion to intact, mildly, and deeply injured arterial segments 4 weeks after injury by angioplasty. Platelet adhesion, although higher in deeply injured segments, was very low. Insert: Correlation between platelet adhesion and neointimal surface 4 weeks after deep injury. *: $P < 0.05$ versus Mild and Intact.
- Figure 7 General morphology and expression of P-selectin by neoendothelium 4 weeks after angioplasty.
A. Histological section showing the neointima (n) of nonredilated artery.
B. Scanning electron microscopy (SEM) photomicrograph of neoendothelium × 200.

C. Lectin (DBA) immunohistochemistry identification of endothelial cells
× 600. Endo: Endothelium.

D. Immunohistochemistry detection of P-selectin. × 200.
Endo: Endothelium.

Table 1

Terminal hematological and hemodynamic parameters in the acute and chronic model

	Acute model	Chronic model
Leucocytes ($\times 10^6/\text{ml}$)	17.3 ± 5.2	18.7 ± 1.2
Neutrophils ($\times 10^6/\text{ml}$)	11.0 ± 5.3	10.7 ± 1.1
Platelets ($\times 10^6/\text{ml}$)	361 ± 41.5	398 ± 26.0
Hematocrit	0.272 ± 0.011	0.254 ± 0.005
Activated clotting time (sec)	112 ± 2.7	109 ± 2.9
Heart rate (bpm)	124 ± 14.9	120 ± 5.9
Mean arterial pressure (mmHg)	59 ± 1.4	67 ± 2.7
Whole blood aggregation (ohms)	14.03 ± 2.12	17.23 ± 1.5

Table 2

Characteristics of the arteries in the acute and chronic model

	Acute model	Chronic model	
		First angioplasty	Second angioplasty
Animals, n	8		19
Dilated arteries, n	16	38	–
Occluded arteries, n	–	–	2
Nonredilated arteries, n	–	–	18
Redilated arteries, n	–	–	18
Balloon/artery ratio	1.16 ± 0.03	1.16 ± 0.02	1.31 ± 0.05*
Mildly injured segments, n (%)	20 (42)	–	28 (47)
Deeply injured segments, n (%)	28 (58)	–	32 (53)
Fracture length (mm)	1.10 ± 0.08	–	1.09 ± 0.11
Fracture length/IEL length (%)	14.89 ± 0.97	–	15.53 ± 1.47

* $P < 0.05$ versus first angioplasty; IEL, internal elastic lamina.

Table 3

Histomorphological data 4 weeks after the first angioplasty in the chronic model

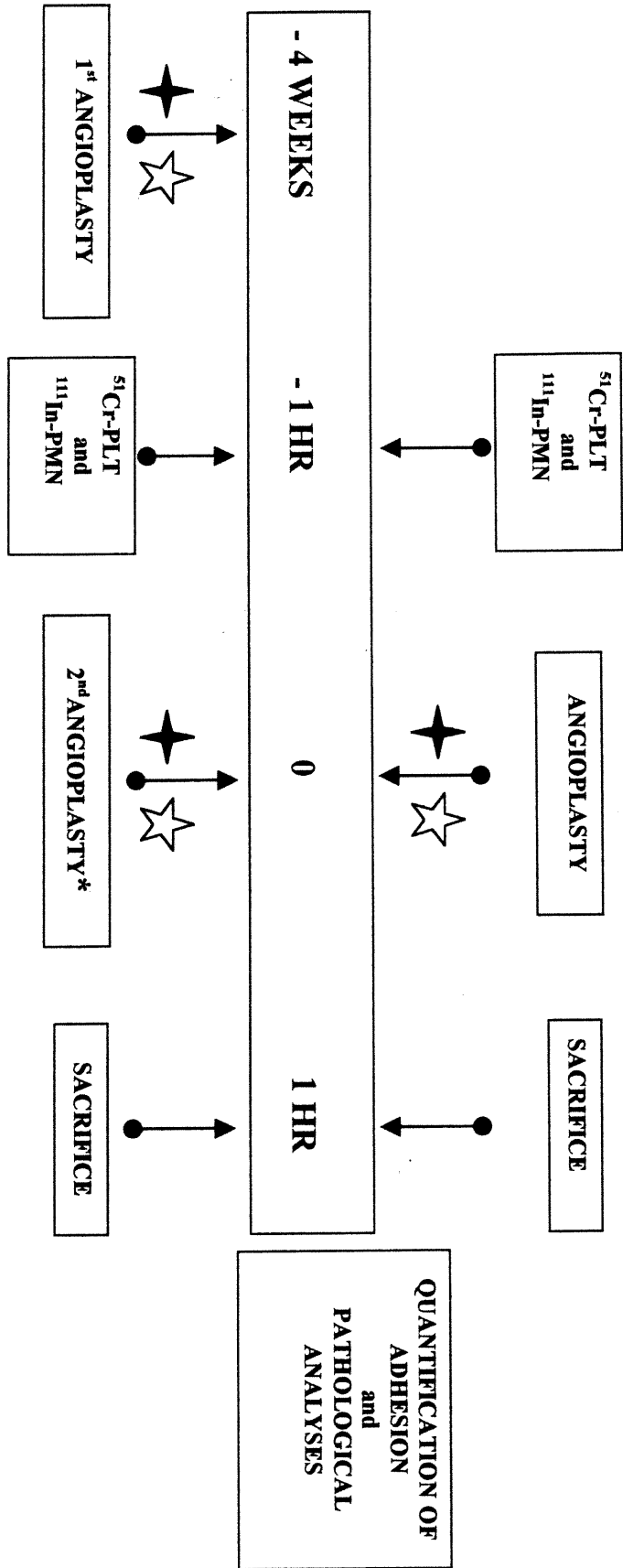
	Mild	Deep
IEL length (mm)	7.76 ± 0.19	8.50 ± 0.33*
Fracture length (mm)	–	2.04 ± 0.36
Fracture length / IEL (%)	–	23.72 ± 4.22
Neointimal surface (mm ²)	0.02 ± 0.01	1.04 ± 0.27*
IEL surface (mm ²)	4.67 ± 0.21	5.58 ± 0.40*
Vascular stenosis (%)	0.45 ± 0.10	16.8 ± 3.6*

* $P < 0.05$ versus mild; IEL, internal elastic lamina.

FIGURE 1

EXPERIMENTAL DESIGN

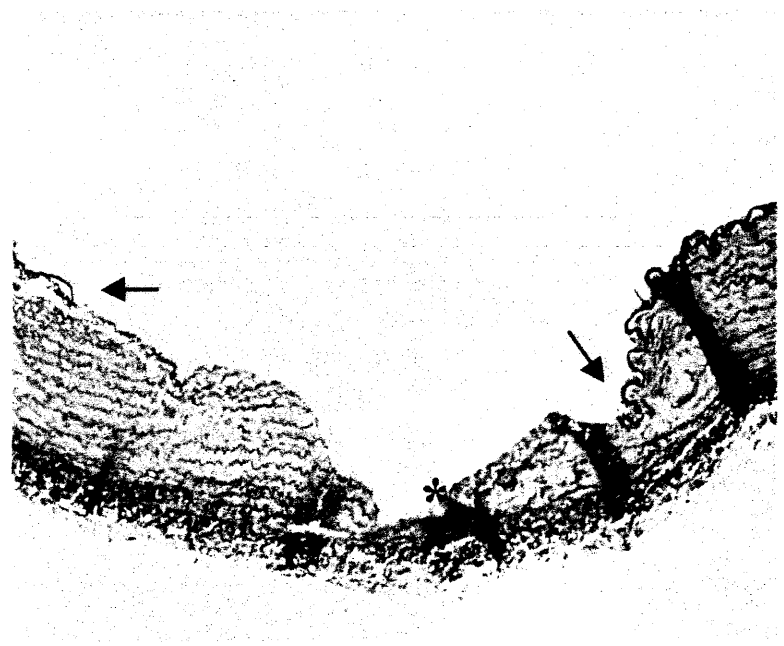
Single Injury (Acute Model)



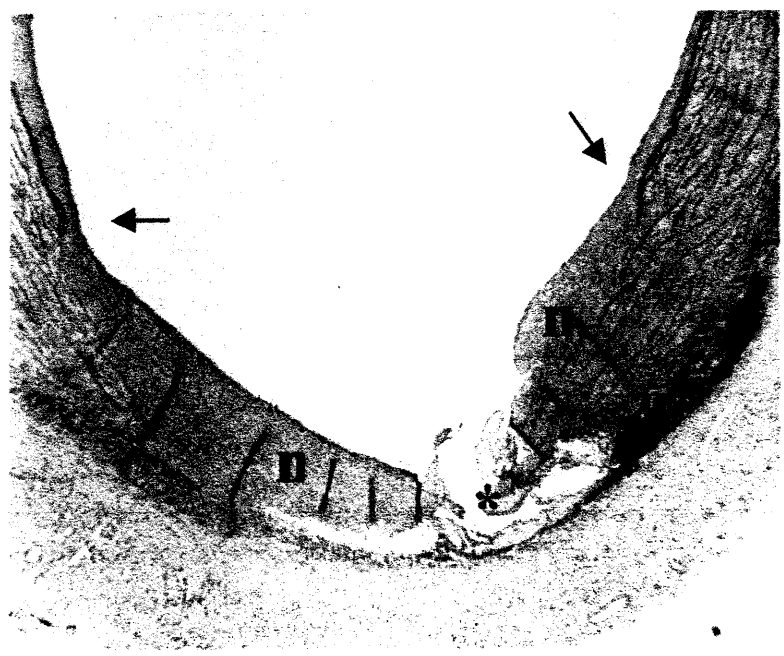
Repeated Injury (Chronic Model)

*. Some arteries were not redilated in order to assess the neointima

FIGURE 2



A



B

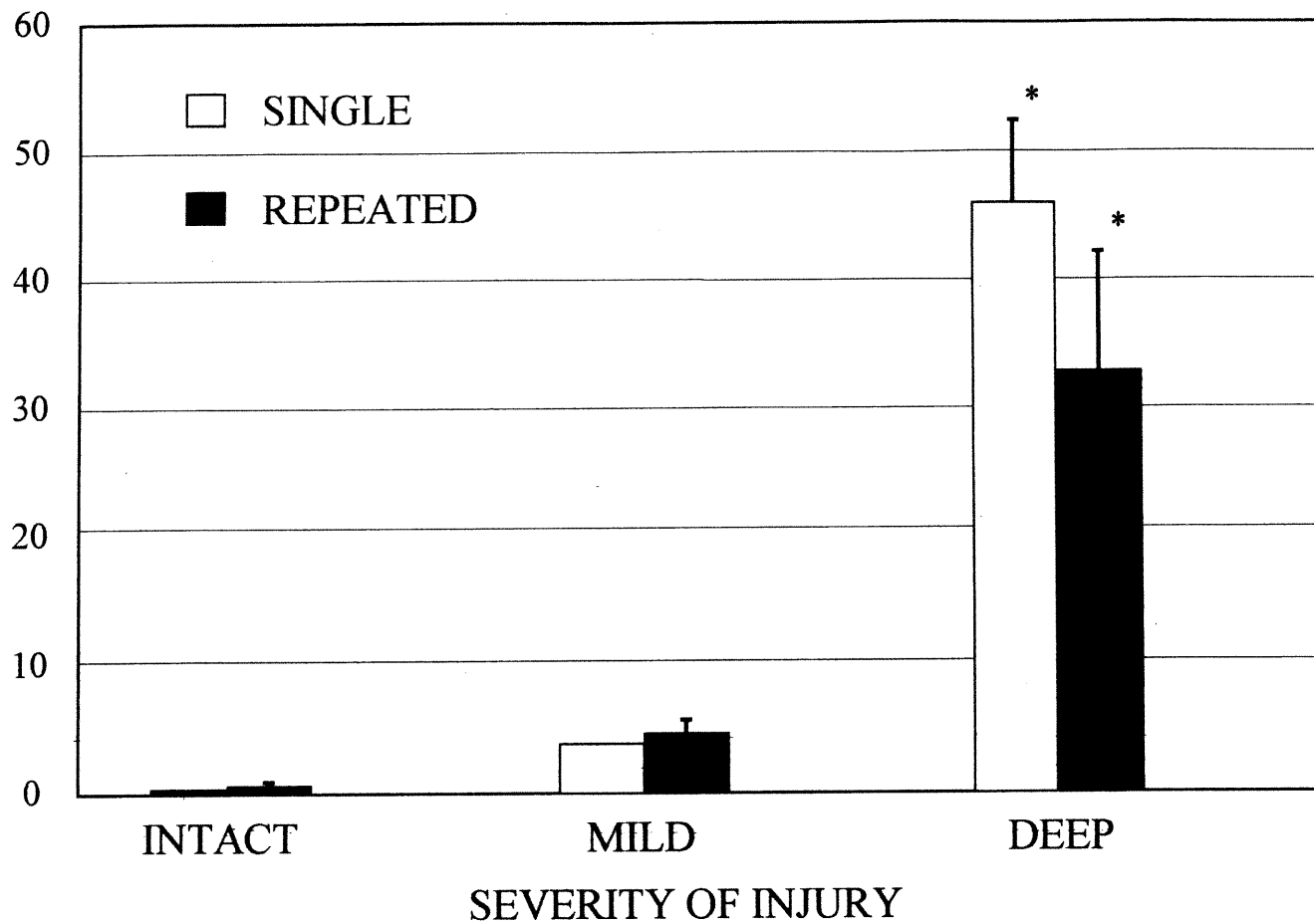
FIGURE 3**PLATELET ADHESION ($\times 10^6/\text{cm}^2$)**

FIGURE 4

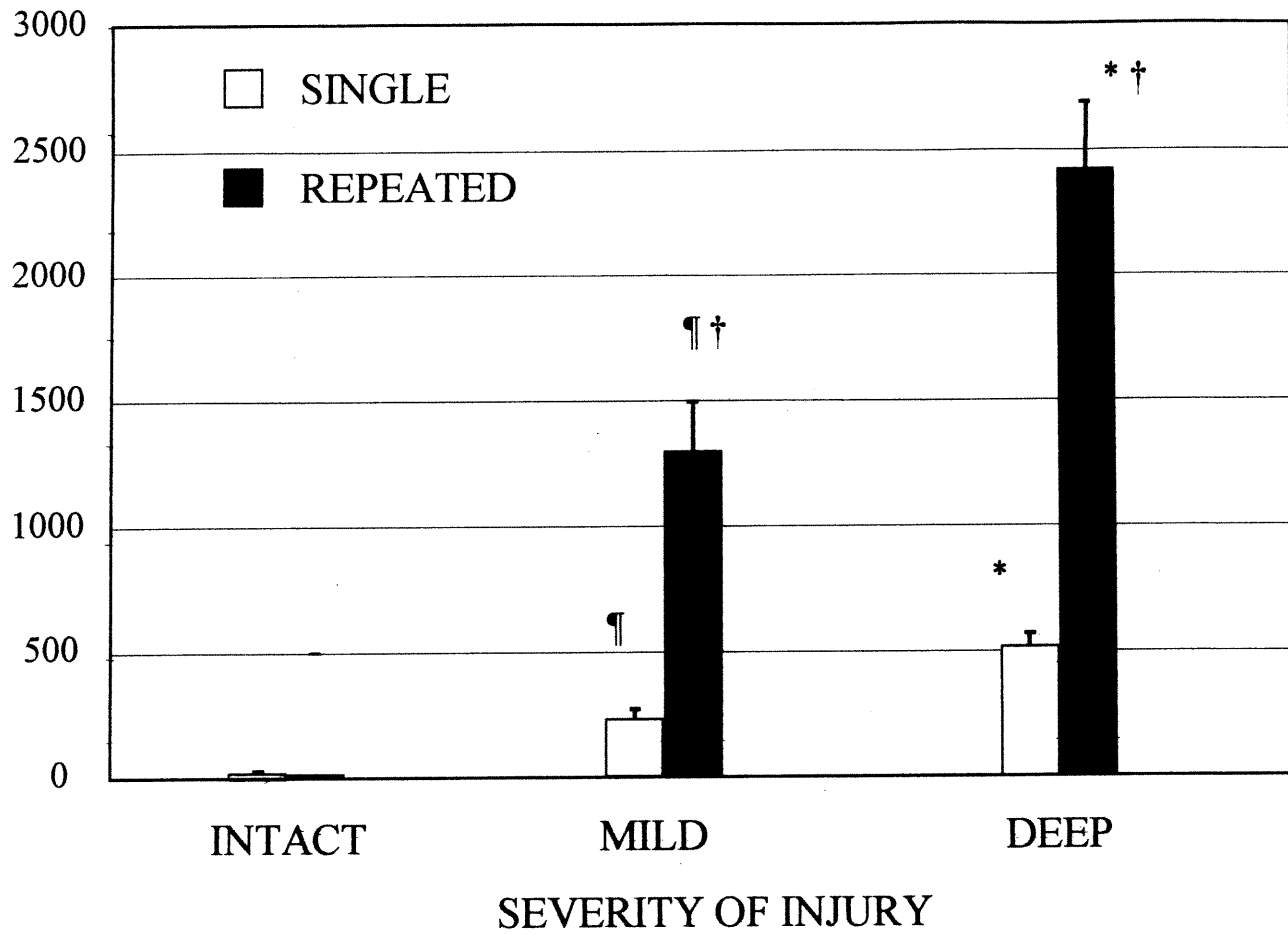
NEUTROPHIL ADHESION ($\times 10^3/\text{cm}^2$)

FIGURE 5

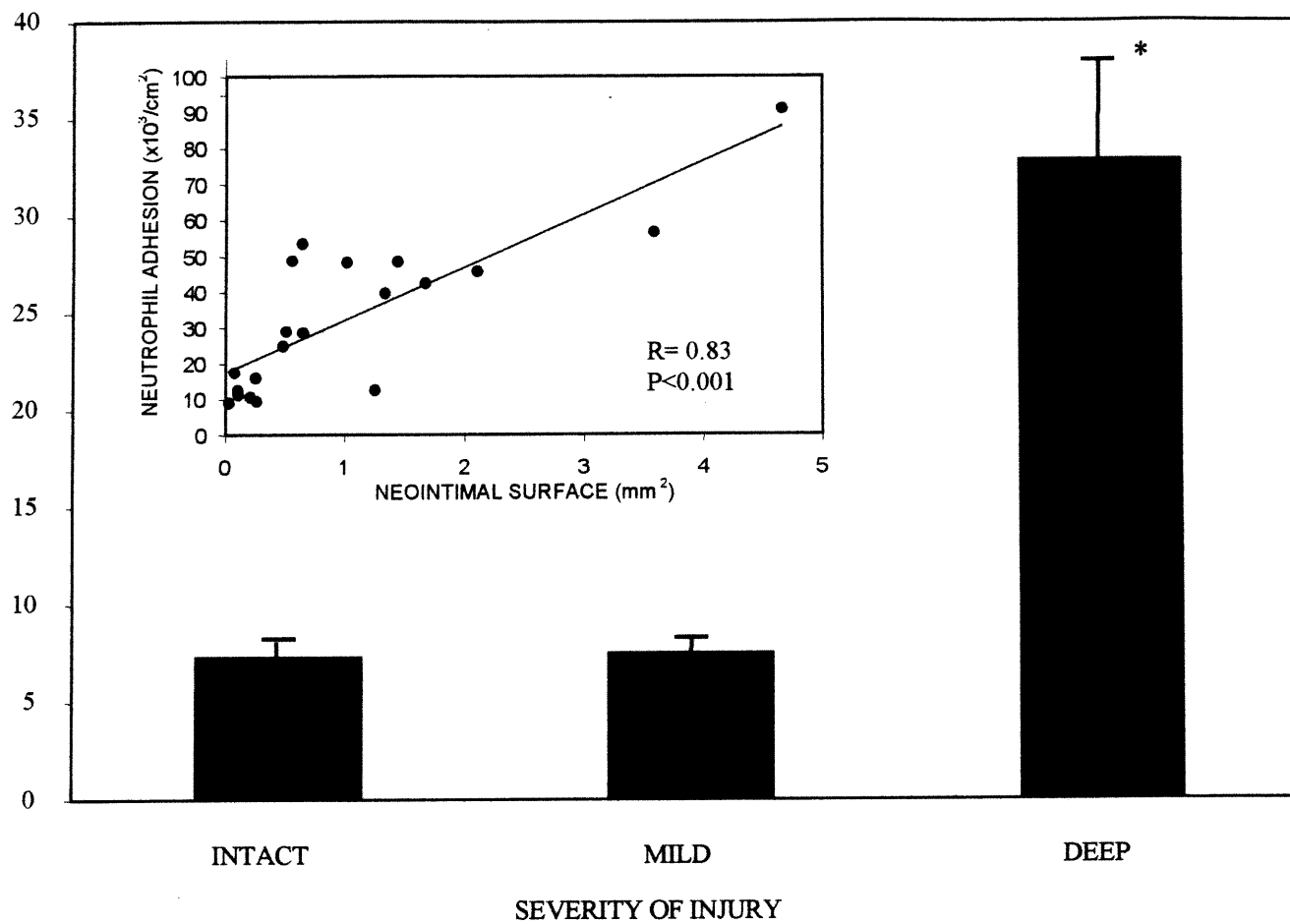
NEUTROPHIL ADHESION ($\times 10^3/\text{cm}^2$)

FIGURE 6
PLATELET ADHESION ($\times 10^6/\text{cm}^2$)

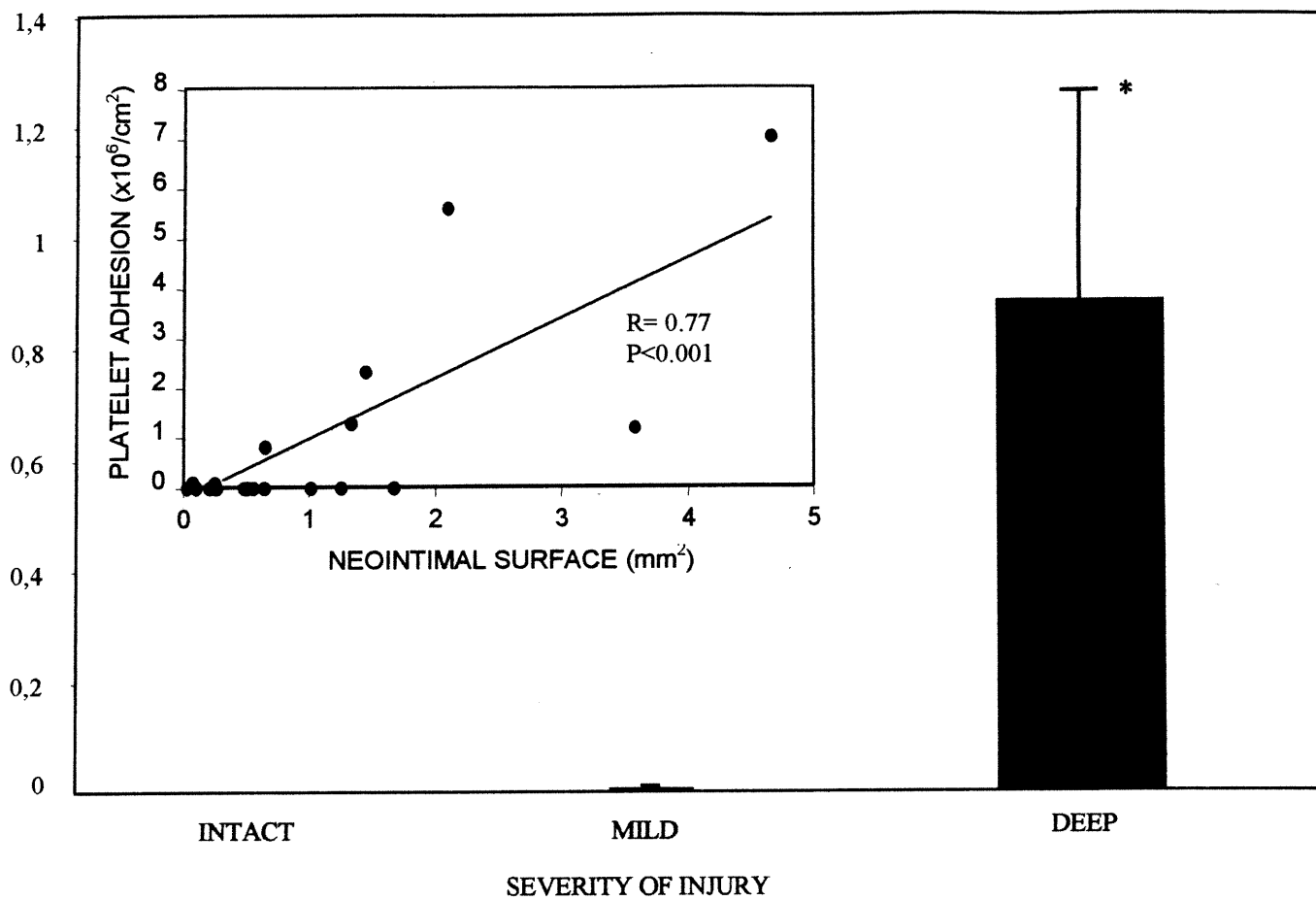
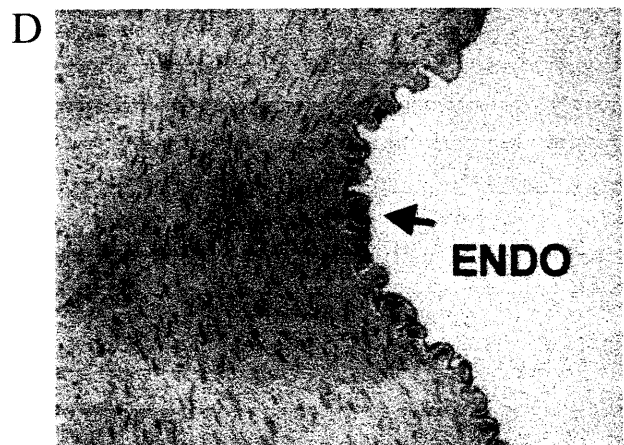
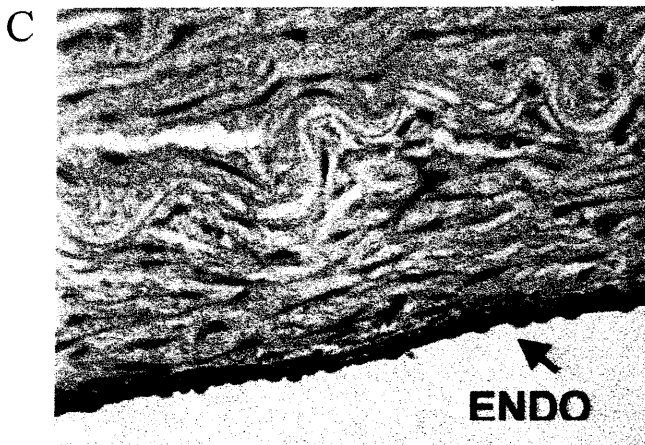
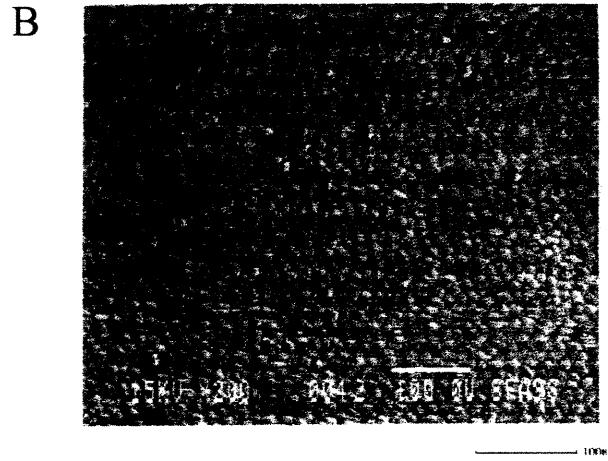
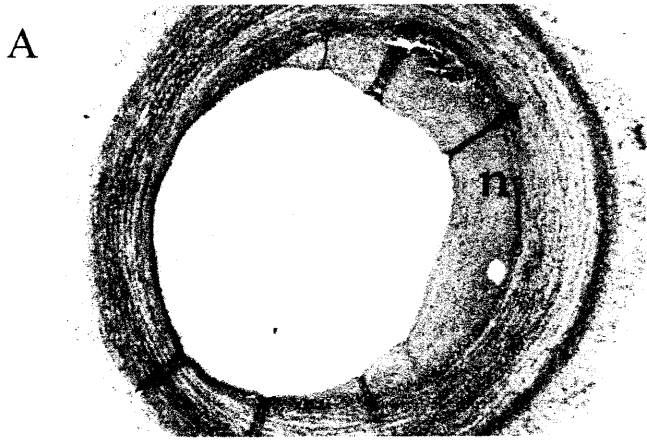


FIGURE 7



3.3 Platelet Activation and Binding to Neutrophils Following Perfusion Over Intact and Damaged Arterial Surfaces: Importance of P-Selectin and PSGL-1

Résumé

Le PSGL-1 (*P-sélectin-glycoprotein-ligand-1*) des neutrophiles permet le roulement initial et l'adhésion des neutrophiles à la P-sélectine exprimée par l'endothélium et les plaquettes activées lors de réactions inflammatoires et thrombotiques. Ces interactions sont accrues chez les patients souffrant de maladies coronariennes, suggérant qu'un dommage artériel conduit à l'activation des plaquettes et à leur liaison avec des neutrophiles. Nous avons donc vérifié l'influence de l'intégrité de la surface endothéliale sur l'expression de la P-sélectine plaquettaire, la liaison des plaquettes aux neutrophiles et l'importance du PSGL-1 dans ces interactions.

L'expression de P-sélectine par des plaquettes humaines et leur liaison avec des neutrophiles furent déterminées par cytométrie en flux. Des mesures furent effectuées avant (basal) et après stimulation par la thrombine de même qu'après l'exposition de ces cellules pour 15 minutes sur une paroi artérielle intacte ou endommagée dans des chambres de perfusion. L'expression de la P-sélectine par les plaquettes après perfusion sur des surfaces intactes était de $12.7 \pm 1.8\%$ (pourcentage de plaquettes positives) et s'est accrue significativement ($P < 0.05$) à $19.7 \pm 1.8\%$ après perfusion sur des surfaces artérielles endommagées. Suite à l'utilisation de suspensions cellulaires mixtes plaquettes/neutrophiles, le pourcentage de neutrophiles liant des plaquettes, tel que déterminé par double fluorescence, a augmenté significativement ($P < 0.05$) de 10.8 ± 1.6 (basal) à 69.7 ± 2.5 après stimulation par la thrombine et à 39.7 ± 2.9 après perfusion sur des surfaces artérielles endommagées. Cette liaison fut inhibée par l'utilisation d'une forme recombinante chimérique et soluble du PSGL-1, le rPSGL-Ig, par un anticorps monoclonal anti PSGL-1 et par un anticorps monoclonal anti P-sélectine. De plus, une corrélation significative ($r = 0.98$, $P < 0.001$) fut notée entre la liaison du rPSGL-Ig avec les plaquettes et son inhibition de la liaison plaquette/neutrophile.

Ces résultats indiquent que les plaquettes sont activées après perfusion sur des surfaces artérielles endommagées, augmentant leur interactions adhésives avec les neutrophiles par un mécanisme impliquant la P-sélectine et le PSGL-1.

Platelet Activation and Binding to Neutrophils Following Perfusion Over Intact and Damaged Arterial Surfaces: Importance of P-Selectin and PSGL-1

Jean-François Théorêt¹, Jean-Guy Bienvenu¹, Anjali Kumar², Jean-Gilles Latour¹,
Yahye Merhi¹

From the ¹Laboratory of Experimental Pathology, Montreal Heart Institute and the University of Montreal, Quebec, Canada; ²Genetics Institute, Andover, MA

Short Title: Selectins in Platelet/Neutrophil Interactions

Word count: 5,104

Correspondence to: Dr. Y Merhi, Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street East, Montreal, Quebec, H1T 1C8, Canada. TEL.: [REDACTED] ext. 3035, FAX: (514) 376-1355, e mail: [REDACTED]

Summary

Neutrophil P-Selectin-Glycoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) mediates the initial rolling and adhesion of neutrophils to P-selectin on activated endothelium and platelets in inflammatory and thrombotic reactions. These interactions are increased in patients with coronary diseases suggesting that arterial damage leads to platelet activation and binding to neutrophils. We therefore investigated the influence of endothelial surface integrity on the expression of platelet P-selectin, the binding of platelets to neutrophils, and the importance of PSGL-1 in these interactions.

Expression of P-selectin on human platelets and their binding to neutrophils were determined by flow cytometry. Measurements were done at baseline, after thrombin activation and after exposure for 15 min to intact and damaged arterial surfaces in perfusion flow chambers. The expression of platelet P-selectin after perfusion over intact endothelium averaged $12.7 \pm 1.8\%$ and increased significantly to $19.7 \pm 1.8\%$ ($p < 0.05$) after perfusion over damaged arterial surfaces. In mixed neutrophil/platelet suspensions, the percentage of neutrophils that bind platelets, as assessed by double labeling, increased significantly as well from 10.8 ± 1.6 at baseline, to 69.7 ± 2.5 and 39.7 ± 2.9 after thrombin activation and after perfusion over damaged arteries, respectively ($p < 0.05$). This binding was inhibited by a recombinant soluble PSGL-1 molecule (rPSGL-Ig) and anti-P-selectin and anti-PSGL-1 monoclonal antibodies. In addition, inhibition of platelet/neutrophil binding with rPSGL-1g correlated well with its binding to platelets ($r = 0.98$, $p < 0.001$)

These results indicate that platelets are activated upon contact with damaged arterial surfaces, thereby enhancing their adhesive interactions with neutrophils via a mechanism involving P-selectin and PSGL-1.

Introduction

Platelets and leukocytes interact with endothelial cells and the subendothelial matrix via their relative cell adhesion molecules (CAMs), thus playing a role both in the maintenance of vascular homeostasis and in modulation of thrombotic and inflammatory reactions (1-3). These interactions are mediated by three major families of CAMs: integrins, selectins and immunoglobulins which mediate homotypic and heterotypic interactions between platelets, neutrophils, and the blood vessel wall (4-6).

The selectin family includes E-selectin (endothelium), L-selectin (leukocytes) and P-selectin (platelets and endothelium) (7-8). P-selectin is present in the α -granules of resting platelets and the Weibel-Palade bodies of unstimulated endothelial cells (9). Following cell activation, P-selectin is rapidly translocated to the cell surface where it can interact, like the other selectins, with sialylated or fucosylated compounds such as Sialyl Lewis^x (7, 8) and P-Selectin-Glycoprotein-Ligand-1 (PSGL-1), a disulfide-linked 240-kDa homodimer protein expressed on myeloid cells that is highly O-glycosylated and rich in serine and threonine (10, 11). PSGL-1 is the high-affinity ligand for P-selectin. It mediates the initial rolling and adhesion of neutrophils on activated endothelial cells, immobilized P-selectin, and activated platelets leading in turn to enhanced neutrophil recruitment in inflammatory and thrombotic reactions (12-15).

The arterial response to injury following angioplasty or atherosclerotic plaque rupture involves the exposure of the subendothelial matrix which contains inflammatory mediators and potent platelet binding and activating proteins that induce platelet activation in the circulation and enhance their adhesion and aggregation at the site of injury (16, 17). This leads to a new set of possible interactions between flowing platelets, neutrophils, and the thrombogenic arterial surfaces. Our previous studies showing that neutrophil accumulation at the site of vascular injury

is time-, shear-, and platelet-dependent have revealed the importance of platelets in neutrophil adhesion to damaged arterial surfaces (18, 19). Recently, we demonstrated in a porcine model of angioplasty that neutrophil adhesion to adherent and activated platelets at the site of arterial injury is mediated, at least, by P-selectin (20). In addition to these interactions at the site of arterial injury, platelet activation and binding to neutrophils have been reported in the circulation of patients after coronary angioplasty, myocardial infarction, and with unstable angina (21-27). Furthermore, activation of platelets has been detected in flowing blood through stenosed arteries (28) or over growing thrombi as demonstrated by P-selectin expression, fibrinogen binding and integrin GPIIb/IIIa activation (29). These cardiovascular diseases are associated with endothelial dysfunction or damage highlighting the importance of endothelial integrity in these interactions. Our hypothesis was, therefore, that platelets may be activated after perfusion over damaged arterial surfaces, express P-selectin and increasingly interact with neutrophils to form conjugates. Indeed, we designed this study to investigate the influence of the endothelial surface integrity and arterial damage on flowing platelet activation, platelet binding to neutrophils, and the possible mechanism of these interactions.

Methods

Preparation of Platelets

Venous blood (25 to 50 ml) was obtained from healthy volunteers (free from medication known to interfere with platelet or neutrophil functions for at least 10 days before the experiments). The blood obtained from the antecubital vein through a 19-gauge butterfly needle was collected in syringes containing acid citrate dextrose (ACD) in a ratio of five parts blood to one part ACD. Platelets were prepared as previously described (18, 20, 30, 31). Briefly, Platelet Rich Plasma (PRP) was prepared by centrifugation of whole blood at 500 g for 15 min. Platelets were then obtained by centrifugation of PRP at 800 g for 10 min and resuspended in Hanks balanced salt solution-HEPES buffer with 0.4 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)

(HBSS-EDTA) pH 6.5 free from Ca^{2+} and Mg^{2+} . After removal of red blood cells by a low centrifugation, the isolated platelets were resuspended in a HBSS-HEPES buffer pH 7.4 with Ca^{2+} (CaCl_2 1.3 mM) and Mg^{2+} (MgSO_4 0.81 mM) and adjusted to a final concentration of $250 \times 10^6/\text{ml}$, using an automated cell counter (T890, Coulter).

Preparation of Neutrophils

Neutrophil preparation was carried out as previously described (18, 20, 30, 31). After PRP collection, during the platelet preparation procedure, the lower phase was treated with an equal volume of HBSS-HEPES citrate (dihydrate sodium citrate 12.9 mM) buffer pH 7.4 without Ca^{2+} and Mg^{2+} that contained 4% dextran (MW 260 kDa, Sigma Chemical Co). After 35 to 40 min sedimentation, the leukocyte-rich suspension was washed, layered over an equal volume of Ficoll-Paque gradient separation medium (Pharmacia Biotech), and centrifuged at 400 g for 30 min. After hypotonic lysis of red blood cells, the isolated neutrophils were resuspended in HBSS-HEPES with Ca^{2+} and Mg^{2+} and adjusted to a final concentration of $5 \times 10^6/\text{ml}$, using an automated cell counter.

Static Experiments

In the first set of experiments, the expression of P-selectin, CD41, and CD61 on isolated platelets ($250 \times 10^6/\text{ml}$) was assessed using saturating concentrations of the following mouse anti-human monoclonal antibodies (Mabs) fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE) conjugated: anti- CD62P-PE (clone AK6, Serotec), anti- CD41-FITC (clone 5B12, Dako) and anti- CD61-FITC (clone Y2/S1, Dako) or an isotype-matched IgG control. Experiments were done at baseline and after 5 min activation with thrombin (0.1 U/ml) at room temperature (RT). In other experiments, the binding of platelets to neutrophils was determined in mixed cell preparations ($250 \times 10^6/\text{ml}$ and $5 \times 10^6/\text{ml}$, respectively), using a dual-labeling technique (26, 27) with mouse anti-human Mabs directed against platelet P-selectin PE-conjugated (AK6) and neutrophil Mac-1 FITC-conjugated (anti- CD11b, clone ICRF44, Serotec). The binding was assessed in the presence of recombinant soluble PSGL-1 molecule (32) (rPSGL-Ig, 0 to 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Genetics Institute) and anti-P-selectin function blocking Mab (0 to 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, clone WASP 12.2, Endogen) and anti-PSGL-1 function blocking Mab (0 to 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, clone KPL-1 Pharmingen). Platelets were treated for 10 min at RT, before adding neutrophils at baseline, and prior to

thrombin activation. Five minutes after the addition of neutrophils, the cells were fixed in phosphate buffer saline (PBS) with 1% paraformaldehyde for 2 hours at 4 °C in the dark. After being washed with PBS-0.1% sodium azide, the cells were labeled with saturating concentrations of the relevant Mabs or isotype matched controls IgG for 30 min at 4 °C in the dark. They were then washed again with PBS and fixed with PBS-1% paraformaldehyde for flow cytometry analyses.

In other experiments, the binding of rPSGL-Ig to platelets was assessed by incubating resting and thrombin activated platelets with increasing concentrations of rPSGL-Ig (0 to 40 µg/ml) for 10 min followed by a second treatment with a goat F(ab')₂ anti-human IgG, R-PE polyclonal antibody (Biosource International) for flow cytometry analyses.

Perfusion Experiments

We have used four plexiglas perfusion chambers that mimic the tube-like cylindrical shape of blood vessels (19, 31, 33). Each chamber contains a window (2.0 mm ID), allowing direct exposure of arterial segments to isolated platelet suspensions mixed (or not) with neutrophils. These arterial segments were prepared from porcine aortas, which had been dissected free of surrounding tissues, cut into rings, and longitudinally opened. Arterial segments with intact endothelium were cut to fit within the perfusion flow chambers. The actual preparation of intact endothelial segments were done with great care in order to avoid direct contact with the luminal surface and to maintain endothelial integrity. Damaged arterial segments were prepared by lifting and peeling off the intima, together with a thin portion of the subjacent media; we then cut them to fit within the perfusion flow chambers, as previously described (18, 19, 31). The flow within the chambers was adjusted at 10 ml/min with a peristaltic pump, which yield a shear stress of approximately 424 s⁻¹. The chambers were placed in parallel (2 per side) in a thermostatically controlled water bath (at 37 °C), thus permitting simultaneous parallel, pairwise perfusion over arterial tissues of treated or untreated cell suspensions. In these experiments, platelets (250 x 10⁶/ml) or mixed platelet/neutrophil (5 x 10⁶/ml) suspensions were perfused and recirculated over the arterial segments, for 15 min in the flow chambers as described previously (18). In the mixed suspensions, platelets were pretreated (or not) for 10 min with rPSGL-Ig (40 µg/ml), the anti-P-selectin blocking Mab (2 µg/ml) or the anti-PSGL-1 blocking Mab (0.5 µg/ml) followed by the addition of neutrophils prior to perfusion. Samples were taken after 15 min exposure time

and immediately fixed in PBS-1% paraformaldehyde. They were then processed with the relevant Mabs for flow cytometry as described in the static experiments.

Flow Cytometry

All samples were analyzed within 6 hours after sample preparation on a Coulter Epics XL cytometer. For one-color analyses, platelet populations were identified and discriminated from the debris by their scatter profile. Debris was excluded from analysis by setting an appropriate scatter electronic gate or threshold. For two-color analyses, the fluorescence threshold was set to analyze only dual FITC- and PE-labelled cells, corresponding to neutrophils exhibiting platelet-CD62P fluorescence from 5,000 cells in each sample.

Statistics

Results are expressed as mean \pm SEM. The expression of CAMs on platelets was compared using Student *t* test. One-way analysis of variance (ANOVA) was used for multiple comparisons and followed, when appropriate, by Bonferroni *t* tests. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Results

Platelet Activation

As shown in Fig. 1, the percentage of platelets expressing P-selectin increased five-fold, from $13.8 \pm 1.2\%$ at baseline, to $72.8 \pm 3.5\%$ after thrombin stimulation ($p < 0.001$). The mean fluorescence intensity (MFI) of P-selectin expression increased as well from 2.3 ± 0.1 to 3.3 ± 0.2 ($p < 0.001$) after platelet activation. In contrast, CD41 and CD61, which are normally expressed on resting platelets, remained unchanged after thrombin activation (Fig. 1).

Fig. 2 presents the expression of platelet P-selectin at baseline and after perfusion for 15 min over either normal arterial segments with intact endothelium or damaged arterial surfaces without endothelium. Perfusion over intact endothelium showed no significant effect on the expression of platelet P-selectin ($12.7 \pm 1.8\%$ as compared to $13.8 \pm 1.2\%$ at baseline). However, perfusion of

resting platelets over damaged arterial surfaces induced a 55% significant increase in P-selectin expression, to $19.7 \pm 1.8\%$ ($p < 0.05$). These results confirm the thrombogenic properties of the subendothelial matrix and the thromboresistant properties of endothelial cells.

Platelet Binding to Neutrophils

Platelet adhesive interactions with neutrophils occurred when platelets were activated by thrombin or after perfusion of resting platelet/neutrophil suspensions over damaged arterial surfaces. At baseline, few neutrophils exhibited platelet-bound fluorescence ($10.8 \pm 1.6\%$), whereas thrombin activation of platelets increased the binding to $69.7 \pm 2.5\%$. Perfusion of resting cells over damaged arterial surfaces was also associated with a significant increase (almost four fold) in neutrophil/platelet binding to $39.7 \pm 2.9\%$ (Fig. 4).

Inhibition of Platelet/Neutrophil Binding

Having shown that thrombin and damaged arterial surfaces induced platelet P-selectin surface expression, as well as the binding of platelets to neutrophils, we investigated the importance of platelet P-selectin and neutrophil PSGL-1 in this binding.

Fig. 3A shows the effect of rPSGL-Ig, a recombinant, soluble PSGL-1 chimera, on thrombin activated platelet binding to neutrophils. We found that rPSGL-Ig prevents in a concentration-dependent manner the binding of activated platelets to neutrophils with an IC_{50} of approximately $5 \mu\text{g/ml}$. We also obtained complete inhibition of activated platelet/neutrophil binding using a blocking P-selectin or PSGL-1 monoclonal antibodies (Figs. 3B and 3C). In addition, rPSGL-Ig and the anti-P-selectin and PSGL-1 treatments were found to be associated with complete inhibition of platelet binding to neutrophils after perfusion over damaged arterial surfaces, as shown in Fig. 4.

rPSGL-Ig Binding to Platelets

Fig. 5 shows the binding of rPSGL-Ig to thrombin-activated platelets and the expression of P-selectin in the same experiments. P-selectin expression was constant (50 to 60%) and unaffected by increasing concentrations of rPSGL-Ig. We found that whereas the binding of rPSGL-Ig to platelets increased with rising concentrations of rPSGL-Ig, the binding was maximal at 40 $\mu\text{g/ml}$ (53%), which represents 100% of platelets expressing P-selectin. In contrast, rPSGL-Ig binding to resting platelets remained less than 10%, unaffected by increasing concentrations of rPSGL-Ig. In addition, the percentage binding of increasing concentrations of rPSGL-Ig (0 to 40 $\mu\text{g/ml}$) to platelets was found to correlate well ($r = 0.98$, $p < 0.001$) with its effect on platelet binding to neutrophils (Fig. 6).

Discussion

In this study, we demonstrated that platelets were activated in contact with damaged arterial surfaces, thus increasing their adhesive interactions with neutrophils, by a mechanism involving platelet P-selectin and neutrophil PSGL-1. Our findings are in agreement with previous studies showing the importance of P-selectin in platelet interaction with neutrophils under static conditions (34, 35). However, studies under flow conditions have mainly examined rolling velocities and adhesion on surface-bound CAMs, extracellular matrix components, or monolayers of platelets (36-38). In the present study, we accordingly examined flowing platelet activation and binding to neutrophils after perfusion over intact and damaged arterial surfaces. These experiments were designed to be more physiopathologically relevant to the *in vivo* situations in the presence of cardiovascular diseases, where platelet activation and binding to neutrophils have

been reported in the circulation of patients with unstable angina, stable coronary artery disease, and previous myocardial infarction or angioplasty (21-27).

Our first finding was that platelets are activated upon perfusion over damaged arterial surfaces but not normal surfaces with intact endothelium, as demonstrated by a significant increase in the expression of platelet P-selectin. These results confirm the thromboresistant properties of the intact endothelium, properties attributed to the secretion of prostacyclin and nitric oxide which is well known to inhibit platelet activation and aggregation and P-selectin expression (39-41). In addition, the endothelium covers the adhesive glycoprotein ligands for platelet integrins in the subendothelium, thus preventing platelet activation in the absence of vascular damage. However, perfusion over injured arterial surfaces, prepared by the removal of the intima and exposure of the tunica media leads to platelet activation and expression of P-selectin. This situation is relevant to many clinical conditions after atherosclerotic plaque rupture or balloon angioplasty, and are associated with ongoing inflammatory reactions and thrombus growth at the site of arterial injury.

Since platelet and neutrophil activation and platelet binding to neutrophils have been reported in many cardiovascular diseases, we investigated the ability of damaged arterial surfaces to induce such platelet/neutrophil interactions. We found that perfusion of platelet/neutrophil suspensions over damaged arterial surfaces induced a significant increase in platelet binding to neutrophils after 15 min of perfusion. This binding is attributed to platelet activation, as demonstrated by enhanced P-selectin expression after 15 min exposure to damaged arterial surfaces. In addition, this increased binding was completely abolished by a function blocking Mab to P-selectin, thus confirming the importance of P-selectin in these interactions.

The selectin family of CAMs is characterized by adhesive interactions that involve fucosylated and sialylated oligosaccharides, such as the Sialyl Lewis^X and PSGL-1, the latter being the

physiological high-affinity ligand for P-selectin on the surface of leukocytes (14,15). Indeed, the binding of platelets to neutrophils following thrombin activation under static conditions or after perfusion over damaged arterial surfaces was abolished by rPSGL-Ig (the recombinant soluble PSGL-1 molecule), and by an anti PSGL-1 blocking monoclonal antibody thus highlighting the importance of PSGL-1 in mediating neutrophil adhesion to platelet P-selectin under dynamic flow conditions. The specificity of rPSGL-Ig to P-selectin was demonstrated by its increased binding to activated platelet suspensions with no binding to resting platelets. In addition, increased binding of rPSGL-Ig to platelets was associated with increased inhibition of platelet/neutrophil binding. Incidentally, rPSGL-Ig is a dimer form that comprises the first 47 amino acids from the N-terminal end of the extracellular domain of mature PSGL-1. Dimerization is essential for functional recognition of P-selectin (42).

The importance of platelets in neutrophil adhesion to damaged arterial surfaces has been documented in many experimental studies. Involvement of P-selectin in these interactions has been reported in both in vitro vessel wall injury models (36-38) and in vivo thrombosis and angioplasty models (20, 43). In fact, platelets and neutrophils interact with each other not only at the site of arterial injury, but also in the circulation of patients with arterial disease and possible vascular damage (21, 27). Their adhesive interactions may contribute to mutual activation and to the secretion of potent vasoactive substances which, in turn, may enhance the arterial response to injury. Under such conditions, the engagement of P-selectin with neutrophil PSGL-1 may lead to tyrosine phosphorylation (44, 45), cytokine expression (46), and generation of reactive oxygen species (47, 48). Also, neutrophil cathepsin G and elastase can activate platelets via an adhesive interaction involving P-selectin (49, 50). In addition, platelet/neutrophil adhesive interactions via P-selectin enhance the transcellular metabolism and secretion of potent vasoactive substances such as thromboxane A₂ (51), leukotrienes (52), and platelet-activating factor (53). This cross-talk between

platelets and neutrophils provides many pathways to increase their recruitment and their deleterious effects in many pathologies. Inhibition of this binding, using soluble PSGL-1 treatment, has proved successful in reducing hepatic ischemia/reperfusion injury (54), kidney graft rejection (55), and cardiac dysfunction after ischemia/reperfusion (56), and in accelerating thrombolysis in a porcine model (32).

Our study provides strong evidence of circulating platelets activation upon contact with damaged arterial surfaces and their binding to circulating neutrophils by a mechanism involving platelet P-selectin and neutrophil PSGL-1. Blockade of P-selectin or its major ligand PSGL-1 may constitute an eventual target in the treatment of many inflammatory reactions and in the management of thrombotic events following arterial injury.

Acknowledgment

This study was supported by grants from the Heart and Stroke Foundation and the Medical Research Council of Canada.

References

1. Marcus AJ. Thrombosis and inflammation as multicellular processes: Pathophysiologic significance of transcellular metabolism. *Blood* 1990; 76: 1903-7.
2. Faint RW. Platelet-neutrophil interactions: Their significance. *Blood Rev* 1992; 6: 83-91.
3. Nash GB. Adhesion between neutrophils and platelets: A modulator of thrombotic and inflammatory events? *Thromb Res* 1994; 74 (suppl 1): S3-S11.
4. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990; 346: 425-33.
5. Jang Y, Lincoff AM, Plow EF, Topol EJ. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24: 1591-601.
6. Frenette PS, Wagner DD. Molecular medicine: Adhesion molecules. *N Engl J Med* 1996; 334: 1526-9.
7. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest* 1993; 91: 379-7.
8. Kansas GS. Selectins and their ligands: Current concepts and controversies. *Blood* 1996; 88: 3259-87.
9. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet α -granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* 1989; 84: 92-9.
10. Moore KL, Stults NL, Diaz S, Smith DF, Cummings RD, Varki A, McEver RP. Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J Cell Biol* 1992; 118: 445-56.
11. Sako D, Chang XJ, Barone KM, Vachino G, White HM, Shaw G, Veldman GM, Bean KM, Ahern TJ, Furie B, Cumming DA, Larsen GR. Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* 1993; 75: 1179-86.

12. Norman KE, Moore KL, McEver RP, Ley K. Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood* 1995; 86: 4417-21.
13. Moore KL, Patel KD, Bruehl RE, Fugang L, Johnson DA, Lichenstein HS, Cummings RD, Bainton DF, McEver RP. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol* 1995; 128: 661-71.
14. McEver RP, Cummings RD. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest* 1997; 100 (suppl): S97-S103.
15. Yang J, Furie BC, Furie B. The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1: Its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction. *Thromb Haemost* 1999; 81: 1-7.
16. Hynes RO. The complexity of platelet adhesion to extracellular matrices. *Thromb Haemost* 1991; 66: 40-3.
17. Ruggeri ZM. Mechanisms of shear-induced platelet adhesion and aggregation. *Thromb Haemost* 1993; 70: 119-23.
18. Merhi Y, Provost P, Guidoin R, Latour JG. Importance of platelets in neutrophil adhesion and vasoconstriction after deep carotid arterial injury by angioplasty in pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1185-91.
19. Merhi Y, Lam JYT, Lacoste LL, Latour JG, Guidoin R, Waters D. Effects of thrombocytopenia and shear rate on neutrophil and platelet deposition on endothelial and medial arterial surfaces. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 951-7.
20. Merhi Y, Provost P, Chauvet P, Théorêt JF, Phillips ML, Latour JG. Selectin blockade reduces neutrophil interaction with platelets at the site of deep arterial injury by angioplasty in pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 372-7.

21. Scharf RE, Tomer A, Marzec UM, Teirstein PS, Ruggeri ZM, Harker LA. Activation of platelet in blood perfusing angioplasty-damaged coronary arteries. Flow cytometric detection. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 1475-87.
22. Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, Schiessler A, Schömig A. Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty. *Circulation* 1996; 93: 229-37.
23. Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Puchner G, Schömig A. Neutrophil and platelet activation at balloon-injured coronary artery plaque in patients undergoing angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 819-24.
24. Serrano CV, Ramires JAF, Venturinelli M, Arie S, D'Amico E, Zweier JL, Pileggi F, da Luz PL. Coronary angioplasty results in leukocyte and platelet activation with adhesion molecule expression. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29: 1276-83.
25. Mickelson JK, Lakkis NM, Villarreal-Levy G, Hughes BJ, Smith CW. Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: A mechanism for recurrent disease? *J Am Coll Cardiol* 1996; 28: 345-53.
26. Ott I, Neumann FJ, Gawaz M, Schmitt M, Schömig A. Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation* 1996; 94: 1239-46.
27. Furman MI, Benoit SE, Barnard MR, Valeri CR, Borbone ML, Becker RC, Hechtman HB, Michelson AD. Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 352-8.
28. Holme PA, Orvim U, Hamers MJAG, Solum NO, Brosstad FR, Barstad RM, Sakariassen KS. Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 646-53.

29. Hagberg IA, Roald HE, Lyberg T. Platelet activation in flowing blood passing growing arterial thrombi. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1331-6.
30. Merhi Y, Lacoste LL, Lam JYT. Neutrophil implications in platelet deposition and vasoconstriction after deep arterial injury by angioplasty in pigs. *Circulation* 1994; 90: 997-1002.
31. Provost P, Merhi Y. Endothelium-derived nitric oxide decreases polymorphonuclear leukocyte interaction with the deeply injured arterial wall under intermediate and high shear conditions. *Thromb Haemost* 1997; 78: 939-46.
32. Kumar A, Villani MP, Patel UK, Keith JC Jr, Schaub RG. Recombinant soluble form of PSGL-1 accelerates thrombolysis and prevents reocclusion in a porcine model. *Circulation* 1999; 99: 1363-9.
33. Badimon L, Turitto V, Rosemark JA, Badimon JJ, Fuster V. Characterization of a tubular flow chamber for studying platelet interaction with biologic and prosthetic materials: deposition of indium 111-labeled platelets on collagen, subendothelium, and expanded polytetrafluoroethylene. *J Lab Clin Med* 1987; 110: 706-18.
34. Jungi TW, Spycher MO, Nydegger UE, Baradun S. Platelet-leukocyte interaction: selective binding of thrombin-stimulated platelets to human monocytes, polymorphonuclear leukocytes, and related cell lines. *Blood* 1986; 67: 629-36.
35. Hamburger SA, McEver RP. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood* 1990; 75: 550-4.
36. Yeo EL, Sheppard JAI, Feuerstein IA. Role of P-selectin and leukocyte activation in polymorphonuclear cell adhesion to surface adherent activated platelets under physiologic shear conditions (an injury vessel wall model). *Blood* 1994; 83: 2498-507.

37. Kuijper PHM, Torres HIG, Lammers JWJ, Sixma JJ, Koenderman L, Zwaginga JJ. Platelet and fibrin deposition at the damaged vessel wall: Cooperative substrates for neutrophil adhesion under flow conditions. *Blood* 1997; 89: 166-75.
38. Kirchhofer D, Riederer MA, Baumgartner HR. Specific accumulation of circulating monocytes and polymorphonuclear leukocytes on platelet thrombi in a vascular injury model. *Blood* 1997; 89: 1270-8.
39. Provost P, Tremblay J, Merhi Y. The antiadhesive and antithrombotic effects of the nitric oxide donor SIN-1 are combined with a decreased vasoconstriction in a porcine model of balloon angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1806-12.
40. Michelson AD, Benoit SE, Furman MI, Breckwoldt WL, Rohrer MJ, Barnard MR, Loscalzo J. Effects of nitric oxide/EDRF on platelet surface glycoproteins. *Am J Physiol* 1996; 270: H1640-H8.
41. Murohara T, Parkinson SJ, Waldman SA, Lefer AM. Inhibition of nitric oxide biosynthesis promotes P-selectin expression in platelets. Role of protein kinase C. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 2068-75.
42. Snapp KR, Craig R, Herron M, Nelson RD, Stoolman LM, Kansas GS. Dimerization of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) required for optimal recognition of P-selectin. *J Cell Biol* 1998; 142: 263-70.
43. Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM, Sajer SA, Furie B. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated *in vivo* by P-selectin on adherent platelets. *Nature* 1992; 359: 848-51.
44. Hidari KI, Weyrich AS, Zimmerman GA, McEver RP. Engagement of P-selectin glycoprotein ligand-1 enhances tyrosine phosphorylation and activates mitogen-activated protein kinases in human neutrophils. *J Biol Chem* 1997; 272: 28750-6.

45. Evangelista V, Manarini S, Sideri R, Rotondo S, Martelli N, Piccoli A, Totani L, Piccardoni P, Vestweber D, de Gaetano G, Cerletti C. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: Role of PSGL-1 as a signaling molecule. *Blood* 1999; 93: 876-85.
46. Neumann FJ, Marx N, Gawaz M, Brand K, Ott I, Rokitta C, Sticherling C, Meinel C, May A, Schömig A. Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation* 1997; 95: 2387-94.
47. DeLano FA, Forrest MJ, Schmid-Schonbein GW. Attenuation of oxygen free radical formation and tissue injury during experimental inflammation by P-selectin blockade. *Microcirculation* 1997; 4: 349-57.
48. Bonomini M, Stuard S, Carreno MP, Settefrati N, Santarelli P, Haeffner-Cavaillon N, Albertazzi A. Neutrophil reactive oxygen species production during hemodialysis: Role of activated platelet adhesion to neutrophils through P-selectin. *Nephron* 1997; 75: 402-11.
49. Cerletti C, Evangelista V, Molino M, de Gaetano G. Platelet activation by polymorphonuclear leukocytes: Role of cathepsin G and P-selectin. *Thromb Haemost* 1995; 74: 218-23.
50. Evangelista V, Piccardoni P, White JG, de Gaetano G, Cerletti C. Cathepsin G-dependent platelet stimulation by activated polymorphonuclear leukocytes and its inhibition by antiproteinases: Role of P-selectin mediated cell-cell adhesion. *Blood* 1993; 81: 2947-57.
51. Maugeri N, Evangelista V, Piccardoni P, Dell'Elba G, Celardo A, de Gaetano G, Cerletti C. Transcellular metabolism of arachidonic acid: Increased platelet thromboxane generation in the presence of activated polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 1992; 80: 447-51.

52. Marcus AJ, Broekman MJ, Safier LB, Ullman HL, Islam N. Formation of leukotrienes and other hydroxy acids during platelet-neutrophil interactions in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 109: 130-7.
53. Coeffier E, Delautier D, Le Couedic JP, Chignard M, Denizot Y, Benveniste J. Cooperation between platelets and neutrophils for PAF-acether (platelet-activating factor) formation. *J Leukoc Biol* 1990; 47: 234-43.
54. Dulkanchainun TS, Goss JA, Imagawa DK, Shaw GD, Anselmo DM, Kaldas F, Wang T, Zhao D, Busuttill AA, Kato H, Murray NGB, Kupiec-Weglinski JW, Busuttill RW. Reduction of hepatic ischemia/reperfusion injury by a soluble P-selectin glycoprotein ligand-1. *Ann Surg* 1998; 227: 832-40.
55. Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, Marquette KA, Tilney NL. The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand. *J Clin Invest* 1997; 99: 2682-90.
56. Lefer AM, Campbell B, Scalia R, Lefer DJ. Synergism between platelets and neutrophils in provoking cardiac dysfunction after ischemia and reperfusion. Role of selectins. *Circulation* 1998; 98: 1322-8.

Figure Legends

- Figure 1** Bar graph showing the expression of P-selectin (CD62P, n = 16), CD41 (n = 6-9) and CD61 (n = 4-6) before (baseline) and after thrombin activation of isolated platelets. *p < 0.001 versus baseline.
- Figure 2** Bar graph showing the expression of platelet P-selectin at baseline (control, n = 16) without perfusion, and after perfusion for 15 min over normal arterial segments with intact endothelium (n = 11) or over damaged arterial segments without endothelium (n = 16). *p < 0.05.
- Figure 3** Dose-response curves showing the effect of rPSGL-Ig (A, n = 6-12), anti-P-selectin function blocking monoclonal antibody (B, n = 6) and anti-PSGL-1 function blocking monoclonal antibody (C, n = 5) on thrombin-activated platelets binding to neutrophils. Results are presented as percent of residual binding, where maximum binding with thrombin was set at 100%. *p < 0.05 versus 0.
- Figure 4** Bar graph showing the percent of neutrophils with platelet-bound fluorescence at baseline (n = 12), and after perfusion for 15 min over damaged arterial surfaces (n = 20), as well, the effects of rPSGL-Ig at 40 µg/ml (n = 5), anti-P-selectin at 2 µg/ml (n = 4) and anti-PSGL-1 at 0.5 µg/ml (n = 5) on this binding. *p < 0.05 versus control.
- Figure 5** Bar graph presenting the expression of P-selectin and the binding of rPSGL-Ig to thrombin-activated platelets in the presence of increasing concentrations of rPSGL-Ig (n = 2-5).
- Figure 6** Correlation between the percent binding of rPSGL-Ig (0-40 µg/ml) to platelets and the percent inhibition of platelet binding to neutrophils (n = 2-5).

FIGURE 1

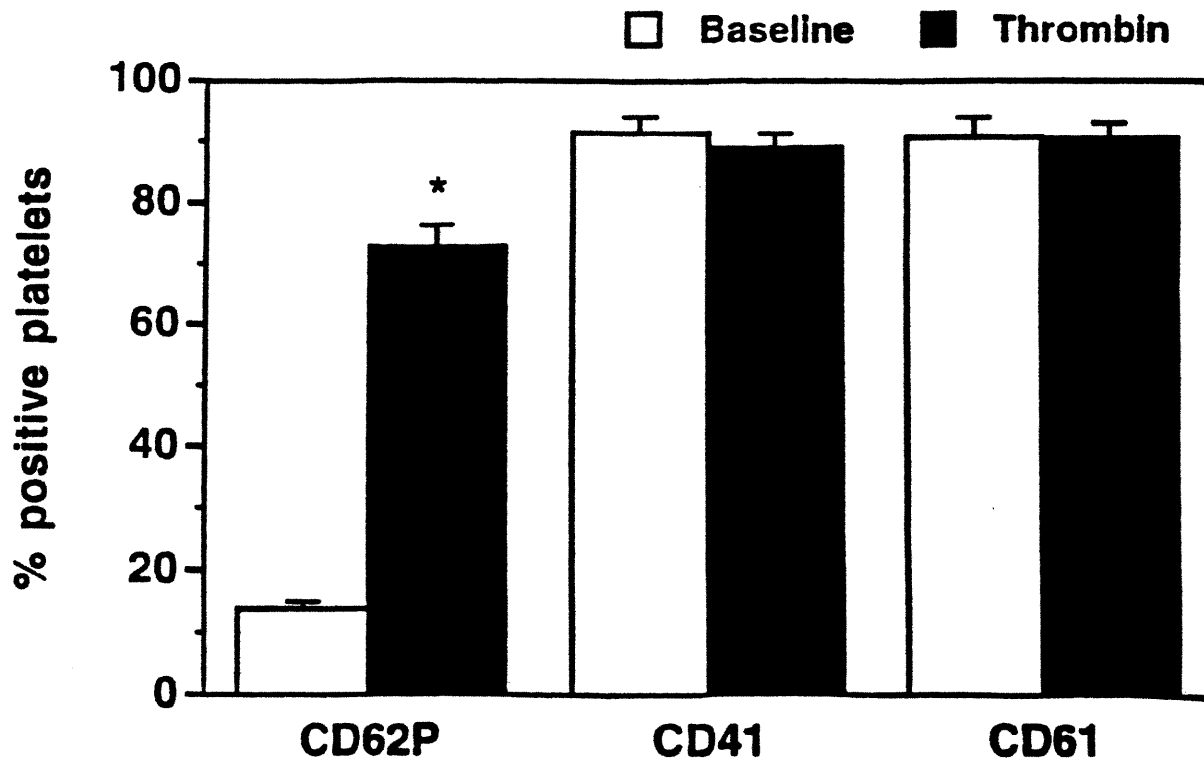


FIGURE 2

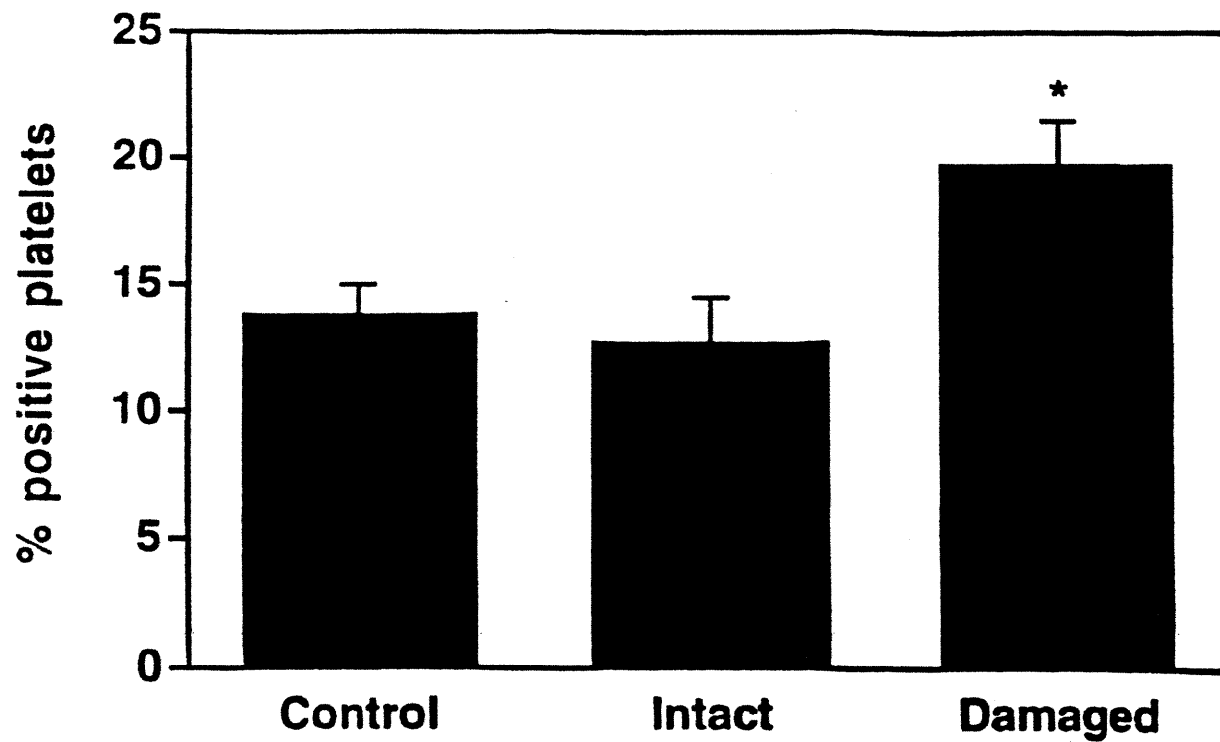


FIGURE 3

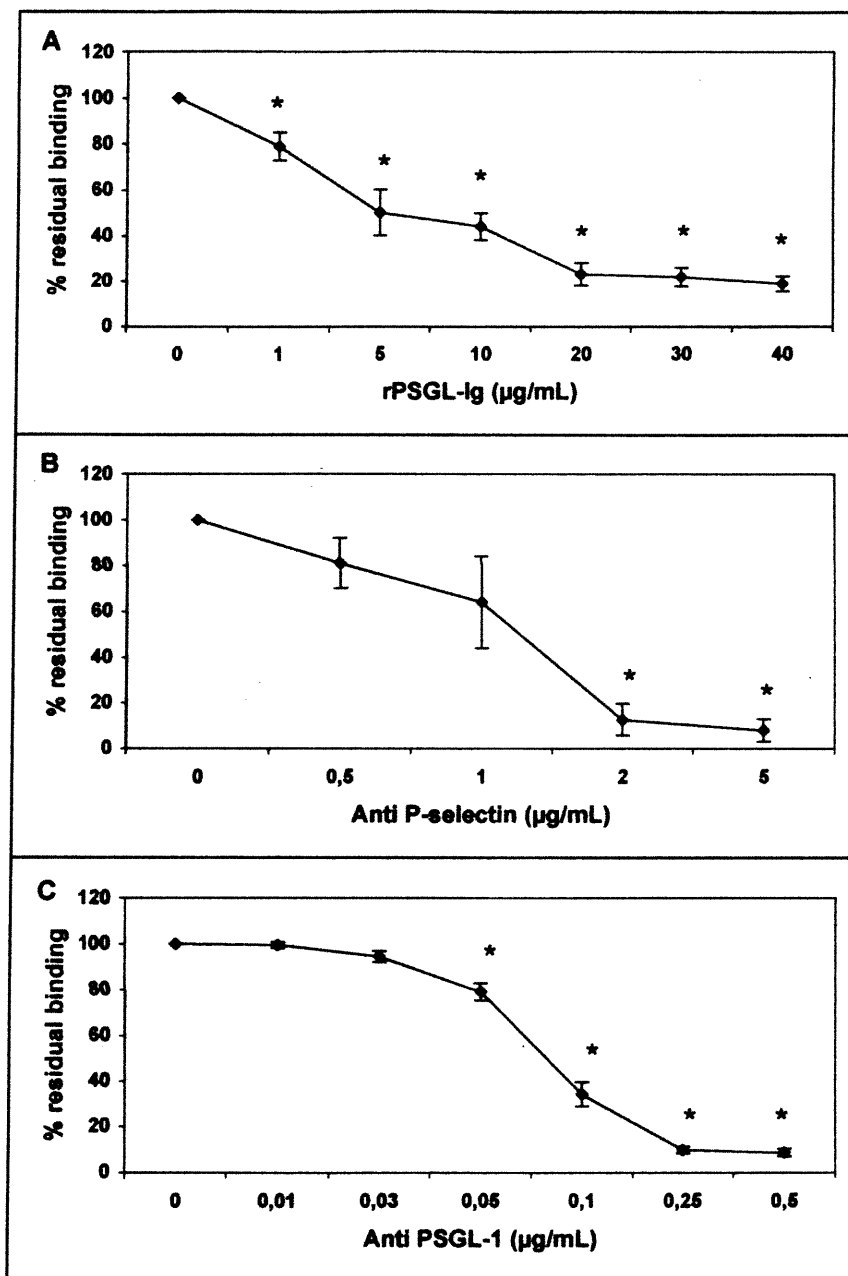


FIGURE 4

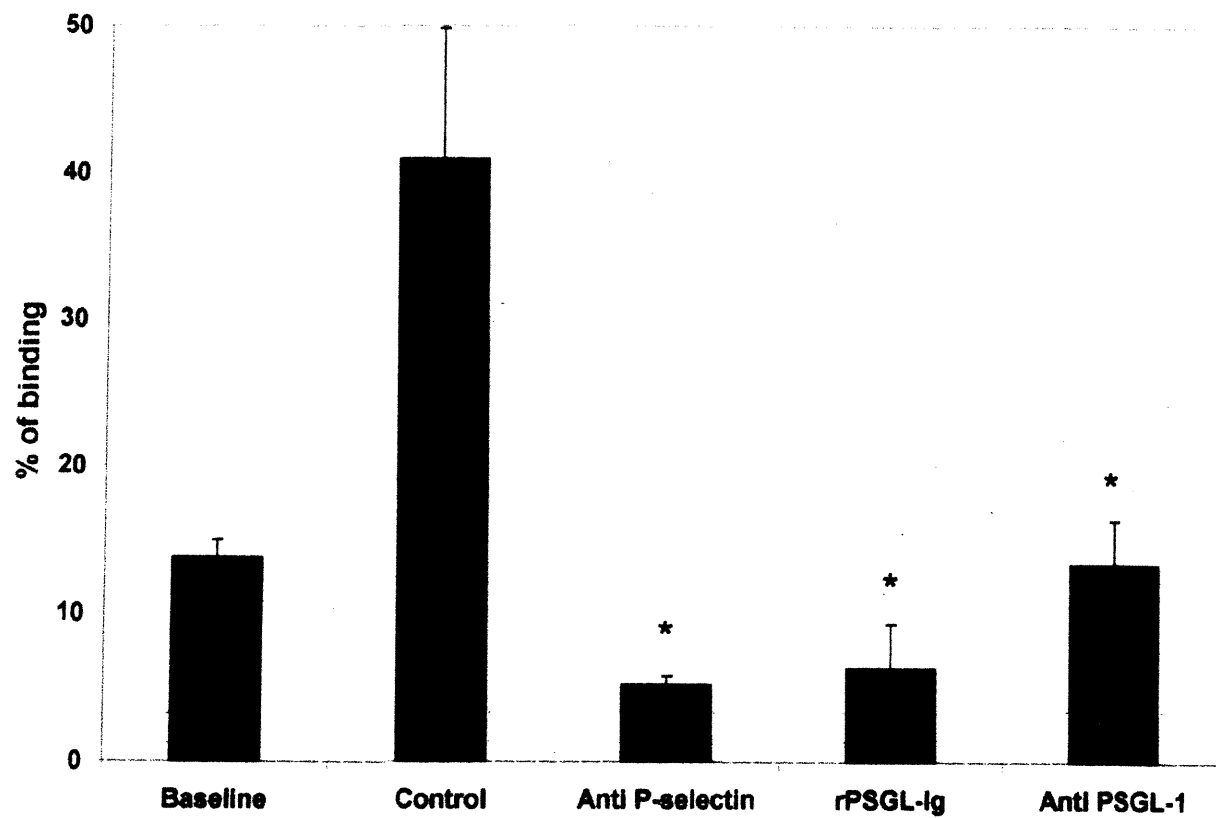


FIGURE 5

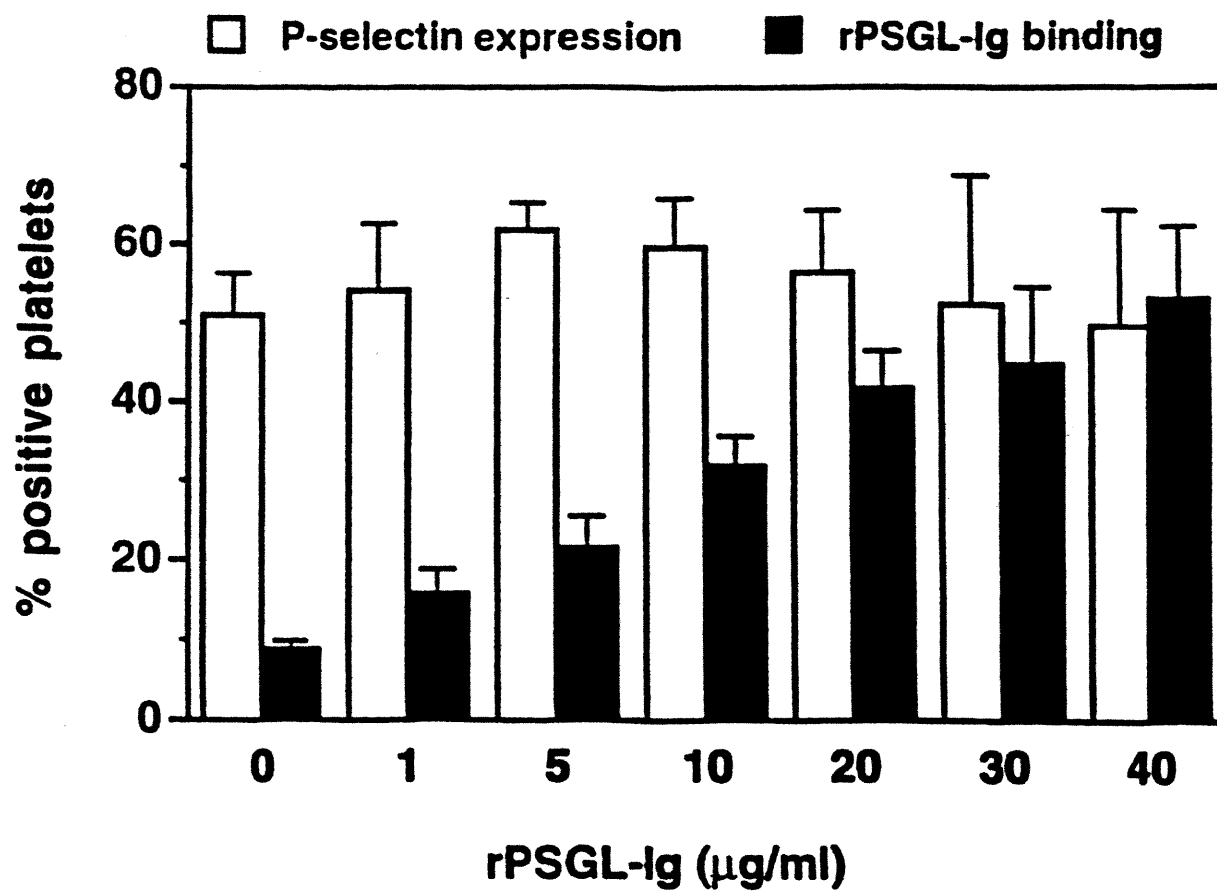
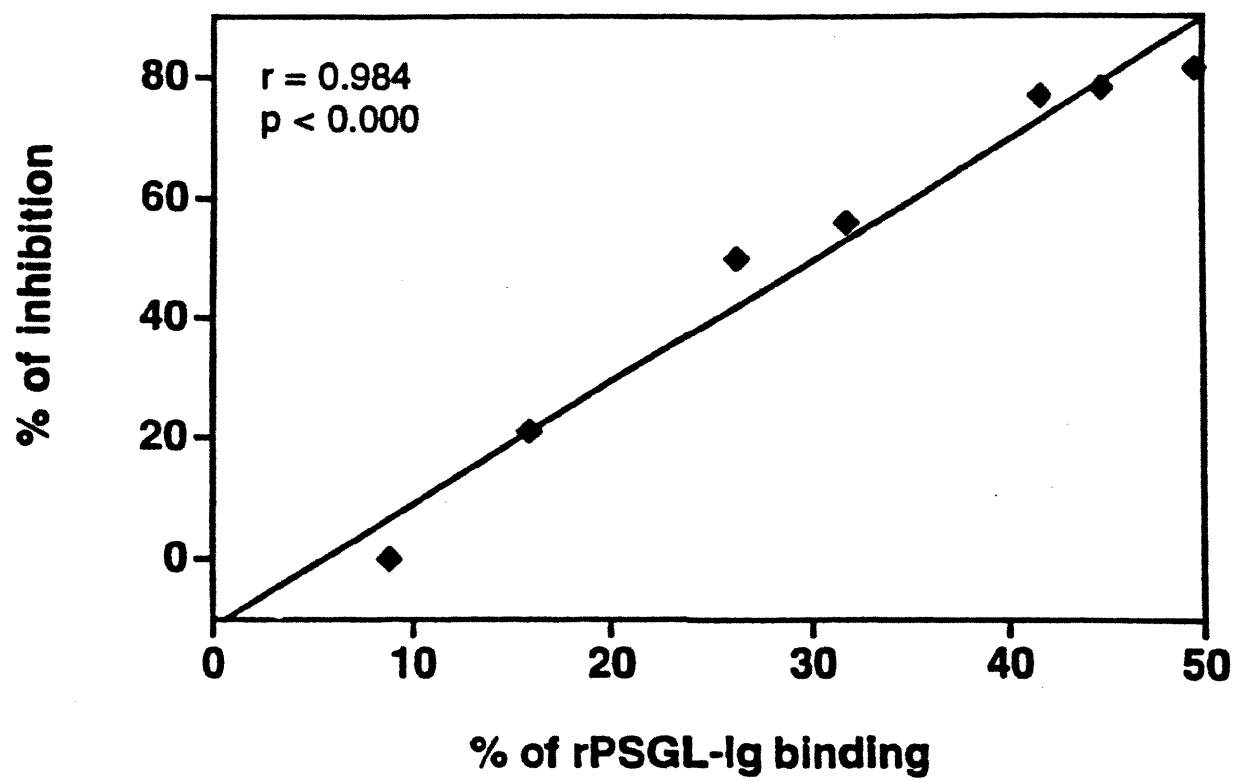


FIGURE 6



3.4 rPSGL-Ig Reduces Restenosis via Inhibition of Platelet-Neutrophil Adhesion After Double Angioplasty in Swine

Résumé

La P-sélectine permet le recrutement des leucocytes sur les plaquettes et les cellules endothéliales activées par des interaction avec son récepteur de haute affinité, le PSGL-1. L'adhésion des plaquettes, l'activation des leucocytes et la formation de complexes plaquettes/leucocytes ont été rapportées suite à une angioplastie coronaire et étaient associées avec l'apparition de resténose. L'utilisation d'antagonistes des sélectines ou une déficience en P-sélectine dans des modèles de dommage artériel ou de remodelage vasculaire ont résulté en une réduction de la sténose vasculaire. Cette étude a pour but d'évaluer l'effet de l'utilisation d'une forme recombinante chimérique et soluble de PSGL-1, le rPSGL-Ig, sur le développement de la resténose 4 semaines après un dommage vasculaire répétée par angioplastie.

Une angioplastie par cathéter ballon fut pratiquée dans les carotides communes des porcs suivie d'une période d'attente d'un mois au cours de laquelle un tissu néointimal se développa aux sites endommagés. Par la suite, une seconde angioplastie, aux mêmes sites, fut pratiquée après une administration intraveineuse du véhicule ou de rPSGL-Ig (dose de 1 mg/kg, demie-vie plasmatique de 10 jours chez le porc). Les animaux furent sacrifiés soit 1 heure, 4 heures, 1 semaine ou 4 semaines plus tard. L'adhésion de plaquettes-Cr⁵¹ et de neutrophiles-In¹¹¹ autologues a été déterminée et des analyses histologiques et histomorphométriques ont été effectuées. Le rPSGL-Ig a réduit significativement l'adhésion des plaquettes (50% à 4 heures et 85% à 1 semaine) et des neutrophiles (50% à 4 heures et 78% à 1 semaines) aux segments artériels sévèrement endommagés après la seconde angioplastie mais n'a pas influencé l'adhésion de ces cellules 1 heure après le dommage. À 4 semaines, la lumière vasculaire résiduelle des segments sévèrement endommagés était de 60% plus importante chez les animaux traités avec le rPSGL-Ig comparés avec les contrôles (6.1 ± 0.6 vs 3.8 ± 0.1 mm²; $P < 0.002$) alors que la surface néointimale était légèrement réduite par l'administration du rPSGL-Ig (de 0.7 mm² à 0.5 mm²). Un ratio de la surface délimitée par la lame élastique externe des segments endommagés par rapport à des segments de référence > 1 chez les animaux traités mais < 1 chez les contrôles suggère que le rPSGL-Ig réduit la resténose en favorisant un remodelage vasculaire positif.

Ces résultats indiquent que l'antagonisme de la P-sélectine par l'utilisation de rPSGL-Ig inhibe l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles au sites de dommage artériels et réduit la resténose en permettant un remodelage vasculaire positif. Le rPSGL-Ig pourrait donc être potentiellement bénéfique dans la prévention de la resténose.

rPSGL-Ig Reduces Restenosis via Inhibition of Platelet-Neutrophil Adhesion After Double Angioplasty in Swine

Jean-Guy Bienvenu, DVM, Jean-François Tanguay, MD, Jean-François Théorêt, MSc,

Anjali Kumar, PhD, Robert G. Schaub, PhD, Yahye Merhi, PhD

Short title: Bienvenu - rPSGL-Ig and Restenosis in Pigs

Word Count: 5,245

Accepted for publication : Circulation

From the Research Center, Montreal Heart Institute Montreal (J-G.B., J-F.Ta., J-F. Th., Y.M.), the University of Montreal (J-G.B., J-F.Ta., J-F. Th., Y.M.), Montreal, Quebec, Canada and Genetics Institute (A.K., R.G.S.), Andover, MA, USA.

This work was supported by the Medical Research Council of Canada, and the Heart and Stroke Foundation of Canada.

Correspondence to Yahye Merhi, Laboratory of Experimental Pathology, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street East., Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8.
Tel.: [REDACTED] Fax: (514) 376-1355; E-mail: [REDACTED]

Abstract

Background—P-selectin mediates leukocyte recruitment to activated platelets and endothelial cells via its high-affinity counter-receptor P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1). Platelet and leukocyte activation, and formation of platelet/leukocyte complexes have been reported following coronary angioplasty; and were correlated with restenosis. This study investigates the effect of a recombinant soluble PSGL-1 molecule (rPSGL-Ig) on the adhesion of platelets and neutrophils and the development of restenosis after double arterial injury by angioplasty.

Methods and Results—Four weeks after balloon angioplasty of both carotid arteries in pigs, a second angioplasty was performed at the same sites, 15 minutes after a single administration of either vehicle or rPSGL-1 (1mg/kg IV). Animals were euthanized at 1 hour, 4 hours, 1 week or 4 weeks later. Adhesion of autologous ^{51}Cr -platelets and ^{111}In -neutrophils was quantified and histologic/morphometric analyses were performed. Although rPSGL-Ig did not affect adherence of these cells 1 hour post-injury, it significantly reduced the adhesion of platelets (50% at 4 hours and 85% at 1 week) and neutrophils (50% at 4 hours and 78% at 1 week) to deeply injured arterial segments. At 4 weeks, the residual lumen was 63% larger in rPSGL-Ig-treated arteries as compared to controls (6.1 ± 0.6 versus 3.8 ± 0.1 mm²; $P < 0.002$). The neointimal surface area was slightly reduced (0.5 in rPSGL-Ig versus 0.7 mm² in control). The ratio of external elastic lamina surface of injured to uninjured reference arterial segments was >1 and <1 in treated and control arteries respectively.

Conclusions—These results indicate that P-selectin antagonism using rPSGL-Ig inhibits early platelet/leukocyte adhesion at the site of arterial injury and reduces restenosis through a

positive impact on vascular remodeling. Hence rPSGL-Ig may have potential in the prevention of restenosis.

Key Words: restenosis ■ remodeling ■ neutrophils ■ platelets ■ PSGL-1

Condensed Abstract

We investigated the effects of a soluble recombinant P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 molecule (rPSGL-Ig) on thrombotic and inflammatory reactions and restenosis in a porcine model after double carotid angioplasty. rPSGL-Ig significantly reduced adhesion of platelets and neutrophils at the sites of injury 4 hours and 1 week post-injury. At 4 weeks, rPSGL-Ig-treated arteries showed a significant larger lumen as compared to control. Although not related to neointimal surface reduction, this inhibition of restenosis was highly correlated with the ratio of external elastic lamina surfaces of injured to reference uninjured segments, suggesting an effect on compensatory remodeling. P-selectin antagonism using rPSGL-Ig may have potential in the prevention of restenosis.

Restenosis following successful coronary angioplasty constitutes a significant limitation to the long-term success of this procedure. Shortly after injury to the vessel wall, elastic recoil thrombotic and inflammatory responses, and secretion of cytokines and growth factors, contribute to thrombus organization. These early reactions are followed, in turn, by medial cell proliferation and migration towards the intima with formation of extracellular matrix and eventual reduction in vascular lumen or restenosis.^{1,2} The excessive reduction in vascular lumen, previously thought to be secondary to neointimal hyperplasia, is now recognized to involve chronic and adaptive changes in vascular structure in response to alterations in hemodynamic conditions and locally mediated vasoactive and growth factors with production/degradation of extracellular matrix resulting in changes to arterial size or remodeling.³⁻⁸

The acute response to arterial injury induced by angioplasty involves the adhesion of platelets and leukocytes, which react with the damaged arterial wall in proportion to the degree of injury.⁹⁻¹¹ Activated platelets promote mural thrombus formation, vasoconstriction, and restenosis.^{12,13} Neutrophils are also activated after PTCA,¹⁴⁻¹⁷ and contribute to the up-regulation of platelet reactivity.¹⁸ These interactions between platelets and neutrophils are facilitated by platelet P-selectin and its high-affinity counter-receptor leukocyte P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1).¹⁹

P-selectin is necessary for platelet-leukocyte interactions²⁰⁻²² where it allows tethering of neutrophils by activated platelets facilitating metabolic cooperation and mutual activation.²²⁻²⁵ Increased platelet-leukocyte activation and interactions have been reported in unstable angina, after myocardial ischemia as well as coronary angioplasty.^{16,17,26,27} Indeed, inhibition of platelet/neutrophil binding with anti P-selectin antibodies or a recombinant soluble form of PSGL-1 has been beneficial in animal models of deep vein thrombosis,²⁸ myocardial, ischemia-reperfusion,^{29,30} intimal hyperplasia following angioplasty,³¹ and arterial thrombosis.^{32,33}

In the present study, we sought to demonstrate that administration of rPSGL-Ig would reduce platelet-leukocyte interactions at the sites of injury, which in turn may contribute to reduce restenosis in a porcine model involving double arterial angioplasty.

Material and Methods

Animal Preparation

Fourteen cross-bred Yorkshire swine (mean weight: 17.3 ± 0.3 kg) were prepared according to the Canadian Council on Animal Care regulations. The study design is summarized in Figure 1. As described previously,^{10,11,34} the animals were sedated with an intramuscular injection of ketamine (Rogarsetic, 15 mg/kg) and azaperone (Stresnil, 3 mg/kg). They were then intubated, mechanically ventilated with medical air and O₂, and anesthetized with 0.5% to 1% halothane. Intravenous heparin (100 U/kg) was given prior to the angioplasty procedure.

Double Arterial Injury by Angioplasty and Experimental Groups

Carotid injury was performed using a 7F-polyethylene balloon dilation catheter (size, 8 mm × 3 cm), as previously described.³⁴ The balloon was positioned, under fluoroscopic control, into the left and right common carotid arteries, between the fourth and the fifth cervical vertebrae. Five 30-second inflations were performed at a pressure of 6 atm, with resting intervals of 60 seconds between each inflation. Angiograms were obtained immediately before and during dilation.

The animals were allowed to recover for 4 weeks during which time neointimal lesions developed at injury sites. They were then subjected to a second angioplasty procedure at the previously injured sites. Approximately 15 minutes before the second angioplasty, a single intravenous bolus of vehicle (formulation buffer) or rPSGL-Ig³³ (Genetics Institute, USA), which

has a half-life of 10 days in pigs, was administered at a dose of 1 mg/kg. As shown in Figure 1, animals were euthanized 1 hour, 4 hours, 1 week, or 4 weeks following the second injury. Before and within 10 minutes of treatment administration, heart rate, blood pressure, and hematological parameters as well as activated clotting time (ACT) and platelet aggregation were determined in each animal as described previously.³⁴

Isolation and Labeling of Neutrophils and Platelets

Autologous blood was used for the isolation and radiolabelling of neutrophils and platelets with ¹¹¹indium-oxine (¹¹¹In) and ⁵¹chromium (⁵¹Cr), respectively, as detailed elsewhere.^{10,11,34} Briefly, a low-speed centrifugation yielded platelet rich plasma (PRP) on the top and a bottom portion rich in red blood cells and leukocytes. Platelets were isolated from the PRP and incubated with 300 µCi of ⁵¹Cr for 30 minutes. Next, the suspension was centrifuged to remove unbound ⁵¹Cr, resuspended in platelet-poor plasma (PPP), and reinjected into the animal.

Neutrophils were isolated from the bottom portion obtained after the first blood centrifugation. A leukocyte-rich suspension, obtained after red blood cells sedimentation with 4% dextran, was then layered on Ficoll-Paque gradient and centrifuged for 30 minutes at 300 g to obtain a neutrophil-rich bottom. Next, contaminating red blood cells were lysed, and neutrophils were incubated with 250 µCi of ¹¹¹In for 15 minutes. Finally, the suspension was centrifuged to remove unbound ¹¹¹In, resuspended in PPP, and reinjected into the animal.

Quantification of Neutrophil and Platelet Adhesion

At the end of the experiments, the carotid arteries were fixed in situ with a buffered formalin solution. The fixed arteries were then removed and cleaned of surrounding tissue. The dilated injured sections as well as the distal uninjured areas were each divided into four segments. After length and internal surface measurements, these segments as well as reference blood samples

were placed in a gamma counter equipped with a multinuclide analysis program for ^{111}In and ^{51}Cr radioactivity determination. The amount of neutrophils and platelets per square centimeter adhering to arterial segments was calculated from the segment's radioactivity, and from the cellular count and radioactivity of a reference blood sample, corrected for the luminal surface of each arterial segment, as described previously.^{34,35} The results are presented as platelet and neutrophil adhesion values from injured segments minus the adhesion on uninjured distal reference segments.

Histopathology

Representative transverse sections from each arterial segment were stained with hematoxylin-phloxin-safran and Movat's pentachrome, thereby allowing for identification of both the internal elastic lamina (IEL) and the demarcation between the neointima and the media, as reported previously.³⁶ All specimens were evaluated microscopically for the presence of mild or deep arterial wall injury, which is characterized by a breached IEL and a lacerated media. Results from deeply injured arterial segments are reported.

Morphometry

Sections from the injured arterial segments, as well as the uninjured, distal (reference) segments were analysed, using computer-assisted histomorphometry and the NIH Image 1.60 imaging software. The circumferences of the external elastic lamina (EEL) and IEL, as well as the surface areas within the EEL, IEL, and residual lumen were measured. Neointimal area was obtained by subtracting the residual lumen area from the area circumscribed by the IEL.³⁷ Vascular stenosis was calculated as follows: $[(\text{reference luminal surface} - \text{dilated luminal surface}) / \text{reference luminal surface}] \times 100$.³ Restenotic segments were defined as those with vascular stenosis >50%. To minimize animal-to-animal variations, normalized data were obtained by dividing the

measurement of the dilated injured segments by the corresponding distal, uninjured reference segment values.

Immunohistochemistry

In the 4-week group, we showed the presence of endothelial cells on the neointima of the arterial segments using peroxidase-labeled Dolichos biflorus lectin.³⁸ In addition, we assessed the expression of P-selectin by the neoendothelium in paraffin-embedded sections, by immunostaining using a rabbit polyclonal antibody to P-selectin (Pharmingen) that has been shown to cross-react with porcine P-selectin (unpublished data, 1996).

Statistical Analysis

Results are reported as mean \pm SEM. Intragroup and intergroup differences were compared using paired and unpaired student's *t* test respectively and followed, when applicable, by one-way ANOVA test with Bonferroni comparisons. A *P* value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

Animal Characteristics

Both control and rPSGL-Ig treated animals had similar initial body weights (17.6 ± 1.9 and 16.9 ± 0.4 kg, respectively). Their hematological and hemodynamic parameters were within the normal range both before and after the injection of either rPSGL-Ig or the vehicle. As shown in Table 1, which summarizes the characteristics of the dilated arteries in each group, one artery was occluded in each of the control groups at 4 hours, 1 week, and 4 weeks. No such occlusion was noted in the arteries of treated animals. For each time point, the extent of injury was similar in control and treated animals.

Effect of rPSGL-Ig on Platelet and Neutrophil Adhesion

The adhesion of platelets and neutrophils to uninjured distal arterial segments (reference, non-dilated) was low and similar for the control and rPSGL-Ig-treated animals (platelets $\times 10^6/\text{cm}^2$: 0.54 ± 0.15 versus 0.51 ± 0.17 , neutrophils $\times 10^3/\text{cm}^2$: 19.5 ± 3.2 versus 14.1 ± 2.8 , respectively).

As shown in Figures 2A and 3A, 1 hour after the second angioplasty, rPSGL-Ig treatment did not significantly influence platelet and neutrophil adhesion to the injured arteries. However, 4 hours later, the adhesion of both platelets (Figure 2A) and neutrophils (Figure 3A) had increased significantly in the control group, which was significantly reduced by approximately 50% in the rPSGL-Ig-treated animals. The effect of rPSGL-Ig was maintained until 1 week post-injury, when it induced a significant 85% and 78% inhibition of platelet (Figure 2B) and neutrophil (Figure 3B) adhesion, respectively. At 4 weeks post-injury, the adhesion of platelets and neutrophils was reduced as well, but not significantly, in rPSGL Ig-treated animals as compared to control.

Morphometric Analyses and Restenosis

Reference distal-uninjured arterial segments of control and rPSGL-Ig-treated animals in the 4-week groups showed similar morphometric values for both the EEL (7.1 versus 7.2 mm^2) and IEL (5.1 versus 5.1 mm^2) surfaces, and the EEL (9.6 versus 9.3 mm) and IEL (8.2 versus 8.4 mm) lengths. Since the uninjured segments had no neointima, these were considered reference values. Similarly, the IEL surfaces in each group were considered the reference vascular lumen.

As shown in Table 2, the vascular lumen was significantly 63% larger in rPSGL-Ig-treated arteries ($6.08 \pm 0.58 \text{ mm}^2$) as compared to the controls ($3.84 \pm 0.06 \text{ mm}^2$), while the neointima in

treated arteries ($0.52 \pm 0.09 \text{ mm}^2$) was only 26% smaller than that in control arteries ($0.7 \pm 0.09 \text{ mm}^2$). In addition, the vascular lumen was reduced by 29% in control arteries, whereas in treated arteries it was increased by 22%. Moreover, EEL and IEL surfaces and lengths were also increased in rPSGL-Ig-treated arteries when compared to controls.

As shown in Figure 4A, in both control and rPSGL-Ig-treated animals, a negative significant correlation was obtained between vascular stenosis and EEL surface. In addition, while 43% of the control arterial segments were restenotic (vascular stenosis $>50\%$), none of the treated arterial segments were restenotic. Figure 4 also indicates that 52% of the arterial segments in the control group showed inadequate compensatory enlargement (normalized EEL surface <1), whereas 90% of the arterial segments in the treated group showed adequate compensatory enlargement (normalized EEL surface >1).

When vascular stenosis is plotted against neointimal surface (Figure 4B), a positive significant correlation was obtained in the control group, but not in the rPSGL-Ig-treated group. These results and those of Figure 4A suggest that in the control arteries, both neointimal tissue formation and constrictive remodeling were responsible for the vascular stenosis observed 4 weeks after double angioplasty. On the other hand, it seems that rPSGL-Ig treatment induced positive remodeling of the arterial wall. Furthermore, this positive remodeling likely occurs between 1 and 4 weeks post-injury, as suggested by the results shown in Figure 5. Although the normalized values of EEL surface and residual lumen were similar between control and treated arteries at 1 week, they had increased significantly at 4 weeks in the rPSGL-Ig-treated arteries.

Pathological Analysis and Immunostaining

Neointima in both control and treated arteries was characterized by various amounts of spindle-shaped cells and organized mural thrombus in the extracellular matrix. As shown in

Figure 6, the rPSGL-Ig-treated arteries demonstrated a dramatically increased overall vessel size and vascular lumen, when compared to the control arteries. In addition, immunostaining for the lectin *Dichlorus biflorus* (DBA) indicated that complete neointimal reendothelialization was achieved 4 weeks post-injury in both control and treated arteries. This newly formed endothelium expressed P-selectin at almost the same level in control and treated arteries. Endothelium of naïve carotid arteries, however, did not express P-selectin, or showed few isolated positive cells (data not shown).

Discussion

In this study, we investigated the effects of rPSGL-Ig on platelet and neutrophil adhesion in a porcine model involving double injury by angioplasty to the carotid arteries. We also assessed the effect of such treatment on the development of restenosis. In this model, a single administration of rPSGL-Ig prior to the second angioplasty significantly reduced the adhesion of platelets and neutrophils during the first 4 hours post-injury. This effect was maintained at 1 week post-injury (Figures 2 and 3). As compared to the adhesion at 1 hour, a sharp increase in the number of platelets (Figure 2A) and neutrophils (Figure 3A) adhering to, and within, the damaged sites of control arteries was noted at 4 hours post-injury. This finding is in agreement with previous studies reporting concurrent accretion of platelets and neutrophils within the first hours after angioplasty.³⁹ The reactions of platelets are mostly integrin-dependent, involving the binding of platelet GPIa/IIa to collagen and GPIIb/IIIa to fibrinogen that result in shape change, release of granule contents, and aggregation, leading to thrombus growth at the sites of arterial injury. The adhesion of neutrophils, however, is predominantly mediated by their binding to P-selectin expressed on adherent activated platelets.^{11,21,23-25,40} This adhesive interaction between

platelets and neutrophils promotes mutual activation and secretion of vasoactive substances that, in turn, amplifies the inflammatory and thrombotic responses. Indeed, it has been shown that platelet and neutrophil activation and binding occur after angioplasty and are predictors of subsequent restenosis.^{16,41} The blockade of selectins has been found to be beneficial in reducing platelet-neutrophil interactions and vascular stenosis in experimental models of angioplasty.^{31,34}

In our study, treatment with rPSGL-Ig, a soluble recombinant form of PSGL-1 (the high-affinity ligand for P-selectin),¹⁹ 15 minutes prior to the second angioplasty, inhibited the adhesion of neutrophils and platelets to deeply injured arterial surfaces out to 1 week post-angioplasty (Figures 2B and 3B). rPSGL-Ig has a long half-life of about 10 days in swine, and is a 10-fold more potent inhibitor of P-selectin than E-selectin and an even weaker inhibitor of L-selectin.³³ In addition, rPSGL-Ig inhibited, in a concentration dependent-manner, isolated porcine platelet-neutrophil binding.⁴² The inhibitory effect of rPSGL-Ig on platelet and neutrophil accumulation at the site of injury, until 1 week post-injury, when reendothelialization of the injured arteries is in progress and incomplete, was likely due to its interference with neutrophil PSGL-1 binding to platelet P-selectin. In addition, P-selectin antagonism using rPSGL-Ig in conjunction with TPA has been shown to accelerate thrombolysis in a porcine model.³³ It has also been shown to possess both antithrombotic,⁴³ and fibrinolytic⁴⁴ properties in rat models where it likely interferes with fibrin accretion. Perhaps, such effects may have contributed to the reduction in thrombus formation at the site of injury. In addition, it has been recently demonstrated that platelet P-selectin could participate in the stabilization of platelet aggregate.⁴⁵ Perhaps this is another mechanism by which rPSGL-Ig, a P-selectin antagonist, diminishes platelet thrombus formation and, consequently, neutrophil recruitment to injured arterial sites.

At 4 weeks post-angioplasty, the level of platelet and neutrophil adhesion to injured arteries was similar to the levels observed 1 week post-injury. By this time, these injured arteries were completely reendothelialized in both control and rPSGL-Ig groups. Previous reports have indicated that reendothelialization following angioplasty in pig carotid arteries, as evaluated by immunohistochemistry using DBA lectin, can be largely achieved 21 days post-injury.⁴⁶ In our study, treatment with rPSGL-Ig still reduced, but not significantly, the adhesion of platelets and neutrophils to the neointima 4 weeks post-injury as compared to control. P-selectin expression was observed on the newly formed endothelium in both control and rPSGL-Ig-treated arteries (Figure 6), which suggests an ongoing pro-inflammatory state,⁴⁷ that continues to contribute to neutrophil and platelet adhesion. Four weeks following a single administration of rPSGL-Ig, its plasma concentration (around 2 $\mu\text{g/mL}$) may have been too low to efficiently block these reactions.

The early inhibition with rPSGL-Ig of platelet and neutrophil adhesion at the site of injury was associated with a subsequent 63% increase in vascular lumen in treated arteries as compared to untreated arteries 4 weeks post-injury (Table 2). In fact, while about 43% of control arterial segments could be considered restenotic (>50% stenosis), no rPSGL-Ig-treated arteries showed restenosis (Figure 4A). Restenosis in control arteries was related to both neointimal tissue production and negative remodeling of the arterial wall. The inhibition of restenosis in rPSGL-Ig-treated arteries was mainly related to positive remodeling, resulting from an adequate compensatory enlargement of the arterial wall. While constrictive remodeling was considered to be the main mechanism explaining the occurrence of restenosis in control arteries (normalized EEL surface <1), positive remodeling (normalized EEL surface = 1.5) was observed in all rPSGL-Ig-treated arteries. Furthermore, our results (Figure 5) revealed that the remodeling process occurred at least 1 week after angioplasty injury. These results are in agreement with

studies in experimental models^{4,5,7,48} and in humans^{49,50} which have suggested that remodeling may be more important than neointimal growth in the arterial response to angioplasty. Further studies are needed to assess more precisely, the mechanism through which rPSGL-Ig favors positive remodeling.

In conclusion, this study highlights the importance of platelet P-selectin binding to neutrophil PSGL-1 in platelet-neutrophil interactions at the sites of arterial injury produced by double angioplasty in swine. It indicates, too, that selectin antagonism using rPSGL-Ig reduced the thrombotic and inflammatory reactions and inhibited restenosis by favoring positive remodeling of the arterial wall, which represents a unique mechanism of action. Our findings at the cellular and pathophysiological levels add new insights to the significance of platelet binding to neutrophils in thrombogenesis and restenosis. They also provide a rationale for exploring the efficacy of P-selectin antagonism using rPSGL-Ig in the clinical management of restenosis.

Acknowledgements

We wish to thank Dr Martin Sirois for immunostaining and Nathalie Jacob and Dominique Lauzier for their excellent technical assistance.

References

1. Gottsauner-Wolf M, Moliterno DJ, Lincoff AM, Topol EJ. Restenosis - An open file. *Clin Cardiol.* 1996;19:347-356.
2. Fuster V, Falk E, Fallon JT, Badimon L, Chesebro JH, Badimon JJ. The three processes leading to post PTCA restenosis: dependence on the lesion substrate. *Thromb Haemost.* 1995;74:552-559.
3. Lafont A, Guzman LA, Whitlow PL, Goormastic M, Cornhill JF, Chisolm GM. Restenosis after experimental angioplasty. Intimal, medial, and adventitial changes associated with constrictive remodeling. *Circ Res.* 1995;76:996-1002.
4. Post MJ, Borst C, Kuntz RE. The relative importance of arterial remodeling compared with intimal hyperplasia in lumen renarrowing after balloon angioplasty. A study in the normal rabbit and the hypercholesterolemic yucatan micropig. *Circulation.* 1994;89:2816-2821.
5. Andersen HR, Maeng M, Thorwest M, Falk E. Remodeling rather than neointimal formation explains luminal narrowing after deep vessel wall injury. Insights from a porcine coronary (re)stenosis model. *Circulation.* 1996;93:1716-1724.
6. Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med.* 1994;330:1431-1438.
7. Kakuta T, Currier JW, Haudenschild CC, Ryan TJ, Faxon DP. Differences in compensatory vessel enlargement, not intimal formation, account for restenosis after angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit model. *Circulation.* 1994;89:2809-2815.
8. Schwartz RS, Topol EJ, Serruys PW, Sangiorgi G, Holmes DR. Artery size, neointima, and remodeling. Time for some standards. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32:2087-2094.

9. Steele PM, Chesebro JH, Stanson AW, Holmes Jr. DR, 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.
10. Merhi Y, L-Lacoste L, Lam JYT. Neutrophil implications in platelet deposition and vasoconstriction after deep arterial injury by angioplasty in pigs. *Circulation*. 1994;90:997-1002.
11. Merhi Y, Provost P, Guidoin R, Latour J-G. Importance of platelets in neutrophil adhesion and vasoconstriction after deep carotid arterial injury by angioplasty in pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:1185-1191.
12. Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, Holmes DR. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol*. 1992;19:267-274.
13. Le Breton H, Plow EF, Topol EJ. Role of platelets in restenosis after percutaneous coronary revascularization. *J Am Coll Cardiol*. 1996;28:1643-1651.
14. De Servi S, Mazzone A, Ricevuti G, Fioravanti A, Bramucci E, Angoli L, Stefano G, Specchia G. Granulocyte activation after coronary angioplasty in humans. *Circulation*. 1990;82:140-146.
15. Ikeda H, Nakayama H, Oda T, Kuwano K, Yamaga A, Ueno T, Yoh M, Hiyamuta K, Koga Y, Toshima H. Neutrophil activation after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J*. 1994;128:1091-1098.
16. Mickelson JK, Lakkis NM, Villarreal-Levy G, Hughes BJ, Smith CW. Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: a mechanism for recurrent disease? *J Am Coll Cardiol*. 1996;28:345-353.

17. Serrano CV, Ramires JAF, Venturinelli M, Arie S, D'Amico E, Zweier JL, Pileggi F, da Luz PL. Coronary angioplasty results in leukocyte and platelet activation with adhesion molecule expression. Evidence of inflammatory responses in coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol*. 1997;29:1276-1283.
18. Nash GB. Adhesion between neutrophils and platelets: a modulator of thrombotic and inflammatory events? *Thromb Res*. 1994;74 (suppl 1):S3-S11.
19. McEver RP, Cummings RD. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest*. 1997;100 (suppl 11):S97-S103.
20. Hamburger SA, McEver RP. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood*. 1990;75:550-554.
21. Kuijper PHM, Gallardo Torres HI, van der Linden JAM, Lammers J-WJ, Sixma JJ, Koenderman L, Zwaginga JJ. Platelet-dependent primary hemostasis promotes selectin- and integrin-mediated neutrophil adhesion to damaged endothelium under flow conditions. *Blood*. 1996;87:3271-3281.
22. de Gaetano G, Cerletti C, Evangelista V. Recent advances in platelet-polymorphonuclear leukocyte interaction. *Haemostasis*. 1999;29:41-49.
23. Buttrum SM, Hatton R, Nash GB. Selectin-mediated rolling of neutrophils on immobilized platelets. *Blood*. 1993;82:1165-1174.
24. Ostrovsky L, King AJ, Bond S, Mitchell D, Lorant DE, Zimmerman GA, Larsen R, Niu XF, Kubes P. A juxtacrine mechanism for neutrophil adhesion on platelets involves platelet-activating factor and a selectin-dependent activation process. *Blood*. 1998;91:3028-3036.

25. Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu Y-M, Sajer SA, Furie B. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated *in vivo* by P-selectin on adherent platelets. *Nature*. 1992;359:848-851.
26. Neumann F-J, Ott I, Gawaz M, Puchner G, Schömig A. Neutrophil and platelet activation at balloon-injured coronary artery plaque in patients undergoing angioplasty. *J Am Coll Cardiol*. 1996;27:819-824.
27. Ott I, Neumann F-J, Gawaz M, Schmitt M, Schömig A. Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation*. 1996;94:1239-1246.
28. Downing LJ, Wakefield TW, Strieter RM, Prince MR, Londy FJ, Fowlkes JB, Hulin MS, Kadell AM, Wilke CA, Brown SL, Wroblewski SK, Burdick MD, Anderson DC, Greenfield LJ. Anti P-selectin antibody decreases inflammation and thrombus formation in venous thrombosis. *J Vasc Surg*. 1997;25:816-828.
29. Lefer AM, Campbell B, Scalia R, Lefer DJ. Synergism between platelets and neutrophils in provoking cardiac dysfunction after ischemia and reperfusion. Role of selectins. *Circulation*. 1998;98:1322-1328.
30. Hayward R, Campbell B, Shin YK, Scalia R, Lefer AM. Recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand-1 protects against myocardial ischemic reperfusion injury in cats. *Cardiovasc Res*. 1999;41:65-76.
31. Barron MK, Scott Lake R, Buda AJ, Tenaglia AN. Intimal hyperplasia after balloon injury is attenuated by blocking selectins. *Circulation*. 1997;96:3587-3592.
32. Toombs CF, Degraaf GL, Martin JP, Geng JG, Anderson DC, Shebuski RJ. Pretreatment with a blocking monoclonal antibody to P-selectin accelerates pharmacological thrombolysis in a primate model of arterial thrombosis. *J Pharm Exp Ther*. 1995;275:941-949.

33. Kumar A, Villani MP, Patel UK, Keith Jr. JC, Schaub RG. Recombinant soluble form of PSGL-1 accelerates thrombolysis and prevents reocclusion in a porcine model. *Circulation*. 1999;99:1363-1369.
34. Merhi Y, Provost P, Chauvet P, Théorêt J-F, Phillips ML, Latour J-G. Selectin blockade reduces neutrophil interaction with platelets at the site of deep arterial injury by angioplasty in pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:372-377.
35. Merhi Y, Lam JYT, Lacoste LL, Latour J-G, Guidoin R, Waters D. Effects of thrombocytopenia and shear rate on neutrophil and platelet deposition on endothelial and medial arterial surfaces. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:951-957.
36. Provost P, Tremblay J, Merhi Y. The antiadhesive and antithrombotic effects of the nitric oxide donor SIN-1 are combined with a decreased vasoconstriction in a porcine model of balloon angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:1806-1812.
37. Kumar A, Hoover JL, Simmons CA, Lindner V, Shebuski RJ. Remodeling and neointimal formation in the carotid artery of normal and P-selectin-deficient mice. *Circulation*. 1997;96:4333-4342.
38. Roussel F, Dalion J. Lectins as markers of endothelial cells: comparative study between human and animal cells. *Lab Anim*. 1988;22:135-140.
39. Pärsson H, Cwikiel W, Johansson K, Swartbol P, Norgren L. Deposition of platelets and neutrophils in porcine iliac arteries after angioplasty and Wallstent placement compared with angioplasty alone. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 1994;17:190-196.
40. Yeo EL, Sheppard J-AI, Feuerstein IA. Role of P-selectin and leukocyte activation in polymorphonuclear cell adhesion to surface adherent activated platelets under physiologic shear conditions (an injury vessel wall model). *Blood*. 1994;83:2498-2507.

41. Inoue T, Sakai Y, Fujito T, Hoshi K, Hayashi T, Takayanagi K, Morooka S. Clinical significance of neutrophil adhesion molecules expression after coronary angioplasty on the development of restenosis. *Thromb Haemost.* 1998;79:54-58.
42. Caron A, Théorêt JF, Kumar A, Merhi Y. Effect of selectin blockade on porcine and human platelet-neutrophil binding. *FASEB J.* 1999; A838. Abstract.
43. Zhang H, Schaub RG, Khor SP, Keith JC, Kumar A. Anti-thrombotic effect of a recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand-1 chimera in a rat model of thrombosis. *Circulation.* 1999;100 (suppl I):I-471. Abstract.
44. Zhang H, Schaub RG, Keith JC, Kumar A. A recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand-1 chimera has a thrombolytic effect in a rat model of thrombosis. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35 (suppl A):280A. Abstract.
45. Merten M, Thiagarajan P. A novel mechanism of platelet aggregation: P-selectin determines size and stability of platelet aggregates. *Circulation.* 1999;100 (suppl I):I-611. Abstract.
46. Giddings JC, Banning AP, Ralis H, Lewis MJ. Redistribution of von Willebrand factor in porcine carotid arteries after balloon angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1872-1878.
47. Johnson-Tidey RR, McGregor JL, Taylor PR, Poston RN. Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques. Coexpression with intercellular adhesion molecule-1. *Am J Pathol.* 1994;144:952-961.
48. Lafont A, Durand E, Samuel JL, Besse B, Addad F, Lévy BI, Desnos M, Guérot C, Boulanger CM. Endothelial dysfunction and collagen accumulation. Two independent factors for restenosis and constrictive remodeling after experimental angioplasty. *Circulation.* 1999;100:1109-1115.

49. Sangiorgi G, Taylor AJ, Farb A, Carter AJ, Edwards WD, Holmes DR, Schwartz RS, Virmani R. Histopathology of percutaneous transluminal coronary angioplasty remodeling in human coronary arteries. *Am Heart J.* 1999;138:681-687.
50. Mintz GS, Popma JJ, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Wong SC, Hong MK, Kovach JA, Leon MB. Arterial remodeling after coronary angioplasty. A serial intravascular ultrasound study. *Circulation.* 1996;94:35-43.

Figure Legends

- Figure 1. Schematic presentation of the experimental design. Hematological and hemodynamic parameters and angiographic measurements (⊕). Injection of ^{51}Cr -platelets and ^{111}In -neutrophils (☆).
- Figure 2. Platelet adhesion to deeply injured arterial segments in control and rPSGL-Ig-treated animals during 1 and 4 hours (A) and at 1 and 4 weeks (B). * $P < 0.05$ versus control.
- Figure 3. Neutrophil adhesion to deeply injured arterial segments in control and rPSGL-Ig-treated animals during 1 and 4 hours (A) and at 1 and 4 weeks (B). * $P < 0.05$ versus control.
- Figure 4. Correlation between vascular stenosis and (A) normalized external elastic lamina (EEL) surface values, and (B) neointimal surface 4 weeks after the second angioplasty.
- Figure 5. Normalized external elastic lamina (EEL) surface values (A) and residual lumen values (B), 1 week and 4 weeks after the second angioplasty.
#: $P < 0.000$ versus control; *: $P < 0.05$ versus 1 week.
- Figure 6. Representative histological sections ($\times 25$) and immunostaining ($\times 500$) of endothelial lectin and P-selectin 4 weeks after the second angioplasty in control (A, B, C) and rPSGL-Ig-treated (D, E, F) arteries. n: neointima.

TABLE 1. Characteristics of the Arteries in Control and rPSGL-Ig-Treated Animals at 1 Hour, 4 Hours, 1 Week or 4 Weeks After the Second Angioplasty

	1 Hour		4 Hours		1 Week		4 Weeks	
	Vehicle	rPSGL-Ig	Vehicle	rPSGL-Ig	Vehicle	rPSGL-Ig	Vehicle	rPSGL-Ig
Animals (n)	8	4	6	5	4	3	5	5
Redilated arteries (n)	12 (16)	8 (8)	12 (12)	10 (10)	7 (8)	6 (6)	9 (10)	10 (10)
Occluded arteries at sacrifice (n)	0	0	1	0	1	0	1	0
Balloon/artery ratio	1.3±0.07	1.3±0.06	1.4±0.06	1.3±0.04	1.1±0.04	1.1±0.03	1.3±0.04	1.3±0.04
Deeply injured segments (%)	39	47	57	50	65	50	66	70
Fracture/IEL length (%)	18.1±2.4	23.5±2.4	29.7±1.0	26.2±1.7	18.9±2.2	19.4±2.5	45.3±3.5	42.6±4.2

IEL indicates internal elastic lamina.

TABLE 2. Histomorphological Data in Deeply Injured Segments 4 Weeks After the Second Angioplasty in Control and rPSGL-Ig-Treated Animals

	Vehicle	rPSGL-Ig	P value
No. examined injured segments	21	28	
EEL surface (mm ²)	6.93±0.60	10.55 ± 0.85	0.002
<i>Normalized</i>	0.96±0.05	1.51±0.10	0.000
EEL length (mm)	9.38±0.40	11.57±0.44	0.000
<i>Normalized</i>	0.98±0.03	1.18±0.03	0.000
IEL surface (mm ²)	4.54±0.06	6.60±0.60	0.005
<i>Normalized</i>	0.86±0.08	1.34±0.09	0.000
IEL length (mm)	7.49±0.05	9.18±0.04	0.000
<i>Normalized</i>	0.91±0.04	1.10±0.03	0.000
Vascular lumen (mm ²)	3.84±0.06	6.08±0.58	0.002
<i>Normalized</i>	0.71±0.09	1.22±0.08	0.000
% Vascular stenosis	29.2±9.5	-21.6±8.5	0.000
Neointimal surface (mm ²)	0.70±0.09	0.52±0.09	NS

EEL indicates external elastic lamina; IEL, internal elastic lamina.

Figure 1

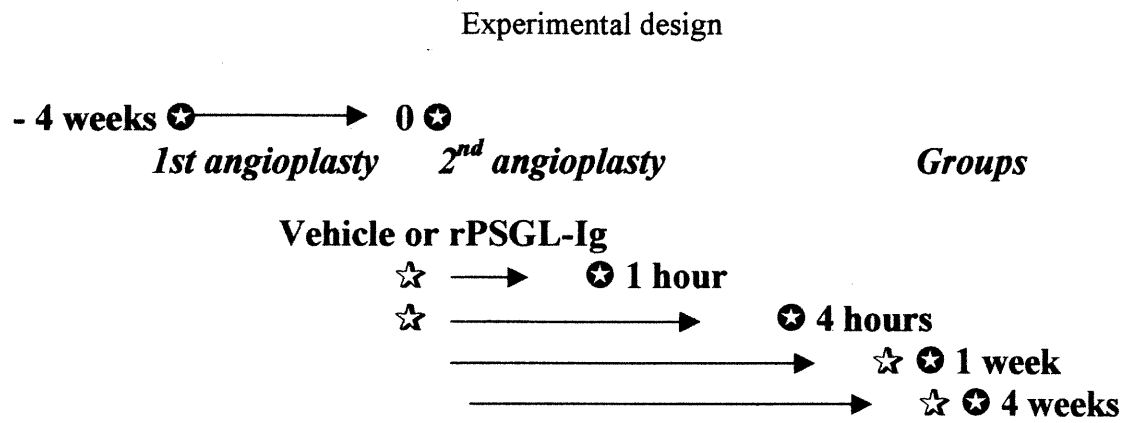


Figure 2

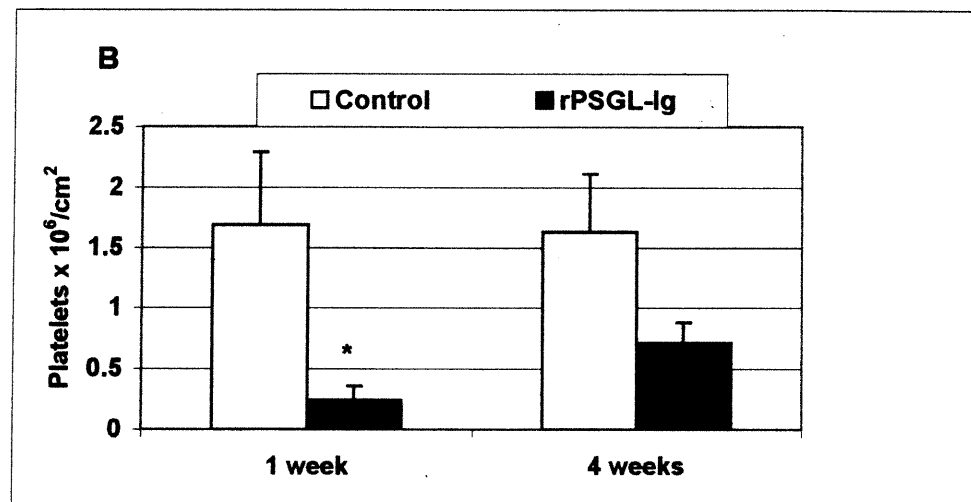
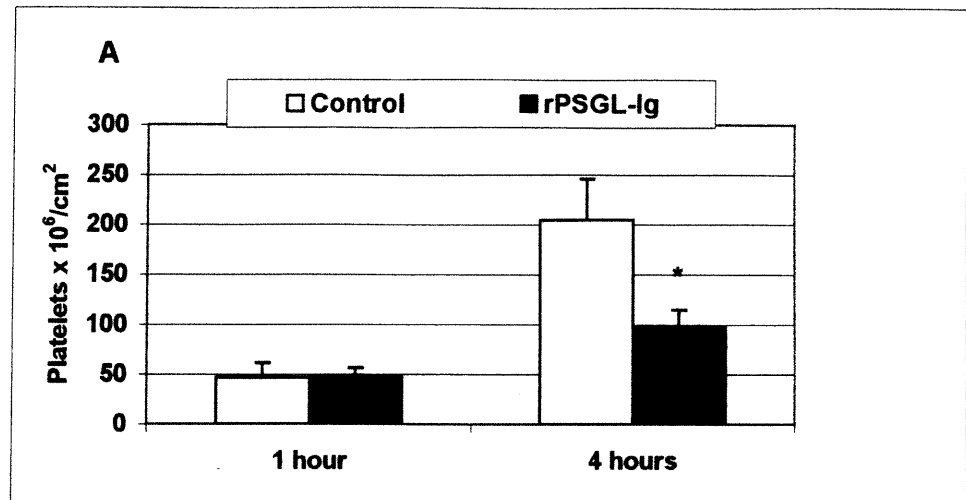


Figure 3

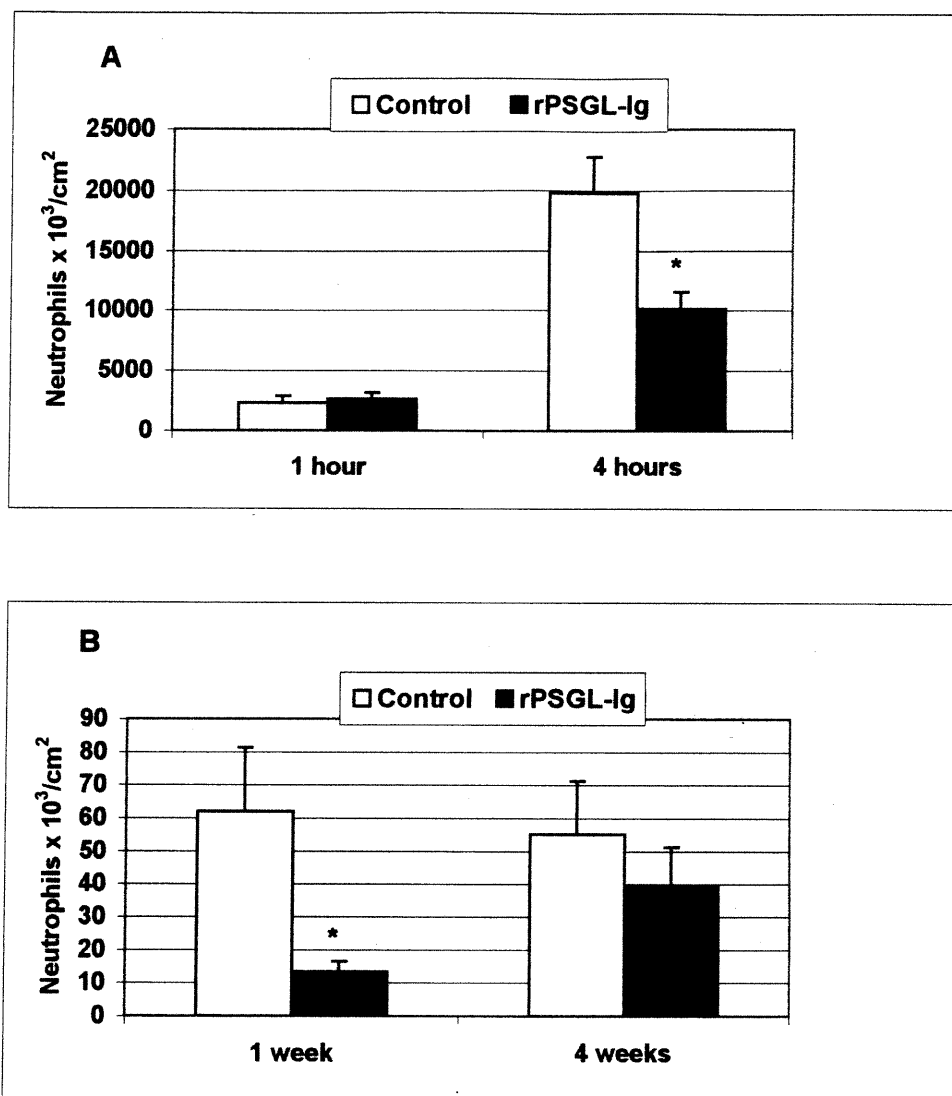
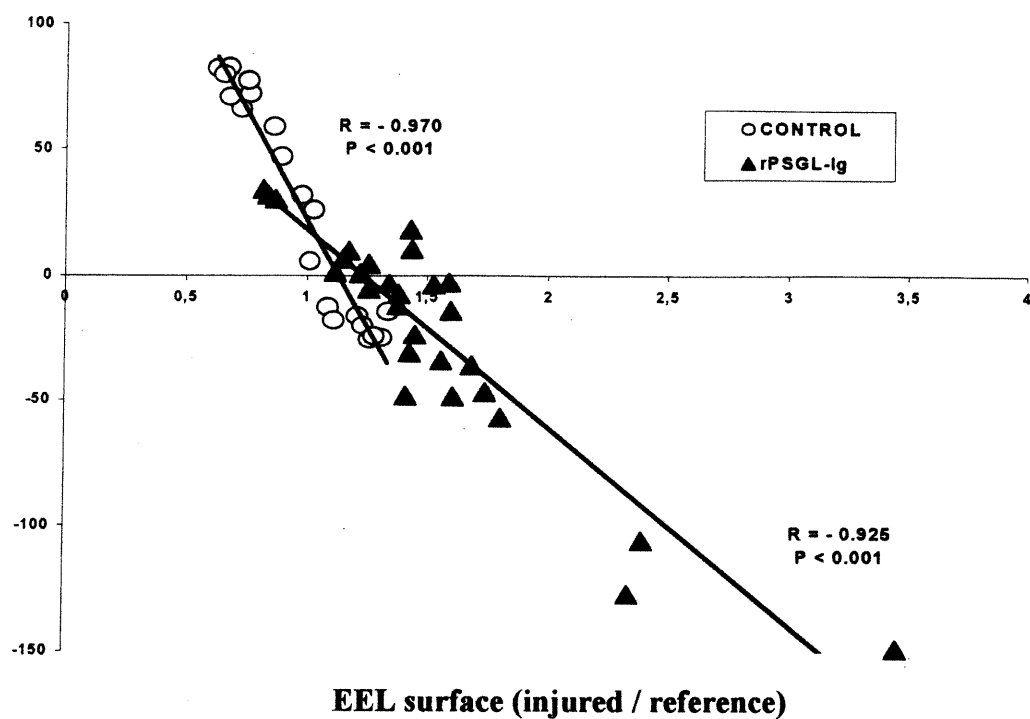


Figure 4

A Vascular stenosis (%)



B Vascular stenosis (%)

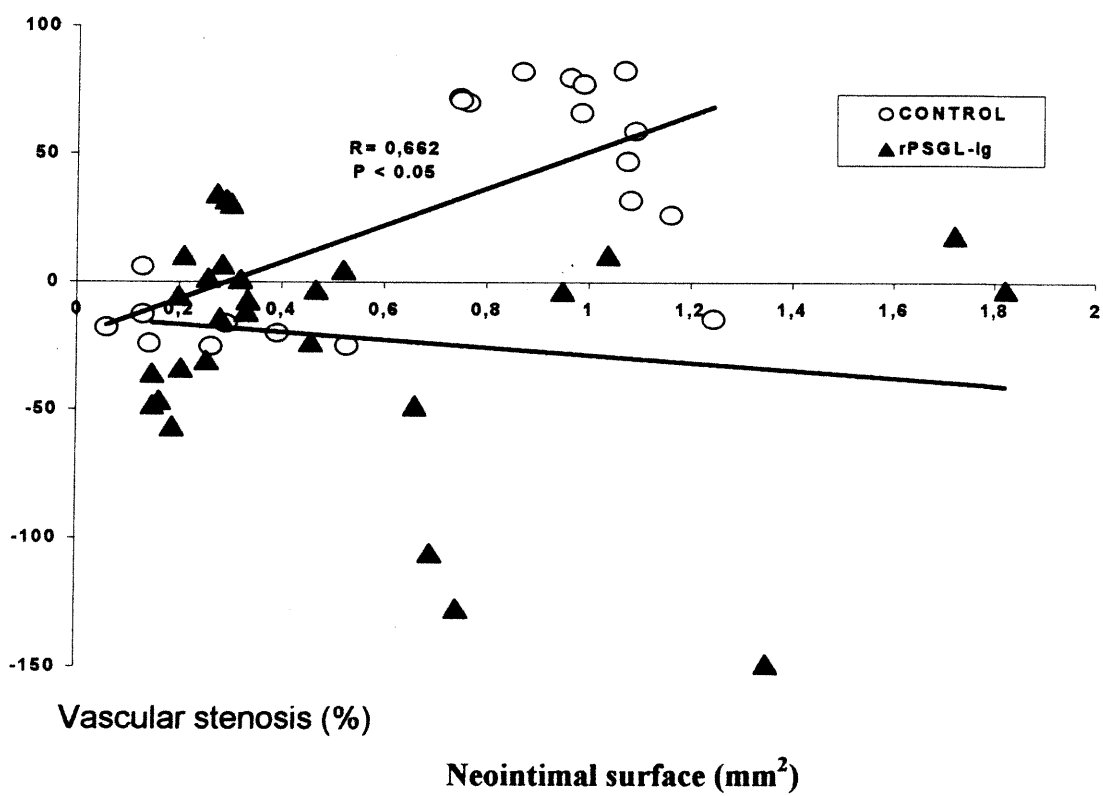


Figure 5

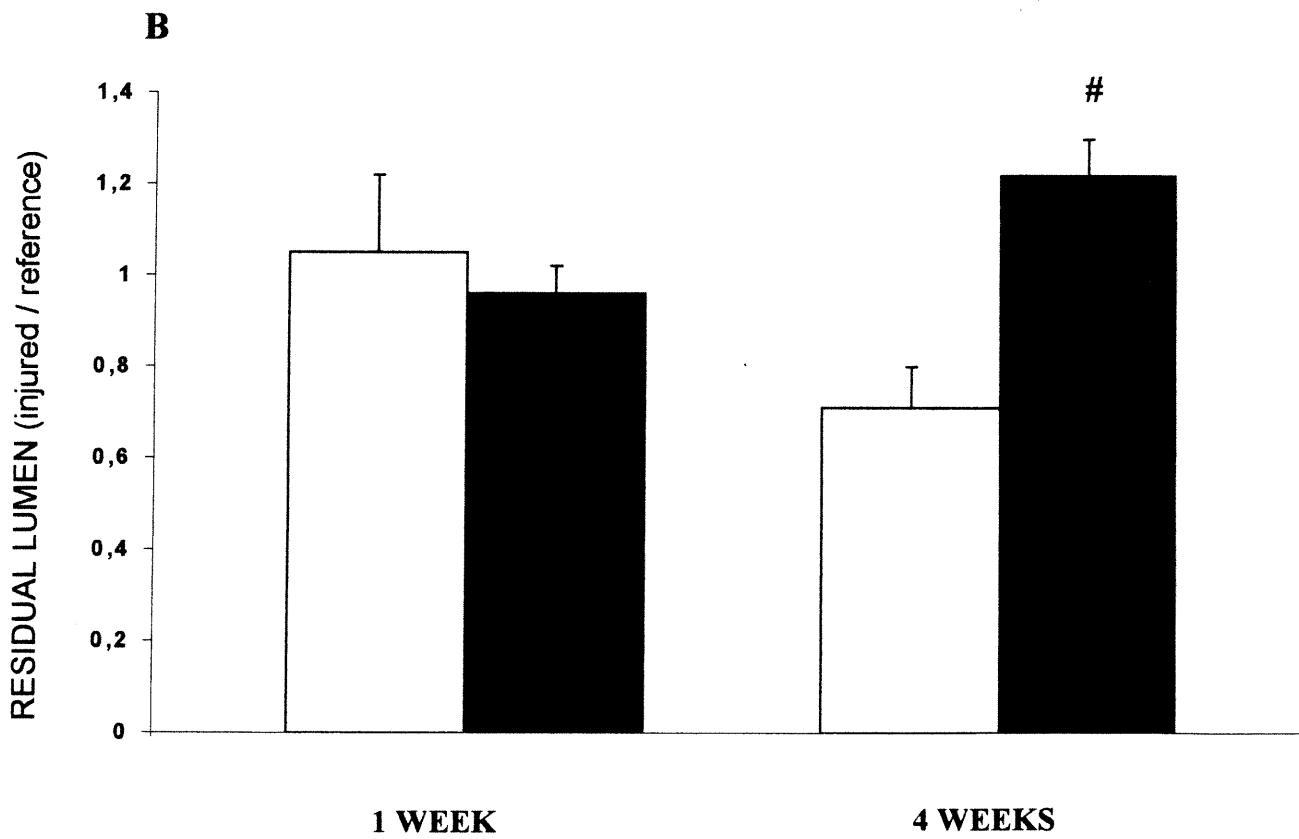
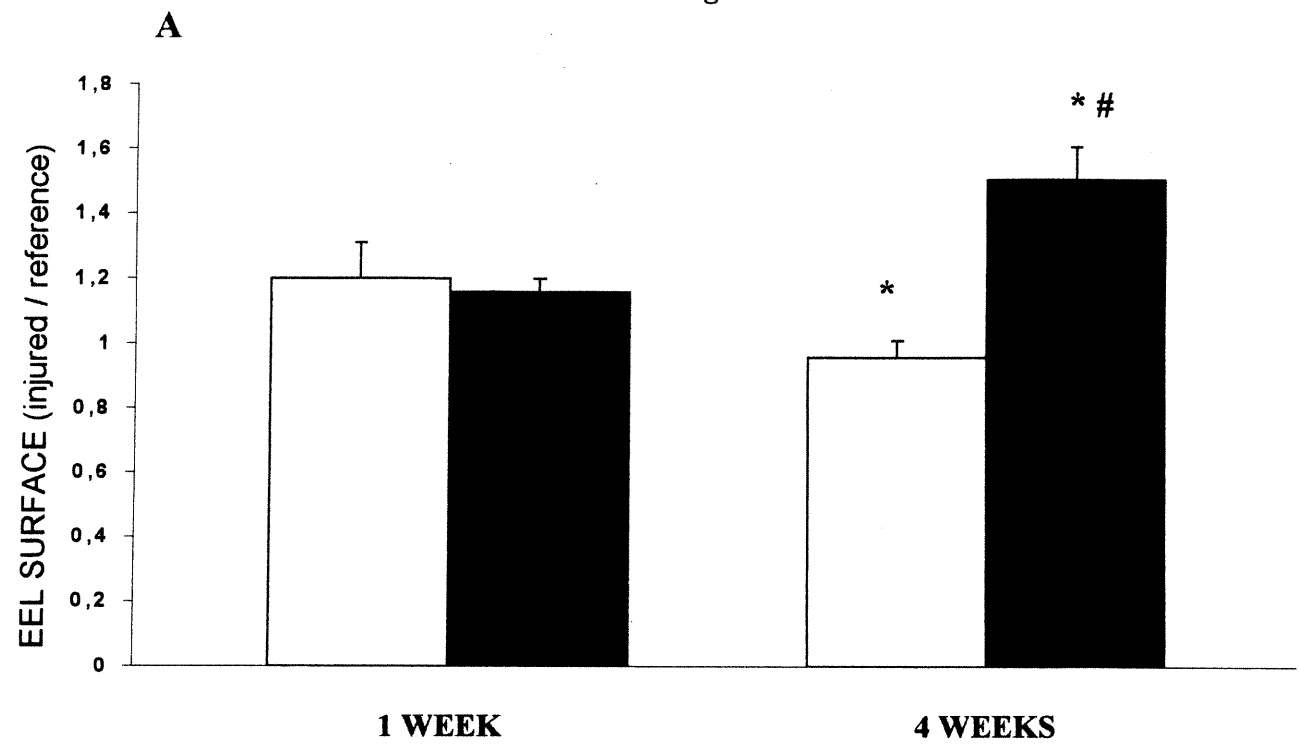
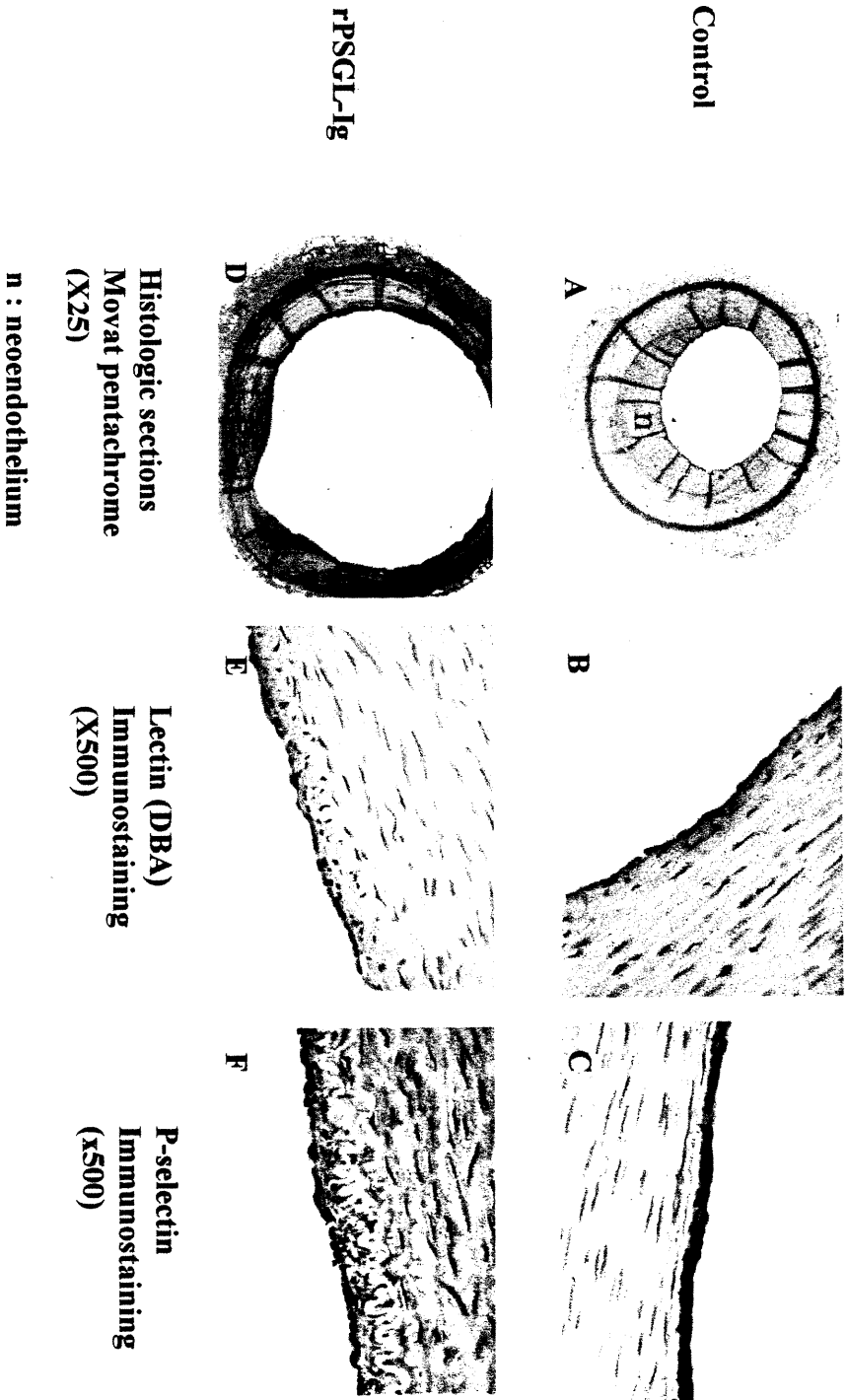


FIGURE 6



DISCUSSION

L'angioplastie par ballonnet représente une alternative très utilisée à la chirurgie cardiaque lors d'occlusion coronaire. Cette procédure entraîne toutefois des lésions vasculaires profondes se traduisant par la formation d'un thrombus intramural et intraluminal avec afflux de cellules inflammatoires et présence d'un vasospasme proximal et distal à la région dilatée. Suite à l'exposition du tissu sous-endothélial et de la média artérielle, des plaquettes et des neutrophiles vont adhérer à la paroi artérielle endommagée, potentialisant la réponse artérielle. L'adhésion des plaquettes et des neutrophiles est fonction du degré de dommage causé par l'angioplastie.^{96,97} L'adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale est principalement dépendante des intégrines⁶⁶⁴ avec activation, sécrétion et agrégation plaquettaire subséquente et activation concomitante de la cascade de la coagulation se traduisant par la formation de thrombine et de fibrine et la formation d'un thrombus riche en plaquettes.^{102,161,438,664} Les plaquettes vont relâcher une foule de médiateurs dont TxA₂, ADP, fibrinogène, sérotonine et PDGF qui vont potentialiser l'activation plaquettaire, favoriser le développement du thrombus et l'apparition d'un vasospasme. L'activation plaquettaire se traduit aussi par l'expression et/ou activation de molécules d'adhésion à la surface des plaquettes, comme la P-sélectine contenue dans les granules α et l'intégrine GpIIb/IIIa, favorisant l'agrégation plaquettaire et la formation du thrombus.

La surface endommagée est également rapidement envahie par des leucocytes, particulièrement des neutrophiles. Bien que les neutrophiles puissent adhérer à la matrice sous-endothéliale de façon indépendante des plaquettes,^{467,471} l'adhésion des neutrophiles à la paroi artérielle endommagée est principalement dépendante des plaquettes recouvrant la matrice extracellulaire.^{97,101,600,708} Les plaquettes supportent l'adhésion des neutrophiles de façon concentration-dépendante.^{97,98} L'adhésion des neutrophiles aux plaquettes activées implique le sLe^x, la L-sélectine et principalement le PSGL-1 des neutrophiles en liaison avec la P-sélectine plaquettaire.^{554,709,710} Ces interactions entre les neutrophiles et les plaquettes ralentissent le neutrophile et induisent son activation permettant son adhésion ferme via une intégrine β_2 (probablement Mac-1),⁴⁴² pouvant se lier à l'intégrine GpIIb/IIIa plaquettaire via un pont de fibrinogène.

459,711 Les neutrophiles, qui sont activés suite à l'angioplastie, 58,92,93,95 relâchent divers médiateurs comme des RLO, des enzymes protéolytiques, comme la cathepsine G et l'élastase et des dérivés de l'acide arachidonique qui vont influencer le tonus vasculaire et moduler la réactivité des plaquettes. 101-103,560

En plus de ces interactions au site d'un dommage vasculaire, la formation de conjugués hétérotypiques circulants plaquettes-neutrophiles a été rapportée chez des patients après une angioplastie coronarienne, infarctus du myocarde ou chez des patients souffrant d'angine. 54,58,59,89,93,94,712

Ces interactions sont favorisées par la formation d'un micro-environnement 426,428 protégeant les protéases des neutrophiles des antiprotéases plasmatiques et favorisant également le métabolisme transcellulaire des dérivés de l'acide arachidonique. 426 L'interaction adhésive entre les plaquettes et les neutrophiles est dépendante principalement de la P-sélectine plaquettaire liant le PSGL-1 à la surface des neutrophiles. Cette liaison entraîne l'activation du neutrophile, 560 activation potentialisée par la présence de PAF à la surface des plaquettes, 458 via une phosphorylation de résidus tyrosine sur des protéines et un changement de conformation et augmentation de l'expression de Mac-1, stabilisant l'adhésion des neutrophiles aux plaquettes. 442

L'importance de la P-sélectine dans les interactions plaquettes-leucocytes a été démontrée dans plusieurs modèles d'endommagement vasculaire *in vitro* 100,600, de thrombose *in vivo* 182 et récemment dans un modèle expérimental d'angioplastie. 684

La fucoïdine, analogue du sLe^x, est un bloqueur des sélectines qui a été utilisé dans de nombreuses études expérimentales ayant trait principalement au mécanisme du roulement des leucocytes sur l'endothélium. 686 En effet, plusieurs études *in vitro* ont démontrées que la fucoïdine pouvait bloquer la L- et la P-sélectine. 659,686,713 Bien que ce composé a démontré des effets bénéfiques *in vivo* dans des modèles d'ischémie-reperfusion 646,691,692 et d'inflammation, 693,694 son utilisation dans un modèle de dommage vasculaire par angioplastie n'a pas été rapportée à ce jour. Étant donné l'importance des interactions plaquettes-neutrophiles et des sélectines dans les événements aigus post-angioplastie, nous avons voulu vérifier l'impact de l'utilisation de la fucoïdine sur les

interactions plaquettes-neutrophiles dans un modèle d'angioplastie carotidienne chez le porc.

Dans cette étude, nous avons confirmé que l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles était fonction de la sévérité du dommage artériel causé par l'angioplastie. Nous avons observé, dans des expériences *in vitro* en chambre de perfusion une augmentation, suite à la présence d'une suspension mixte de cellules, de l'adhésion de plaquettes et de neutrophiles à la paroi artérielle endommagée, suggérant une coopération entre les plaquettes et les neutrophiles au site d'un dommage vasculaire. Nous avons aussi démontré que l'utilisation de fucoïdine (5 mg/kg) se traduisait *in vivo* par une réduction importante de l'adhésion des plaquettes (73%) et des neutrophiles (84%) à la paroi artérielle sévèrement endommagée de même que de la vasoconstriction distale (51%). La fucoïdine pourrait diminuer le recrutement des plaquettes via des interactions avec la matrice extracellulaire, comme la laminine,⁷¹⁴ la fibronectine⁷¹⁵ et la thrombospondine⁷¹⁴ ou en interférant avec l'agrégation plaquettaire.^{686,714} La réduction de l'adhésion des neutrophiles est probablement consécutive au blocage des interactions plaquettes-neutrophiles médiées par les sélectines. En effet, *in vitro*, la fucoïdine inhiba complètement l'augmentation de l'adhésion des neutrophiles observée en présence de plaquettes, soulignant l'importance des plaquettes dans le recrutement des neutrophiles après dommage vasculaire, phénomène également observé *in vivo*.^{97,98} Toutefois, on ne peut totalement exclure que la fucoïdine, par le biais de liaisons avec certains éléments de la matrice extracellulaire, interfère avec l'adhésion des neutrophiles à la matrice extracellulaire, la fucoïdine *in vitro* ayant partiellement réduit, en l'absence de plaquettes, l'adhésion des neutrophiles à la paroi artérielle endommagée.

Cette étude a donc permis de confirmer l'importance des interactions plaquettes-neutrophiles et des sélectines après dommage vasculaire par angioplastie. Cependant, cette étude, ainsi que la majorité des études expérimentales de dommage vasculaire utilisent des artères saines. L'angioplastie est pratiquée en clinique dans des vaisseaux démontrant une occlusion vasculaire, principalement suite à la présence d'une plaque athérosclérotique. Le dommage causé par l'angioplastie expose donc un tissu néointimal composé de cellules musculaires lisses, de leucocytes et de lipides dans une matrice extracellulaire plus ou moins riche en protéoglycans et collagène. Les réactions et interactions cellulaires pourraient donc être différentes dans cet environnement qui se distingue du contexte

expérimental usuel. ^{223,325,716} Dans le but de se rapprocher de la situation clinique, nous avons donc développé un modèle chronique de dommage répété par angioplastie carotidienne où une seconde angioplastie est pratiquée 1 mois après la première angioplastie. Ce modèle nous permet d'étudier les interactions plaquettes-neutrophiles après angioplastie d'une artère présentant un tissu néointimal formé suite à l'angioplastie initiale. Dans cette étude, nous avons comparé les interactions des plaquettes et des neutrophiles suite à l'angioplastie d'artères saines et d'artères endommagées par une angioplastie préalable. Nous avons également étudié la formation du néointima et l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles 1 mois après angioplastie d'artères saines. Tout comme après angioplastie d'artères saines (modèle aigu), l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles à la paroi artérielle endommagée immédiatement (1 hre) après angioplastie répétée (modèle chronique) était fonction de la sévérité du dommage causé. Alors que le niveau de l'adhésion plaquettaire était similaire entre les deux modèles, une adhésion accrue de neutrophiles fut observée après angioplastie répétée. Plusieurs études ont souligné l'importance des plaquettes dans le recrutement des neutrophiles via un mécanisme médié par des sélectines. ^{97,456,458,599,600,684,717} L'adhésion neutrophilique accrue sur le néointima, en l'absence d'une adhésion des plaquettes, suggère qu'un mécanisme indépendant des plaquettes est également impliqué. Le néointima formé suite à la première angioplastie, contrairement à la paroi artérielle normale, est riche en collagène et en fibronectine, éléments de la matrice extracellulaire auxquels le neutrophile peut adhérer via ses intégrines β_1 et β_2 . Cette différence de substrat adhésif combinée à la présence de leucocytes, de cytokines et de facteurs chémoattractants dans le néointima pourrait amener une plus grande activation des neutrophiles et leur adhésion aux sites vasculaires endommagés. Une activation accrue des neutrophiles, telle qu'évaluée par l'expression de Mac-1 via analyse de cytométrie en flux, est rapportée chez des patients après angioplastie et serait associée à une incidence plus élevée de resténose. ^{191,718} Une réduction de la formation du tissu néointimal fut observée dans un modèle expérimental d'angioplastie ¹⁸⁹ et dans un modèle de dommage vasculaire et de sténose, ³²⁹ suite à l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre une intégrine β_2 des leucocytes (Mac-1). Un résultat similaire fut également obtenu dans un modèle expérimental de dommage artériel chez des souris déficiente en Mac-1. ⁷¹⁹

Tel qu'évalué 1 mois après angioplastie, l'adhésion des neutrophiles au néointima était significativement plus importante sur des artères sévèrement endommagées que sur des artères intactes ou légèrement endommagées. Un dommage sévère était aussi associé à un néointima plus abondant et à une sténose plus importante de la lumière vasculaire. Un mois après angioplastie, la réendothélialisation du néointima était largement complétée, en accord avec des études précédentes démontrant que la réendothélialisation est essentiellement complétée 21 jours après angioplastie d'artères carotidiennes porcines.^{400,720} Alors que la P-sélectine est peu ou pas exprimée par l'endothélium d'artères carotidiennes porcines saines, nous avons noté son expression à la surface du néoendothélium 1 mois après l'angioplastie. L'expression de P-sélectine a d'ailleurs été rapportée par l'endothélium recouvrant les plaques athérosclérotiques d'artères coronaires humaines.⁷²¹ Ces résultats suggèrent que le néointima et/ou le néoendothélium démontre(nt) une adhésion et/ou attraction accrue(s) pour les neutrophiles.

Nous avons donc démontré par cette étude que l'angioplastie par ballonnet d'un néointima, formé à la suite d'une angioplastie préalable, se traduisait par une adhésion accrue de neutrophiles, mais non de plaquettes aux sites vasculaires endommagés. Toutefois, ces résultats demeurent une évaluation de la situation immédiatement après l'angioplastie. Il serait intéressant d'étudier l'évolution temporelle de l'adhésion des neutrophiles et des plaquettes dans ce modèle d'angioplastie carotidienne répétée. Ce modèle nous offre également la possibilité d'étudier la resténose et non une simple sténose. Nous avons donc choisi d'étudier 1 mois après angioplastie répétée la présence de resténose. La resténose est la principale complication chronique de l'angioplastie coronaire; elle est également observée dans des artères périphériques, comme l'artère carotidienne.^{722,723} Alors que la présence d'un tissu néointimal était considéré jusqu'à récemment comme la principale raison de la diminution de la lumière vasculaire, le remodelage vasculaire est maintenant reconnu comme déterminant dans la resténose post-angioplastie. Le remodelage est principalement évalué par la quantification de la surface totale de l'artère. Les mécanismes régissant le remodelage sont peu définis.

De façon à évaluer l'impact des sélectines, principalement de la P-sélectine et des interactions plaquettes-neutrophiles dans les événements chroniques post-angioplastie, nous avons utilisé le rPSGL-Ig. Le rPSGL-Ig est une forme soluble recombinante chimérique du PSGL-1, le ligand leucocytaire de haute affinité de la P-sélectine. Le

rPSGL-Ig est un inhibiteur dix fois plus puissant de la P-sélectine que de la E- ou la L-sélectine. (Anjali Kumar, observation non publiée, 1998) Dans des expériences *in vitro*, nous avons démontré que l'activation des plaquettes par la thrombine, en condition statique, et par le passage sur une surface artérielle endommagée pendant 15 minutes en chambre de perfusion, se traduisait par l'expression de P-sélectine et par la formation de conjugués hétérotypiques plaquettes-neutrophiles, tel qu'évalué par cytométrie en flux. L'ajout d'un anticorps monoclonal anti PSGL-1 ou de rPSGL-Ig, en condition statique comme en chambre de perfusion, inhiba les interactions plaquettes-neutrophiles. La spécificité de la liaison rPSGL-Ig-Psélectine fut démontrée par son inhabilité à lier des plaquettes non activées. De plus, l'augmentation de la liaison du rPSGL-Ig aux plaquettes activées était associée à une augmentation de l'inhibition des conjugués plaquettes-neutrophiles. Ces résultats soulignent l'importance du PSGL-1 dans l'adhésion des neutrophiles à la P-sélectine plaquettaire en condition de flot et l'efficacité du rPSGL-Ig à inhiber les interactions plaquettes-neutrophiles.

Peu d'études expérimentales de la resténose (et non de sténose) se sont attardées au rôle des sélectines et des interactions plaquettes-neutrophiles dans le développement de la resténose post-angioplastie. L'utilisation d'un analogue du sLe^x a déjà été rapporté comme pouvant diminuer la production du néointima dans un modèle de sténose après angioplastie carotidienne chez le lapin.¹⁹⁰ A notre connaissance, le bénéfice potentiel du rPSGL-Ig dans un modèle expérimental de resténose post-angioplastie n'a pas été exploré à ce jour. Contrairement aux analogues du sLe^x, comme la fucoïdine, le rPSGL-Ig est beaucoup plus spécifique pour la P-sélectine. De plus, sa demie-vie prolongée chez le porc (environ 10 jours) en facilite grandement l'utilisation dans un modèle *in vivo*. Le rPSGL-Ig ayant diminué l'infiltration des neutrophiles et le dommage tissulaire dans des modèles d'ischémie-reperfusion^{683,704,705} et basé sur nos résultats *in vitro*, il était permis de croire que l'administration de rPSGL-Ig pourrait réduire les interactions plaquettes-neutrophiles après angioplastie, contribuant à diminuer la resténose. Nous avons donc évalué l'impact de l'administration du rPSGL-Ig non seulement sur les interactions plaquettes-neutrophiles à divers temps suite à l'angioplastie d'artères carotidiennes préalablement endommagées, mais aussi sur le développement de resténose, 1 mois plus tard.

Une heure après la deuxième angioplastie, le niveau de l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles à la paroi artérielle était similaire au niveau noté dans l'étude *in vivo* précédente. L'administration de rPSGL-Ig (1 mg/kg) avant la deuxième angioplastie n'a pas influencée l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles à la paroi artérielle endommagée 1 heure après la seconde angioplastie. Une augmentation substantielle de l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles à la paroi artérielle endommagée sévèrement avec formation d'un thrombus mural de taille variable a été notée 4 heures après la seconde angioplastie. Ces observations corroborent des résultats publiés antérieurement par Pärsson et coll. qui démontrent que l'accumulation des plaquettes et des neutrophiles à la paroi artérielle endommagée est surtout importante dans les premières heures suivant l'angioplastie.²⁰⁹ L'utilisation du rPSGL-Ig nous a permis de réduire de près de 50% la présence de plaquettes et de neutrophiles dans les segments artériels sévèrement endommagés. Étant donné qu'une proportion importante de l'adhésion des neutrophiles à la paroi artérielle endommagée est dépendante des plaquettes, une inhibition des interactions plaquettes-neutrophiles par le rPSGL-Ig pourrait certainement expliquer la réduction du nombre de neutrophiles 4 heures post-angioplastie répétée. Un effet profibrinolytique du rPSGL-Ig a récemment été rapporté,^{702,707} accélérant la thrombolyse dans un modèle de thrombose chez le rat et le porc. De plus, des études récentes suggèrent que la P-sélectine participe à la stabilisation et à la propagation du thrombus.⁷²⁴ Ces résultats, ainsi qu'une diminution de l'activation des plaquettes suite à une réduction des interactions plaquettes-neutrophiles, pourraient expliquer la réduction du nombre de plaquettes observées 4 heures après angioplastie répétée.

A une semaine après la seconde angioplastie, l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles à la paroi artérielle endommagée était grandement diminuée. Toutefois, même à ce niveau restreint d'adhésion, l'administration de rPSGL-Ig, avant la seconde angioplastie, se traduit par une réduction de l'adhésion plaquettaire et neutrophilique. Tel que rapporté dans des études précédentes, la réendothélialisation suite à l'angioplastie d'une artère carotidienne est déjà apparente 7 jours suivant un dommage sévère.^{85,400} Nous avons noté, par microscopie électronique à balayage, une réendothélialisation partielle des segments artériels sévèrement endommagés 1 semaine après la seconde angioplastie. (observations nonpubliées, 1999) Une étude récente suggère que la P-sélectine peut se lier avec la GpIb-IX-V des plaquettes, participant au roulement des

plaquettes sur l'endothélium.⁷²⁵ Étant donné la demie-vie prolongée du rPSGL-Ig, il est possible que la réduction de l'adhésion des neutrophiles observée une semaine après l'administration du composé soit consécutive au blocage de la liaison entre la P-sélectine endothéliale et le PSGL-1 des neutrophiles. Quant à la réduction de l'adhésion des plaquettes, en plus des éléments de réponse mentionnés précédemment pour expliquer l'effet du rPSGL-Ig sur l'adhésion plaquettaire, il est possible que le rPSGL-Ig interfère avec le roulement des plaquettes sur l'endothélium, contribuant à diminuer le recrutement de plaquettes. Toutefois, cette dernière possibilité reste à démontrer.

Quatre semaines après angioplastie répétée, l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles était d'un niveau similaire à celui observé 1 semaine après la seconde angioplastie. Alors que la réendothélialisation était pratiquement complétée et que ce néoendothélium exprimait de la P-sélectine à sa surface, l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles 4 semaines après l'angioplastie répétée était comparable avec ou sans administration préalable de rPSGL-Ig. Étant donné sa demie-vie d'environ 10 jours chez le porc, un niveau plasmatique insuffisant de rPSGL-Ig pourrait expliquer, du moins partiellement, cette absence d'effet bénéfique 4 semaines après angioplastie répétée.

La resténose demeure la complication chronique majeure de l'angioplastie, le remodelage vasculaire serait largement responsable de l'apparition de resténose post-angioplastie.^{289,290,293,294,296-298,315,726} Le remodelage reflète un changement chronique, une adaptation du vaisseau à des changements hémodynamiques et à la présence d'un néointima. Les mécanismes précis régissant le développement du remodelage sont mal connus, mais les processus de croissance, de migration et de mort cellulaire de même que de production et de dégradation de la matrice extracellulaire sont potentiellement impliqués.²⁹⁸ Alors que quatre semaines après angioplastie, la resténose, définie comme une sténose supérieure à 50% de la lumière vasculaire par rapport à un segment de référence, était présente dans environ 40% des contrôles, aucun animal traité avec le rPSGL-Ig ne démontrait de resténose. En fait, l'utilisation de rPSGL-Ig se traduit par une augmentation d'environ 60% de la lumière vasculaire par rapport aux animaux contrôles. Tel que suggéré par l'absence de corrélation entre la surface du néointima et la sténose vasculaire, à la fois la présence de resténose chez les contrôles et son absence chez les animaux traités n'étaient pas reliées à la présence d'un néointima. De plus, la surface néointimale était similaire entre les animaux traités ou non avec le rPSGL-Ig. Par contre,

un remodelage négatif, tel que défini par une diminution de la surface totale de sections transversales de l'artère (EEL) et par un index de constriction (surface de EEL/surface de EEL d'un segment de référence) inférieur à 1, fut noté chez les artères contrôles resténotiques. Le développement d'une fibrose adventitielle avec constriction de l'artère a été proposé comme mécanisme pouvant expliquer le remodelage négatif.²⁷² Cependant, l'utilisation du rPSGL-Ig se traduit par un remodelage positif (index de constriction supérieur à 1), empêchant l'apparition de resténose. Le ou les mécanisme(s) par le(s)quel(s) le rPSGL-Ig favorise(nt) un remodelage positif demeure(nt) à préciser.

Ces résultats sont particulièrement intéressants dans la mesure où ils démontrent qu'une simple injection intraveineuse de rPSGL-Ig administrée avant l'angioplastie peut prévenir le développement de la resténose post-angioplastie. Deuxièmement, ils suggèrent aussi qu'une diminution des plaquettes et des neutrophiles aux sites d'un dommage vasculaire, suite à l'utilisation d'un bloqueur de la liaison P-sélectine-PSGL-1, favorise le remodelage positif, suggérant une avenue de recherche possible pour élucider la pathogénie de la resténose et du remodelage vasculaire post-angioplastie. Toutefois, c'est avec circonspection qu'on doit extrapoler ces résultats en clinique. En effet, il demeure à vérifier si le bénéfice du rPSGL-Ig est maintenu plusieurs mois après angioplastie répétée et si cet effet est également observé dans d'autres modèles expérimentaux d'angioplastie, notamment suite à l'angioplastie d'artères coronaires porcines. Néanmoins, il demeure que nous avons démontré qu'un bloqueur spécifique de la P-sélectine pouvait amener une réduction substantielle de l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles ainsi que de la resténose post-angioplastie, suggérant que la P-sélectine est importante non seulement dans les interactions plaquettes-neutrophiles mais également dans la pathophysiologie de la resténose.

BIBLIOGRAPHIE

1. Traub O, Berk BC. Laminar shear stress; mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:677-685.
2. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993;362:801-809.
3. Fuster V. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation.* 1994;90:2126-2146.
4. Richardson PD, Davies MJ, Born GVR. Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. *Lancet.* 1989;2:941-944.
5. Libby P. Molecular bases of acute coronary syndromes. *Circulation.* 1995;91:2844-2850.
6. Cleutjens JPM. The role of matrix metalloproteinases in heart disease. *Cardiovasc Res.* 1996;32:816-821.
7. Newby AC, Zaltsman AB. Fibrous cap formation or destruction - the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovasc Res.* 1999;41:345-360.
8. Pasterkamp G, Schoneveld AH, van der Wal AC, Hijnen D-J, van Wolveren WJA, Plomp S, Teepen HLJM, Borst C. Inflammation of the atherosclerotic cap and shoulder of the plaque is a common and locally observed feature in unruptured plaques of femoral and coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:54-58.
9. Hajjar DP. Viral pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Pathol.* 1991;139:1195-1211.
10. Navab M, Fogelman AM, Berlinere JA, Territo MC, Demer LL, Frank JS, Watson AD, Edwards PA, Lusis AJ. Pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Cardiol.* 1995;76:18C-23C.
11. Tanaka K, Sueishi K. The coagulation and fibrinolysis systems and atherosclerosis. *Lab Invest.* 1993;69:5-18.

12. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (part 1 of 2). *N Engl J Med*. 1992;326:242-250.
13. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis- an update. *N Engl J Med*. 1986;314:488-500.
14. Ross R. Atherosclerosis- An inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126.
15. O'Brien KD, Allen MD, McDonald TO, Chait A, Harlan JM, Fishbein D, McCarty J, Ferguson M, Hudkins K, Benjamin CD, Lobb R, Alpers CE. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1993;92:945-951.
16. Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the apoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:842-851.
17. Cybulsky MI, Gimbrone MA. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*. 1991;251:788-791.
18. Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJH, Pigott R, Woolf N, Katz D, Kyriakopoulos A. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol*. 1993;171:223-229.
19. Selwyn AP, Kinlay S, Creager M, Libby P, Ganz P. Cell dysfunction in atherosclerosis and the ischemic manifestations of coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1997;79:17-23.
20. Wever RMF, Lüscher TF, Cosentino F, Rabelink TJ. Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 1998;97:108-112.
21. Gimbrone MAJ, Nagel T, Topper JN. Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. *J Clin Invest*. 1997;99:1809-1813.
22. Meredith IT, Yeung AC, Weidinger FF, Anderson TJ, Uehata A, Ryan TJ, Selwyn AP, Ganz P. Role of impaired endothelium-dependent vasodilation in ischemic manifestations of coronary artery disease. *Circulation*. 1993;87 (Suppl V):V-56-V-66.

23. Nabel EG, Selwyn AP, Ganz P. Large coronary arteries in humans are responsive to changing blood flow: an endothelium-dependent mechanism that fails in patients with atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 1990;16:349-356.
24. Walpole PL, Gotlieb AI, Cybulsky MI, Langille BL. Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:2-10.
25. Kol A, Libby P. The mechanisms by which infectious agents may contribute to atherosclerosis and its clinical manifestations. *Trends Cardiovasc med*. 1998;8:191-199.
26. Nicholson AC, Hajjar DP. Herpesviruses in atherosclerosis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:339-348.
27. Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman III WP, Tracy RE, Wattigney WA. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. *N Engl J Med*. 1998;338:1650-1656.
28. Glasser SP, Selwyn AP, Ganz P. Atherosclerosis: risk factors and the vascular endothelium. *Am Heart J*. 1996;131:379-384.
29. Damerman m, Breslow JL. Genetic basis of lipoprotein disorders. *Circulation*. 1995;91:505-512.
30. Grainger DJ, Kirschenlohr HL, Metcalfe JC, Weissberg PL, Wade DP, Lawn RM. Proliferation of human smooth muscle cells promoted by lipoprotein (a). *Science*. 1993;260:1655-1658.
31. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*. 1995;91:2488-2496.
32. Horiuchi S. Advanced glycation end products (AGE)-modified proteins and their potential relevance to atherosclerosis. *T C M*. 1996;6:163-168.
33. Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor- β 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest*. 1992;90:456-461.
34. Boers GHJ. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for arterial and venous disease. A review of evidence and relevance. *Thromb Haemost*. 1997;78:520-522.

35. Lentz SR, Sadler JE. Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J Clin Invest.* 1991;88:1906-1914.
36. Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K. Homocysteine and coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 1996;27:517-527.
37. Majors A, Ehrhart LA, Pezacka EH. Homocysteine as a risk factor for vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2074-2081.
38. Falk E. Coronary thrombosis: pathogenesis and clinical manifestations. *Am J Cardiol.* 1991;68:28B-35B.
39. Ribeiro PA, Shah PM. Unstable angina: New insights into pathophysiologic characteristics, prognosis, and management strategies. *Curr Probl Cardiol.* 1996;21:669-732.
40. Davies MJ. The contribution of thrombosis to the clinical expression of coronary atherosclerosis. *Thromb Res.* 1996;82:1-32.
41. Bassand J-P. L'angioplastie dans l'angine de poitrine instable. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 1999;92:1609-1615.
42. Jennings RB, Murry CE, Steenbergen C, Reimer KA. Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation.* 1990;82 (Suppl II):II-2-II-12.
43. Kloner RA. Does reperfusion injury exist in humans? *J Am Coll Cardiol.* 1993;21:537-545.
44. Korthuis RJ, Grangere DN. Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. *Clin Cardiol.* 1993;16:119-126.
45. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med.* 1989;320:365-376.
46. Snyder F. Platelet-activating factor and its analogs: metabolic pathways and related intracellular processes. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1995;1254:231-249.
47. Hansen PR. Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation.* 1995;91:1872-1885.
48. Weyrich AS, Ma X-l, Lefter DJ, Albertine KH, Lefter AM. In vivo neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Clin Invest.* 1993;91:2620-2629.

49. Engler RL, Dahlgren MD, Morris DD, Peterson MA, Schmid-Schönbein GW. Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs. *Am J Physiol*. 1986;251:H314-H322.
50. Simpson PJ, Fantone JC, Mickelson JK, Gallagher KP, Lucchesi BR. Identification of a time window for therapy to reduce experimental canine myocardial injury: suppression of neutrophil activation during 72 hours of reperfusion. *Circ Res*. 1988;63:1070-1079.
51. Simpson PJ, Todd RF, Fantone JC, Mickelson JK, Griffin JD, Lucchesi BR. Reduction of experimental canine myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody (anti-Mo1, anti-CD11b) that inhibits leukocyte adhesion. *J Clin Invest*. 1988;81:624-629.
52. Litt MR, Jeremy RW, Weisman HF, Winkelstein JA, Becker LC. Neutrophil depletion limited to reperfusion reduces myocardial infarct size after 90 minutes of ischemia. *Circulation*. 1989;80:1816-1827.
53. Ma X-l, Lefer DJ, Lefer AM, Rothlein R. Coronary endothelial and cardiac protective effects of a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*. 1992;86:937-946.
54. Rousseau G, Hébert D, Libersan D, Khalil A, St-Jean G, Latour J-G. Importance of platelets in myocardial injury after reperfusion in the presence of residual coronary stenosis in dogs. *Am Heart J*. 1993;125:1553-1563.
55. Neumann F-J, Marx N, Gawaz M, Brand K, Ott I, Rokitta C, Sticherling C, Meinel C, May A, Schömig A. Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation*. 1997;95:2387-2394.
56. Libby P, Clinton SK. Cytokines as mediators of vascular pathology. *Nouv Rev Fr Hematol*. 1992;34 (Suppl I):S47-S53.
57. Neumann F-J, Ott I, Gawaz M, Richardt G, Holzappel H, Jochum M, Schömig A. Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation*. 1995;92:748-755.
58. Cassatella MA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today*. 1995;16:21-26.

59. Mickelson JK, Lakkis NM, Villarreal-Levy G, Hughes BJ, Smith CW. Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: a mechanism for recurrent disease? *J Am Coll Cardiol*. 1996;28:345-353.
60. Ott I, Neumann F-J, Gawaz M, Schmitt M, Schömig A. Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation*. 1996;94:1239-1246.
61. Entman ML, Ballantyne CM. Association of neutrophils with platelet aggregates in unstable angina. Should we alter therapy? *Circulation*. 1996;94:1206-1208.
62. Bittl JA. Advances in coronary angioplasty. *N Engl J Med*. 1996;335:1290-1302.
63. Ryan TJ, Bauman WB, Kennedy JW, Kereiakes DJ, King III SB, McCallister BD, Smith SC, Ulliyot DJ. Guidelines for percutaneous transluminal coronary angioplasty. A report of the American Heart Association/American College of cardiology task force on assessment of diagnostic and therapeutic cardiovascular procedures (committee on percutaneous transluminal coronary angioplasty). *Circulation*. 1993;88:2987-3007.
64. Keenan CR, Chou TM. Revascularization in coronary artery disease. *West J Med*. 1998;168:280-285.
65. Angioplasty substudy investigators GI. A clinical trial comparing primary coronary angioplasty with tissue plasminogen activator for acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1997;336:1621-1628.
66. Nunn CM, O'Neill WW, Rothbaum D, Stone GW, O'Keefe J, Overlie P, Donohue B, Grines L, Browne KF, Vliestra RE, Catlin T, Grines CL. Long-term outcome after primary angioplasty: report from the primary angioplasty in myocardial infarction (PAMI-I) trial. *J Am Coll Cardiol*. 1999;33:640-646.
67. Anderson WD, King III SB. A review of randomized trials comparing coronary angioplasty and bypass grafting. *Curr Opin Cardiol*. 1996;11:583-590.
68. Stone GW, Brodie BR, Griffin JJ, Morice MC, Costantini C, Goar FGS, Overlie PA, Popma JJ, McDonnell J, Jones D, O'Neill WW, Grines CL. Prospective, multicenter study of the safety and feasibility of primary stenting in acute myocardial infarction: In-hospital and 30-day results of the PAMI stent pilot trial. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31:23-30.

69. Dotter CT, Judkins MP. Transluminal treatment of atherosclerotic obstruction. *Circulation*. 1964;30:654-670.
70. Gruentzig AR. Percutaneous transluminal coronary angioplasty: six year's experience. *Am Heart J*. 1984;107:818-819.
71. Simpson JB, Baim DS, Robert EW, Harrison DC. A new catheter system for coronary angioplasty. *Am J Cardiol*. 1982;49:1216-1222.
72. Tan K, Sulke N, Taub N, Sowton E. Clinical and lesion morphologic determinants of coronary angioplasty success and complications: current experience. *J Am Coll Cardiol*. 1995;25:855-865.
73. Maillard L, Desveaux B, Quilliet L. Angioplastie au ballonnet. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 1999;92:1539-1549.
74. Collaborators NASCET. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. *N Engl J Med*. 1991;325:445-453.
75. Executive Committee ACAS. Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis. *JAMA*. 1995;273:1421-1428.
76. Yadav JS, Roubin GS, Iyer S, Vitek J, King P, Jordan WD, Fisher WS. Elective stenting of the extracranial carotid arteries. *Circulation*. 1997;95:376-381.
77. Kerber CW, Hornwell LD, Loehden OL. Catheter dilatation of proximal carotid stenosis during bifurcation endarterectomy. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1980;1:348-349.
78. Kellog J, X., Nesbit GM, Clark WM, Barnwell SL. The role of angioplasty in the treatment of cerebrovascular disease. *Neurosurgery*. 1998;43:549-555.
79. Yadav JS, Roubin GS, King P, Iyer S, Vitek J. Angioplasty and stenting for restenosis after carotid endarterectomy. *Stroke*. 1996;27:2075-2079.
80. Lanzino G, Mericle RA, Lopes DK, Wakhloo AK, Guterman LR, Hopkins LN. Percutaneous transluminal angioplasty and stent placement for recurrent carotid artery stenosis. *J Neurosurg*. 1999;90:688-694.
81. Brown MM. Results of the carotid and vertebral artery transluminal angioplasty study. *Br J Surg*. 1999;86:710-711.

82. Waller BF, Pinkerton CA, Orr CM, Slack JD, VanTassel JW, Peters T. Morphological observations late (>30 days) after clinically successful coronary balloon angioplasty. *Circulation*. 1991;1991:I28-I41.
83. Gravanis MB, Roubin GS. Histopathologic phenomena at the site of percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Hum Pathol*. 1989;20:477-485.
84. Wilentz JR, Sanborn TA, Haudenschild CC, Valeri CR, Ryan TJ, Faxon DP. Platelet accumulation in experimental angioplasty: time course and relation to vascular injury. *Circulation*. 1987;75:636-642.
85. Lam JYT, Chesebro JH, Steele PM, Dewanjee MK, Badimon L, Fuster V. Deep arterial injury during experimental angioplasty: relation to a positive indium-111-labeled platelet scintigram, quantitative platelet deposition and mural thrombosis. *J Am Coll Cardiol*. 1986;8:1380-1386.
86. Steele PM, Chesebro JH, Stanson AW, Holmes DR, 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.
87. Fuster V, Badimon J, Chesebro JH, Fallon JT. Plaque rupture, thrombosis, and therapeutic implications. *Haemostasis*. 1996;26:269-284.
88. Taubman MB, Fallon JT, Schechter AD, Giesen P, Mendlowitz M, Fyfe BS, Marmur JD, Nemerson Y. Tissue factor in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 1997;78:200-204.
89. Faint RW. Platelet-neutrophil interactions: their significance. *Blood Rev*. 1992;6:83-91.
90. Gawaz M, Neumann F-J, Ott I, Schiessler A, Schömig A. Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty. *Circulation*. 1996;93:229-237.
91. Holme PA, Orvim U, Hamers MJAG, Solum NO, Brosstad FR, Barstad RM, Sakariassen KS. Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:646-653.
92. Merten M, Pakala R, Thiagarajan P, Benedict CR. Platelet microparticles promote platelet interaction with subendothelial matrix in a glycoprotein IIb/IIIa-dependent mechanism. *Circulation*. 1999;99:2577-2582.

93. De Servi S, Mazzone A, Ricevuti G, Fioravanti A, Bramucci E, Angoli L, Stefano G, Specchia G. Granulocyte activation after coronary angioplasty in humans. *Circulation*. 1990;82:140-146.
94. Serrano CV, Ramires JAF, Venturinelli M, Arie S, D'Amico E, Zweier JL, Pileggi F, da Luz PL. Coronary angioplasty results in leukocyte and platelet activation with adhesion molecule expression. Evidence of inflammatory responses in coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol*. 1997;29:1276-1283.
95. Neumann F-J, Ott I, Gawaz M, Puchner G, Schömig A. Neutrophil and platelet activation at balloon-injured coronary artery plaque in patients undergoing angioplasty. *J Am Coll Cardiol*. 1996;27:819-824.
96. Ikeda H, Nakayama H, Oda T, Kuwano K, Yamaga A, Ueno T, Yoh M, Hiyamuta K, Koga Y, Toshima H. Neutrophil activation after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J*. 1994;128:1091-1098.
97. Merhi Y, Guidoin R, Provost P, Leung T-K, Lam JYT. Increase of neutrophil adhesion and vasoconstriction with platelet deposition after deep arterial injury by angioplasty. *Am Heart J*. 1995;129:445-451.
98. Merhi Y, Provost P, Guidoin R, Latour J-G. Importance of platelets in neutrophil adhesion and vasoconstriction after deep carotid arterial injury by angioplasty in pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:1185-1191.
99. Merhi Y, Lam JYT, Lacoste LL, Latour J-G, Guidoin R, Waters D. Effects of thrombocytopenia and shear rate on neutrophil and platelet deposition on endothelial and medial arterial surfaces. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:951-957.
100. Merhi Y, Lacoste L, Lam JYT. Neutrophil implications in platelet deposition and vasoconstriction after deep arterial injury by angioplasty in pigs. *Circulation*. 1994;90:997-1002.
101. Kirchhofer D, Riederer MA, Baumgartner HR. Specific accumulation of circulating monocytes and polymorphonuclear leukocytes on platelet thrombi in a vascular injury model. *Blood*. 1997;89:1270-1278.
102. Nash GB. Adhesion between neutrophils and platelets: a modulator of thrombotic and inflammatory events? *Thromb Res*. 1994;74:S3-S11.
103. Marcus AJ, Safier LB. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB J*. 1993;7:516-522.

104. Cerletti C, Evangelista V, de Gaetano G. Platelet-polymorphonuclear leukocyte functional interactions: role of adhesive molecules. *Thromb Haemost.* 1996;26:20-27.
105. Myler RK, Shaw RE, Stertz SH, Hecht HS, Ryan C, Rosenblum J, Cumberland DC, Murphy MC, Hansell HN, Hidalgo B. Lesion morphology and coronary angioplasty: current experience and analysis. *J Am Coll Cardiol.* 1992;19:1641-1652.
106. Bonnet J-L, Avran A, Quilici J, Fourcade L, Bory M. Complications aiguës de l'angioplastie coronaire: prévention et prise en charge. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 1999;92:1571-1577.
107. Singh M, Ohman M, Gallup D, Reeder GS, Holmes DR, Hodgson P. Is angiographic thrombus still a marker of adverse outcome? *Circulation.* 1999;100 (Suppl):I-435. Abstract.
108. Weaver WD, Simes J, Betriu A, Grines CL, Zijlstra F, Garcia E, Grinfeld L, Gibbons RJ, Ribeiro EE, DeWood MA, Ribichini F. Comparison of primary coronary angioplasty and intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. *J. A. M. A.* 1997;278:2093-2098.
109. King SB, Yeh W, Holubkov R, Baim DS, Sopko G, Desvigne-Nickens P, Holmes DR, Cowley MJ, Bourassa MG, Margolis J, Detre KM. Balloon angioplasty versus new device intervention: clinical outcomes. A comparison of the NHLBI PTCA and NACI registries. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31:558-566.
110. Lincoff AM, Popma JJ, Ellis SG, Hacker JA, Topol EJ. Abrupt vessel closure complicating coronary angioplasty: Clinical angiographic and therapeutic profile. *J Am Coll Cardiol.* 1992;19:926-935.
111. Tcheng JE. Platelet glycoprotein IIb/IIIa integrin blockade: recent clinical trials in interventional cardiology. *Thromb Haemost.* 1997;78:205-209.
112. Chronos N, Vahanian A, Betriu A, Emanuelsson H, Goldberg S, Gulba D, van Hout BA. Use of abciximab in interventional cardiology. *Am Heart J.* 1998;135:S67-S76.
113. Brener SJ, Barr LA, Burchenal JEB, Katz S, George BS, Jones AA, Cohen ED, Gainey PC, White HJ, Cheek HB, Moses JW, Moliterno DJ, Effron MB, Topol EJ. Randomized, placebo-controlled trial of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade

- with primary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation*. 1998;98:734-741.
114. El-Tamimi H, Davies GJ, Crea F, Maseri A. Response of human coronary arteries to acetylcholine after injury by coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol*. 1993;21:1152-1157.
115. Eguchi H, Ikeda H, Murohara T, Yasukawa H, Haramaki N, Sakisaka S, Imaizumi T. Endothelial injuries of coronary arteries distal to thrombotic sites. Role of adhesive interactions between endothelial P-selectin and leukocyte sialyl lewis^x. *Circ Res*. 1999;84:525-535.
116. Jessup W. Oxidized lipoproteins and nitric oxide. *Curr Opin Lipidol*. 1996;7:274-280.
117. Provost P, Tremblay J, Merhi Y. The antiadhesive and antithrombotic effects of the nitric oxide donor SIN-1 are combined with a decreased vasoconstriction in a porcine model of balloon angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:1806-1812.
118. Provost P, Merhi Y. Endothelium-derived nitric oxide decreases polymorphonuclear leukocyte interaction with the deeply injured arterial wall under intermediate and high shear conditions. *Thromb Haemost*. 1997;78:939-946.
119. Minamino T, Kitakaze M, Node K, Funaya H, Inoue M, Hori M, Kamada T. Activated polymorphonuclear leukocytes induce constriction of canine coronary artery via Mac-1, but not LFA-1, and ICAM-1. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28:1575-1581.
120. Lam JYT, Chesebro JH, Steele PM, Badimon L, Fuster V. Is vasospasm related to platelet deposition? Relationship in a porcine preparation of arterial injury in vivo. *Lab Invest*. 1987;75:243-248.
121. Provost P, Borgeat P, Merhi Y. Platelets, neutrophils, and vasoconstriction after arterial injury by angioplasty in pigs: effects of MK-886, a leukotriene biosynthesis inhibitor. *Br J Pharmacol*. 1998;123:251-258.
122. Le Breton H. Le diagnostic de la resténose. *Arch Mal Coeur*. 1999;92:1583-1587.
123. Lefkovits J, Topol EJ. Pharmacological approaches for the prevention of restenosis after percutaneous coronary intervention. *Prog Cardiovasc Dis*. 1997;40:141-158.

124. Serruys PW, Luijten HE, Beatt KJ, Geuskens R, De Feyter PJ, van den Brand M, Reiber JHC, ten Katen HJ, van Es GA, Hugenholtz PG. Incidence of restenosis after successful coronary angioplasty: a time-related phenomenon. *Circulation*. 1988;77:361-371.
125. Bauters C, Van Belle E, McFadden E, Lablanche J-M, Bertrand M-E. La resténose après angioplastie. *Arch Mal Coeur*. 1999;92:1579-1582.
126. Nobuyoshi M, Kimura T, Nosaka H, Mioka S, Ueno K, Yokoi H, Hamasaki N, Horiuchi H, Ohishi H. Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial angiographic follow-up of 229 patients. *J Am Coll Cardiol*. 1988;12:616-623.
127. Kitazume H, Kubo I, Iwama T, Ageishi Y. Long-term angiographic follow-up of lesions patent 6 months after percutaneous coronary angioplasty. *Am Heart J*. 1995;129:441-444.
128. Ormiston JA, Stewart F, M., Roche AHG, Webber BJ, Whitlock RML, Webster MWI. Late regression of the dilated site after coronary angioplasty. *Circulation*. 1997;96:468-474.
129. Mehta VY, Jorgensen MB, Raizner AE, Wolde-Tsadik G, Mahrer PR, Mansukhani P. Spontaneous regression of restenosis: an angiographic study. *J Am Coll Cardiol*. 1995;26:696-7022.
130. Kimura T, Yokoi H, Nakagawa Y, Tamura T, Kaburagi S, Sawada Y, Sato Y, Yokoi H, Hamasaki N, Nosaka H. Three-year follow-up after implantation of metallic coronary-artery stents. *N Engl J Med*. 1996;334:561-566.
131. Nobuyoshi M, Kimura T, Ohishi H, Horiuchi H, Nosaka H, Hamasaki N, Yokoi H, Kim K. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: pathologic observations in 20 patients. *J Am Coll Cardiol*. 1991;17:433-439.
132. Glacov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1987;316:1371-1375.
133. Serruys PW, Foley DP, Kirkeeide RL, King SB. Restenosis revisited: insights provided by quantitative coronary angiography. *Am Heart J*. 1993;126:1243-1267.

134. Kakuta T, Usui M, Coats WD, Currier JW, Numano F, Faxon DP. Arterial remodeling at the reference site after angioplasty in the atherosclerotic rabbit model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:47-51.
135. Kimura T, Kaburagi S, Tamura T, Yokoi H, Nakagawa Y, Yokoi H, Hamasaki N, Nosaka H, Nobuyoshi M, Mintz GS, Popma JJ, Leon MB. Remodeling of human coronary arteries undergoing coronary angioplasty or atherectomy. *Circulation.* 1997;96:475-483.
136. Mintz GS, Popma JJ, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Wong SC, Hong MK, Kovach JA, Leon MB. Arterial remodeling after coronary angioplasty. *Circulation.* 1996;94:35-43.
137. Weintraub WS, Kosinski AS, Brown III CL, King SB. Can restenosis after coronary angioplasty be predicted from clinical variables? *J Am Coll Cardiol.* 1993;21:6-14.
138. Rensing BJ, Hermans WRM, Deckers JW, de Feyter PJ, Serruys PW. Which angiographic variable best describes functional status 6 months after successful single-vessel coronary balloon angioplasty? *J Am Coll Cardiol.* 1993;21:317-324.
139. Bourassa MG, Lespérance J, Eastwood C, Schwartz L, Côté G, Kazim F, Hudon G. Clinical, physiologic, anatomic and procedural factors predictive of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol.* 1991;18:368-376.
140. Bauters C, Lablanche JM, McFadden EP, Hamon M, Bertrand ME. Relation of coronary angioscopic findings at coronary angioplasty to angiographic restenosis. *Circulation.* 1995;92:2473-2479.
141. de Boer OJ, van der Wal AC, Teeling P, Becker AE. Leucocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization? *Cardiovasc Res.* 1999;41:443-449.
142. Falk E. Why do plaques rupture? *Circulation.* 1992;86:III-30-III-42.
143. Drexler H. Endothelial dysfunction: clinical implications. *Prog Cardiovasc Dis.* 1997;39:287-324.
144. Tschoepe D, Roesen P, Esser J, Schwippert B, Nieuwenhuis HK, Kehrel B, Gries FA. Large platelets circulate in an activated state in diabetes mellitus. *Sem Thromb Hemost.* 1991;17:433-438.

145. Cohen RA. Dysfunction of vascular endothelium in diabetes mellitus. *Circulation*. 1993;87 (Suppl V):V-67-V-76.
146. Aronson D, Bloomgarden Z, Rayfield EJ. Potential mechanisms promoting restenosis in diabetic patients. *J Am Coll Cardiol*. 1996;27:528-535.
147. Kornowski R, Mintz GS, Kent KM, Pichard AD, Satler LF, Bucher TA, Hong MK, Popma JJ, Leon MB. Increased restenosis in diabetes mellitus after coronary interventions is due to exaggerated intimal hyperplasia. *Circulation*. 1997;95:1366-1369.
148. Hirshfeld JW, Schwartz S, Jugo R, MacDonald RG, Goldberg S, Savage MP, Bass TA, Vetrovec G, Cowley M, Taussig AS, Whitworth HB, Margolis JR, Hill JA, Pepine CJ. Restenosis after coronary angioplasty: a multivariate statistical model to relate lesion and procedure variables to restenosis. *J Am Coll Cardiol*. 1991;18:647-656.
149. Kuntz RE, Gibson M, Nobuyoshi M, Baim DS. Generalized model of restenosis after conventional balloon angioplasty, stenting and directional atherectomy. *J Am Coll Cardiol*. 1993;21:15-25.
150. Schwartz RS, Holmes DR, Topol EJ. The restenosis paradigm revisited: an alternative proposal for cellular mechanisms. *J Am Coll Cardiol*. 1992;20:1284-1293.
151. Fuster V, Falk E, Fallon JT, Badimon L, Chesebro JH, Badimon JJ. The three processes leading to post PTCA restenosis: dependence on the lesion substrate. *Thromb Haemost*. 1995;74:552-559.
152. Lee PC, Gibbons GH, Dzau VJ. Cellular and molecular mechanisms of coronary artery restenosis. *Coron Artery Dis*. 1993;4:254-259.
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. *Prog Cardiovasc Dis*. 1997;39:361-398.
154. Bauters C, Meurice T, Hamon M, McFadden E, Lablanche J-M, Bertrand ME. Mechanisms and prevention of restenosis: from experimental models to clinical practice. *Cardiovasc Res*. 1996;31:835-846.

155. Forrester JS, Fishbein M, Helfant R, Fagin J. A paradigm for restenosis based on cell biology: clues for the development of new preventive therapies. *J Am Coll Cardiol.* 1991;17:758-769.
156. Rensing BJ, Hermans WRM, Beatt KJ, Jan Laarman G, Suryapranata H, van der Brand M, de Feyter PJ, Serruys PW. Quantitative angiographic assessment of elastic recoil after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am J Cardiol.* 1990;66:1039-1044.
157. Hanet C, Wijns W, Michel X, Schroeder E. Influence of balloon size and stenosis morphology on immediate and delayed elastic recoil after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol.* 1991;18:506-511.
158. Waller BF, Pinkerton CA, Orr CM, Slack JD, VanTassel JW, Peters T. 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.
159. Ardissino D, Di Somma S, Kubica J, Barberis P, Angelica Merlini P, Eleuteri E, De Servi S, Bramucci E, Specchia G, Montemartini C. Influence of elastic recoil on restenosis after successful coronary angioplasty in unstable angina pectoris. *Am J Cardiol.* 1993;71:659-663.
160. Ip JH, Fuster V, Israel D, Badimon L, Badimon J, Chesebro JH. The role of platelets, thrombin and hyperplasia in restenosis after coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol.* 1991;17:77B-88B.
161. Eisenberg PR. The role of thrombin in coronary artery thrombosis. *Coron Artery Dis.* 1996;7:400-408.
162. Ghigliotti G, Waissbluth AR, Speidel C, Abendschein DR, Eisenberg PR. Prolonged activation of prothrombin on the vascular wall after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:250-257.
163. Baykal D, Schmedtje JF, Runge MS. Role of thrombin receptor in restenosis and atherosclerosis. *Am J Cardiol.* 1995;75:82B-87B.
164. Brass LF. Thrombin receptor antagonists: a work in progress. *Coron Artery Dis.* 1997;8:49-58.
165. Muhlfelder TW, Khan I, Niemetz J. Factors influencing the release of procoagulant-tissue factor activity from leukocytes. *J Lab Clin Med.* 1978;92:65-72.

166. Todoroki H, Higure A, Okamoto K, Okazaki K, Nagafuchi Y, Takeda S, Katoh H, Itoh H, Ohsato K, Nakamura S. Possible role of platelet-activating factor in the in vivo expression of tissue factor in neutrophils. *J Surg Res*. 1998;80:149-155.
167. Harker LA, Hanson SR, Runge MS. Thrombin hypothesis of thrombus generation and vascular lesion formation. *Am J Cardiol*. 1995;75:12B-17B.
168. Wilcox JN, Rodriguez J, Subramanian R, Ollerenshaw J, Zhong C, Hayzer DJ, Horaist C, Hanson SR, Lumsden A, Salam TA, Kelly AB, Harker LA, Runge M. Characterization of thrombin receptor expression during vascular lesion formation. *Circ Res*. 1994;75:1029-1038.
169. Coughlin SR. How thrombin talks to cells. Molecular mechanisms and roles in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:514-518.
170. Jamieson GA. Pathophysiology of platelet thrombin receptors. *Thromb Haemost*. 1997;78:242-246.
171. Gerdes C, Faber-Steinfeld V, Yalkinoglu Ö, Wohlfeil S. Comparison of the effects of the thrombin inhibitor r-hirudin in four animal models of neointima formation after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:1306-1311.
172. Sarembock IJ, Gertz SD, Gimble LW, Owen RM, Powers ER, Roberts WC. Effectiveness of recombinant desulphatohirudin in reducing restenosis after balloon angioplasty of atherosclerotic femoral arteries in rabbits. *Circulation*. 1991;84:232-243.
173. Sarembock IJ, Gertz SD, Thome LM, McCoy KW, Ragosta M, Powers ER, Maraganore JM, Gimble LW. Effectiveness of hirulog in reducing restenosis after balloon angioplasty of atherosclerotic femoral arteries in rabbits. *J Vasc Res*. 1996;33:308-314.
174. Unterberg C, Sandrock D, Nebendahl K, Buchwald AB. Reduced acute thrombus formation results in decreased neointimal proliferation after coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol*. 1995;26:1747-1754.
175. Serruys PW, Herrman JP, Simon R, Rutsch W, Bode C, Laarman GJ, van Dijk R, van den Bos AA, Umans VA, Fox KA, Close P, Deckers JW. A comparison of hirudin with heparin in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. Helvetica Investigators. *N Engl J Med*. 1995;333:757-763.

176. Burchenal JEB, Marks DS, Mann T, Scweiger MJ, Rothman MT, Ganz P, Adelman B, Bittl JA. Effect of direct thrombin inhibition with *Bivalirudin* (Hirulog) on restenosis after coronary angioplasty. *Am J Cardiol.* 1998;82:511-515.
177. Forney Prescott M, Kabosi McBride C, Court M. Development of intimal lesions after leukocyte migration into the vascular wall. *Am J Pathol.* 1989;135:835-846.
178. Jorgensen L, Grothe AG, Groves HM, Kinlough-Rathbone RL, Richardson M, Mustard JF. Sequence of cellular responses in rabbit aortas following one and two injuries with a balloon catheter. *Br J Exp Path.* 1988;69:473-486.
179. Cole CW, Hagen P-O, Lucas JF, Mijat EM, O'Malley MK, Radic ZS, Makhoul RG, McCann RL. Association of polymorphonuclear leukocytes with sites of aortic catheter-induced injury in rabbits. *Atherosclerosis.* 1987;67:229-236.
180. Pakianathan DR. Extracellular matrix proteins and leukocyte function. *J Leukoc Biol.* 1995;57:699-702.
181. Smith RE, Hogaboam CM, Strieter RM, Lukacs NW, Kunkel SL. Cell-to-cell and cell-to-matrix interactions mediate chemokine expression: an important component of the inflammatory lesion. *J Leukoc Biol.* 1997;62:612-619.
182. Walzog B, Weinmann P, Jeblonski F, Scharffetter-Kochanek K, Bommert K, Gaehtgens P. A role for $\beta 2$ integrins (CD11/CD18) in the regulation of cytokine gene expression of polymorphonuclear neutrophils during the inflammatory response. *FASEB J.* 1999;13:1855-1865.
183. Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu Y-M, Sajer SA, Furie B. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated *in vivo* by P-selectin on adherent platelets. *Nature.* 1992;359:848-851.
184. Issekutz AC, Ripley M, Jackson JR. Role of neutrophils in the deposition of platelets during acute inflammation. *Lab Invest.* 1983;49:716-724.
185. Cole CW, Makhoul RG, McCann RL, O'Malley MK, Hagen PO. A neutrophil derived factor(s) stimulate [3H] thymidine incorporation by vascular smooth muscle cells in vitro. *Clin Invest Med.* 1988;11:62-67.
186. Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res.* 1992;70:593-599.

187. Libby P, Schwartz D, Brogi E, Tanaka H, Clinton SK. A cascade model for restenosis. A special case of atherosclerosis progression. *Circulation*. 1992;86:III-47-III-52.
188. Libby P, Tanaka H. The molecular bases of restenosis. *Prog Cardiovasc Dis*. 1997;40:97-106.
189. Clausell N, de Lima VC, Molossi S, Liu P, Turley E, Gotlieb AI, Adelman AG, Rabinovitch M. Expression of tumor necrosis factor alpha and accumulation of fibronectin in coronary artery restenotic lesions retrieved by atherectomy. *Br Heart J*. 1995;73:534-539.
190. Rogers C, Edelman ER, Simon DI. A mAb to the β 2-leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) reduces intimal thickening after angioplasty or stent implantation in rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:10134-10139.
191. Barron MK, Scott Lake R, Buda AJ, Tenaglia AN. Intimal hyperplasia after balloon injury is attenuated by blocking selectins. *Circulation*. 1997;96:3587-3592.
192. Inoue T, Sakai Y, Fujito T, Hoshi K, Hayashi T, Takayanagi K, Morooka S. Clinical significance of neutrophil adhesion molecules expression after coronary angioplasty on the development of restenosis. *Thromb Haemost*. 1998;79:54-58.
193. Lijnen HR, Collen D. Endothelium in hemostasis and thrombosis. *Prog Cardiovasc Dis*. 1997;XXXIX:343-350.
194. Bassenge E. Endothelial function in different organs. *Prog Cardiovasc Dis*. 1996;39:209-228.
195. Vanhoutte PM, Mombouli J-V. Vascular endothelium: vasoactive mediators. *Prog Cardiovasc Dis*. 1996;39:229-238.
196. Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis*. 1995;38:87-104.
197. De Caterina R, Libby P, Peng H-B, Thannickpal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest*. 1995;96:60-68.

198. Armstead VE, Minchenko AG, Schuhl RA, Hayward R, Nossuli TO, Lefer AM. Regulation of P-selectin expression in human endothelial cells by nitric oxide. *Am J Physiol.* 1997;273:H740-H746.
199. Gaboury J, Woodman RC, Granger DN, Reinhardt P, Kubes P. Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide. *Am J Physiol.* 1993;265:H862-H867.
200. Van Belle E, Christophe B, Takayaki A, Isner JM. Endothelial regrowth after arterial injury: from vascular repair to therapeutics. *Cardiovasc Res.* 1998;38:54-68.
201. 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.
202. Shimokawa H, Aarhus LL, Vanhoutte PM. Porcine coronary arteries with regenerated endothelium-dependent responsiveness to aggregating platelets and serotonin. *Circ Res.* 1987;61:256-270.
203. Myers PR, Webel R, Thondapu V, Xu X-P, Amann J, Tanner MA, Jenkins JS, Pollock JS, Laughlin MH. Restenosis is associated with decreased coronary artery nitric oxide synthase. *Int J Cardiol.* 1996;55:183-191.
204. Ma X-l, Weyrich AS, Lefer DJ, Lefer AM. Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circ Res.* 1993;72:403-412.
205. Hamon M, Vallet B, Bauters C, Wernert N, McFadden EP, Lablanche JM, Dupuis B, Bertrand ME. Long-term oral administration of L-arginine reduces intimal thickening and enhances neoendothelium-dependent acetylcholine-induced relaxation after arterial injury. *Circulation.* 1994;90:1357-1362.
206. Janssens S, Flaherty D, Nong Z, Varenne O, van Pelt N, Haustermans C, Zoldhelyi P, Gerard R, Collen D. Human endothelial nitric oxide synthase gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after balloon injury in rats. *Circulation.* 1998;97:1274-1281.
207. Jain SP, Jain A, Collins TJ, Ramee SR, White CJ. Predictors of restenosis: a morphometric and quantitative evaluation by intravascular ultrasound. *Am Heart J.* 1994;128:664-673.

208. Tousoulis D, Carlos Kaski J, Davies G, Pereira W, El Tamimi H, McFadden E, Maseri A. Preangioplasty complicated coronary stenosis morphology as a predictor of restenosis. *Am Heart J*. 1992;123:15-20.
209. Cavallini C, Giommi L, Franceschini E, Risica G, Olivari Z, Marton F, Cuzzato V. Coronary angioplasty in single-vessel complex lesions: short- and long-term outcome and factors predicting acute coronary occlusion. *Am Heart J*. 1991;122:44-49.
210. Pärsson H, Cwikiel W, Johansson K, Swartbol P, Norgren L. Deposition of platelets and neutrophils in porcine iliac arteries after angioplasty and Wallstent placement compared with angioplasty alone. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 1994;17:190-196.
211. Gallo R, Padurean A, Toschi V, Bichler J, Fallon J, Chesebro JH, Fuster V, Badimon JJ. Prolonged thrombin inhibition reduces restenosis after balloon angioplasty in porcine coronary arteries. *Circulation*. 1998;97:581-588.
212. Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of Platelet-Derived-Growth-Factor. *Cell*. 1986;46:155-169.
213. Hughes AD, Clunn GF, Refson J, Demoliou-Mason C. Platelet-derived growth factor (PDGF): actions and mechanisms in vascular smooth muscle. *Gen Pharmac*. 1996;27:1079-1089.
214. Mannaioni PF, Di Bello MG, Masini E. Platelets and inflammation: role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. *Inflamm Res*. 1997;46:4-18.
215. Deuel TF, Senior RM, Huang JS, Griffin GL. Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor. *J Clin Invest*. 1982;69:1046-1049.
216. Hamon M, Bauters C, McFadden EP, Wernert N, Lablanche JM, Dupuis B, Bertrand ME. Restenosis after coronary angioplasty. *Eur Heart J*. 1995;16:33-48.
217. Banskota NK, Taub R, Zellner K, King GL. Insulin, insulin-like growth factor I and platelet-derived growth factor interact additively in the induction of the protooncogene c-myc and cellular proliferation in cultured bovine aortic smooth muscle cells. *Mol Endocrinol*. 1989;3:1183-1190.
218. Battegay EJ. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J Mol Med*. 1995;73:333-346.

219. Meurice T, Bauters C, Auffray J-L, Vallet B, Hamon M, Valero F, Van Belle E, Lablanche J-M, Bertrand ME. Basic fibroblast growth factor restores endothelium-dependent responses after balloon injury of rabbit arteries. *Circulation*. 1996;93:18-22.
220. Lindner V, Lappi DA, Baird A, Majack RA, Reidy MA. Role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation. *Circ Res*. 1991;68:106-113.
221. Miano JM, Vlastic N, Tota RR, Stemerman MB. Smooth muscle cell immediate-early gene and growth factor activation follows vascular injury. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:211-219.
222. Foegh ML, Virmani R. Molecular biology of intimal proliferation. *Curr Opin Cardiol*. 1993;8:938-950.
223. 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;1994:944-951.
224. Schwartz SM, Reidy MA, O'Brien ERM. Assessment of factors important in atherosclerotic occlusion and restenosis. *Thromb Haemost*. 1995;74:541-551.
225. Seidel CL. Cellular heterogeneity of the vascular tunica media. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:1868-1871.
226. Dinarello CA. Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv Immunol*. 1989;44:153-205.
227. 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.
228. Lazarous DF, Shou M, Scheinowitz M, Hodge E, Thirumurthi V, Kitsiou AN, Stiber JA, Lobo AD, Hunsberger S, Guetta E, Epstein SE, Unger EF. Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and the arterial response to injury. *Circulation*. 1996;94:1074-1082.
229. Ferns GA, Raines EW, Sprugel KH, Motani A, Reidy MA, Ross R. Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science*. 1991;253:1129-1132.

230. Fingerle J, Johnson R, Clowes AW, Majesky MW, Reidy MA. Role of platelets in smooth muscle cell proliferation and migration after vascular injury in rat carotid artery. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:8412-8416.
231. Liaw L, Skinner MP, Raines EW, Ross R, Cheresh DA, Schwartz SM, Giachelli CM. The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins. Role of $\alpha_v\beta_3$ in smooth muscle cell migration to osteopontin in vitro. *J Clin Invest*. 1995;95:713-724.
232. Clyman RI, Mauray F, Kramer RH. Beta 1 and beta 3 integrins have different roles in the adhesion and migration of vascular smooth muscle cells on extracellular matrix. *Exp Cell Res*. 1992;200:272-284.
233. Panda D, Kundu GC, Lee BI, Peri A, Fohl D, Chackalaparampil I, Mukherjee BB, Li XD, Mukherjee DC, Seides S, Rosenberg J, Stark K, Mukherjee AB. Potential roles of osteopontin and $\alpha_v\beta_3$ integrin in the development of coronary artery restenosis after angioplasty. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:9308-9313.
234. Choi ET, Engel L, Callow AD, Sun S, Trachtenberg J, Santoro S, Ryan US. Inhibition of neointimal hyperplasia by blocking $\alpha_v\beta_3$ integrin with a small peptide antagonist GpenGRGDSPCA. *J Vasc Surg*. 1994;19:125-134.
235. Matsuno H, Stassen JM, Vermeylen J, Deckmyn H. Inhibition of integrin function by a cyclic RGD-containing peptide prevents neointima formation. *Circulation*. 1994;90:2203-2206.
236. Srivatsa SS, Fitzpatrick LA, Tsao PW, Reilly TM, Holmes DR, Schwartz RS, Mousa SA. Selective $\alpha_v\beta_3$ integrin blockade potently limits neointimal hyperplasia and lumen stenosis following deep coronary arterial stent injury: evidence for the functional importance of integrin $\alpha_v\beta_3$ and osteopontin expression during neointima formation. *Cardiovasc Res*. 1997;36:408-428.
237. Newby AC, George SJ. Proliferation, migration, matrix turnover, and death of smooth muscle cells in native coronary and vein graft atherosclerosis. *Curr Opin Cardiol*. 1996;11:574-582.
238. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res*. 1995;77:863-868.
239. 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.
240. Libby P, Tanaka H, Kranzhöfer R, Sukhova G, Allaire E, Clowes AW, Ganz P. Inflammatory mechanisms of remodeling in injured arteries. In: Lafont A, Topol EJ, eds. *Arterial remodeling: A critical factor in restenosis*. Boston: Kluwer Academic; 1997:439-452.
241. Bendeck MP, Zempo N, Clowes AW, Galardy RE, Reidy MA. Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circ Res.* 1994;75:539-545.
242. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994;94:2493-2503.
243. Kenagy RD, Hart CE, Stetler-Stevenson WG, Clowes AW. Primate smooth muscle cell migration from aortic explant is mediated by endogenous platelet-derived growth factor and basic fibroblast growth factor acting through matrix metalloproteinases 2 and 9. *Circulation.* 1997;96:3555-3560.
244. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Mechanisms of stenosis after arterial injury. *Lab Invest.* 1983;49:208-215.
245. Lindner V, Giachelli CM, Schwartz SM, Reidy MA. A subpopulation of smooth muscle cells in injured rat arteries expresses platelet-derived growth factor-B chain mRNA. *Circ Res.* 1995;76:951-957.
246. Riessen R, Wight TN, Pastore C, Henley C, Isner JM. Distribution of hyaluronan during extracellular matrix remodeling in human restenotic arteries and balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation.* 1996;93:1141-1147.
247. Schönherr E, Järveläinen HT, Kinsella MG, Sandell LJ, Wight TN. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β_1 differentially affect the synthesis of biglycan and decorin by monkey arterial smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb.* 1993;13:1026-1036.
248. Border WA, Ruoslahti E. Transforming growth factor- β in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest.* 1992;90:1-7.
249. Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA, Ruoslahti E. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan,

- decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J.* 1994;302:527-534.
250. Sibinga NE, Foster LC, Hsieh CM, Perrella MA, Lee WS, Endege WO, Sage EH, Lee ME, Haber E. Collagen VIII is expressed by vascular smooth muscle cells in response to injury. *Circ Res.* 1997;80:532-541.
251. Ju H, Dixon IMC. Extracellular matrix and cardiovascular diseases. *Can J Cardiol.* 1996;12:1259-1267.
252. Guarda E, Katwa LC, Campbell SE, Tanner MA, Webel RM, Laughlin H, Jenkins S, Myers PR. Extracellular matrix collagen synthesis and degradation following coronary balloon angioplasty. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28:699-706.
253. 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.
254. Senior RM, Griffin GL, Mecham RP, Wrenn DS, Prasad KU, Urry DW. Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly, a repeating peptide in elastin, is chemotactic for fibroblasts and monocytes. *J Cell Biol.* 1984;99:870-874.
255. Stamm C, Sarret Y, Schmitt D, Thivolet J. Les Fibronectines. *Path Biol.* 1992;40:649-654.
256. Thyberg J, Blomgren K, Roy L, Tran PK, Hedin U. Phenotypic modulation of smooth muscle cells after arterial injury is associated with changes in the distribution of laminin and fibronectin. *J Histochem Cytochem.* 1997;45:837-846.
257. Casscells W. Migration of smooth muscle and endothelial cells. *Circulation.* 1992;86:723-729.
258. Miano JM, Vlastic N, Tota RR, Stemerman MB. Smooth muscle cell immediate-early gene and growth factor activation follows vascular injury. A putative in vivo mechanism for autocrine growth. *Arterioscler Thromb.* 1993;13:211-219.
259. Ribeiro SM, Poczatek M, Schultz-Cherry S, Villain M, Murphy-Ullrich JE. The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor-beta. *J Biol Chem.* 1999;274:13586-13593.
260. O'Brien ER, Garvin MR, Stewart DK, Hinohara T, Simpson JB, Schwartz SM, Giachelli CM. Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle, and

- endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:1648-1656.
261. Curfs JHAJ, Meis JFGM, Hoogkamp-Korstanje JAA. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10:742-780.
262. McCaffrey TA, Consigli S, Du B, Falcone DJ, Sanborn TA, Spokojny AM, Bush HL. Decreased type II/type I TGF-beta receptor ratio in cells derived from human atherosclerotic lesions. Conversion from an antiproliferative to profibrotic response to TGF-beta1. *J Clin Invest*. 1995;96:2667-2675.
263. Bategay EJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope DF, Ross R. TGF-beta induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. *Cell*. 1990;63:515-524.
264. Wysocki SJ, Zheng MH, Fan Y, Lamawansa MD, House AK, Norman PE. Expression of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and urokinase-type plasminogen activator (u-PA) genes during arterial repair in the pig. *Cardiovasc Res*. 1996;31:28-36.
265. Rasmussen LM, Wolf YG, Ruoslahti E. Vascular smooth muscle cells from injured rat aortas display elevated matrix production associated with transforming growth factor-beta activity. *Am J Pathol*. 1995;147:1041-1048.
266. Nabel EG, Shum L, Pompili VJ, Yang ZY, San H, Shu HB, Liptay S, Gold L, Gordon D, Derynck R. Direct transfert of transforming growth factor beta 1 gene into arteries stimulates fibrocellular hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:10759-10763.
267. Tyagi SC, Meyer L, Schmaltz RA, Reddy HK, Voelker DJ. Proteinases and restenosis in the human coronary artery: extracellular matrix production exceeds the expression of proteolytic activity. *Atherosclerosis*. 1995;116:43-57.
268. Reilly CF, Kindy MS, Brown KE, Rosenberg RD, Sonenshein GE. Heparin prevents vascular smooth muscle cell progression through the G1 phase of the cell cycle. *J Biol Chem*. 1989;264:6990-6995.
269. Rosenberg RD, Shworak NW, Liu J, Schwartz JJ, Zhang L. Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system. *J Clin Invest*. 1997;99:2062-2070.
270. Wight TN, Kinsella MG, Qwarnström EE. The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation. *Curr Opin Cell Biol*. 1992;4:793-801.

271. Clowes AW, Clowes MM, Kocher O, Ropraz P, Chaponnier C, Gabbiani G. Arterial smooth muscle cells in vivo: relationship between actin isoform expression and mitogenesis and their modulation by heparin. *J Cell Biol.* 1988;107:1939-1945.
272. Snow AD, Bolender RP, Wight TN, Clowes AW. Heparin modulates the composition of the extracellular matrix domain surrounding arterial smooth muscle cells. *Am J Pathol.* 1990;137:313-330.
273. 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.
274. Zalewski A, Shi Y. Vascular myofibroblasts. Lessons from coronary repair and remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:417-422.
275. Shimokawa H, Ito A, Fukumoto Y, Kadokami T, Nakaike R, Sakata M, Takayanagi T, Egashira K, Takeshita A. Chronic treatment with interleukin-1 beta induces coronary intimal lesions and vasospastic responses in pigs in vivo. *J Clin Invest.* 1996;97:769-776.
276. Booth RFG, Martin JF, Honey AC, Hassall DG, Beesley JE, Moncada S. Rapid development of atherosclerotic lesions in the rabbit carotid artery induced by perivascular manipulation. *Atherosclerosis.* 1989;76:257-268.
277. Shi Y, Pieniek M, Fard A, O'Brien J, Mannion JD, Zalewski A. Adventitial remodeling after coronary arterial injury. *Circulation.* 1996;93:340-348.
278. Scott NA, Cipolla GD, Ross CE, Dunn B, Martin FH, Simonet L, Wilcox JN. Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries. *Circulation.* 1996;93:2178-2187.
279. Shi Y, O'Brien JE, Ala-Kokko L, Chung W, Mannion JD, Zalewski A. Origin of extracellular matrix synthesis during coronary repair. *Circulation.* 1997;95:997-1006.
280. Fukumoto Y, Shimokawa H, Ito A, Kadokami T, Yonemitsu Y, Aikawa M, Owada MK, Egashira K, Sueishi K, Nagai R, Yazaki Y, Takeshita A. Inflammatory cytokines cause coronary arteriosclerosis-like changes and

- alterations in the smooth-muscle phenotypes in pigs. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1997;29:222-231.
281. Shi Y, O'Brien JE, Fard A, Zalewski A. Transforming growth factor-beta 1 expression and myofibroblast formation during arterial repair. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:1298-1305.
282. Liu MW, Roubin GS, King III SB. Restenosis after coronary angioplasty. Potential biological determinants and role of intimal hyperplasia. *Circulation*. 1989;79:1374-1387.
283. Ip JH, Fuster V, Badimon L, Badimon J, Taubman MB, Chesebro JH. Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. *J Am Coll Cardiol*. 1990;15:1667-1687.
284. Califf RM, Fortin DF, Frid DJ, Harlan III WR, Ohman M, Bengtson JR, Nelson CL, Tchong JE, Mark DB, Stack RS. Restenosis after coronary angioplasty: an overview. *J Am Coll Cardiol*. 1991;17:2B-13B.
285. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Mechanisms of stenosis after arterial injury. *Lab Invest*. 1983;49:208-215.
286. Isner JM, Kearney M, Bauters C, Leclerc G, Nikol S, Pickering JG, Riessen R, Weir L. Use of human tissue specimens obtained by directional atherectomy to study restenosis. *Trends Cardiovasc Med*. 1994;4:213-221.
287. Johnson DE, Hinohara T, Selmon MR, Braden LJ, Simpson JB. Primary peripheral arterial stenoses and restenoses excised by transluminal atherectomy: a histopathologic study. *J Am Coll Cardiol*. 1990;15:419-425.
288. 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. *Circ Res*. 1993;73:223-231.
289. Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ERM. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res*. 1995;77:445-465.
290. Kakuta T, Currier JW, Haudenschild CC, Ryan TJ, Faxon DP. Differences in compensatory vessel enlargement, not intimal formation, account for restenosis after angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit model. *Circulation*. 1994;89:2809-2815.

291. Lafont A, Moreyra C, Grati Z, Durand E, Bougrini K, Rahal S, Desnos M, Guérot C. Élargissement compensateur versus constriction chronique. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 1997;90:827-834.
292. Labinaz M, Pels K, Hoffert C, Aggarwal S, O'Brien ER. Time course and importance of neoadventitial formation in arterial remodeling following balloon angioplasty of porcine coronary arteries. *Cardiovasc Res.* 1999;41:255-266.
293. de Smet BJGL, van der Zande J, van der Helm YJM, Kuntz RE, Borst C, Post MJ. The atherosclerotic Yucatan animal model to study the arterial response after balloon angioplasty: the natural history of remodeling. *Cardiovasc Res.* 1998;39:224-232.
294. Post MJ, Borst C, Kuntz RE. The relative importance of arterial remodeling compared with intimal hyperplasia in lumen renarrowing after balloon angioplasty. A study in the normal rabbit and the hypercholesterolemic yucatan micropig. *Circulation.* 1994;89:2816-2821.
295. Andersen HR, Maeng M, Thorwest M, Falk E. Remodeling rather than neointimal formation explains luminal narrowing after deep vessel wall injury. Insights from a porcine coronary (re)stenosis model. *Circulation.* 1996;93:1716-1724.
296. Guzman LA, Mick MJ, Arnold AM, Forudi F, Whitlow P. Role of intimal hyperplasia and arterial remodeling after balloon angioplasty. An experimental study in the atherosclerotic rabbit model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:479-487.
297. Lafont A, Guzman LA, Whitlow PL, Goormastic M, Cornhill JF, Chisolm GM. Restenosis after experimental angioplasty. Intimal, medial, and adventitial changes associated with constrictive remodeling. *Circ Res.* 1995;76:996-1002.
298. Post MJ, de Smet BJGL, van der Helm Y, Borst C, Kuntz RE. Arterial remodeling after balloon angioplasty or stenting in an atherosclerotic experimental model. *Circulation.* 1997;96:996-1003.
299. Schwartz RS, Topol EJ, Serruys PW, Sangiorgi G, Holmes DR. Artery size, neointima, and remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32:2087-2094.
300. Staab ME, Srivatsa SS, Lerman A, Sangiorgi G, Ho Jeong M, Edwards WD, Holmes DR, Schwartz RS. Arterial remodeling after experimental percutaneous

- injury is highly dependent on adventitial injury histopathology. *Int J Cardiol.* 1997;58:31-40.
301. Geary RL, Williams JK, Golden D, Brown DG, Benjamin ME, Adams MR. Time course of cellular proliferation, intimal hyperplasia, and remodeling following angioplasty in monkeys with established atherosclerosis. A nonhuman primate model of restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:34-43.
302. Lafont A, Faxon D. Why do animal models of post-angioplasty restenosis sometimes poorly predicts the outcome of clinical trials? *Cardiovasc Res.* 1998;39:50-59.
303. Luo H, Nishioka T, Eigler NL, Forrester JS, Fishbein MC, Berglund H, Siegel RJ. Coronary artery restenosis after balloon angioplasty in humans is associated with circumferential coronary constriction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:1393-1398.
304. Di Mario C, Gil R, Camenzind E, Ozaki Y, von Birgelen C, Umans V, de Jaegere P, de Feyter PJ, Roelandt JRTC, Serruys PW. Quantitative assessment with intracoronary ultrasound of the mechanisms of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty and directional coronary atherectomy. *Am J Cardiol.* 1995;75:772-777.
305. Sangiorgi G, Taylor AJ, Farb A, Carter AJ, Edwards WD, Holmes DR, Schwartz RS, Virmani R. Histopathology of percutaneous transluminal coronary angioplasty remodeling in human coronary arteries. *Am Heart J.* 1999;138:681-687.
306. Nakamura Y, Zhao H, Yutani C, Imakita M, Ishibashi-Ueda H. Morphometric and histologic assessment of remodeling associated with restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Cardiology.* 1998;90:115-121.
307. Geary RL, Nikkari ST, Wagner WD, Williams K, Adams MR, Dean RH. Wound healing: a paradigm for lumen narrowing after arterial reconstruction. *J Vasc Surg.* 1998;27:96-108.
308. Nakahara K, Okamoto E-i, Galis ZS, Scott NA, Wilcox JN. Adventitial expression of MMP-1, MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 during vascular remodeling after angioplasty of porcine coronary arteries. *Circulation.* 1999;100 (Suppl):I-700. Abstract.

309. Tanaka H, Sukhova GK, Swanson SJ, Clinton SK, Ganz P, Cybulsky MI, Libby P. Sustained activation of vascular cells and leukocytes in the rabbit aorta after balloon injury. *Circulation*. 1993;88:1788-1803.
310. O'Brien KD, McDonald Thomas O, Chait A, Alen MD, Alpers CE. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation*. 1996;93:672-682.
311. Okamoto E, De Leon H, Subramanian RR, Wilcox JN. Adventitial expression of MCP-1 and cell adhesion molecules after balloon angioplasty of the rat carotid artery. Potential role in vascular remodeling? *Circulation*. 1999;100 (Suppl):I-690. Abstract.
312. Pels K, Labinaz M, Hoffert C, O'Brien ER. Adventitial angiogenesis early after coronary angioplasty. Correlation with arterial remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:229-238.
313. Coté G, Tardif J-C, Lespérance J, Lambert J, Bourassa M, Bonan R, Gosselin G, Joyal M, Tanguay J-F, Nattel S, Gallo R, Crépeau J. Effects of probucol on vascular remodeling after coronary angioplasty. *Circulation*. 1999;99:30-35.
314. Tardif JC, Coté G, Lespérance J, Bourassa M, Lambert J, Doucet S, Bilodeau L, Nattel S, de Guise P. Probucol and multivitamins in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. *N Engl J Med*. 1997;337:365-372.
315. Ku G, Doherty NS, Wolos JA, Jackson RL. Inhibition by probucol of interleukin 1 secretion and its implication in atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 1988;62:77B-81B.
316. Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med*. 1994;330:1431-1438.
317. Tronc F, Wassef M, Esposito B, Henrion D, Glacov S, Tedgui A. Role of NO in flow-induced remodeling of the rabbit common carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:1256-1262.
318. Ben Driss A, Benessiano J, Poitevin P, Levy BI, Michel J-B. Arterial expansive remodeling induced by high flow rates. *Am J Physiol*. 1997;272:H851-H858.
319. Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest*. 1998;101:731-736.

320. Le Tourneau T, Van Belle E, Corseaux D, Vallet B, Lebuffe G, Dupuis B, Lablanche J-M, McFadden E, Bauters C, Bertrand ME. Role of nitric oxide in restenosis after experimental balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit: effects on neointimal hyperplasia and vascular remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 1999;33:876-882.
321. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van de Putte LBA, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 1998;12:1063-1073.
322. Collier BS. Potential non-glycoprotein IIb/IIIa effects of abciximab. *Am Heart J.* 1999;138:S1-S5.
323. Konstantopoulos K, Kamat SG, Schafer AI, Banez EI, Jordan R, Kleiman NS, Hellums JD. Shear-induced platelet aggregation is inhibited by in vivo infusion of an anti-glycoprotein IIb/IIIa antibody fragment, c7E3 Fab, in patients undergoing coronary angioplasty. *Circulation.* 1995;91:1427-1431.
324. Madan M, Berkowitz SD, Tchong JE. Glycoprotein IIb/IIIa integrin blockade. *Circulation.* 1999;98:2629-2635.
325. Bhatt DL, Marso SP, Lincoff AM, Wolski KE, Ellis SG, Topol EJ. Abciximab reduces mortality in diabetics following percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35:922-928.
326. Lincoff MA, Califf RM, Moliterno DJ, Ellis SG, Ducas J, Kramer JH, Kleiman NS, Cohen EA, Booth JE, Sapp SK, Cabot CF, Topol EJ. Complementary clinical benefits of coronary-artery stenting and blockade of platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors. *N Engl J Med.* 1999;341:319-327.
327. Barry WL, Wiegman PJ, Gimple LW, Gertz DS, Powers ER, Owens GK, Sarembock IJ. A new single-injury model of balloon angioplasty in cholesterol-fed rabbits: beneficial effect of hirudin and comparison with double-injury model. *Lab Invest.* 1997;77:109-116.
328. Currier JW, Pow TK, Haudenschild CC, Minihan AC, Faxon DP. Low molecular weight heparin (enoxaparin) reduces restenosis after iliac angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit. *J Am Coll Cardiol.* 1991;17:118B-125B.
329. Faxon DP, Spiro TE, Minor S, Coté G, Douglas J, Gottlieb R, Califf R, Dorosti K, Topol E, Gordon JB, Ohmen M. Low molecular weight heparin in prevention of

- restenosis after angioplasty. Results of enoxaparine restenosis (ERA) trial. *Circulation*. 1994;90:908-914.
330. Thome LM, Gimple LW, Bachhuber BG, McNamara CA, Ragosta M, Gertz SD, Powers ER, Owens GK, Humphries JE, Sarembock IJ. Early plus delayed hirudin reduces restenosis in the atherosclerotic rabbit more than early administration alone: potential implications for dosing of antithrombotic agents. *Circulation*. 1998;98:2301-2306.
331. Golino P, Ambrosio G, Ragni M, Cirillo P, Esposito N, Willerson JT, Rothlein R, Petrucci L, Condorelli M, Chiariello M, Buja LM. Inhibition of leucocyte and platelet adhesion reduces neointimal hyperplasia after arterial injury. *Thromb Haemost*. 1997;77:783-788.
332. Kumar A, Hoover JL, Simmons CA, Volkhard L, Shebuski RJ. Remodeling and neointimal formation in the carotid artery of normal and P-selectin-deficient mice. *Circulation*. 1997;96:4333-4342.
333. Hayashi S-I, Watanabe N, Suzuki J-I, Tamatani T, Sakamoto S, Isobe M. Roles of P-selectin-dependent adhesion in leukocyte-platelet interactions and inflammations in balloon injured arteries. *Circulation*. 1999;100 (Suppl):I-810. Abstract.
334. Liu MW, Roubin GS, Robinson KA, Black AJ, Siegel RJ, King SB. Trepidil in preventing restenosis after balloon angioplasty in the atherosclerotic rabbit. *Circulation*. 1990;81:1089-1093.
335. Tiell ML, Sussman IL, Gordon PB, Saunders RN. Suppression of fibroblast proliferation in vitro and of myointimal hyperplasia in vivo by the triazolopyridine, trapidil. *Artery*. 1983;12:33-50.
336. Maresta A, Balducelli M, Cantini L, Casari A, Chioin R, Fabbri M, Fontanelli A, Monici Preti PA, Repetto S, De Servi S. Trepidil, (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.
337. Rakugi H, Kim D-K, Krieger JE, Wang DS, Dzau VJ, Pratt RE. Induction of angiotensin converting enzyme in the neointima after vascular injury. *J Clin Invest*. 1994;93:339-346.

338. Cheng JWM, Ngo MN. Current perspective on the use of angiotensin-converting enzyme inhibitors in the management of coronary (atherosclerotic) artery disease. *Ann Pharmacother*. 1997;31:1499-1506.
339. 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.
340. Lam JYT, Lacoste L, Bourassa MG. Cilazapril and early atherosclerotic changes after balloon injury of porcine carotid arteries. *Circulation*. 1992;85:1542-1547.
341. Huber KC, Schwartz RS, Edwards WD, Camrud AR, Bailey KR, Jorgensen MA, Holmes DR. Effects of angiotensin converting enzyme inhibition on neointimal proliferation in a porcine coronary injury model. *Am Heart J*. 1993;125:695-701.
342. Faxon DP. Effect of high dose angiotensin-converting enzyme inhibition on restenosis: final results of the MARCATOR Study, a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial of cilazapril. *J Am Coll Cardiol*. 1995;25:362-369.
343. MERCATOR study g. 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;86:100-110.
344. Soma MR, Donetti E, Parolini C, Mazzani G, Ferrari C, Fumagalli R, Paoletti R. HMG CoA reductase inhibitors. In vivo effects on carotid intimal thickening in normocholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:571-578.
345. Ferns GA, Forster L, Stewart-Lee A, Konneh M, Nourooz-Zadeh J, Angg ard EE. Probucol inhibits neointimal thickening and macrophage accumulation after balloon injury in the cholesterol-fed rabbit. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:11312-11316.
346. Schneider JE, Berk BC, Gravanis MB, Santoian EC, Cipolla GD, Tarazona N, Lassegue B, King SB. Probucol decreases neointimal formation in a swine model of coronary artery balloon injury. A possible role for antioxidants in restenosis. *Circulation*. 1993;88:628-637.
347. Bauters C, Mc Fadden EP, Lablanche J-M, Quandalle P, Bertrand ME. Restenosis rate after multiple percutaneous transluminal coronary angioplasty procedures at the same site. *Circulation*. 1993;88:969-974.

348. Eltchaninoff H. Traitement curatif de la resténose. *Arch Mal Coeur*. 1999;92:1589-1593.
349. Wong CS, Leon MB, Popma JJ. New device angioplasty: the impact on restenosis. *Coron Artery Dis*. 1993;4:243-253.
350. Neumann F-J, Gawaz M, Ott I, May A, Mossmer G, Schomig A. Prospective evaluation of hemostatic predictors of subacute stent thrombosis after coronary Palmaz-Schatz stenting. *J Am Coll Cardiol*. 1996;27:15-21.
351. Schomig A, Neumann FJ, Walter H, Schuhlen H, Hadamitzky M, Zitzmann-Roth EM, Dirschinger J, Hausleiter J, Blasini R, Schmitt C, Alt E, Kastrati A. Coronary stent placement in patients with acute myocardial infarction: comparison of clinical and angiographic outcome after randomization to antiplatelet or anticoagulant therapy. *J Am Coll Cardiol*. 1997;29:28-34.
352. Schomig A, Neumann FJ, Kastrati A, Schuhlen H, Blasini R, Hadamitzky M, Walter H, Zitzmann-Roth EM, Richardt G, Alt E, Schmitt C, Ulm K. A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents. *N Engl J Med*. 1996;334:1084-1089.
353. Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickk G, Emanuelsson H, Marco J, Legrand V, Materne P, Belardi J, Sigwart U, Colombo A, Goy JJ, van den Heuvel P, Delcan J, Morel M-A. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*. 1994;331:489-495.
354. Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, Detre K, Veltri L, Ricci D, Nobuyoshi M, Cleman M, Heuser R, Almond D, Teirstein PS, Fish RD, Colombo A, Brinker J, Moses J, Shaknovich A, Hirshfeld J, Bailey S, Ellis S, Rake R, Goldberg S. A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. *N Engl J Med*. 1994;331:496-501.
355. Stone GW, Brodie BR, Griffin JJ, Costantino C, Morice MC, St. Goar FG, Overlie PA, Popma JJ, McDonnell J, Jones D, O'Neill WW, Grines CL. Clinical and angiographic follow-up after primary stenting in acute myocardial infarction. *Circulation*. 1999;99:1548-1554.

356. Benestent-I study g. Continued benefit of coronary stenting versus balloon angioplasty: five-year clinical follow-up of Benestent-I trial. *Circulation*. 1999;100 (Suppl):I-233. Abstract.
357. Strauss BH, Umans VA, van Suylen RJ, de Feyter PJ, Marco J, Robertson GC, Renkin J, Heyndrickx G, Vuzevski VD, Bosman FT. Directional atherectomy for treatment of restenosis within coronary stents: clinical, angiographic and histologic results. *J Am Coll Cardiol*. 1992;20:1465-1473.
358. Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vliestra RE, Holmes DR. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol*. 1992;19:267-274.
359. Karas SP, Gravanis MB, Santoian EC, Robinson KA, Anderberg KA, King III SB. Coronary intimal proliferation after balloon injury and stenting in swine: an animal model of restenosis. *J Am Coll Cardiol*. 1992;20:467-474.
360. Hoffmann R, Mintz GS, Dussailant GR, Popma JJ, Pichard AD, Satler LF, Kent KM, Griffin J, Leon MB. Patterns and mechanisms of in-stent restenosis. *Circulation*. 1996;94:1247-1254.
361. Hoffmann R, Mintz GS, Mehran R, Kent KM, Pichard AD, Satler LF, Leon MB. Tissue proliferation within and surrounding Palmaz-Schatz stents is dependent on the aggressiveness of stent implantation technique. *Am J Cardiol*. 1999;83:1170-1174.
362. Kornowski R, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Wu H, Leon MB. In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31:224-230.
363. Eltchaninoff H, Koning R, Tron C, Gupta V, Cribier A. Balloon angioplasty for the treatment of coronary in-stent restenosis: immediate results and 6-month angiographic recurrent restenosis rate. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32:980-984.
364. Sharma SK, Duvvuri S, Dangas G, Kini A, Vidhun R, Venu K, Ambrose JA, Marmur JD. Rotational atherectomy for in-stent restenosis: acute and long-term results of the first 100 cases. *J Am Coll Cardiol*. 1999;32:1358-1365.
365. Lauer B, Schmidt E, Ambrosch H, Steinbrink S, Diederich K-W, Zotz RJ, Krankenberg H, Kuhn A, Sick PB, Schuler G. In-stent restenosis: rotational

- atherectomy, excimer laser angioplasty or conventional balloon angioplasty? *Circulation*. 1999;100 (Suppl):I-449. Abstract.
366. Al-Sergani HS, Ho PC, Nesto RW, Lewis SM, Leeman D, Fitzpatrick P, Mittleman M, Waxman S, Shubrooks SJ. Stenting for in-stent restenosis: a long-term clinical follow-up. *Catheter Cardiovasc Interv*. 1999;48:143-148.
367. Mazur W, Ali MN, Khan MM, Dabaghi SF, DeFelice CA, Paradis P, Butler EB, Wright AE, Fajardo LF, French BA, Raizner AE. High dose rate intracoronary radiation for inhibition of neointimal formation in the stented and balloon-injured porcine models of restenosis: angiographic, morphometric, and histopathologic analyses. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1996;36:777-788.
368. Carter AJ, Laird JR. Experimental results with endovascular irradiation via a radioactive stent. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1996;36:797-803.
369. Fortunato JE, Glagov S, Bassiouny HS. Irradiation for the treatment of intimal hyperplasia. *Ann Vasc Surg*. 1998;12:495-503.
370. Teirstein PS, Massullo V, Jani S, Popma JJ, Mintz GS, Russo RJ, Schatz RA, Guarneri EM, Steuterman S, Morris NB, Leon MB, Tripuraneni P. Catheter-based radiotherapy to inhibit restenosis after coronary stenting. *N Engl J Med*. 1997;336:1697-1703.
371. Kiesz RS, Buszman P, Martin JL, Deutsch E, Gaszewska E, Rewicki M, Seweryniak P, Kosmider M, Tendera M. Local delivery of enoxaparin to decrease restenosis after stenting: the POLONIA study. *Circulation*. 1999;100 (Suppl):I-468. Abstract.
372. Fishman JA, Ryan GB, Karnovsky MJ. Endothelial regeneration in the rat carotid artery and the significance of endothelial denudation in the pathogenesis of myointimal thickening. *Lab Invest*. 1975;32:339-351.
373. De Meyer GRY, Bult H. Mechanisms of neointima formation - lessons from experimental models. *Vasc Med*. 1997;2:179-189.
374. Muller DW, Ellis SG, Topol EJ. Experimental models of coronary artery restenosis. *J Am Coll Cardiol*. 1992;19:418-432.
375. Sims FH. A comparison of structural features of the walls of coronary arteries from 10 different species. *Pathology*. 1989;21:115-124.

376. Anderson PG. Restenosis: Animal models and morphometric techniques in studies of the vascular response to injury. *Cardiovasc Pathol*. 1992;1:263-278.
377. Lindner V, Collins T. Expression of NF- κ B and I κ B- α by aortic endothelium in an arterial injury model. *Am J Pathol*. 1996;148:427-438.
378. Carmeliet P, Moons L, Stassen J-M, De Mol M, Bouché A, van den Oord JJ, Kockx M, Collen D. Vascular wound healing and neointima formation induced by perivascular electric injury in mice. *Am J Pathol*. 1997;150:761-776.
379. 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.
380. Carmeliet P, Moons L, Collen D. Mouse models of angiogenesis, arterial stenosis, atherosclerosis and hemostasis. *Cardiovasc Res*. 1998;39:8-33.
381. Weidinger FF, McLenachan JM, Cybulsky MI, Gordon JB, Rennke HG, Hollemberg NK, Fallon JT, Ganz P, Cooke JP. Persistent dysfunction of regenerated endothelium after balloon angioplasty of rabbit iliac artery. *Circulation*. 1990;81:1667-1679.
382. Scalia R, Appel III JZ, Lefer AM. Leukocyte-endothelium interaction during the early stages of hypercholesterolemia in the rabbit; role of P-selectin, ICAM-1, and VCAM-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1093-1100.
383. Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Libby P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:197-204.
384. Van Put DJM, Van Osselaer N, De Meyer GRY, Andries LJ, Kockx MM, De Clerk LS, Bult H. Role of polymorphonuclear leukocytes in collar-induced intimal thickening in the rabbit carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:915-921.
385. Hirosumi J, Nomoto A, Ohkubo Y, Sekiguchi C, Mutoh S, Yamaguchi I, Aoki H. Inflammatory responses in cuff-induced atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*. 1987;64:243-254.
386. Kockx MM, De Meyer GR, 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.

387. Johnson GJ, Griggs TR, Badimon L. The utility of animal models in the preclinical study of interventions to prevent human coronary artery restenosis: analysis and recommendations. *Thromb Haemost.* 1999;81:835-843.
388. Andre P, dit Sollier CB, Bonneau M, Pignaud G, Hainaud P, Azzam K, Drouet L. Which experimental model to choose to study arterial thrombosis and evaluate potentially useful therapeutics? *Haemostasis.* 1996;26:55-69.
389. Mason RG, Read MS. Some species differences in fibrinolysis and blood coagulation. *J Biomed Mater Res.* 1971;5:121-128.
390. Schwartz RS, Edwards WD, Bailey KR, Camrud AR, Jorgenson MA, Holmes DR. Differential neointimal response to coronary artery injury in pigs and dogs. Implication for restenosis models. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:395-400.
391. Blaton V, Peeters H. The nonhuman primates as models for studying human atherosclerosis: Studies on the chimpanzee, the baboon and the rhesus macacus. *Adv Exp Med Biol.* 1976;67:33-64.
392. Mattsson EJR, Kohler TR, Vergel SM, Clowes AW. Increased blood flow induces regression of intimal hyperplasia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2245-2249.
393. Giese NA, Marijianowski 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.
394. Mondy JS, Williams JK, Adams MR, Dean RH, Geary RL. Structural determinants of lumen narrowing after angioplasty in atherosclerotic nonhuman primates. *J Vasc Surg.* 1997;26:875-883.
395. Deitch JS, Williams JK, Adams MR, Fly CA, Herrington DM, Jordan RE, Nakada MT, Jakubowski JA, Geary RL. Effects of β 3-integrin blockade (c7E3) on the response to angioplasty and intra-arterial stenting in atherosclerotic nonhuman primates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1730-1737.
396. Marijianowski MM, Nakada MT, Jordan RE, Jakubowski JA, Sundell BI, Kelly AB, Chronos NAF, Hanson SR. Abciximab reduces stent restenosis in non-human primates. *Circulation.* 1999;100 (Suppl):I-697. Abstract.

397. Clarkson TB, Hughes CL, Potvin Klein K. The nonhuman primate model of the relationship between gonadal steroids and coronary heart disease. *Prog Cardiovasc Dis*. 1995;38:189-198.
398. Softeland E, Framstad T, Thorsen T, Holmsen H. Porcine platelets *in vitro* and *in vivo* studies: relevance to human thrombosis research. *Eur J Haematol*. 1992;49:161-173.
399. Chibber R, Castle AG. Biochemical characterisation of porcine polymorphonuclear leucocytes: comparison with human polymorphonuclear leucocytes. *Comp Biochem Physiol*. 1983;75B:335-340.
400. Gal D, Rongione AJ, Slovenkai GA, DeJesus ST, Lucas A, Fields CD, Isner JM. Atherosclerotic Yucatan microswine: an animal model with high-grade, fibrocalcific, nonfatty lesions suitable for testing catheter-based interventions. *Am Heart J*. 1990;119:291-300.
401. de Smet BJGL, Pasterkamp G, van der Helm YJ, Borst C, Post MJ. The relation between de novo atherosclerosis remodeling and angioplasty-induced remodeling in an atherosclerotic yucatan micropig model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:702-707.
402. Groves PH, Banning AP, Penny WJ, Lewis MJ, Cheadle HA, Newby AC. Kinetics of smooth muscle cell proliferation and intimal thickening in a pig carotid model of balloon injury. *Atherosclerosis*. 1995;117:83-96.
403. Liu MW, Anderson PG, Luo JF, Roubin GS. Local delivery of ethanol inhibits intimal hyperplasia in pig coronary arteries after balloon injury. *Circulation*. 1997;96:2295-2301.
404. Schwartz RS, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vliestra RE, Holmes DR. Restenosis after balloon angioplasty. A practical proliferative model in porcine coronary arteries. *Circulation*. 1990;82:2190-2200.
405. Ali MN, Mazur W, Kleiman NS, Rodgers GP, Abukhalil JM, French BA, Raizner AE. Inhibition of coronary restenosis by antithrombin III in atherosclerotic swine. *Coron Artery Dis*. 1996;7:851-861.
406. Miller DD, Karim MA, Edwards WD, Schwartz RS. Relationship of vascular thrombosis and inflammatory leukocyte infiltration to neointimal growth following porcine coronary artery stent placement. *Atherosclerosis*. 1996;124:145-155.

407. Yamawaki T, Shimokawa H, Kozai T, Miyata K, Higo T, Tanaka E, Egashira K, Shiraishi T, Tamai H, Igaki K, Takeshita A. Intramural delivery of a specific tyrosine kinase inhibitor with biodegradable stent suppresses the restenotic changes of the coronary artery in pigs in vivo. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32:780-786.
408. Badimon JJ, Ortiz AF, Meyer B, Mailhac A, Fallon JT, Falk E, Badimon L, Chesebro JH, Fuster V. Different response to balloon angioplasty of carotid and coronary arteries: effects on acute platelet deposition and intimal thickening. *Atherosclerosis*. 1998;140:307-314.
409. Karim A. Inflammatory response to coronary artery stenting. *Circulation*. 1997;96:2091-2092.
410. Grinstead WC, Rodgers GP, Mazur W, French BA, Cromeens D, Van Pelt C, West SM, Raizner AE. Comparison of three porcine restenosis models: the relative importance of hypercholesterolemia, endothelial abrasion, and stenting. *Coron Artery Dis*. 1994;5:425-434.
411. Bonan R, Paiement P, Scorticini D, Cloutier M-J, Leung TK. Coronary restenosis: evaluation of a restenosis injury index in a swine model. *Am Heart J*. 1993;126:1334-1340.
412. Bonan R, Paiement P, Leung TK. Swine model of coronary restenosis: effect of a second injury. *Cathet Cardiovasc Diagn*. 1996;38:44-49.
413. Lafont A, Durand E, Samuel JL, Besse B, Addad F, Lévy BI, Desnos M, Guérot C, Boulanger CM. Endothelial dysfunction and collagen accumulation. Two independent factors for restenosis and constrictive remodeling after experimental angioplasty. *Circulation*. 1999;100:1109-1115.
414. Myllarniemi LM, Rasilainen SK, Lemstrom KB, Hayry PJ. Enhanced intimal proliferation upon injury to pre-existing neointima and resistance of neointimal cells to cell death. *Cardiovasc Pathol*. 1999;8:339-347.
415. Schwartz RS, Chu A, Edwards WD, Srivatsa SS, Simari RD, Isner JM, Holmes DR. A proliferation analysis of arterial neointimal hyperplasia: lessons for antiproliferative restenosis therapies. *Int J Cardiol*. 1996;53:71-80.

416. Currier JW, Faxon DP. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: have we been aiming at the wrong target. *J Am Coll Cardiol.* 1995;25:516-520.
417. Faxon DP, Currier JW. Prevention of post-PTCA restenosis. *Ann NY Acad Sci.* 1995;748:419-427.
418. Yamabe T, Imazu M, Yamamoto H, Ueda H, Hattori Y, Hayashi Y, Sekiguchi Y, Ito M, Yamakido M. Effects of cilazapril on vascular restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Coron Artery Dis.* 1995;6:573-579.
419. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood.* 1997;89:3503-3521.
420. Sengelov H, Kjeldsen L, Diamond MS, Springer TA, Borregaard N. Subcellular localization and dynamics of Mac-1 ($\alpha_m\beta_2$) in human neutrophils. *J Clin Invest.* 1993;92:1467-1476.
421. Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science.* 1995;268:233-239.
422. Crockett-Torabi E, Sulenbarger B, Smith CW, Fantone JC. Activation of human neutrophils through L-selectin and Mac-1 molecules. *J Immunol.* 1995;154:2291-2302.
423. Ley K. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc Res.* 1996;32:733-742.
424. Mazzoni MC, Schmid-Schönbein GW. Mechanisms and consequences of cell activation in the microcirculation. *Cardiovasc Res.* 1996;32:709-719.
425. Kitchen E, Rossi AG, Condliffe AM, Haslett C, Chilvers ER. Demonstration of reversible priming of human neutrophils using platelet-activating factor. *Blood.* 1996;88:4330-4337.
426. LeVan TD, Dow SB, Chase PB, Bloom JW, Regan JW, Cunningham E, Halonen M. Evidence for platelet-activating factor receptor subtypes on human polymorphonuclear leukocyte membranes. *Biochem Pharmacol.* 1997;54:1007-1012.
427. Swain SD, Bunker PL, Sipes KM, Nelson LK, Jutila KL, Boylan SM, Quinn MT. Platelet-activating factor induces a concentration-dependent spectrum of functional responses in bovine neutrophils. *J Leukoc Biol.* 1998;64:817-827.

428. Maugeri N, Evangelista V, Celardo A, Dell'Elba G, Martelli N, Piccardoni P, de Gaetano G, Cerletti C. Polymorphonuclear leukocyte-platelet interaction: role of P-selectin in thromboxane B₂ and leukotriene C₄ cooperative synthesis. *Thromb Haemost.* 1994;72:450-456.
429. Renesto P, Chignard M. Neutrophil-mediated platelet activation: a key role for serine proteinases. *Gen Pharmac.* 1995;26:905-910.
430. Evangelista V, Piccardoni P, White JG, de Gaetano G, Cerletti C. Cathepsin G-dependent platelet stimulation by activated polymorphonuclear leukocytes and its inhibition by antiproteinases: role of P-selectin-mediated cell-cell adhesion. *Blood.* 1993;81:2947-2957.
431. Si-Tahar M, Pidard D, Balloy V, Moniatte M, Kieffer N, Van Dorsselaer A, Chignard M. Human neutrophil elastase proteolytically activates the platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ through cleavage of the carboxyl terminus of the α_{IIb} subunit heavy chain. *J Biol Chem.* 1997;272:11636-11647.
432. Weissmann G, Smolen JE, Korchak HM. Release of inflammatory mediators from stimulated neutrophils. *N Engl J Med.* 1980;303:27-34.
433. Body SC. Platelet activation and interactions with the microvasculature. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1996;27:S13-S25.
434. Cramer EM, Savidge GF, Vainchenker W, Berndt MC, Pidard D, Caen JP, Massé J-M, Breton-Gorius J. Alpha-granule pool of glycoprotein IIb-IIIa in normal and pathological platelets and megakaryocytes. *Blood.* 1990;75:1220-1227.
435. Berman CL, Yeo EL, Wencel-Drake JD, Furie BC, Ginsberg MH, Furie B. A platelet alpha granule membrane protein that is associated with the plasma membrane after activation. *J Clin Invest.* 1986;78:130-137.
436. Israels SJ, Gerrard JM, Jacques YV, McNicol A, Cham B, Nishibori M, Bainton DF. Platelet dense granule membranes contain both granulophysin and P-selectin (GMP-140). *Blood.* 1992;80:143-152.
437. Youssefian T, Massé J-M, Rendu F, Guichard J, Cramer EM. Platelet and megakaryocyte dense granules contain glycoproteins Ib and IIb-IIIa. *Blood.* 1997;89:4047-4057.
438. Clemetson KJ. Platelet collagen receptors: a new target for inhibition? *Haemostasis.* 1999;29:16-26.

439. Colman RW. Mechanisms of thrombus formation and dissolution. *Cardiovasc Pathol.* 1993;2:23S-31S.
440. Ruggeri ZM. Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thromb Haemost.* 1997;78:611-616.
441. Gachet C, Hechler B, Léon C, Vial C, Leray C, Ohlmann P, Cazenave J-P. Activation of ADP receptors and platelet function. *Thromb Haemost.* 1997;78:271-275.
442. Mills DCB. ADP receptors on platelets. *Thromb Haemost.* 1996;76:835-856.
443. Maclouf J, Folco G, Patrono C. Eicosanoids and iso-eicosanoids: constitutive, inducible and transcellular biosynthesis in vascular disease. *Thromb Haemost.* 1998;79:691-705.
444. Brown KK, Henson PM, Maclouf J, Moyle M, Ely JA, Worthen GS. Neutrophil-platelet adhesion: relative roles of platelet P-selectin and neutrophil β_2 (CD18) integrins. *Am J Respir Cell Mol.* 1998;18:100-110.
445. Lewis RA, Austen F, Soberman RJ. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. *N Engl J Med.* 1990;323:645-655.
446. Del Maschio A, Dejana E, Bazzoni G. Bidirectional modulation of platelet and polymorphonuclear leukocyte activities. *Ann Hematol.* 1993;67:23-31.
447. Scalia R, Gefen J, Petasis NA, Serhan CN, Lefer AM. Lipoxin A₄ stable analogs inhibit leukocyte rolling and adherence in the rat mesenteric microvasculature: role of P-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:9967-9972.
448. Maugeri N, Evangelista V, Piccardoni P, Dell'Elba G, Celardo A, de Gaetano G, Cerletti C. Transcellular metabolism of arachidonic acid: increased platelet thromboxane generation in the presence of activated polymorphonuclear leukocytes. *Blood.* 1992;80:447-451.
449. Siminiak T, Flores NA, Sheridan DJ. Neutrophil interactions with endothelium and platelets: possible role in the development of cardiovascular injury. *Eur Heart J.* 1995;16:160-170.
450. Coëffier E, Delautier D, Le Couedic J, Chignard M, Denizot Y, Benveniste J. Cooperation between platelets and neutrophils for PAF-acether (platelet activating factor) formation. *J Leukoc Biol.* 1990;47:234-243.

451. Cohen AB, Stevens MD, Miller EJ, Atkinson MA, Mullenbach G. Generation of the neutrophil-activating peptide-2 by cathepsin G and cathepsin G-treated human platelets. *Am J Physiol.* 1992;263:L249-L256.
452. López-Farré A, Caramelo C, Esteban A, Alberola ML, Millás I, Montón M, Casado S. Effects of aspirin on platelet-neutrophil interactions. *Circulation.* 1995;91:2080-2088.
453. Valles J, Santos MT, Marcus AJ, Safier LB, Broekman MJ, Islam N, Ullman HL, Aznar J. Downregulation of human platelet reactivity by neutrophils. Participation of lipoxygenase derivatives and adhesion proteins. *J Clin Invest.* 1993;92:1357-1365.
454. Rollins BJ. Chemokines. *Blood.* 1997;90:909-928.
455. Celi A, Pellegrini G, Lorenzet R, De Blasi A, Ready N, Furie BC, Furie B. P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:8767-8771.
456. Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B, Fallon JT, Badimon JJ, Riederer MA, Nemerson Y. Leukocytes transfer tissue factor to platelets during thrombosis. *Circulation.* 1999;100 (Suppl I):I-610. Abstract.
457. Moore KL, Patel KD, Bruehl RE, Fugang L, Johnson DA, Lichenstein HS, Cummings RD, Bainton DF, McEver RP. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol.* 1995;128:661-671.
458. Buttrum SM, Hatton R, Nash GB. Selectin-mediated rolling of neutrophils on immobilized platelets. *Blood.* 1993;82:1165-1174.
459. Nagata K, Tsuji T, Todoroki N, Katagiri Y, Tanoue K, Yamazaki H, Hanai N, Irimura T. Activated platelets induce superoxide anion release by monocytes and neutrophils through P-selectin (CD62). *J Immunol.* 1993;151:3267-3273.
460. Ostrovsky L, King AJ, Bond S, Mitchell D, Lorant DE, Zimmerman GA, Larsen R, Niu XF, Kubes P. A juxtacrine mechanism for neutrophil adhesion on platelets involves platelet-activating factor and a selectin-dependent activation process. *Blood.* 1998;91:3028-3036.
461. Weber C, Springer TA. Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of MAC-1 with fibrinogen bound to

- α IIb β 3 and stimulated by platelet-activating factor. *J Clin Invest.* 1997;100:2085-2093.
462. Smyth SS, Joneckis CC, Parise LV. Regulation of vascular integrins. *Blood.* 1993;81:2827-2843.
463. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 1992;69:11-25.
464. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood.* 1994;84:2068-2101.
465. Elangbam CS, Qualls CW, Dahlgren RR. Cell adhesion molecules-update. *Vet Pathol.* 1997;34:61-73.
466. Tuckwell DS, Weston SA, Humphries MJ. Integrins: a review of their structure and mechanisms of ligand binding. *Symp Soc Exp Biol.* 1993;47:107-136.
467. Freed E, Gailit J, van der Geer P, Ruoslahti E, Hunter T. A novel β subunit is associated with the vitronectin receptor α subunit (αv) in a human osteosarcoma cell line and is a substrate for protein kinase C. *EMBO J.* 1989;8:2955-2965.
468. Bohnsack JF, Zhou X-N. Divalent cation substitution reveals CD18- and very late antigen-dependent pathways that mediate human neutrophil adherence to fibronectin. *J Immunol.* 1992;149:1340-1347.
469. Kubes P, Niu X-F, Smith CW, Kehrl ME, Reinhardt PH, Woodman RC. A novel β 1-dependent adhesion pathway on neutrophils: a mechanism invoked by dihydrocytochalasin B or endothelial transmigration. *FASEB J.* 1995;9:1103-1111.
470. Frieser M, Hallman R, Johanson S, Vestweber D, Goodman SL, Sorokin L. Mouse polymorphonuclear granulocyte binding to extracellular matrix molecules involves β 1 integrins. *Eur J Immunol.* 1996;26:3127-3136.
471. Rieu P, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Evidence for integrins other than β 2 on polymorphonuclear neutrophils: expression of $\alpha_6\beta$ 1 heterodimer. *J Leukoc Biol.* 1993;53:576-582.
472. Mecham RP. Receptors for laminin on mammalian cells. *FASEB J.* 1991;5:2538-2546.
473. Bohnsack JF. CD11/CD18-independent neutrophil adherence to laminin is mediated by the integrin VLA-6. *Blood.* 1992;79:1545-1552.

474. Wei J, Shaw LM, Mercurio AM. Integrin signaling in leukocytes: lesson from the $\alpha_6\beta_1$ integrin. *J Leukoc Biol.* 1997;61:397-407.
475. Leuenroth S, Isaacson E, Lee C, Keeping H, Simms HH. Integrin regulation of polymorphonuclear leukocyte apoptosis during hypoxia is primarily dependent on very late activation antigens 3 and 5. *Surgery.* 1997;122:153-162.
476. Suchard SJ. Interaction of human neutrophils and HL-60 cells with the extracellular matrix. *Blood Cells.* 1993;19:197-223.
477. Reinhardt PH, Elliott JF, Kubes P. Neutrophils can adhere via $\alpha_4\beta_1$ -integrin under flow conditions. *Blood.* 1997;89:3837-3846.
478. Jang Y, Lincoff M, Plow EF, Topol EJ. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 1994;24:1591-1601.
479. Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest.* 1992;90:1138-1144.
480. Libby P, Li H. Vascular cell adhesion molecule-1 and smooth muscle cell activation during atherogenesis. *J Clin Invest.* 1993;92:538-539.
481. Bainton DF, Miller LJ, Kishimoto TK, Springer TA. Leukocyte adhesion receptors are stored in peroxidase-negative granules of human neutrophils. *J Exp Med.* 1987;166:1641-1653.
482. Miller LJ, Bainton DF, Borregaard N, Springer TA. Stimulated mobilization of monocyte Mac-1 and p150,95 adhesion proteins from an intracellular vesicular compartment to the cell surface. *J Clin Invest.* 1987;80:535-544.
483. Diamond MS, Springer TA. A subpopulation of Mac-1 (CD11b/CD18) molecules mediates neutrophil adhesion to ICAM-1 and fibrinogen. *J Cell Biol.* 1993;120:545-556.
484. Dustin ML, Garcia-Aguilar J, Hibbs ML, Larson RS, Stacker SA, Staunton DE, Wardlaw AJ, Springer TA. Structure and regulation of the leukocyte adhesion receptor LFA-1 and its counterreceptors, ICAM-1 and ICAM-2. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1989;54:753-765.

485. Altieri DC, Agbanyo FR, Plescia J, Ginsberg MH, Edgington TS, Plow EF. A unique recognition site mediates the interaction of fibrinogen with the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Biol Chem*. 1990;265:12119-12122.
486. Altieri DC, Plescia J, Plow EF. The structural motif glycine 190-valine 202 of the fibrinogen γ chain interacts with CD11b/CD18 integrin ($\alpha_M\beta_2$, Mac-1) and promotes leukocyte adhesion. *J Biol Chem*. 1993;268:1847-18533.
487. Diamond MS, Garcia-Aguilar J, Bickford JK, Corbi AL, Springer TA. The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. *J Cell Biol*. 1993;120:1031-1043.
488. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today*. 1994;15:74-80.
489. Loike JD, Silverstein R, Wright SD, Weitz JI, Huang AJ, Silverstein SC. The role of protected extracellular compartments in interactions between leukocytes, and platelets, and fibrin/fibrinogen matrices. *Ann NY Acad Sci*. 1992;667:163-172.
490. Loike JD, Sodeik B, Cao L, Leucona S, Weitz JI, Detmers PA, Wright SD, Silverstein SC. CD11c/CD18 on neutrophils recognizes a domain at the N terminus of the A α chain of fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:1044-1048.
491. Chen S, Alon R, Fuhlbrigge RC, Springer TA. Rolling and transient tethering of leukocytes on antibodies reveal specializations of selectins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:3172-3177.
492. Lollo BA, Chan KWH, Hanson EM, Moy VT, Brian AA. Direct evidence for two affinity states for lymphocyte function-associated antigen 1 on activated T cells. *J Biol Chem*. 1993;268:21693-21700.
493. Diacovo TG, deFougerolles AR, Bainton DF, Springer TA. A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2. *J Clin Invest*. 1994;94:1243-1251.
494. Driessens MHE, van Hulten P, Zuurbier A, La Rivière G, Roos E. Inhibition and stimulation of LFA-1 and MAC-1 functions by antibodies against murine CD18. Evidence that the LFA-1 binding sites for ICAM-1, -2, and -3 are distinct. *J Leukoc Biol*. 1996;60:758-765.

495. de Fougerolles AR, Springer TA. Intercellular adhesion molecule 3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule 1 on resting lymphocytes. *J Exp Med*. 1992;175:185-190.
496. de Fougerolles AR, Qin X, Springer TA. Characterization of the function of intercellular adhesion molecule (ICAM)-3 and comparison with ICAM-1 and ICAM-2 in immune responses. *J Exp Med*. 1994;179:619-629.
497. Prieto J, Eklund A, Patarroyo M. Regulated expression of integrins and other adhesion molecules during differentiation of monocytes into macrophages. *Cell Immunol*. 1994;156:191-211.
498. Moroi M, Jung SM. Platelet receptors for collagen. *Thromb Haemost*. 1997;78:439-444.
499. Saelman EUM, Nieuwenhuis HK, Hese KM, de Groot PG, Heijnen HFG, Sage EH, Williams S, McKeown L, Gralnick HR, Sixma JJ. Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa ($\alpha_2\beta_1$ -integrin). *Blood*. 1994;83:1244-1250.
500. Sonnenberg A, Modderman PW, Hogervorst F. Laminin receptor on platelets is the integrin VLA-6. *Nature*. 1988;336:487-489.
501. Piotrowicz RS, Orzechowski RP, Nugent DJ, Yamada KY, Kunicki TJ. Glycoprotein Ic-IIa functions as an activation-independent fibronectin receptor on human platelets. *J Cell Biol*. 1988;106:1359-1364.
502. Philips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood*. 1988;71:831-843.
503. Shattil SJ. Regulation of platelet anchorage and signaling by integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *Thromb Haemost*. 1993;70:224-228.
504. Du X, Ginsberg MH. Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and platelet function. *Thromb Haemost*. 1997;78:96-100.
505. Fujimura K, Phillips DR. Calcium cation regulation of glycoprotein IIb-IIIa complex formation in platelet plasma membrane. *J Biol Chem*. 1983;258:10247-10252.
506. Bennett JS. Mechanisms of platelet adhesion and aggregation: an update. *Hosp Pract*. 1992;April 15:124-140.

507. Peerschke EI, Zucker MB, Grant RA, Egan JJ, Johnson MM. Correlation between fibrinogen binding to human platelets and platelet aggregability. *Blood*. 1980;55:841-847.
508. Beer J, Collier BS. Evidence that platelet glycoprotein IIIa has a large disulfide-bonded loop that is susceptible to proteolytic cleavage. *J Biol Chem*. 1989;264:17564-17573.
509. Calvete JJ. Clues for understanding the structure and function of a prototypic human integrin: the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex. *Thromb Haemost*. 1994;72:1-15.
510. Calvete JJ. Platelet integrin GpIIb/IIIa: structure-function correlations. An update and lessons from other integrins. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999;222:29-38.
511. Cierniewski CS, Byzova T, Papierak M, Haas TA, Niewiarowska J, Zhang L, Cieslak M, Plow EF. Peptide ligands can bind to distinct sites in integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and elicit different functional responses. *J Biol Chem*. 1999;274:16923-16932.
512. Frojmovic MM. Platelet aggregation in flow: differential roles for adhesive receptors and ligands. *Am Heart J*. 1998;135:S119-S131.
513. Lefkovits J, Plow EF, Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med*. 1995;332:1553-1559.
514. Shattil SJ, Ginsberg MH. Integrin signaling in vascular biology. *J Clin Invest*. 1997;100:1-5.
515. Furman MI, Gardner TM, Goldschmidt-Clermont PJ. Mechanisms of cytoskeletal reorganization during platelet activation. *Thromb Haemost*. 1993;70:229-232.
516. Hers I, Donath J, van Willigen G, Akkerman JWN. Differential involvement of tyrosine kinase and serine/threonine kinases in platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ exposure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:404-414.
517. Narumiya S. The small GTPase Rho : cellular functions and signal transduction. *J Biochem*. 1996;120:215-228.
518. Jennings LK, White MM, Mandrell TD. Interspecies comparison of platelet aggregation, LIBS expression and clot retraction: observed differences in GPIIb-IIIa functional activity. *Thromb Haemost*. 1995;74:1551-1556.

519. Leisner TM, Wencel-Drake JD, Wang W, Lam SC. Bidirectional transmembrane modulation of integrin α IIb β 3 conformations. *J Biol Chem.* 1999;274:12945-12949.
520. Loftus JC, Liddington RC. New insights into integrin-ligand interaction. *J Clin Invest.* 1997;99:2302-2306.
521. Van Willigen G, Akkerman J-WN. Regulation of glycoprotein IIb/IIIa exposure on platelets stimulated with α -thrombin. *Blood.* 1992;79:82-90.
522. Schwartz MA, Ingber DE, Lawrence M, Springer TA, Lechene C. Multiple integrins share the ability to induce elevation of intracellular pH. *Exp Cell Res.* 1991;195:533-535.
523. Shattil SJ, Ginsberg MH, Brugge JS. Adhesive signaling in platelets. *Curr Opin Cell Biol.* 1994;6:695-704.
524. Weiss HJ. Flow-related platelet deposition on subendothelium. *Thromb Haemost.* 1995;74:117-122.
525. Ruggeri ZM. Mechanisms of shear-induced platelet adhesion and aggregation. *Thromb Haemost.* 1993;70:119-123.
526. Iijima K, Murata M, Nakamura K, Kitaguchi T, Handa M, Watanabe K, Fujimura Y, Yoshioka A, Ikeda Y. High shear stress attenuates agonist-induced, glycoprotein IIb/IIIa-mediated platelet aggregation when von Willebrand factor binding to glycoprotein Ib/IX is blocked. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;233:796-800.
527. Agbanyo FR, Sixma JJ, de Groot PG, Languino LR, Plow EF. Thrombospondin-platelet interactions. Role of divalent cations, wall shear rate, and platelet membrane glycoproteins. *J Clin Invest.* 1993;92:288-296.
528. Kowalska MA, Tuszynski GP. Interaction of thrombospondin with platelet glycoproteins GPIa-IIa and GPIIb-IIIa. *Biochem J.* 1993;295:725-730.
529. Shattil SJ. Function and regulation of the β_3 integrins in hemostasis and vascular biology. *Thromb Haemost.* 1995;74:149-155.
530. Bevilacqua M, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest.* 1993;91:379-387.
531. Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood.* 1996;88:3259-3287.
532. Varki A. Selectin ligands. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:7390-7397.

533. Foxall C, Watson SR, Dowbenko D, Fennie C, Lasky LA, Kiso M, Hasegawa A, Asa D, Brandley BK. The three members of the selectin receptor family recognize common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis^x oligosaccharide. *J Cell Biol.* 1992;117:895-902.
534. Paavonen T, Renkonen R. Selective epitope of sialyl-Lewis X and Lewis A epitopes, putative ligands for L-selectin, on peripheral lymph-node high endothelial venules. *Am J Pathol.* 1992;141:1259-1264.
535. Handa K, Nudelman ED, Stroud MR, Shiozawa T, Hakomori S-I. Selectin GM-140 (CD62; PADGEM) binds to sialosyl-Le^a and sialosyl-Le^x, and sulfated glycans modulate this binding. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;181:1223-1230.
536. Stone JP, Wagner DD. P-selectin mediates adhesion of platelets to neuroblastoma and small cell lung cancer. *J Clin Invest.* 1993;92:804-813.
537. Takada A, Ohmori K, Takahashi N, Tsuyuoka K, Yago A, Zenita K, Hasegawa A, Kannagi R. Adhesion of human cancer cells to vascular endothelium mediated by a carbohydrate antigen, sialyl Lewis^a. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;179:713-719.
538. Varki A. Selectin ligands: will the real ones please stand up? *J Clin Invest.* 1997;99:158-162.
539. Norgard KE, Moore KL, Diaz S, Stults NL, Ushiyama S, McEver RP, Cummings RD, Varki A. Characterization of a specific ligand for P-selectin on myeloid cells: a minor glycoprotein with sialylated o-linked oligosaccharides. *J Biol Chem.* 1993;268:12764-12774.
540. Hidari KI-PJ, Weyrich AS, Zimmerman GA, McEver RP. Engagement of P-selectin glycoprotein ligand-1 enhances tyrosine phosphorylation and activates mitogen-activated protein kinases in human neutrophils. *J Biol Chem.* 1997;272:28750-28756.
541. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet α -granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weible-Palade bodies. *J Clin Invest.* 1989;84:92-99.

542. Subramaniam M, Koedam JA, Wagner DD. Divergent fates of P- and E-selectins after their expression on the plasma membrane. *Mol Biol Cell*. 1993;4:791-801.
543. Green SA, Setiadi H, McEver RP, Kelly RB. The cytoplasmic domain of P-selectin contains a sorting determinant that mediates rapid degradation in lysosomes. *J Cell Biol*. 1994;124:435-448.
544. Dunlop LC, Skinner MP, Bendall LJ, Favaloro EJ, Castaldi PA, Gorman JJ, Gamble JR, Vadas MA, Berndt MC. Characterization of GMP-140 (P-selectin) as a circulating plasma protein. *J Exp Med*. 1992;175:1147-1150.
545. Crovello CS, Furie BC, Furie B. Rapid phosphorylation and selective dephosphorylation of P-selectin accompanies platelet activation. *J Biol Chem*. 1993;268:14590-14593.
546. Sanders WE, Wilson RW, Ballantyne CM, Beaudet AL. Molecular cloning and analysis of in vivo expression of murine P-selectin. *Blood*. 1992;80:795-800.
547. Gotsch U, Jager U, Dominis M, Vestweber D. Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha in vivo. *Cell Adhesion Commun*. 1994;2:7-14.
548. Sako D, Chang X-J, Barone KM, Vachino G, White HM, Shaw G, Veldman GM, Bean KM, Ahern TJ, Furie B, Cumming DA, Larsen GR. Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell*. 1993;75:1179-1186.
549. Cummings RD. Structure and function of the selectin ligand PSGL-1. *Braz J Med Biol Res*. 1999;32:512-528.
550. Skinner MP, Lucas CM, Burns GF, Chesterman CN, Berndt MC. GMP-140 binding to neutrophils is inhibited by sulfated glycans. *J Biol Chem*. 1991;266:5371-5374.
551. Norman KE, Moore KL, McEver RP, Ley K. Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood*. 1995;86:4417-4421.
552. Lim Y-C, Snapp K, Kansas GS, Camphausen R, Ding H, Luscinskas FW. Important contributions of P-Selectin Glycoprotein Ligand-1-mediated secondary capture to human monocyte adhesion to P-selectin, E-selectin, and TNF- α -activated endothelium under flow in vitro. *J Immunol*. 1998;161:2501-2508.

553. Patel KD, McEver RP. Comparison of tethering and rolling of eosinophils and neutrophils through selectins and P-selectin glycoprotein ligand-1. *J Immunol.* 1997;159:4555-4565.
554. Li F, Erickson HP, James JA, Moore KL, Cummings RD, McEver RP. Visualization of P-selectin glycoprotein ligand-1 as a highly extended molecule and mapping of protein epitopes for monoclonal antibodies. *J Biol Chem.* 1996;271:6342-6348.
555. Pouyani T, Seed B. PSGL-1 recognition of P-selectin is controlled by a tyrosine sulfation consensus at the PSGL-1 amino terminus. *Cell.* 1995;83:333-343.
556. De Luca M, Dunlop LC, Andrews RK, Flannery JV, Ettl R, Cumming DA, Veldman GM, Berndt MC. A novel cobra venom metalloproteinase, mocarhagin, cleaves a 10-amino acid peptide from the mature N terminus of P-selectin Glycoprotein Ligand receptor, PSGL-1, and abolishes P-selectin binding. *J Biol Chem.* 1995;270:26734-26737.
557. Liu W-J, Ramachandran V, Kang J, Kishimoto TK, Cummings RD, McEver RP. Identification of N-terminal residues on P-selectin glycoprotein ligand-1 required for binding to P-selectin. *J Biol Chem.* 1998;273:7078-7087.
558. Wilkins PP, Moore KL, McEver RP, Cummings RD. Tyrosine sulfation of P-selectin glycoprotein ligand-1 is required for high affinity binding to P-selectin. *J Biol Chem.* 1995;270:22677-22680.
559. Li F, Wilkins PP, Crawley S, Weinstein J, Cummings RD, McEver RP. Post-translational modifications of recombinant P-selectin glycoprotein ligand-1 required for binding to P- and E-selectin. *J Biol Chem.* 1996;271:3255-3264.
560. Snapp KR, Craig R, Herron M, Nelson RD, Stoolman LM, Kansas GS. Dimerization of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) required for optimal recognition of P-selectin. *J Cell Biol.* 1998;142:263-270.
561. Moore KL, Eaton SF, Lyons DE, Lichenstein HS, Cummings RD, McEver RP. The P-selectin glycoprotein ligand from human neutrophils displays sialylated, fucosylated, O-linked poly-N-acetyllactosamine. *J Biol Chem.* 1994;269:23318-23327.
562. Evangelista V, Manarini S, Sideri R, Rotondo S, Martelli N, Piccoli A, Totani L, Piccardoni P, Vestweber D, de Gaetano G, Cerletti C. Platelet/polymorphonuclear

- leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent cd11b/cd18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule. *Blood*. 1999;93:876-885.
563. de Gaetano G, Cerletti C, Evangelista V. Recent advances in platelet-polymorphonuclear leukocyte interaction. *Haemostasis*. 1999;29:41-49.
564. Evangelista V, Manarini S, Rotondo S, Martelli N, Polischuk R, McGregor JL, de Gaetano G, Cerletti C. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction in dynamic conditions: evidence of adhesion cascade and cross talk between p-selectin and the β_2 integrin CD11b/CD18. *Blood*. 1996;88:4183-4194.
565. Blanks JE, Moll T, Eytner R, Vestweber D. Stimulation of P-selectin glycoprotein ligand-1 on mouse neutrophils activates β_2 -integrin mediated cell attachment to ICAM-1. *Eur J Immunol*. 1998;28:433-443.
566. Lorant DE, Patel KD, McIntyre TM, McEver RP, Prescott SM, Zimmerman GA. Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombin: a juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils. *J Cell Biol*. 1991;115:223-234.
567. Lorant DE, McEver RP, McIntyre TM, Moore KL, Prescott SM, Zimmerman GA. Activation of polymorphonuclear leukocytes reduces their adhesion to P-selectin and causes redistribution of ligands for P-selectin on their surfaces. *J Clin Invest*. 1995;96:171-182.
568. Imhof BA, Dunon D. Leukocyte migration and adhesion. *Adv Immunol*. 1995;58:345-416.
569. Kishimoto TK, Kahn J, Migaki G, Mainolfi E, Shirley F, Ingraham R, Rothlein R. Regulation of L-selectin expression by membrane proximal proteolysis. *Agents Actions Suppl*. 1995;47:121-134.
570. von Adrian UH, Hasslen SR, Nelson RD, Erlandsen SL, Butcher EC. A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell*. 1995;82:989-999.
571. Hasslen SR, von Andrian UH, Butcher EC, Nelson RD, Erlandsen SL. Spatial distribution of L-selectin (CD62L) on human lymphocytes and transfected murine L1-2 cell. *Histochem J*. 1995;27:547-554.

572. Berg EL, Robinson MK, Warnock RA, Butcher EC. The human peripheral lymph node vascular addressin is a ligand for LECAM-1, the peripheral lymph node homing receptor. *J Cell Biol.* 1991;114:343-.
573. Rosen SD. Endothelial ligands for L-selectin. *Am J Pathol.* 1999;155:1013-1020.
574. Lasky LA, Singer MS, Dowbenko D, Imai Y, Henzel WJ, Grimley C, Fennie C, Gillett N, Watson SR, Rosen SD. An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. *Cell.* 1992;69:927-938.
575. Delia D, Lampugnani MG, Resnati M, Dejana E, Aiello A, Fontanella E, Soligo D, Pierotti MA, Greaves MF. CD34 expression is regulated reciprocally with adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro. *Blood.* 1993;81:1001-1008.
576. Norton J, Sloane JP, Delia D, Greaves MF. Reciprocal of CD34 and cell adhesion ELAM-1 on vascular endothelium in acute cutaneous graft-versus-host disease. *J Pathol.* 1993;170:173-177.
577. Puri KD, Finger EB, Gaudernack G, Springer TA. Sialomucin CD34 is the major L-selectin ligand in human tonsil high endothelial venules. *J Cell Biol.* 1995;131:261-270.
578. Picker LJ, Warnock A, Burns AR, Doerschuk CM, Berg EL, Butcher EC. The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell.* 1991;66:921-933.
579. Ramos CL, Smith MJ, Snapp KR, Kansan GS, Stickney GW, Ley K, Lawrence MB. Functional characterization of L-selectin ligands on human neutrophils and leukemia cell lines: evidence for mucinlike ligand activity distinct from P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood.* 1998;91:1067-1075.
580. Snapp KR, Ding H, Atkins K, Warnke R, Luscinskas FW, Kansas GS. A novel P-selectin glycoprotein ligand-1 monoclonal antibody recognizes an epitope within the tyrosine sulfate motif of human PSGL-1 and blocks recognition of both P- and L-selectin. *Blood.* 1998;91:154-164.
581. Laudanna C, Constantin G, Baron P, Scarpini E, Scarlato G, Cabrini G, Dehecchi C, Rossi F, Cassatella MA, Berton G. Sulfatides trigger increase of cytosolic free calcium and enhanced expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-8 mRNA in human neutrophils. *J Biol Chem.* 1994;269:4021-4026.

582. Waddell TK, Fialkow L, Kin Chan C, Kei Kishimoto T, Downey GP. Potentiation of the oxidative burst of human neutrophils. *J Biol Chem*. 1994;269:18485-18491.
583. Po JL, Mazer B, Jensen GS. The L-selectin antibody FMC46 mediates rapid, transient increase in intracellular calcium in human peripheral blood mononuclear cells and Daudi lymphoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;217:1145-1150.
584. Tsang YTM, Neelamegham S, Hu Y, Berg EL, Burns AR, Smith CW, Simon SI. Synergy between L-selectin signaling and chemotactic activation during neutrophil adhesion and transmigration. *J Immunol*. 1997;159:4566-4577.
585. Simon SI, Burns AR, Taylor AD, Gopalan PK, Lynam EB, Sklar LA, Smith CW. L-selectin (CD62L) cross-linking signals neutrophil adhesive functions via the MAC-1 (CD11b/CD18) β 2-integrin. *J Immunol*. 1995;155:1502-1514.
586. Collins T, Palmer HJ, Whitley MZ, Neish AS, Williams AJ. A common theme in endothelial activation. Insights from the structural analysis of the genes for E-selectin and VCAM-1. *Trends Cardiovasc Med*. 1993;3:92-97.
587. Brostjan C, Anrather J, Csizmadia V, Natarajan G, Winkler H. Glucocorticoids inhibit E-selectin expression by targeting NF- κ B and not ATF/c-Jun. *J Immunol*. 1997;158:3836-3844.
588. Manning AM, Bell FP, Rosenbloom CL, Chosay JG, Simmons CA, Northrup JL, Shebuski RJ, Dunn CJ, Anderson DC. NF- κ B is activated during acute inflammation in vivo in association with elevated endothelial cell adhesion molecule gene expression and leukocyte recruitment. *J Inflamm*. 1995;45:283-296.
589. Batten P, Yacoub MH, Rose ML. Effect of human cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-4) on porcine endothelial cells: induction of MHC and adhesion molecules and functional significance of these changes. *Immunology*. 1996;87:127-133.
590. Ghersa P, van Huijsduijnen RH, Whelan J, DeLamararter JF. Labile proteins play a dual role in the control of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) gene regulation. *J Biol Chem*. 1992;267:19226-19232.
591. Chu W, Presky DH, Swerlick RA, Burns DK. Alternatively processed human E-selectin transcripts linked to chronic expression of E-selectin in vivo. *J Immunol*. 1994;153:4179.

592. Crockett-Torabi E. Selectins and mechanisms of signal transduction. *J Leukoc Biol.* 1998;63:1-14.
593. Larsen GR, Sako D, Ahern TJ, Shaffer M, Erban J, Sajer SA, Gibson RM, Wagner DD, Furie BC, Furie B. P-selectin and E-selectin. Distinct but overlapping leukocyte ligand specificities. *J Biol Chem.* 1992;267:11104-.
594. Levinovitz A, Muhlhoff J, Isenmann S, Vestweber D. Identification of a glycoprotein ligand for E-selectin on mouse myeloid cells. *J Cell Biol.* 1993;121:449-459.
595. Steegmaier M, Borges E, Berger J, Schwartz H, Vestweber D. The E-selectin-ligand ESL-1 is located in the Golgi as well as on microvilli on the cell surface. *J Cell Sci.* 1997;110:687-694.
596. Steegmaier M, Levinovitz A, Isenmann S, Borges E, Lenter M, Kocher HP, Kleuser B, Vestweber D. The E-selectin-ligand ESL-I is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature.* 1995;373:615-620.
597. Lo SK, Lee S, Ramos RA, Lobb R, Rosa M, Chi-Rosso G, Wright SD. Endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 stimulates the adhesive activity of leukocyte integrin CR3 (CD11b/CD18), Mac-1, $\alpha_m\beta_2$) on human neutrophils. *J Exp Med.* 1991;173:1493-1500.
598. Yoshida M, Westlin WF, Wang N, Ingber DE, Rosenzweig A, Resnick N, Gimbrone MA. Leukocyte adhesion to vascular endothelium induces E-selectin linkage to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol.* 1996;133:445-455.
599. Hamburger SA, McEver RP. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood.* 1990;75:550-554.
600. Jungi TW, Spycher MO, Nydegger UE, Barandun S. Platelet-leukocyte interactions: selective binding of thrombin-stimulated platelets to human monocytes, polymorphonuclear leukocytes, and related cell lines. *Blood.* 1986;67:629-636.
601. Doré M. Platelet-leukocyte interactions. *Am Heart J.* 1998;135:S146-S151.
602. Diacovo TG, Roth SJ, Buccola JM, Bainton DF, Springer TA. Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the β_2 -integrin cd11b/cd18. *Blood.* 1996;88:146-157.

603. Yeo EL, Sheppard J-AI, Feuerstein IA. Role of P-selectin and leukocyte activation in polymorphonuclear cell adhesion to surface adherent activated platelets under physiologic shear conditions (an injury vessel wall model). *Blood*. 1994;83:2498-2507.
604. Doré M, Burns AR, Hughes BJ, Entman ML, Smith CW. Chemoattractant-induced changes in surface expression and redistribution of a functional ligand for P-selectin on neutrophils. *Blood*. 1996;87:2029-2037.
605. Bruehl RE, Moore KL, Lorant DE, Borregaard N, Zimmerman GA, McEver RP, Bainton DF. Leukocyte activation induces surface redistribution of P-selectin glycoprotein ligand-1. *J Leukoc Biol*. 1997;61:489-499.
606. Michelson AD, Benoit SE, Furman MI, Breckwoldt WL, Rohrer MJ, Barnard MR, Loscalzo J. Effects of nitric oxide/EDRF on platelet surface glycoproteins. *Am J Physiol*. 1996;270:H1640-H1648.
607. Dembinska-Kiec A, Zmuda A, Wenhryniewicz O, Stachura J, Peskar BA, Gryglewski RJ. Selectin-P-mediated adherence of platelets to neutrophils is regulated by prostanoids and nitric oxide. *Int J Tiss Reac*. 1993;15:55-64.
608. Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell*. 1991;65:859-873.
609. Alon R, Hammer DA, Springer TA. Lifetime of the P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydronamic flow. *Nature*. 1995;374:539-542.
610. Spangenberg P, Redlich H, Bergmann I, Lösche W, Götzrath M, Kehrel B. The platelet glycoprotein IIb/IIIa complex is involved in the adhesion of activated platelets to leukocytes. *Thromb Haemost*. 1993;70:514-521.
611. Sheikh S, Nash GB. Continuous activation and deactivation of integrin cd11b/cd18 during de novo expression enables rolling neutrophils to immobilize on platelets. *Blood*. 1996;87:5040-5050.
612. Leung LLK. Role of thrombospondin in platelet aggregation. *J Clin Invest*. 1984;74:1764-1772.
613. Silverstein RL, Asch AS, Nachman RL. Glycoprotein IV mediates thrombospondin-dependent platelet-monocyte and platelet-U937 cell adhesion. *J Clin Invest*. 1989;84:546-552.

614. Chung J, Gao A-G, Frazier WA. Thrombospondin acts via integrin-associated protein to activate the platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *J Biol Biochem*. 1997;272:14740-14746.
615. Suchard SJ, Boxer LA, Dixit VM. Activation of human neutrophils increases thrombospondin receptor expression. *J Immunol*. 1991;147:651-659.
616. Huizinga TWJ, de Haas M, Kleijer M, Nuijens JH, Roos D, von dem Borne AEGK. Soluble Fc γ receptor III in human plasma originates from release by neutrophils. *J Clin Invest*. 1990;86:416-423.
617. Alonso A, Bayon Y, Mateos JJ, Sanchez Crespo M. Signaling by leukocyte chemoattractant and Fc γ receptors in immune-complex tissue injury. *Lab Invest*. 1998;78:377-392.
618. Sullam PM, Hyun WC, Szöllösi J, Dong J-F, Foss WM, Lopez JA. Physical proximity and functional interplay of the glycoprotein Ib-IX-V complex and the Fc receptor Fc γ RIIA on the platelet plasma membrane. *J Biol Chem*. 1998;273:5331-5336.
619. Adelman B, Sobel M, Fujimura Y, Ruggeri ZM, Zimmerman TS. Heparin-associated thrombocytopenia: observations on the mechanism of platelet aggregation. *J Lab Clin Med*. 1989;113:204-210.
620. Richard S, Shaw AS, Showell HJ, Connelly PA. The role of individual Fc γ receptors in aggregated IgG-stimulated protein tyrosine phosphorylation in the human neutrophil. *Biochem Biophys Res Comm*. 1994;189:653-661.
621. Bizzaro N, Goldschmeding R, von dem Borne AE. Platelet satellitism is Fc gamma RIII (CD16) receptor-mediated. *Am J Clin Pathol*. 1995;103:740-744.
622. Lawrence MB, Kansas GS, Kunkel EJ, Ley K. Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L, P, E). *J Cell Biol*. 1997;136:717-727.
623. Ley K, Bullard D, Arbones ML, Bosse R, Vestweber D, Tedder TF, Beaudet AL. Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. *J Exp Med*. 1995;181:669-675.
624. Puri KD, Finger EB, Springer TA. The faster kinetics of L-selectin than of E-selectin and P-selectin rolling at comparable binding strength. *J Immunol*. 1997;158:405-413.

625. Smith CW, Kishimoto TK, Abbass O, Hughes B, Rothlein R, McIntire LV, Butcher E, Anderson DC. Chemotactic factors regulate lectin adhesion molecule 1 (LECAM-1)-dependent neutrophil adhesion to cytokine-stimulated endothelial cells in vitro. *J Clin Invest.* 1991;87:609-618.
626. Abbassi O, Lane CL, Krater S, Kishimoto TK, Anderson DC, McIntire LV, Smith CW. Canine neutrophil margination mediated by lectin adhesion molecule-1 in vitro. *J Immunol.* 1991;147:2107-2115.
627. Spertini O, Luscinskas FW, Gimbrone MA, Tedder TF. Monocyte attachment to activated human vascular endothelium in vitro is mediated by leukocyte adhesion molecule-1 (L-selectin) under nonstatic conditions. *J Exp Med.* 1992;175:1789-1792.
628. Tangelder GJ, Arfors K-E. Inhibition of leukocyte rolling in venules by protamine and sulfated polysaccharides. *Blood.* 1991;77:1565-1571.
629. Ley K, Linnermann G, Meinen M, Stoolman LM, Gaetgens P. Fucoidin, but not yeast polyphosphomannan PPME, inhibits leukocyte rolling in venules of the rat mesentery. *Blood.* 1993;81:177-185.
630. Watson SR, Fennie C, Lasky LA. Neutrophil influx into an inflammatory site inhibited by a soluble homing receptor-IgG chimera. *Nature.* 1991;349:164-167.
631. Ley K, Tedder TF, Kansas GS. L-selectin can mediate leukocyte rolling in untreated mesenteric venules in vivo independent of E- and P-selectin. *Blood.* 1993;82:1632.
632. Ma X-L, Weyrich AS, Lefer DJ, Buerke M, Albertine KH, Kishimoto TK, Lefer AM. Monoclonal antibody to L-selectin attenuates neutrophil accumulation and protects ischemic reperfused cat myocardium. *Circulation.* 1993;88:649-.
633. Luscinskas FW, Ding H, Tan P, Cumming D, Tedder TF, Gerritsen ME. L- and P-selectins, but not CD49d (VLA-4) integrins, mediate monocyte initial attachment to TNF- α -activated vascular endothelium under flow in vitro. *J Immunol.* 1996;157:326-.
634. Ley K, Zakrzewicz A, Hanski C, Stoolman LM, Kansas GS. Sialylated O-glycans and L-selectin sequentially mediate myeloid cell rolling in vivo. *Blood.* 1995;85:3727-3735.

635. Yamada K, Tojo SJ, Hayashi M, Morooka S. The role of P-selectin, sialyl Lewis X and sulfatide in myocardial ischemia and reperfusion injury. *Eur J Pharmacol.* 1998;346:217-225.
636. Arbones ML, Ord DC, Ley K, Ratech H, Maynard-Curry C, Otten G, Capon DJ, Tedder TF. Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity.* 1994;1:247-260.
637. Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P-selectin-deficient mice. *Cell.* 1993;74:541-554.
638. Bosse R, Vestweber D. Only simultaneous blocking of the L- and P-selectin completely inhibits neutrophil migration into mouse peritoneum. *Eur J Immunol.* 1994;24:3019-3024.
639. Robinson SD, Frenette PS, Rayburn H, Cumiskey M, Ullman-Culleré M, Wagner DD, Hynes RO. Multiple, targeted deficiencies in selectins reveal a predominant role for P-selectin in leukocyte recruitment. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:11452-11457.
640. Jung U, Ley K. Mice lacking two or all three selectins demonstrate overlapping and distinct functions for each selectin. *J Immunol.* 1999;162:6755-6762.
641. Ramos CL, Kunkel EJ, Lawrence MB, Jung U, Vestweber D, Bosse R, McIntyre KW, Gillooly KM, Norton CR, Wolitzky BA, Ley K. Differential effect of E-selectin antibodies on neutrophil rolling and recruitment to inflammatory sites. *Blood.* 1997;89:3009-3018.
642. Norman KE, Anderson GP, Kolb HC, Ley K, Ernst B. Sialyl Lewis^x (sLe^x) and an sLe^x mimetic, CGP69669A, disrupt E-selectin-dependent leukocyte rolling in vivo. *Blood.* 1998;91:475-483.
643. Labow MA, Norton CR, Rumberge JM, Lombard-Gillooly KM, Shuster DJ, Hubbard J, Bertko R, Knaack PA, Terry RW, Harbison ML, Kontgen F, Stewart CL, McIntyre KW, Will PC, Burns DK, Wolitzky BA. Characterization of E-selectin-deficient mice: demonstration of overlapping function of the endothelial selectins. *Immunity.* 1994;1:709-720.
644. Kunkel EJ, Jung U, Bullard DC, Norman KE, Wolitzky BA, Vestweber D, Beaudet AL, Ley K. Absence of trauma-induced leukocyte rolling in mice

- deficient in both P-selectin and intercellular adhesion molecule 1. *J Exp Med*. 1996;183:57-65.
645. Frenette PS, Mayadas TN, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. *Cell*. 1996;84:563-574.
646. Catalina MD, Estess P, Siegelman MH. Selective requirements for leukocyte adhesion molecules in models of acute and chronic cutaneous inflammation: participation of E- and P- but not L-selectin. *Blood*. 1999;93:580-589.
647. Ley K, Allietta M, Bullard DC, Morgan S. Importance of E-selectin for firm leukocyte adhesion *in vivo*. *Circ Res*. 1998;83:287-294.
648. Kogaki S, Sawa Y, Sano T, Matsushita T, Ohata T, Kurotobi S, Tojo SJ, Matsuda H, Okada S. Selectin on activated platelets enhances neutrophil endothelial adherence in myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 1999;43:968-973.
649. Kubes P, Jutila M, Payne D. Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia/reperfusion. *J Clin Invest*. 1995;95:2510-2519.
650. McEver RP, Cummings RD. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest*. 1997;100:S97-S103.
651. Bargatze RF, Kurk S, Butcher EC, Jutila MA. Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells. *J Exp Med*. 1994;180:1785-1792.
652. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 1990;346:425-434.
653. Arnaout MA. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood*. 1990;75:1037-1050.
654. Gopalan PK, Smith CW, Lu H, Berg EL, McIntyre LV, Simon SI. Neutrophil CD18-dependent arrest on intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in shear flow can be activated through L-selectin. *J Immunol*. 1997;158:367-375.
655. Lorant DE, Topham MK, Whatley RE, McEver RP, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Inflammatory roles of P-selectin. *J Clin Invest*. 1993;92:559-570.
656. Anderson DC, Springer TA. Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1 and p150,95 glycoproteins. *Annu Rev Med*. 1987;38:175-194.

657. Wilson RW, Ballantyne CM, Smith CW, Montgomery C, Bradley A, O'Brien WE, Beaudet AL. Gene targeting yields a CD-18-mutant mouse for study of inflammation. *J Immunol.* 1993;151:1571-1578.
658. Furie MB, Tancinco MC, Smith CW. Monoclonal antibodies to leukocyte integrin CD11a/CD18 and integrin CD11b/CD18 or intercellular adhesion molecule-1 inhibit chemoattractant-stimulated neutrophil transendothelial migration in vitro. *Blood.* 1991;78:2089-2097.
659. Vaporciyan AA, DeLisser HM, Yan H-C. Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science.* 1993;262:1580-1582.
660. Muller WA. The role of PECAM-1 (CD31) in leukocyte emigration: studies in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol.* 1995;57:523-528.
661. Guyer DA, Moore KL, Lynam EB, Schammel CMG, Rogelj S, McEver RP, Sklar LA. P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) is a ligand for L-selectin in neutrophil aggregation. *Blood.* 1996;88:2415-2421.
662. Rochon YP, Simon SI, Lynam EB, Sklar LA. A role for lectin interactions during human neutrophil aggregation. *J Immunol.* 1994;152:1385-1393.
663. de Mora F, Williams CMM, Frenette PS, Wagner DD, Hynes RO, Galli SJ. P- and E-selectins are required for the leukocyte recruitment, but not the tissue swelling, associated with IgE- and mast cell-dependent inflammation in mouse skin. *Lab Invest.* 1998;78:497-505.
664. Walcheck B, Moore KL, McEver RP, Kishimoto TK. Neutrophil-neutrophil interactions under hydrodynamic shear stress involve L-selectin and PSGL-1. *J Clin Invest.* 1996;98:1081-1087.
665. Simon SI, Chambers JD, Butcher E, Sklar LA. Neutrophil aggregation is β_2 -integrin- and L-selectin-dependent in blood and isolated cells. *J Immunol.* 1992;149:2765-2771.
666. Simon SI, Rochon YP, Lynam EB, Smith CW, Anderson DC, Sklar LA. β_2 -integrin and L-selectin are obligatory receptors in neutrophil aggregation. *Blood.* 1993;82:1097-1106.
667. Andrews RK, López JA, Berndt MC. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997;29:91-105.

668. Furlan M. Von Willebrand factor: molecular size and functional activity. *Ann Hematol.* 1996;72:341-348.
669. Lopez JA. The platelet glycoprotein Ib-IX complex. *Blood Coag Fibrinol.* 1994;5:97-119.
670. Andrews RK, Fox JE. Interaction of purified actin-binding protein with the platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex. *J Biol Chem.* 1991;266:7144-7147.
671. Nurden AT, Nurden P. A review of the role of platelet membrane glycoproteins in the platelet-vessel wall interaction. *Baillieres Clin Haematol.* 1993;6:653-690.
672. Lopez JA, Leung B, Reynolds CC, Li CQ, Fox JEB. Efficient plasma membrane expression of a functional human glycoprotein Ib-IX complex requires the presence of its three subunits. *J Biol Chem.* 1992;267:12851-12859.
673. Moroi M, Jung SM, Nomura S, Sekiguchi S, Ordinas A, Diaz-Ricart M. Analysis of the involvement of the von Willebrand factor-glycoprotein Ib interaction in platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions. *Blood.* 1997;90:4413-4424.
674. Kroll MH, Harris TS, Moake JL, Handin RI, Schafer AI. von Willebrand factor binding to platelet GPIb initiates signals for platelet activation. *J Clin Invest.* 1991;88:1568-1573.
675. Chow TW, Hellums JD, Moake JL, Kroll MH. Shear-stress-induced von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib initiates calcium influx associated with aggregation. *Blood.* 1990;80:113-120.
676. Santoro SA, Zutter MM. The $\alpha_2\beta_1$ integrin: a collagen receptor on platelets and other cells. *Thromb Haemost.* 1995;74:813-821.
677. Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell.* 1996;84:289-297.
678. Endenburg SC, Hantgan RR, Lindeboom-Blokzijl L, Lankhof H, Jerome WG, Lewis JC, Sixma JJ, de Groot PG. On the role of von Willebrand factor in promoting platelet adhesion to fibrin in flowing blood. *Blood.* 1995;86:4158-4165.
679. Gralnick HR, Kramers WS, McKeown LP, Garfinkel L, Pinot A, Williams SB, Krutzsch H. Platelet adhesion at high shear rates: the role of von Willebrand factor/GPIb and the β_1 integrin $\alpha_2\beta_1$. *Thromb Res.* 1996;81:113-119.

680. Moroi M, Jung SM, Shinmyozu K, Tomiyama Y, Ordinas A, Diaz-Ricart M. Analysis of platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions: the involvement of glycoprotein VI in the platelet adhesion. *Blood*. 1996;88:2081-2092.
681. Shattil SJ, Gao J, Kashiwagi H. Not just a pretty face: regulation of platelet function at the cytoplasmic face of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *Thromb Haemost*. 1997;78:220-225.
682. Kilgore KS, Park JL, Chi L, Musser JH, Date V, Abras S, Lucchesi BR. Reduction of myocardial infarct size in the rabbit by a carbohydrate analog of Sialyl LewisX. *J Cardiovasc Pharmacol Therapeut*. 1996;1:49-56.
683. Birnbaum Y, Patterson M, Kloner RA. The effects of CY1503, a sialyl Lewis^x analog blocker of the selectin adhesion molecules, on infarct size and "no-reflow" in the rabbit model of acute myocardial infarction/reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29:2013-2025.
684. Flynn DM, Buda AJ, Jeffords PR, Lefer DJ. A sialyl Lewis^x-containing carbohydrate reduces infarct size: role of selectins in myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol*. 1996;271:H2086-H2096.
685. Buerke M, Weyrich AS, Zheng Z, Gaeta FCA, Forrest MJ, Lefer AM. Sialyl Lewis^x-containing oligosaccharide attenuates myocardial reperfusion injury in cats. *J Clin Invest*. 1994;93:1140-1148.
686. Lefer AM, Campbell B, Scalia R, Lefer DJ. Synergism between platelets and neutrophils in provoking cardiac dysfunction after ischemia and reperfusion. *Circulation*. 1998;98:1322-1328.
687. Merhi Y, Provost P, Chauvet P, Théorêt J-F, Phillips ML, Latour J-G. Selectin blockade reduces neutrophil interaction with platelets at the site of deep arterial injury by angioplasty in pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:372-377.
688. Springer GF, Wurzel HA, McNeal GMJ, Ansell NJ, Doughty MF. Isolation of anticoagulant fractions from crude fucoidin. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1957;94:404-409.
689. Patankar MS, Oehninger S, Barnett T, Williams RL, Clark GF. A revised structure for Fucoidan may explain some of its biological activities. *J Biol Chem*. 1993;268:21770-21776.

690. Blondin C, Chaubet F, Nardella A, Siquin C, Jozefonvicz J. Relationships between chemical characteristics and anticomplementary activity of fucans. *Biomaterials*. 1996;17:597-603.
691. Soeda S, Ohmagari Y, Shimeno H, Nagamatsu A. Preparation of oversulfated fucoidan fragments and evaluation of their antithrombotic activities. *Thromb Res*. 1993;72:247-256.
692. Soeda S, Sakaguchi S, Shimeno H, Nagamatsu A. Fibrinolytic and anticoagulant activities of highly sulfated fucoidan. *Biochem Pharmacol*. 1992;43:1853-1858.
693. Ley K, Gaehtgens P, Fennie C, Singer MS, Lasky LA, Rosen SD. Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo. *Blood*. 1991;77:2553-2555.
694. Omata M, Matsui N, Inomata N, Ohno T. Protective effects of polysaccharide Fucoidin on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *J Cardiovasc Pharm*. 1997;30:717-724.
695. Miura T, Nelson DP, Schermerhorn ML, Shin'oka T, Zund G, Hickey PR, Neufeld EJ, Mayer JE. Blockade of selectin-mediated leukocyte adhesion improves postischemic function in lamb hearts. *Ann Thorac Surg*. 1996;62:1295-1300.
696. Granert C, Raud J, Xie X, Lindquist L, Lindbom L. Inhibition of leukocyte rolling with polysaccharide fucoidin prevents pleocytosis in experimental meningitis in the rabbit. *J Clin Invest*. 1994;93:929-936.
697. Shimaoka M, Ikeda M, Iida T, Taenaka N, Yoshiya I, Honda T. Fucoidin, a potent inhibitor of leukocyte rolling, prevents neutrophil influx into phorbol-ester-induced inflammatory sites in rabbit lung. *Am J Resp Crit Care Med*. 1996;153:307-311.
698. Collic S, Fisher AM, Tapon-Bretoniere J, Boisson C, Durand P, Jozefonvicz J. Anticoagulant properties of a fucoidan fraction. *Thromb Res*. 1991;64:143-154.
699. Minix R, Doctor VM. Interaction of fucoidan with proteases and inhibitors of coagulation and fibrinolysis. *Thromb Res*. 1997;87:419-429.
700. Church FC, Meade JB, Treanor RE, Whinna HC. Antithrombotic activity of fucoidan. The interaction of fucoidan with heparin cofactor II, antithrombin III, and thrombin. *J Biol Chem*. 1989;264:3618-3623.

701. Grauffel V, Kloareg B, Mabeau S, Durand P, Jozefonvicz J. New natural polysaccharides with potent antithrombic activity: fucans from brown algae. *Biomaterials*. 1989;10:363-368.
702. Doctor VM, Hill C, Jackson GL. Effect of Fucoidan during activation of human plasminogen. *Thromb Res*. 1995;79:237-247.
703. Goetz DJ, Greif DM, Ding H, Camphausen RT, Howes S, Comess KM, Snapp KR, Kansas GS, Lucinskas FW. Isolated P-selectin glycoprotein ligand-1 dynamic adhesion to P- and E-selectin. *J Cell Biol*. 1997;137:509-519.
704. Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, Marquette KA, Tilney NL. The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia-reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand. *J Clin Invest*. 1997;99:2682-2690.
705. Kumar A, Villani MP, Patel UK, Keith JC, Schaub RG. Recombinant soluble form of PSGL-1 accelerates thrombolysis and prevents reocclusion in a porcine model. *Circulation*. 1999;99:1363-1369.
706. Canfield SM, Morrison SL. The binding affinity of human IgG for its high affinity Fc receptor is determined by multiple amino acids in the C_H2 domain and is modulated by the hinge region. *J Exp Med*. 1991;173:1483-1491.
707. Hayward R, Campbell B, Shin YK, Scalia R, Lefer AM. Recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand-1 protects against myocardial ischemic reperfusion injury in cats. *Cardiovasc Res*. 1999;41:65-76.
708. Hayward R, Lefer AM. Acute mesenteric ischemia and reperfusion: protective effects of recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand-1. *Shock*. 1999;12:201-207.
709. Dulkanchainun TS, Goss JA, Imagawa DK, Shaw GD, Anselmo DM, Kaldas F, Wang T, Zhao D, Busuttil AA, Kato H, Murray NGB, Kupiec-Weglinski JW, Busuttil RW. Reduction of hepatic ischemia/reperfusion injury by a soluble P-selectin glycoprotein ligand-1. *Ann Surg*. 1998;227:832-840.
710. Zhang H, Schaub RG, Khor SP, Keith JC, Kumar A. Anti-thrombotic effect of a recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand-1 chimera in a rat model of thrombosis. *Circulation*. 1999;100 (Suppl I):I-471. Abstract.
711. Kuijper PHM, Gallardo Torres HI, van der Linden JAM, Lammers J-WJ, Sixma JJ, Koenderman L, Zwaginga JJ. Platelet-dependent primary hemostasis promotes

- selectin- and integrin-mediated neutrophil adhesion to damaged endothelium under flow conditions. *Blood*. 1996;87:3271-3281.
712. Lo SK, Golenbock DT, Sass PM, Maskati A, Xu H, Silverstein RL. Engagement of the Lewis X antigen (CD15) results in monocyte activation. *Blood*. 1997;89:307-314.
713. Borges E, Eytner R, Moil T, Steegmaier M, Campbell MA, Ley K, Mossmann H, Vestweber D. The P-selectin glycoprotein ligand-1 is important for recruitment of neutrophils into inflamed mouse peritoneum. *Blood*. 1997;90:1934-1942.
714. Kuijper PHM, Gallardo THI. Platelet and fibrin deposition at the damaged vessel wall: cooperative substrates for neutrophil adhesion under flow conditions. *Blood*. 1997;89:166-175.
715. Furman MI, Benoit SE, Barnard MR, Valeri CR, Borbone ML, Becker RC, Hechtman HB, Michelson AD. Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31:352-358.
716. Hajela K, Kayestha R. Carbohydrate induced modulation of cell membrane IV: interaction with mucin and fucoidan totally immobilizes the human platelet membrane. *Indian J Biochem Biophys*. 1996;33:308-310.
717. Roberts DD, Rao CN, Liotta LA, Gralnick HR, Ginsberg V. Comparison of the specificities of laminin, thrombospondin, and von Willebrand factor for binding to sulfated glycolipids. *J Biol Chem*. 1986;261:6872-6877.
718. Burton-Wurster N, Zhang DW, Lust G. Accumulation of fibronectin in articular cartilage explants cultured with TGF β 1 and fucoidan. *Arch Biochem Biophys*. 1995;316:452-460.
719. Capron L, Jarnet J, Heudes D, Joseph-Monrose D, Bruneval P. Repeated balloon injury of rat aorta. A model of neointima with attenuated inhibition by heparin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:1649-1656.
720. Kuijper PHM, Gallardo Torres HI, Houben LAMJ, Lammers J-WJ, Zwaginga JJ, Koenderman L. P-selectin and Mac-1 mediate monocyte rolling and adhesion to ECM-bound platelets under flow conditions. *J Leukoc Biol*. 1998;64:467-473.
721. Inoue T, Sakai Y, Morooka S, Hayashi T, Takayanagi K, Takabatake Y. Expression of polymorphonuclear leukocyte adhesion molecules and its

- significance in patients treated with percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol*. 1996;28:1127-1133.
722. Simon DI, Chen Z, Seifert P, Edelman ER, Ballantyne CM, Rogers C. Decreased neointimal formation in mac-1 (-/-) mice reveals a role for inflammation in vascular repair after angioplasty. *J Clin Invest*. 2000;105:293-300.
723. Giddings JC, Banning AP, Ralis H, Lewis MJ. Redistribution of von Willebrand factor in porcine carotid arteries after balloon angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:1872-1878.
724. Johnson-Tidey RR, McGregor JL, Taylor PR, Poston RN. Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques. Coexpression with intercellular adhesion molecule-1. *Am J Pathol*. 1994;144:952-961.
725. Crawley F, Clifton A, Markus H, Brown MM. Delayed improvement in carotid artery diameter after carotid angioplasty. *Stroke*. 1997;28:574-579.
726. Hunter GC. The clinical and pathologic spectrum of recurrent carotid stenosis. *Am J Surg*. 1997;174:583-588.
727. Merten M, Thiagarajan P. A novel mechanism of platelet aggregation: P-selectin determines size and stability of platelet aggregates. *Circulation*. 1999;100 (Suppl I):I-611. Abstract.
728. Romo GM, Dong J-F, Schade AJ, Gardiner EE, Kansas GS, Li CQ, McIntire LV, Berndt MC, Lopez JA. The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med*. 1999;190:803-813.
729. Post MJ, Borst C, Pasterkamp G, Haudenschild CC. Arterial remodeling in atherosclerosis and restenosis: a vague concept of a distinct phenomenon. *Atherosclerosis*. 1995;118:S115-S123.