UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE (LILLE I)

U.F.R. DE BIOLOGIE

Année 1999

N° attribué par la bibliothèque

50376

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE (LILLE I)

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE.

Présentée et soutenue publiquement par

Isabelle SIX

le 29 octobre 1999

ROLE DU MONOXYDE D'AZOTE ET DES FACTEURS DE CROISSANCE

DANS L'ATHEROSCLEROSE ET LA RESTENOSE APRES ANGIOPLASTIE

JURY :

Monsieur	le Professeur Benoni BOILLY	Président
Monsieur	le Professeur Patrick DURIEZ	Rapporteur
Monsieur	le Docteur Jean François ARNAL	Rapporteur
Monsieur	le Professeur Bernard DUPUIS	Examinateu
Monsieur	le Docteur Eric VAN BELLE	Examinateu
Monsieur	le Professeur Christophe BAUTERS	E DE Directeur de



A Louis, mon avenir

A Monsieur le Professeur Boilly,

Vous me faites l'honneur et la joie de présider cette thèse. J'ai eu le privilège de bénéficier de votre savoir au cours de ma vie universitaire à la Faculté des Sciences de Lille. J'ai apprécié la qualité de vos enseignements. Ils ont attisé l'intérêt que je porte à la physiologie. Vos compétences en recherche fondamentale feront de vos remarques une source d'enrichissement.

Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Duriez,

Vous me faites l'honneur d'être membre de mon jury de thèse. La position que vous occupez dans le domaine de l'athérosclérose vous donne une place privilégiée dans l'appréciation de ce travail. En acceptant de juger ce mémoire, vous m'offrez une caution scientifique d'importance.

Soyez assuré de mon estime et de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Arnal,

Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté de juger ce travail. Je vous remercie également de l'intérêt que vous avez toujours porté à nos travaux et de l'aide que vous nous avez offerte dans certains protocoles. Vos compétences en cardiologie et vos connaissances en recherche expérimentale et clinique rendent votre présence justifiée. Chacune de vos remarques conduira à améliorer mes connaissances dans le domaine de la recherche scientifique et de ses applications cliniques.

Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Dupuis,

Vous m'avez acceptée dans votre Laboratoire et permis de réaliser ce travail de thèse. Je mesure aujourd'hui la chance que j'ai eue de pouvoir travailler en collaboration avec des cliniciens, des pharmaciens et des fondamentalistes. Ces années m'ont appris la rigueur nécessaire à la Recherche Scientifique. Je ne manquerai pas de mettre à profit l'enseignement que j'ai reçu au Laboratoire de Pharmacologie.

Je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude et mon plus grand respect.

A Monsieur le Professeur Bauters,

Tu m'as soutenue sans relâche dans mes efforts et prodigué le sens de la rigueur et de la précision, indispensables à un travail de Recherche Scientifique. Tu m'as offert ton expérience en qualité de chercheur ainsi que tes connaissances en cardiologie. J'ai pu apprécier la disponibilité et la patience dont tu as fait preuve à mon égard. J'ai surtout apprécié les moments où les ascensions de l'Everest se transformaient en promenade tranquille en plaine. Je n'oublierai pas ces années d'enseignements à tes côtés. Elles m'ont permis d'acquérir de solides connaissances dans la recherche cardiovasculaire. Je te remercie pour ces années agréablement passées.

Sois assuré de ma profonde gratitude et de mon plus grand respect.

A Monsieur le Docteur Van Belle,

Tu as su me guider durant ces trois années de thèse grâce à tes connaissances dans le domaine de la cardiologie clinique et expérimentale et à tes indiscutables qualités de chercheur. J'ai toujours apprécié tes critiques et commentaires. Tu as su me faire partager la passion de la Recherche et l'envie d'aller toujours plus loin. Au delà des connaissances que tu m'as enseignées, tu m'as également dirigée dans mes comportements et parée pour l'avenir. Je te remercie d'avoir fait de ces années un enrichissement inestimable.

Sois assuré de ma plus profonde gratitude et de mon plus grand respect.

A mes parents,

Vous avez été un soutien inestimable pendant toutes ces années. Vous vous êtes intéressés à tout ce que je faisais et vous avez toujours eu confiance en tout ce que j'entreprenais. Vous avez su m'enseigner la patience, l'amour du travail, la curiosité et l'humilité. Soyez assurés de mon amour.

A Sabrina,

Tu es la soeur que j'aurais souhaité. Nous avons toujours tout partagé et entre nous les mots ont toujours été inutiles. Mon silence te signifiera plus que tous les discours. Nos chemins ne se sépareront jamais.

A Frédéric,

Tu es comme mon frère, merci pour ton soutien de tous les jours et pour ton intérêt.

A l'ensemble de ma famille,

Je sais que vous avez toujours été derrière moi et sans certains d'entre vous je ne passerai pas cette thèse aujourd'hui. Pour tout cela je vous adresse mes profonds remerciements. Je tiens à remercier l'ensemble du personnel du Laboratoire d'Hématologie en particulier Hélène, Véronique, Marie Pascale et Anne pour leur soutien, leur disponibilité et leur amitié.

Je tiens surtout à remercier l'ensemble du personnel du Laboratoire de Pharmacologie. Le Docteur Régis Bordet pour sa bonne humeur et ses précieux conseils. Mesdames Nadine Pruvost et Sabine Duriez pour leur amitié.

Je tiens également à adresser mes remerciements à Catherine et Sylvette pour leur accueil toujours chaleureux.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes amis:

Delphine, Bérengère, Emmanuelle, Jérome et Monique pour leur présence au quotidien et pour leur amitié sincère. Vous avez fait de ces quatre ans un enrichissement personnel inestimable.

TABLE DE	S MA	ATIER	ES
----------	------	-------	----

Introduction	17
Etude bibliographique	19
PREMIERE PARTIE : L'ENDOTHELIUM FONCTIONS ET DYSFONCTIONS	19
I. STRUCTURE DE L'ENDOTHELIUM	24

PAGES

II. EQUILIBRE ENTRE HEMOSTASE ET THROMBOSE	26

II.1- Endothélium, plaquettes et coagulation	26
II.1.1- Propriétés non thrombogènes de l'endothélium	26
II.1.2- Phénotype prothrombotique de l'endothélium	27
II.1.3- Endothélium et Facteur Tissulaire	28

III.REGULATION DU TONUS VASCULAIRE

III.1- La vasodilatation	29
III.1.1- Substances vasodilatatrices	29
III.1.2- Mécanisme d'action du NO	31
III.2- La vasoconstriction	32

IV.REGULATION DE LA CROISSANCE DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES 34

28

29

V. REGULATION DE LA PERMEABILITE VASCULAIRE	35
V.1- Propriétés structurelles de l'endothélium	35
V.2- Endothélium et molécules d'adhésion	36
V.2.1- ICAM-1	37
V.2.2- VCAM-1	37
V.2.3- PECAM-1	38
V.2.4- Régulation des molécules d'adhésion	39
DEUXIEME PARTIE : LA RESTENOSE	41
I. DESCRIPTION DE LA RESTENOSE	41
I.1- Recalibration du vaisseau	42
I.2- Formation du thrombus	42
I.3- Hyperplasie néointimale	43
I.4- Remodelage vasculaire	44
I.5- Expression du Facteur Tissulaire après angioplastie artérielle	45
II. IMPLICATION DE L'ENDOTHELIUM DANS LA RESTENOSE	46
II.1- Aspect anatomique	46
II.2- Aspect fonctionnel	46
II.3- Conséquences sur la paroi artérielle	47

_

III.APPROCHES THERAPEUTIQUES	48
III.1- Apport en NO	48
III.2- Facteurs de croissance endothéliaux	48
III.3- Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine	49
TROISIEME PARTIE : L'ATHEROSCLEROSE	51
I. DESCRIPTION DE L'ATHEROSCLEROSE	51
II. EXPRESSION DU FACTEUR TISSULAIRE DANS L'ATHEROSCLEROSE	56
III.IMPLICATION DU NO DANS L'ATHEROSCLEROSE	57
IV.IMPLICATION DE L'ENDOTHELIUM DANS L'ATHEROSCLEROSE	58
QUATRIEME PARTIE : LES FACTEURS DE CROISSANCE	60
I. GENERALITES	60
II. LE VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)	60
II.1- VEGF : généralités	60
II.2- Distribution et rôle biologique du VEGF	61
II.3- Récepteurs et voies de signalisation du VEGF	62

III.LES FIBROBLAST GROWTH FACTORS (FGF)	64
III.1- FGF : généralités	64
III.1.1- L'acidic et le basic fibroblast growth factor	64
III.1.2- Rôle biologique du basic fibroblast growth factor (bFGF)	65
III.1.3- Les récepteurs du bFGF	68
III.1.4- Stockage du bFGF dans la matrice extracellulaire	70
III.2- FGF : Effets sur les vaisseaux	72
III.2.1- Effets sur la fonction endothéliale	72
III.2.2- Effets sur l'hyperplasie intimale	73
Résultats	75
I. IMPLICATION DU NO DANS LE PROCESSUS DE REENDOTHEL	IALISATION
APRES AGRESSION ARTERIELLE PAR BALLONNET	
(Article n°1)	77

II. EFFETS DE LA L-ARGININE DANS L'ATHEROSCLEROSE

(Article n°2)	87

III.EFFETS DES FACTEURS DE CROISSANCE DANS L'ATHEROSCLEROSE 95

III.1- Evaluation des effets précoces du bFGF dans un modèle d'athérosclérose

(Article	n°3)
----------	------

III.2- Evaluation des effets à long terme du bFGF dans un modèle d'athérosclérose 131
III.3- Evaluation des effets du bFGF sur l'expression du facteur tissulaire
(Article n°5)

Discussion générale

Conclusion

Références bibliographiques

15

170

176

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN: Acide Désoxyribonucléique aFGF: acidic Fibroblast Growth Factor AMPc: Adénylate monophosphate cyclique ARNm: Acide ribonucléique messager bFGF: basic Fibroblast Growth Factor CAM: Cell Adhesion Molecule CML: Cellule musculaire lisse EDHF: Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor EDRF: Endothelium Derived Relaxing Factor FGF-R: Récepteur du FGF FGF: Fibroblast Growth Factor FT: Facteur Tissulaire GMPc: Guanylate monophosphate cyclique GTP: Guanylate triphosphate ICAM-1: Inter cellular Adhesion Molecule-1 IEC: Inhibiteur de l'enzyme de conversion IFN_γ: Interféron γ

Il: Interleukine L-NAME: N-nitro-L-arginine-methyl-ester LDL: Lipoprotéines de faible densité MEC: Matrice Extra Cellulaire NO: Monoxyde d'azote NOS: NO synthétase NOSe: NO synthétase endothéliale PAI-1: Inhibiteur du plasminogène de type Ι PDGF: Platelet Derived Growth Factor PECAM-1: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 **TFPI:** Tissue Factor Pathway Inhibitor TGF β : Transforming Growth Factor β TNFα: Tumor Necrosis Factor α tPA: Activateur du plasminogène tissulaire TXA2: Thromboxane A2 VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

Introduction

La fonction de l'endothélium vasculaire a longtemps été considérée comme se limitant à celle d'une barrière semi-perméable inerte et uniforme, mais l'évolution des connaissances a donné à l'endothélium un statut de tissu fonctionnel. L'endothélium forme une surface d'échanges considérable qui règle les fonctions hémodynamiques par la sécrétion de substances vasorelaxantes et vasoconstrictrices, module l'homéostasie des vaisseaux en intervenant sur la perméabilité vasculaire, le système de coagulation et l'angiogénèse. Dans certaines conditions pathologiques, l'endothélium est capable d'enclencher la coagulation par la sécrétion de substances prothrombotiques et antifibrinolytiques. L'endothélium participe à la défense de l'organisme et joue un rôle clé dans la réponse inflammatoire et immunitaire.

Plus récemment, le rôle fondamental de la cellule endothéliale a été démontré dans les processus de "cicatrisation" de la paroi en réaction à divers types d'agressions. En effet, la cellule endothéliale joue un rôle clé dans deux pathologies vasculaires majeures que sont la resténose après angioplastie et l'athérosclérose. Les résultats des expériences visant à moduler la réponse de la cellule endothéliale dans ces deux situations, ont apporté des arguments supplémentaires pour un rôle moteur de cette cellule dans le processus de réparation vasculaire.

La repousse des cellules endothéliales a une importance majeure dans le mécanisme de la resténose post angioplastie. En effet, il a été démontré que les segments présentant une hyperplasie modérée possèdent également une réendothélialisation plus importante. Il a donc été supposé que les cellules endothéliales étaient responsables de l'inhibition du développement de l'hyperplasie intimale et le monoxyde d'azote produit par les cellules

endothéliales a longtemps été suggéré comme étant le facteur responsable de cette réduction de l'hyperplasie.

Il a été également démontré qu'il existe une dysfonction endothéliale majeure dans les modèles d'athérosclérose induite par un régime enrichi en cholestérol chez l'animal. Outre les cellules endothéliales, les monocytes et les macrophages sont impliqués dans la progression de l'athérosclérose. Les monocytes peuvent exprimer le facteur tissulaire (FT) qui est le contributeur majeur à la thrombogénicité des plaques rompues. De nombreux travaux ont prouvé le rôle bénéfique du monoxyde d'azote et des facteurs de croissance dans des modèles de circulation collatérale ou d'angioplastie par ballonnet. Le rôle de ces médiateurs reste à définir dans les modèles d'athérosclérose.

Etude bibliographique

PREMIERE PARTIE : L'ENDOTHELIUM: FONCTIONS ET DYSFONCTIONS

La paroi artérielle est constituée de trois tuniques individualisées, dont la taille et la composition dépendent du type d'artère envisagé: artères à prédominance musculaire, telles que les coronaires ou à prédominance élastique, de plus gros diamètre, comme l'aorte. De la périphérie à la lumière, on trouve, l'adventice, la média et l'intima (Figure 1).

L'adventice

C'est la couche externe de la paroi vasculaire. Son épaisseur varie avec le type de vaisseaux. Elle est plus large dans les artères musculaires que dans les artères élastiques. L'adventice est une matrice conjonctive et adipeuse, constituée essentiellement de fibroblastes et de quelques monocytes/macrophages. Les fibroblastes sont responsables de la synthèse des éléments constitutifs du tissu conjonctif: dont le collagène et la fibronectine. L'adventice est séparée de la média par la lame limitante élastique externe.

A l'état physiologique, l'adventice joue un rôle nutritif. Elle est également impliquée dans la régulation de la vasomotricité et de la trophicité vasculaire par la présence de terminaisons nerveuses libérant de nombreux neurotransmetteurs responsables de signaux divers dans la cellule musculaire lisse (CML). C'est dans cette couche que vont cheminer les *vasa vasorum* (vaisseaux des vaisseaux) irriguant la partie externe de la média, tandis que la



Figure 1 : Strusture de la paroi artérielle (d'après Benditt, 1977)

partie interne de la média et l'intima reçoivent leur apport nutritionnel du sang circulant dans la lumière du vaisseau. La présence de *vasa vasorum* n'est observée que lorsque le vaisseau a un diamètre supérieur à 200 µm. Les *vasa vasorum* permettent l'oxygénation de la paroi vasculaire externe car, lorsque celle-ci est épaisse, elle dépasse la distance maximale de diffusion de l'oxygène provenant du sang circulant dans la lumière. La qualité fonctionnelle des *vasa vasorum* est capitale pour la physiologie et la biologie de la paroi des vaisseaux de gros calibres.

La média

La média, tunique médiane des vaisseaux, est la couche la plus épaisse. Dans une artère saine, elle est essentiellement constituée de CMLs fusiformes disposées en couches concentriques associées à une trame conjonctive constituée de glycosaminoglycanes, de collagène et d'élastine. Elle est impliquée directement dans les phénomènes de contraction et de dilatation vasculaire.

La CML, d'origine artérielle, est une cellule plurifonctionnelle, dotée de potentialités contractiles et sécrétoires qui s'expriment de manière variable selon les circonstances correspondant ainsi à deux phénotypes différents (Figure 2).

On oppose traditionnellement la prolifération et la différenciation des CMLs en les associant à ces deux phénotypes distincts que sont respectivement le phénotype dédifférencié, sécréteur et le phénotype mature myo-différencié, contractile.



1 - Capacité contractile

2 - Filaments d'actine et de myosine abondants

PHENOTYPE SECRETOIRE

- 1 Capacité proliférative
- 2 Diminution du contenu en α actine et desmine
- 3 Appareil de Golgi et réticulum endoplasmique abondants
- 4 Synthèse de composants de la matrice extracellulaire



Figure 2 : Modulation phénotypique des Cellules Musculaires Lisses

La localisation des CMLs dans la paroi contribue au déterminisme de leur phénotype. Dans la média des artères adultes normales, la majorité des cellules présentent un phénotype contractile. Dans l'intima, les cellules présentent le plus souvent un phénotype de synthèse. La conversion des phénotypes dépend de la densité cellulaire et de l'état physiologique ou pathologique des tissus environnants.

<u>L'intima</u>

C'est la couche interne de la paroi vasculaire. Elle est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales, jointives, de forme polygonale reposant sur une membrane basale extracellulaire et un sous-endothélium conjonctif composé de fibres de collagène et de quelques fibres élastiques. L'intima est séparée de la média par la lame limitante élastique interne.

L'endothélium vasculaire est situé à l'interface du sang et des tissus interstitiels. La fonction de l'endothélium a longtemps été considérée comme se limitant à celle d'une barrière semi-perméable inerte et uniforme, mais l'évolution des connaissances a donné à l'endothélium un statut de tissu fonctionnel. L'arbre vasculaire apporte les substances nécessaires à la vie des différents tissus et élimine les déchets issus de leur métabolisme. L'endothélium forme une surface d'échange considérable qui règle les fonctions hémodynamiques par la sécrétion de substances vasorelaxantes et vasoconstrictrices, module l'homéostasie des vaisseaux en intervenant sur la perméabilité vasculaire, le tonus vasculaire, le système de coagulation et l'angiogénèse (Gimbrone 1995).

Dans des conditions pathologiques, l'endothélium est capable d'enclencher la coagulation par la sécrétion de substances prothrombotiques et antifibrinolytiques.

L'endothélium participe à la défense de l'organisme et joue un rôle clé dans la réponse inflammatoire et immunitaire. Différents stimuli métaboliques ou immunitaires perturbent les fonctions endothéliales et induisent l'expression de molécules d'adhérence pour les leucocytes. Ils modifient la perméabilité, les propriétés antithrombotiques, l'expression des médiateurs du tonus vasculaire et la production de facteurs de croissance des cellules endothéliales.

I. Structure de l'endothélium

L'endothélium est relativement hétérogène. Ainsi, des différences structurales existent entre les micro- et macrovaisseaux mais aussi selon la localisation des microvaisseaux. La taille des cellules endothéliales varie de 25 à 50 µm de long sur 10 à 15 µm de large. L'aspect polygonal ou allongé des cellules endothéliales varie en fonction du segment vasculaire qu'elles occupent (Simionescu 1988). Elles s'orientent selon un axe parallèle à celui du courant circulatoire. Les cellules endothéliales tapissant le vaisseau ont quelques dizaines de nanomètres d'épaisseur et possèdent un noyau qui se situe du côté de la lumière vasculaire. La surface des cellules endothéliales en contact avec le sang est recouverte d'une enveloppe cellulaire, le glycocalyx, riche en protéines glycosylées. Ces protéines, surtout l'héparane sulfate, sont des protéoglycanes qui possèdent de nombreuses charges électronégatives. Grâce au glycocalyx, les cellules endothéliales ne réagissent pas à l'état normal avec les éléments figurés du sang tels que les plaquettes ou les leucocytes. Les cellules endothéliales contiennent tout l'équipement nécessaire à la synthèse, la conservation et la sécrétion de substances

biologiquement actives, en particulier les mitochondries, les lysosomes, le réticulum endoplasmique, les granules de glycogène. Parmi les substances synthétisées, nous retrouvons le collagène, la fibronectine, l'élastine, la laminine, les glycosaminoglycanes, en particulier l'héparane sulfate, ainsi que des molécules aux propriétés anticoagulantes, substances s'opposant à l'activation et à l'agrégation plaquettaire. L'endothélium peut ainsi être considéré comme l'équivalent d'un organe sécrétoire (Simionescu 1988).

Il est difficile d'identifier les cellules endothéliales uniquement sur des critères morphologiques, ainsi certains de leurs composants ou antigènes spécifiques sont utilisés pour les caractériser. Les molécules d'adhérence (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1 et E-selectine), l'enzyme de conversion de l'angiotensine I, le récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDL) acétylées et le facteur von Willebrand sont des marqueurs classiques des cellules endothéliales (Gimbrone 1995).

In vitro, les cellules endothéliales se multiplient beaucoup plus vite qu'in vivo. Le temps de doublement, in vitro est de l'ordre de 48 heures alors qu'in vivo, chez l'adulte, le remplacement des cellules endothéliales s'effectue dans un délai variant de un mois à un an. Physiologiquement, l'angiogénèse ou croissance vasculaire est sous l'influence de médiateurs (prostaglandine E1 et E2, adénosine) et de facteurs de croissance (vascular endothélial growth factor VEGF, et fibroblast growth factor FGF, acide et basique) sécrétés par les cellules endothéliales elles-mêmes, ou par les cellules avoisinantes (Delomenie 1993). Les cellules endothéliales sécrètent également d'autres facteurs de croissance agissant sur d'autres cibles cellulaires en particulier le platelet derived growth factor (PDGF), agent mitogène et chimiotactique pour les fibroblastes et les CMLs, mais aussi des facteurs de croissance de l'hématopoïèse (granulocyte macrophage colony stimuling factor, granulocyte colony

stimuling factor). Les cellules endothéliales subissent aussi l'influence de facteurs inhibiteurs, en particulier d'origine monocytaire, qui maintiennent l'endothélium quiescent (héparine, héparanes sulfates, interleukine-1 et monoxyde d'azote, NO) (Vilette 1990).

La structure et l'organisation des cellules endothéliales leur confèrent certaines propriétés. En effet, les jonctions interendothéliales forment des structures complexes impliquées dans le contrôle de la perméabilité vasculaire. A côté des jonctions communicantes ou nexus qui assurent les échanges intercellulaires au moyen de substances informatrices endogènes (ions, cytokines, prostacycline), il existe des zones d'adhérence entre deux cellules endothéliales (Chappey 1996), constituées de molécules d'adhérence appartenant à la famille des cadhérines.

IL Equilibre entre hémostase et thrombose

L'endothélium vasculaire doit jouer un rôle ambivalent, antithrombotique lorsqu'il doit maintenir la fluidité du sang circulant, et prothrombotique lors de l'apparition d'une brèche vasculaire afin d'arrêter l'hémorragie.

II.1 Endothélium, plaquettes et coagulation

II.1.1 Propriétés non thrombogènes de l'endothélium

Physiologiquement, les cellules endothéliales sont non thrombogènes (Zwaginga 1990) et constituent une interface où les cellules, extrêmement actives, sont capables de synthétiser une variété de facteurs participant à la régulation de la coagulation et de la fibrinolyse (Gertler 1992). L'endothélium synthétise différents médiateurs empêchant l'adhésion des plaquettes et leur activation : le glycocalyx (Ryan 1984) et la prostacycline (PGI₂) (Moncada 1978), puissant inhibiteur de l'agrégation plaquettaire dont l'action est renforcée par le NO (Radomski 1987 A, Radomski 1987 B, Adrie 1996). L'équilibre hémostatique est maintenu grâce à la synthèse, par les cellules endothéliales, de facteurs anticoagulants. La thrombomoduline, en fixant la thrombine, confère à cette dernière des propriétés anticoagulantes, en particulier en activant la protéine C. Les cellules endothéliales expriment également de manière constitutive le Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), qui est l'inhibiteur naturel majeur de la voie de la coagulation initiée par le facteur tissulaire (FT). L'antithrombine III intervient également par son action inhibitrice sur la thrombine.

II.1.2 Phénotype prothrombotique de l'endothélium

Dans certaines conditions pathologiques (infection, inflammation ...), l'endothélium réagit en acquérant un phénotype prothrombotique. Il devient capable d'exprimer des récepteurs d'adhérence pour les plaquettes, de produire des facteurs d'activation plaquettaire comme le platelet activating factor, le thromboxane A2. Les cellules endothéliales en apoptose deviennent également des cellules procoagulantes par la diminution d'expression des facteurs anticoagulants tels que la thrombomoduline et le TFPI (Bombeli 1997) et par la rapide redistribution de la phosphatidylsérine à la surface membranaire favorisant l'activation du FT. Le FT, initiateur principal de la cascade de coagulation, est induit à la surface luminale de

l'endothélium sous l'influence de cytokines (interleukine 1, tumor necrosis factor) et de l'endotoxine bactérienne (Bevilacqua 1986).

II.1.3 Endothélium et Facteur Tissulaire

De nombreux travaux ont été consacrés aux modifications d'expression du FT en pathologie. Les premiers d'entre eux se sont intéressés aux monocytes circulants, ces cellules étant plus accessibles et plus sensibles individuellement aux stimuli infectieux et inflammatoires que les cellules endothéliales. Très récemment, la mise en œuvre de techniques immunohistochimiques et de biologie moléculaire à partir de coupes tissulaires a permis de progresser nettement dans la compréhension du rôle du FT en pathologie.

Au niveau des vaisseaux normaux, l'ARNm du FT a été trouvé en grande quantité dans l'adventice des artères y compris les artères coronaires. Il n'est cependant pas détectable dans l'endothélium ou l'intima normale, et faiblement retrouvé au niveau des CMLs constituant la média (Wilcox 1989).

II.2 Endothélium et fibrinolyse

La fibrinolyse intra-vasculaire est initiée à la surface du vaisseau par la synthèse et la sécrétion de l'activateur du plasminogène tissulaire (t-PA) qui permet la conversion et l'activation du plasminogène en plasmine (Loskutoff 1977). La sécrétion du t-PA est modulée par le stress, l'occlusion du vaisseau, la thrombine, l'histamine et différentes cytokines.

L'endothélium produit aussi l'inhibiteur du plasminogène de type I (PAI-1) qui permet de moduler la fibrinolyse et donc de réduire la lyse de la fibrine (Dosquet 1995). L'expression du PAI-1 est corrélée à la migration des CMLs et des cellules endothéliales dans le mur artériel après agression par ballonnet (Reidy 1996).

III.Régulation du tonus vasculaire

Le tonus vasculaire est le résultat de stimulations nerveuses (sympathiques et parasympathiques) ou hormonales (système rénine-angiotensine). Agissant sur le muscle lisse vasculaire, la production de NO par l'endothélium, grâce à une ou plusieurs synthétases, montre que les cellules endothéliales ont une capacité propre à réguler le tonus vasculaire.

III.1 La vasodilatation

III.1.1 Substances vasodilatatrices

L'endothélium produit des substances biologiques actives en réponse à certains stimuli tels que l'agrégation plaquettaire, la formation de thrombine, la synthèse d'hormones, de neurotransmetteurs, des changements de pression en oxygène ou l'augmentation du flux sanguin. Il existe essentiellement deux molécules vasodilatatrices produites par l'endothélium : la prostacycline (PGI₂) et le NO. La prostacycline (PGI₂) a été la première substance vasoactive dérivée de l'endothélium découverte à la fin des années 1970 (Moncada 1978). Dès 1980, Furchgott et Zawadski observent que la relaxation des artères isolées soumises à l'action de l'acétylcholine dépend de l'endothélium. Ils en déduisent qu'un facteur fugace appelé EDRF (Endothelium Derived Relaxing Factor), sécrété par les cellules endothéliales traitées par l'acétylcholine ou la bradykinine, provoque l'élongation des CMLs adjacentes (Furchgott 1980). La nature chimique suggérée par Ignarro (Ignarro 1988) n'a été reconnue qu'en 1987 par Palmer et Moncada (Palmer 1987). La prostacycline (PGI₂) et le NO agissent de manière synergique par deux mécanismes distincts de transduction du signal intracellulaire : la voie de l'AMPc pour la PGI₂ et celle du GMPc pour le NO. La prostacycline PGI₂ augmente la concentration d'adénosine monophosphate cyclique intracellulaire et diminue la production d'endothéline 1 (Figure 3).

A côté de ces deux puissants vasodilatateurs, un autre produit existe dans l'endothélium, l'EDHF (Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor) (Suzuki 1990). Ce facteur hyperpolarise la membrane plasmique, relaxe la CML vasculaire par l'intermédiaire des canaux potassiques et insensibilise la cellule vis-à-vis des stimuli vasoconstricteurs (Suzuki 1990).

La synthèse de NO par l'endothélium vasculaire est responsable du tonus vasculaire qui est essentiel pour la régulation de la pression sanguine (Michel 1997 A). La relaxation endothélium-dépendante est diminuée chez les lapins athéroscléreux. L'administration de L-arginine, le précurseur du NO, normalise cette dysfonction vasculaire chez des patients et des animaux ayant une hypercholestérolémie. Chez les animaux, l'effet est accompagné d'une réduction de l'épaississement de la lésion intimale (Moncada 1993).

III. 1. 2 Mécanisme d'action du NO

Le NO est un agent de communication intercellulaire original. Il ne possède pas de récepteur membranaire spécifique et agit sans déclenchement d'une cascade de seconds messagers. Le NO diffuse de la cellule émettrice vers la cellule réceptrice où il agit directement sur des cibles moléculaires intracellulaires. Le NO est produit à partir de l'atome nitrogène guanido terminal de la L-arginine (Palmer 1988). Il active la guanylate cyclase présente dans les CMLs qui transforment le guanosine triphosphate (GTP) en guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Celui-ci initie une chaîne de réactions chimiques aboutissant à la vasodilatation (Moncada 1993). L'enzyme NO synthétase, responsable de cette réaction, a été isolée et caractérisée (Schmidt 1991). De nombreux isoformes de NO synthétases (NOS) ont été identifiés. Ils peuvent être constitutifs et sont retrouvés dans les cellules endothéliales, le cerveau, et nécessitent la présence de calcium et de calmoduline. Ils peuvent être inductibles, et sont retrouvés dans de nombreux types cellulaires (les cellules endothéliales, les CMLs ...) après stimulation par l'endotoxine, le TNF ou d'autres cytokines et ne nécessitent pas la présence de calcium (Förstermann 1990, Loscalzo 1995, Moncada 1993). De nombreuses substances induisent la libération de NO en agissant sur des récepteurs membranaires spécifiques (Figure 3). Plusieurs d'entre elles (acétylcholine, sérotonine, bradykinine, histamine, adénosine, endothéline, noradrénaline) ont des effets vasoconstricteurs directs sur le muscle lisse et des effets relaxants indirects par la libération de NO par les cellules endothéliales. Le stimulus physiologique le plus important provoquant la production de NO est le frottement du sang sur l'endothélium qui varie avec le débit et les conditions d'écoulement (Rubanyi 1986).

III.2 La vasoconstriction

La vasoconstriction des CMLs, dépendante de l'endothélium, est activée par des substances naturelles comme la thrombine, des agents pharmacologiques, des forces physiques ou l'hypoxie (Rubanyi 1988). L'endothélium produit alors des seconds messagers capables d'induire la vasoconstriction coronaire en réponse à ces stimuli.

Les facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium peuvent être divisés en deux catégories. La première catégorie est constituée par un puissant vasoconstricteur peptidique : l'endothéline (Hickey 1985, Levin 1995). La seconde catégorie est représentée par des métabolites de l'acide arachidonique tels que le thromboxane A_2 (TXA₂), la prostaglandine H_2 et les endopéroxides.

Outre la synthèse de vasoconstricteurs, l'endothélium représente un passage obligé de certaines substances vasoconstrictrices vers les CMLs en participant à leur activation, ou à leur stockage. Ainsi, l'enzyme de conversion de l'angiotensine I, permettant la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II, a pu être localisée dans les cellules endothéliales des capillaires, des artères et des veines (Caldwell 1976). L'angiotensine II, générée à la surface de l'endothélium a été décrite également comme un facteur vasoconstricteur dérivé de l'endothélium.





IV. Régulation de la croissance des cellules musculaires lisses

Dans le vaisseau sanguin, les CMLs sont responsables du maintien du tonus vasculaire et montrent une faible capacité proliférative. Des dommages au niveau de l'endothélium entraînent une activation de la prolifération des CMLs (Fishman 1975, Schwartz 1990). Par contre, la réparation de l'endothélium entraîne une réversion de ce processus et une restauration de la quiescence des CMLs. Cette séquence d'événements est représentative du rôle majeur de l'endothélium dans la régulation de la croissance des CMLs vasculaires. Les cellules endothéliales cultivées peuvent produire une variété de facteurs de croissance peptidergiques et de cytokines agissant comme mitogènes sur les CMLs artérielles isolées (Schwartz 1986, Davies 1986, Mantovani 1989). Les cellules endothéliales en culture peuvent produire l'héparine, l'héparane sulfate (Castellot 1987, Scott-Burden 1988), le TGFß et l'IFNy. Ces agents peuvent prévenir ou retarder la transition des CMLs d'un phénotype contractile en un phénotype synthétique qui est requis pour la prolifération des CMLs (Chamley-Campbell 1981, Schwartz 1986). Les prostaglandines ont également été identifiées comme modifiant la croissance induite par l'endothélium. La prostacycline et les prostaglandines E1 et E2 inhibent la synthèse d'ADN et la prolifération des CMLs en culture (Gryglewski 1988, Morisaki 1988).

Le rôle du NO sur la prolifération des CMLs vasculaires a été suggéré pour la première fois par les études de Garg et collaborateurs. Ils ont montré que des vasodilatateurs producteurs de NO ou l'augmentation intracellulaire de GMP cyclique réduisent l'incorporation de thymidine tritiée dans les CMLs vasculaires en culture (Garg 1989). La

relevance physiologique de cet effet a été corroborée par des expériences de co-culture dans lesquelles l'effet inhibiteur des cellules endothéliales sur la prolifération des CMLs vasculaires est augmenté quand de la L-arginine, est ajoutée au milieu de culture. Le rôle de l'EDRF/NO a été confirmé par les résultats d'expériences réalisées dans des modèles de traumatisme artériel par ballonnet (Guo 1994, Hamon 1994, Taguchi 1993, Von Der Leyen 1994) et des modèles d'athérosclérose par alimentation enrichie en cholestérol (Cooke 1991, Wang 1994). Dans ces expériences, la supplémentation en L-arginine ou la surexpression de la NOS constitutive au niveau du site d'agression permettent de diminuer l'hyperplasie intimale, cet effet étant aboli par le N-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME) ou diminué par la nitro L-arginine, des inhibiteurs compétitifs de la L-arginine pour la NOS (Scott-Burden 1993).

V. Régulation de la perméabilité vasculaire

V.1 Propriétés structurelles de l'endothélium

L'intégralité structurale et fonctionnelle de l'endothélium est essentielle dans la régulation du passage des macromolécules et l'extravasation des cellules circulantes telles que les leucocytes. Le passage à travers l'endothélium vasculaire dépend à la fois de la taille des molécules circulantes et de la structure de l'endothélium. Lorsque l'endothélium est continu, la qualité des jonctions interendothéliales est prépondérante ainsi que les jonctions entre les cellules endothéliales et la matrice sous-jacente. Les cellules endothéliales sont contigües et en contact les unes avec les autres grâces à des jonctions étroites dans les artères (" tight junction "). C'est au niveau de l'endothélium et grâce à lui que de nombreuses substances vont

être épurées, séquestrées, métabolisées ou transférées. Certains échanges sont passifs, mais la plupart répondent à des mécanismes actifs :

-Phénomènes d'internalisation : une substance spécifique se fixe sur un récepteur membranaire et le complexe récepteur-substance entre dans la cellule grâce à un phénomène d'endocytose. Ce mécanisme permet l'apport de nutriments nécessaires au métabolisme de la cellule (tel est le cas des LDLs).

-D'autres systèmes permettent le passage de macromolécules à travers l'endothélium, des systèmes transitoires comme les vésicules de pinocytose, les canaux transendothéliaux. Le mécanisme de transport transendothélial, qui permet le passage direct du plasma vers l'intima, se fait par un système complexe de vésicules. Les glycosaminoglycanes et d'autres molécules chargées, présentes à la surface de l'endothélium, permettent l'absorption sélective de certaines macromolécules telles que les cytokines et les facteurs de croissance.

V.2 Endothélium et molécules d'adhésion

Les cellules endothéliales sont également équipées d'une variété de molécules d'adhésion cellulaire (CAM ; Cell Adhesion Molecule). Ces molécules d'adhésion contrôlent les interactions des cellules endothéliales avec d'autres cellules endothéliales (interactions cellule-cellule homotypique), avec les cellules sanguines circulantes (interactions hétérotypiques) ainsi qu'avec les composants de la membrane basale. Ces CAMs sont regroupées en famille en fonction de leur structure moléculaire. Notre propos se limitera aux membres de la superfamille des immunoglobulines telles que PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, CD 31), ICAM-1 et VCAM-1. PECAM-1 est essentiel pour les
contacts entre cellules endothéliales. ICAM-1 et VCAM-1 jouent un rôle central dans les interactions cellules endothéliales – monocytes, granulocytes et lymphocytes. ICAM-1 et VCAM-1 sont exprimés de façon modérée après une semaine de régime enrichi en cholestérol à 0,5 %, leur expression est massive après deux semaines de régime et reste liée à une diminution de la libération de NO (Scalia 1998). L'expression d'ICAM-1 et de VCAM-1 dans les CMLs de la média et de l'intima est plus importante dans les plaques fibreuses et les lésions athéroscléreuses avancées (Kasper 1995).

Des quantités élevées de molécules d'adhésion solubles ont été observées chez des patients présentants une athérosclérose (Miwa 1997).

V.2.1 ICAM-1

ICAM-1 est un des ligands endothéliaux pour les intégrines de type β -2 impliquées dans l'adhésion (Springer 1990, Staunton 1990). Ces intégrines de type β -2 sont le LFA-1 pour les lymphocytes, Mac-1 pour les monocytes. Elles possèdent en commun une chaîne α associée à différentes sous-unités β (Carlos 1994, Panés 1999). L'expression d'ICAM-1 peut être induite par des cytokines proinflammatoires (II-1, TNF- α , IFN- γ).

V.2.2 VCAM-1

VCAM-1 est un des ligands endothéliaux pour les intégrines de type β -1 impliquées dans l'adhésion (Springer 1990, Staunton 1990, Elices 1990). Ces intégrines de type β -1 sont

le VLA-4 (Very Late Activation) pour les lymphocytes et pour les monocytes. Elles possèdent en commun une chaîne β associée à différentes sous unités α (Carlos 1994, Panés 1999). L'expression de VCAM-1 peut être induite par des cytokines proinflammatoires (Il-1, Il-4, TNF- α). Le niveau constitutif de VCAM-1 est significativement plus bas que celui d'ICAM-1 mais l'expression de VCAM-1 est augmentée de façon très importante au niveau des cellules endothéliales 5 à 9 heures après stimulation par des cytokines (Henninger 1997). Li et collaborateurs montrent que les cellules de la paroi artérielle expriment VCAM-1 avant même l'apparition de lésions athéromateuses chez le lapin rendu hypercholestérolémique (Li 1993). Des études immunohistochimiques réalisées sur des plaques d'athérome humaines ou animales ont permis de démontrer que VCAM-1 est exprimé au niveau des cellules endothéliales mais également dans les zones de néovascularisation et d'infiltration inflammatoire à la base des plaques. L'utilisation d'un double immunomarquage et de l'hybridation in-situ ont permis de confirmer que VCAM-1 est également exprimé dans les CMLs et les macrophages (O'Brien 1993).

V.2.3 PECAM-1

PECAM-1 est constitutivement exprimé dans les cellules endothéliales. Après induction par des cytokines, il n'y a pas d'augmentation de PECAM-1 au niveau des cellules endothéliales mais une redistribution de PECAM-1 au niveau des bords des cellules endothéliales adjacentes ce qui permet d'augmenter l'interaction cellule endothéliale - cellule endothéliale ce qui affecte la migration des leucocytes et la perméabilité vasculaire (Romer 1995)

V.2.4 Régulation des molécules d'adhésion

Il existe un site de fixation pour le facteur de transcription NF κ B dans les promoteurs des gènes codant pour VCAM-1 et ICAM-1. Le promoteur du gène codant pour ICAM-1 possède également un site de fixation pour le facteur de transcription AP-1. L'expression des molécules d'adhésion est donc régulée par les voies passant par NF κ B, I κ B l'inhibiteur de NF κ B et AP-1.

Les facteurs de croissance ont un rôle régulateur dans l'expression des molécules d'adhésion. L'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 est inhibée dans les cellules endothéliales tumorales et dans les carcinomes de cellules rénales. Il a été démontré que l'exposition des cellules endothéliales à des facteurs angiogéniques est responsable de ce phénomène (Griffioen 1996 B). De même, l'utilisation de culture de cellules endothéliales vasculaires humaines a permis de démontrer un effet inhibiteur de la part du bFGF (Melder 1996) et du VEGF sur l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 (Griffioen 1996 A).

Le NO semble également jouer un rôle régulateur dans l'expression des molécules d'adhésion. Le précurseur du NO, la L-arginine, réduit l'adhésion des monocytes à l'endothélium vasculaire en inhibant l'expression des molécules d'adhésion cellulaires au niveau endothélial (Tsao 1994, Adams 1997). Des donneurs de NO comme SIN-1 ou le nitroprussiate de sodium inhibent l'expression d'ICAM-1 et de VCAM-1 dans les CMLs (Shin 1996). Cet effet du NO est indépendant de la stimulation de la guanylate cyclase soluble

(Shin 1996). Ces donneurs de NO agissent au niveau transcriptionnel et impliquent une inhibition de l'activité NF κ B (Shin 1996).

--

DEUXIEME PARTIE : LA RESTENOSE

I. Description de la resténose

Depuis son introduction en 1977, L'angioplastie endoluminale est un des traitements de choix des artériopathies oblitérantes. Elle consiste à utiliser un ballonnet gonflé à de fortes pressions qui va écraser contre la paroi la plaque d'athérome. Malgré l'amélioration constante du matériel et la sélection rigoureuse des indications, elle reste grévée d'un taux de resténose dans les six mois suivants qui varie entre 20 et 40 % (Serruys 1988, Nobuyoshi 1988, Makowski 1995). La resténose est la conséquence d'une réaction de cicatrisation exagérée engendrée par le traumatisme de la paroi vasculaire au cours de l'angioplastie. Les études expérimentales chez l'animal et les études chez l'homme ont permis de mieux comprendre les mécanismes de la resténose qui se déroulent en quatre étapes principales :

- une phase de réaction précoce de la paroi de l'artère vis-à-vis de la procédure,
c'est à dire la recalibration du vaisseau

- une phase de formation d'un thrombus mural

- une phase de multiplication et de migration des CMLs vers l'intima

- une phase de remodelage

I.1 Recalibration du vaisseau

Cette phase intervient dans les 24 heures suivant l'angioplastie et constitue une réaction de constriction précoce de la paroi consécutive à l'angioplastie : c'est le retour élastique du vaisseau. Cette réaction semble être une conséquence des propriétés élastiques du vaisseau. Ce recul de la paroi dépend du contenu de la lésion en fibres, en calcium et de l'état plus ou moins fibreux de la plaque d'athérome.

I.2 Formation du thrombus

Durant les premiers jours suivant l'angioplastie, un phénomène thrombotique constitue l'élément déterminant de la formation de la resténose (Kimura 1997). En effet, lors de l'angioplastie, l'écrasement de la plaque d'athérome par le ballonnet permet la libération de thrombine et de fibrine internalisées dans la lésion athéromateuse. Les plaquettes circulantes sont très sensibles à l'activation par la thrombine et se déposent alors le long de la paroi pour former un thrombus. En se fixant au collagène, au facteur de coagulation Von Willebrand et au fibrinogène, les récepteurs des plaquettes de type glycoprotéique tels que les récepteurs Ia, Ib, IIb/IIIa permettent l'agrégation et renforcent l'adhésion des plaquettes à la paroi (Popma 1991). Ainsi l'administration d'anticorps anti-glycoprotéine IIb/ IIIa diminue le risque de survenue d'événements thrombotiques aigus consécutifs à l'angioplastie (Libby 1995).

D'autres éléments tels que la composition des plaques d'athérome influencent la formation du thrombus. Le noyau riche en lipides est le composant le plus thrombogène. Une

angioplastie réalisée sur des plaques riches en lipides augmente donc le risque de formation d'un thrombus.

I.3 Hyperplasie néointimale

La dénudation artérielle par ballonnet reproduit chez l'animal une séquence d'événements comparable à celle observée après angioplastie coronaire transluminale chez l'homme (Bauters 1996, Groves 1995). Ainsi, l'agression de la paroi vasculaire par une sonde à ballonnet provoque une désendothélialisation, associée à des fractures de la lame limitante élastique interne et à un certain degré de traumatisme de la média. L'hyperplasie néointimale est caractérisée par la prolifération des macrophages, des cellules endothéliales, la prolifération et la migration des CMLs et la synthèse de la matrice extra cellulaire (MEC) (O'Brien 1993). La prolifération et l'accumulation des CMLs dans l'intima est un processus fondamental de la resténose.

Les phases de la prolifération des CMLs

<u>Phase I</u>: Dans les 24 premières heures suivant l'angioplastie, on observe, une thrombose aiguëe, accompagnée par la sécrétion d'agents mitogènes pour les CMLs. Des molécules telles que le PDGF, le TGF β , le bFGF et l'IL-1 sont responsables de la modulation du phénotype des CMLs qui s'hypertrophient et prolifèrent dans la média (Reidy 1992). Cette prolifération médiale est maximale vers le 7^{ème} jour après l'angioplastie et revient à son niveau de base environ un mois après l'intervention (Hanke 1990). <u>Phase II</u>: Du 4^{ème} au 14^{ème} jour après la procédure, les CMLs traversent la lame limitante élastique interne et migrent vers l'intima pour former une néo-intima. Des études ont démontré que les cellules qui pénètrent dans l'intima entrent majoritairement en division dans les 7 premiers jours après l'angioplastie (Hanke 1990).

<u>Phase III</u>: La troisième étape commence aux environs du 14^{ème} jour et correspond à une amplification de la prolifération des CMLs sous l'action d'agents mitogènes. Les cellules s'accumulent alors dans le néo-intima. Puis la synthèse importante de MEC participe à l'augmentation considérable de la taille du néo-intima (environ 80%). Cette prolifération myointimale des CMLs constitue un événement clé de la formation de la resténose (Clowes 1983).

I.4 Remodelage vasculaire

Il existe actuellement de plus en plus d'éléments suggérant un rôle important du remodelage vasculaire dans la resténose après angioplastie (Birnbaum 1997). Kakuta et coll. ont montré qu'un élargissement compensateur du vaisseau survient dans les semaines suivant une angioplastie expérimentale (Kakuta 1994). Ce phénomène permet de " compenser " presque 60 % de l'hyperplasie néo-intimale réactionnelle au traumatisme par le ballonnet et ainsi de limiter le rétrécissement de la lumière. De manière surprenante, dans ce modèle expérimental, la resténose n'est pas corrélée au degré d'hyperplasie néo-intimale mais plutôt à un manque d'élargissement compensateur ou même à un certain degré de constriction

vasculaire. Le remodelage vasculaire est ainsi capable de limiter les effets de l'hyperplasie néointimale sur la lumière du vaisseau et ce sont des différences en terme de remodelage vasculaire et non pas en terme de formation néo-intimale qui sont responsables de la resténose dans ce modèle. L'importance du remodelage vasculaire dans la resténose postangioplastie a été confirmée dans d'autres modèles expérimentaux (Post 1994, Lafont 1995).

I.5 Expression du Facteur Tissulaire après angioplastie artérielle

Plusieurs éléments établissent une relation entre FT et thrombose postangioplastie. Des cellules endothéliales stimulées ou une MEC, exprimant du FT, sont un support très efficace de formation d'un thrombus fibrineux et plaquettaire in vitro (Diquelou 1995). Chez le lapin, l'angioplastie par ballonnet provoque une activation prolongée de la coagulation au niveau de l'artère lésée, activation médiée par le FT (Speidel 1995). La thrombogénicité peut être abolie par l'utilisation d'un anticorps anti-FT (Pawashe 1994). Cette activation de la coagulation est également retrouvée dans un modèle porcin d'angioplastie coronaire (Gallo 1995). L'expression du FT après angioplastie se produit au niveau des CMLs. En effet, l'angioplastie par ballonnet induit, chez le rat, une expression d'ARNm de FT et une activité FT au niveau de la paroi lésée et plus particulièrement au niveau des CMLs (Marmur 1993). Cette expression est à la fois rapide (2 heures) et durable (plus de 48 heures). La réponse initiale à la dénudation est une expression rapide de FT par les CMLs de la média. Ce FT est protégé de la circulation par un ensemble d'éléments (lame limitante élastique, couche plaquettaire, endothélium régénéré), mais lorsqu'une deuxième agression vasculaire se produit, le FT est alors mis en contact avec le sang circulant et active la cascade de la coagulation favorisant les dépôts de fibrine. De plus, l'angioplastie par ballonnet est susceptible d'induire l'exposition de FT au niveau de la plaque d'athérome écrasée.

II. Implication de l'endothélium dans la resténose

II.1 Aspect anatomique

La régénération endothéliale commence dès les premières heures suivant la dénudation et cesse six à dix semaines plus tard selon les modèles et les espèces animales (Fishman 1975, Stemerman 1977). Elle s'effectue par prolifération et migration des cellules endothéliales à partir des zones bordant la lésion initiale et des orifices des branches collatérales. Même si elle peut être complète, la régénération endothéliale est très souvent partielle. L'endothélium régénéré présente des caractéristiques morphologiques différentes de l'endothélium normal, avec protrusion du cytoplasme dans la lumière du vaisseau, perte de l'alignement dans le sens du flux et aspect polygonal des contours (Haudenschild 1979, Reidy 1983).

II.2 Aspect fonctionnel

Les modifications structurales décrites ci-dessus sont associées à des modifications fonctionnelles. En effet, l'endothélium régénéré est dysfonctionnant, perdant ses propriétés de régulation de la vasoréactivité. Sur le plan expérimental, cela se traduit par une altération très sévère des réponses vasomotrices endothélium-dépendantes à des agonistes vasodilatateurs tel

que l'acétylcholine (Weidinger 1990). Cette dysfonction endothéliale serait due à une diminution de production ou de relarguage du NO, favorisant le spasme, l'adhésion leucocytaire, l'agrégation plaquettaire et la croissance des CMLs (Palmer 1987).

II.3 Conséquences sur la paroi artérielle

La régénération endothéliale (sur le plan anatomique et fonctionnel) joue vraisemblablement un rôle régulateur de la quantité d'hyperplasie néo-intimale qui va se développer en réponse au traumatisme artérielle. En effet, l'épaisseur de la néo-intima après dénudation par ballonnet est étroitement dépendante de la présence d'un endothélium régénéré. Il a ainsi été démontré que les zones non réendothélialisées étaient celles où l'épaississement intimal était le plus important. En effet, l'endothélium, en plus de son rôle fondamental dans la régulation de la vasomotricité, de la perméabilité, de la thrombogénicité et de l'adhésion leucocytaire, peut inhiber la croissance des CMLs, par la production de médiateurs tels que le NO.

Le rôle de la régénération endothéliale sur le remodelage vasculaire postangioplastie n'est pas connu. L'importance d'un endothélium fonctionnel dans la survenue d'un remodelage vasculaire favorable a cependant été démontrée dans d'autres situations. Ainsi, l'augmentation de taille des vaisseaux qui survient en réponse à une augmentation chronique du débit est dépendante de la présence d'un endothélium intact. Il est possible que le remodelage favorable qui s'observe dans certains cas après angioplastie (et qui permet de compenser l'hyperplasie néo-intimale) soit dépendant de la récupération rapide d'un endothélium plus ou moins fonctionnel au niveau de la zone dilatée.

III.Approches thérapeutiques

III.1 Apport en NO

L'une des premières approches testée a été de compenser les anomalies endothéliales en augmentant la quantité de NO disponible au niveau de la paroi artérielle. L'administration de L-arginine (le précurseur métabolique du NO), de donneurs de NO ou l'inhalation de NO ont été associées à une réduction de l'hyperplasie néo-intimale postangioplastie et à une amélioration de la relaxation endothélium-dépendante des segments dilatés (Schwarzacher 1997, Lee 1996, De Meyer 1995).

III.2 Facteurs de croissance endothéliaux

L'administration chez l'animal de facteurs de croissance endothéliaux tels que le bFGF ou le VEGF a été associée à une accélération de la réendothélialisation de segments artériels préalablement dénudés (Lindner 1990, Meurice 1996, Asahara 1996). Cet effet est observé après administration locale ou après administration intraveineuse du facteur de croissance.

Dans le cas du VEGF, il a récemment été montré que l'administration locale de ce facteur de croissance après dénudation artérielle permettait, non seulement d'entraîner une repousse très rapide de l'endothélium, mais aussi de limiter de manière extrêmement significative l'hyperplasie néo-intimale réactionnelle; il est vraisemblable que cet effet inhibiteur soit une conséquence de la repousse rapide de l'endothélium qui exerce des propriétés inhibitrices sur la croissance des CMLs (Asahara 1996). L'administration de bFGF permet non seulement d'augmenter la réendothélialisation des zones dénudées mais aussi de restaurer des réponses fonctionnelles endothéliumdépendantes quasi normales (Meurice 1996). L'effet du bFGF sur l'hyperplasie néo-intimale réactionnelle est plus controversé : dans certaines études, le bFGF provoque une augmentation de l'hyperplasie (Lindner 1991A), dans d'autres il y a une absence voire même une diminution de l'hyperplasie (Lazarous 1996, Meurice 1996). A la différence du VEGF, le bFGF n'est pas un facteur de croissance spécifique des cellules endothéliale, il est aussi actif sur les CMLs. Un effet indirect d'inhibition de l'hyperplasie néo-intimale (du fait de la réendothélialisation) pourrait aussi être contrebalancé par un effet direct de stimulation de l'hyperplasie néointimale (par augmentation de la prolifération des CMLs).

III.3 Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine

Depuis les travaux de Powell et collaborateurs, démontrant qu'un inhibiteur de l'enzyme de conversion (IEC) permettait une réduction significative de l'épaississement néointimal après angioplastie expérimentale chez le rat (Powell 1989), de très nombreuses études ont été consacrées aux actions de cette classe thérapeutique après traumatisme vasculaire (Farhy 1993, Van Belle 1996)

Des auteurs ont également rapporté l'efficacité des IEC sur l'amélioration de la relaxation endothélium-dépendante chez le rat spontanément hypertendu ou chez le lapin hypercholestérolémique, deux modèles classiques de dysfonction endothéliale. Van Belle et collaborateurs ont confirmé cette amélioration fonctionnelle après traitement par périndopril dans un modèle d'angioplastie expérimentale chez le lapin, associée à une réduction de

l'hyperplasie néo-intimale (Van Belle 1996). Ces effets bénéfiques fonctionnels et structuraux de l'IEC étaient attribués à l'inhibition de la production d'angiotensine II, un puissant agent mitogène pour les CMLs, mais aussi à l'inhibition de la dégradation de la bradykinine par l'enzyme de conversion, favorisant ainsi la production de NO. Ces effets bénéfiques étaient, en effet, abolis complètement en présence de L-NAME, inhibiteur compétitif de l'oxyde nitrique synthétase, ce qui suggère l'implication de la voie du NO dans l'effet de l'IEC.

TROISIEME PARTIE : L'ATHEROSCLEROSE

I. Description de l'athérosclérose

La plaque athéroscléreuse résulte d'un épaississement local au niveau de l'intima des artères. Elle comporte deux parties: l'athérome et la sclérose. L'athérome forme le centre de la plaque. Il est constitué de 80% de lipides, essentiellement des esters de cholestérol, souvent localisés à l'intérieur de cellules qui sont principalement des monocytes/macrophages, mais aussi des CMLs et quelques lymphocytes. La sclérose forme le pourtour de la plaque et dessine une chape fibreuse où prédominent, essentiellement des CMLs. Les proportions respectives de l'athérome et de la sclérose varient d'une lésion à l'autre (Capron 1990, Ross 1993, Sanders 1994, Libby 1996).

Plusieurs théories, probablement complémentaires, ont été proposées pour expliquer la génèse de l'athérosclérose. La première théorie émise par Ross décrit l'athérosclérose comme une lésion intimale locale et hémodynamique. Selon cette théorie, se succéderaient, associées à une accumulation de lipides intra et extracellulaire, une dénudation endothéliale et une adhésion et dégranulation plaquettaire libérant du PDGF entraînant la migration vers l'intima et la prolifération des CMLs (Ross 1977). Aujourd'hui, on considère plus volontiers l'athérosclérose comme le résultat d'interactions complexes de type inflammatoire, entre les éléments figurés du sang (plaquettes, monocytes, lymphocytes) et les cellules de la paroi vasculaire (cellules endothéliales, CMLs).

La progression d'une lésion athéroscléreuse se déroule en plusieurs étapes (Ross 1993, Sanders 1994, Libby 1996, Fuster 1997, Felton 1997) :

- la formation de la strie lipidique correspondant à l'accumulation sousendothéliale de cellules à inclusions lipidiques, dites cellules spumeuses
- l'évolution vers la formation de la plaque fibreuse avec un revêtement de fibres de collagène et d'élastine et l'enchassement de CMLs dans cette structure
- le vieillissement et l'altération de la plaque

Les lésions les plus précoces observées à l'autopsie de sujets très jeunes décédés accidentellement et sans signe clinique vasculaire, sont uniquement constituées de macrophages spumeux isolés plus ou moins saturés en vésicules lipidiques. Il s'agit de lésions visibles uniquement en microscopie. Ces lésions siègent le plus souvent au niveau des bifurcations, des coudures et des branchements artériels qui sont le lieu de stress hémodynamique de la paroi puisqu'à ce niveau, l'écoulement sanguin n'est plus laminaire.

L'étape suivante consiste en la formation de stries lipidiques, visibles macroscopiquement. A côté des macrophages spumeux, la lésion s'enrichit de quelques lymphocytes venus du sang circulant et de quelques CMLs venues de la média. Des lipides non phagocytés s'accumulent dans les stries. Ces lésions ne sont pas symptomatiques et sont encore réversibles si les conditions qui les ont créées sont contrôlées par le mode de vie et un traitement. Sinon, elles évoluent vers la plaque athéromateuse proprement dite.

La média est souvent amincie. La plaque athéromateuse devenue volumineuse est visible à l'angiographie. La plaque est généralement excentrée et n'occlut pas le vaisseau. Du

fait de sa position anatomique dans la lumière, elle est soumise à de fortes contraintes mécaniques qui peuvent ulcérer sa surface ou la rompre au niveau de son insertion sur la partie saine du vaisseau. L'ulcération ou la rupture mettent en contact direct le sang avec du matériel sous-endothélial. Un thrombus fait de plaquettes et de fibrine se forme immédiatement et peut conduire à l'occlusion complète du vaisseau si celui-ci est de petit calibre, comme par exemple l'artère coronaire. S'il s'agit d'un vaisseau de plus gros calibre, l'artère carotide par exemple, le thrombus se forme, et peut dans les cas les plus graves se détacher et être emporté en aval par le flux sanguin jusqu'à ce qu'il s'immobilise dans un vaisseau de plus petit calibre qu'il occlut totalement. Il est alors responsable d'une ischémie aiguëe : infarctus du myocarde, mort subite, accidents vasculaires cérébraux. Ces accidents surviennent à l'âge moyen de la vie, d'autant plus tôt que le patient accumule des facteurs de risque.

Par la suite, la plaque s'enrichit en CMLs qui prolifèrent localement. Sa couverture fibreuse s'épaissit. La taille des lésions s'accroît, rétrécissant encore d'avantage la lumière artérielle. Le débit sanguin diminue et le patient présente des signes d'ischémie chronique : angine de poitrine, insuffisance artérielle des membres inférieurs. Cependant, ces signes n'apparaissent que lorsque les besoins en oxygène sont augmentés par l'effort. Le patient a le plus souvent développé une circulation collatérale de suppléance qui permet une perfusion suffisante des organes dans les conditions basales. Cependant la tolérance à une anémie ou à une insuffisance respiratoire est fortement réduite. A ce stade, la maladie est invalidante, limite l'activité du sujet mais ne menace plus autant qu'au stade précédent sa vie par des accidents aigus.

L'événement déterminant dans la formation de la plaque d'athérome est l'activation de l'endothélium. Les LDLs traversent alors la paroi endothéliale et se dirigent vers les tissus sous-jacents où elles sont oxydées. Elles induisent l'expression de facteurs chimiotactiles par les cellules de la média permettant le recrutement des monocytes et des lymphocytes T. Ces cellules s'infiltrent, alors, entre les cellules endothéliales et migrent vers les tissus sousendothéliaux où les monocytes se différencient en macrophages.

L'atteinte initiale, infra-microscopique est une atteinte fonctionnelle de l'endothélium. La probabilité de développer plus ou moins rapidement cette agression endothéliale est pour chaque individu une combinaison complexe de facteurs environnementaux tels que le tabagisme, le régime alimentaire, les infections et les facteurs génétiques qui contrôlent les métabolismes, ou encore la réponse immune. L'endothélium agressé réagit en exposant à sa surface des molécules d'adhésion cellulaire qui permettent l'ancrage des leucocytes circulants, des lymphocytes et surtout des monocytes. Les monocytes recrutés traversent la paroi endothéliale et s'établissent dans le sous endothélium où ils sont activés en macrophages par les dépôts de lipides oxydés. La croissance de la lésion ne doit pas être comprise comme un simple dépôt de lipides mais comme une véritable réaction inflammatoire localisée induite par l'activation des macrophages. Ceux-ci libèrent des cytokines et des facteurs de croissance. Ces médiateurs solubles activent l'endothélium, augmentent sa perméabilité aux lipides et augmentent le recrutement de leucocytes. Cytokines et facteurs de croissance activent également les CMLs de la média sous-jacente, qui vont migrer vers l'intima et secondairement s'y multiplier. Il s'établit au niveau de la plaque un échange de médiateurs solubles entre plusieurs types cellulaires, notamment les macrophages, l'endothélium, les lymphocytes T et les CMLs qui empêche le processus de s'éteindre spontanément.

La rupture ou l'érosion de la plaque vont déterminer le passage à la survenue des évènements cliniques critiques. Elles se produisent sur des lésions mécaniquement fragiles,

relativement pauvres en CMLs et protégées par une mince capsule fibreuse. La solidité de cette capsule est conditionnée par sa richesse en collagène, dont le renouvellement permanent est assuré par la synthèse des CMLs combinée à la dégradation par des enzymes protéolytiques, en particulier par des métalloprotéinases fixées à la MEC. Cet équilibre est déplacé en faveur de la dégradation de la capsule au voisinage des cellules inflammatoires de la plaque. La capsule protectrice s'amincit et peut donc se rompre plus facilement. Lorsque, plus tard, les CMLs auront proliféré sous l'effet de facteurs de croissance, la MEC et donc la capsule fibreuse seront plus épaisses et plus solides.

La rupture de la plaque provoque la formation d'un thrombus partiellement ou totalement occlusif qui peut, dans certains cas comme l'infarctus du myocarde, être lysé rapidement par un traitement fibrinolytique. La formation du thrombus est facilitée par la présence de macrophages et de CMLs activés exprimant du FT fonctionnellement actif. En présence des facteurs plasmatiques de la coagulation, la cascade de la coagulation est initiée ce qui entraîne des dépôts de fibrine associés aux plaquettes activées.

L'expression pariétale du t-PA se modifie durant le développement de l'athérosclérose. Comparée à celle des vaisseaux sains, la quantité de t-PA présente dans l'intima de vaisseaux athéroscléreux est réduite. A l'inverse, elle est augmentée dans la média et associée aux CMLs. Une majoration de l'urokinase a été observée dans la néo-intima des lésions athéroscléreuses. Elle est attribuée à une production par les macrophages infiltrant la plaque et les CMLs.

Chez l'homme, l'expression pariétale de PAI-1 augmente avec le degré d'athérosclérose. Cette augmentation d'expression est en partie attribuée aux néovaisseaux parcourant les plaques et aux CMLs. Le PAI-1 au sein des plaques serait en large excès par rapport aux activateurs du plasminogène et pourrait, donc, favoriser les dépôts de fibrine avec pour conséquence un ensemble de propriétés proathérogènes incluant une stimulation de la croissance cellulaire, la fixation de lipoprotéines, des modifications du tonus et de la perméabilité vasculaire et une action chimiotactique sur les leucocytes.

II. Expression du FT dans l'athérosclérose

De nombreuses études ont analysé l'expression du FT dans l'athérosclérose humaine. La présence de FT au sein d'une plaque athéromateuse humaine a été mise en évidence pour la première fois en 1972 par immunohistochimie (Zeldis 1972). Le FT a ensuite été mis en évidence sur des fragments d'endartérectomie carotidienne techniques par immunohistochimiques et par hybridation in situ (Wilcox 1989), puis sur des fragments provenant d'athérectomie coronaire par immunohistochimie (Annex 1995). Plus récemment, par technique fonctionnelle, il a été démontré que le FT est fonctionnellement actif et donc capable d'activer la coagulation (Marmur 1996). Le FT est mis en évidence au niveau des cellules spumeuses, d'origine musculaire ou macrophagique, et aussi dans les îlots de nécrose contenant également des lipides oxydés, des cristaux de cholestérol et des médiateurs de l'inflammation. Par fixation des FVIIa et FX préalablement marqués, il a été démontré que le FT est également très abondant dans le cœur lipidique acellulaire et, pour la première fois, a été détecté au niveau de l'endothélium recouvrant les plaques (Thiruvikraman 1996). Il a également été retrouvé dans les plaques d'athérome riches en lipides (Toschi 1997). Le FT est donc un élément constitutif des plaques athéroscléreuses.

Le FT présent dans la plaque d'athérome provient probablement des macrophages. En effet, des macrophages isolés de plaques athéroscléreuses carotidiennes expriment une forte activité FT (Tipping 1989). De plus la surcharge lipidique en cholestérol et en LDL oxydées est capable d'induire une augmentation d'expression du FT par les macrophages, de même que le processus inflammatoire existant au niveau du site de rupture. Cependant, le FT peut également provenir des CMLs (Moreno 1996). L'origine endothéliale quant à elle reste à confirmer.

III.Implication du NO dans l'athérosclérose

Le NO est le principal facteur antiathérogène de l'endothélium. Le NO interfère in vitro avec les éléments clés du développement de l'athérosclérose tels que l'adhésion des monocytes et des leucocytes à l'endothélium (Tsao 1994) ainsi que les interactions plaquettes-mur vasculaire. Le NO a été démontré comme inhibant la prolifération et la migration des CMLs autant in vitro qu'in vivo. Le précurseur du NO, la L-arginine, inhibe le développement des plaques athéroscléreuses et permet de restaurer, dans les stades précoces de l'athérosclérose, une fonction endothéliale normale (Jeremy 1996). Plusieurs raisons peuvent expliquer la diminution de la synthèse de NO dans l'hypercholestérolémie et l'athérosclérose. Des ces conditions il y aurait un découplage du complexe recepteur protéines G. Il existe également dans l'hypercholestérolémie une quantité importante d'ADMA circulant l'ADMA étant un inhibiteur endogène des NOS. Ceci a été démontré dans les

modèles expérimentaux chez le lapin et dans les pathologies d'hypercholestérolémies humaines (Böger 1997).

IV.Implication de l'endothélium dans l'athérosclérose

La dysfonction endothéliale dans l'athérosclérose correspond à une altération de la réponse vasodilatatrice dépendante de l'endothélium (Vanhoutte1997). L'administration d'un régime enrichi en cholestérol chez l'animal permet de reproduire les séquences observées dans l'athérosclérose humaine (Daley 1994). Ce modèle a permis de mettre en évidence une altération de la relaxation endothélium-dépendante bien qu'il n'y ait pas de modifications anatomiques de l'endothélium; les relaxations endothélium-indépendantes demeurent généralement intactes (Bossaler 1987, Jayakody 1987, Weidinger 1991, Shimokawa 1989, Freiman 1986). Chez des animaux âgés de 12 à 14 mois génétiquement hypercholestérolémiques (Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbits), la dysfonction endothéliale est associée à une perte de cellules endothéliales (Kolodgie 1990). Les artères coronaires de patients athéroscléreux présentent une altération de la dilatation endothéliumdépendante identique (Berkenboom 1987, Ludmer 1986, Förstermann 1988, Lewis 1998). On considère que ces anomalies sont en rapport soit avec une diminution de la production, (Shimokawa 1989) soit avec une augmentation de la destruction de l'EDRF/NO (Girerd 1990, Keaney 1995, Ohara 1995). L'activité de la NOS endothéliale (NOSe) est modulée par le complexe Ca²⁺ - calmoduline et par les protéines inhibitrices que sont les cavéolines (Feron 1996, Michel 1997 B, Ju 1997, Garcia-Gardena 1997). Une étude récente a démontré que lorsque des cellules endothéliales aortiques bovines sont cultivées en présence de serum de

patients hypercholestérolémiques, les cavéolines sont sans effet sur l'activité de la NOSe mais il existe une diminution de la quantité de NO et une augmentation du complexe cavéoline – NOSe (Feron 1999). Ceci pourrait, en partie, expliquer la diminution de NO associée à la dysfonction endothéliale retrouvée dans l'athérosclérose.

Contrairement aux premières hypothèses, on sait aujourd'hui que dans de nombreuses circonstances pathologiques, l'endothélium peut être présent au niveau des lésions d'athérosclérose mais est fonctionnellement anormal. L'endothélium peut perdre ses fonctions antithrombotiques et être au contraire le point de départ de la coagulation et de la formation de thrombus. Parallèlement, l'endothélium exprime des molécules d'adhérence pour les leucocytes favorisant leur migration vers l'espace extravasculaire. L'adhésion des monocytes sur l'endothélium artériel est l'une des étapes les plus précoces rencontrée dans la genèse de la plaque d'athérome (Duplaa 1993, Gerrity 1985). Nous l'avons vu dans la première partie, cette adhésion est rendue possible grâce à l'expression de molécules d'adhésion endothéliale qui reconnaissent leur ligand monocytaire. Des facteurs mécaniques comme les turbulences du flux sanguin, ou humoraux, comme l'hypercholestérolémie, entraînent une surexpression de ces molécules d'adhésion endothéliales qui recrutent alors les monocytes circulants. Devenues macrophages, ces cellules immunocompétentes phagocytent les déchets lipidiques accumulés dans l'espace sous-endothélial. Lorsqu'ils sont dépassés dans leur capacité d'épurateurs, ces macrophages forment alors les cellules spumeuses présentent dans le noyau lipidique de la plaque d'athérome.

QUATRIEME PARTIE : LES FACTEURS DE CROISSANCE

I. Généralités

Les facteurs de croissance sont des polypeptides qui ont la particularité de contrôler la croissance d'un ou plusieurs type(s) cellulaire(s). Un certain nombre de ces facteurs de croissance joue un rôle fondamental dans la physiologie et la physiopathologie vasculaires.

Les facteurs de croissance sont impliqués dans :

- l'homéostasie des cellules : maintien d'un tissu égal à lui-même, la perte des cellules est compensée par un apport de cellules

- l'embryogénèse
- la régénération de tissus, d'organes (Foie)

- le cancer

II. Le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

II.1 VEGF : généralités

Le VEGF est également appelé vascular permeability factor (VPF) pour ses propriétés de contrôle de la perméabilité vasculaire (Dvorak 1995). Il existe 3 sous familles de VEGF : VEGF A, B et C. Le VEGF est une glycoprotéine homodimérique de 45 kDa avec quatre isoformes connues, produites par épissage alternatif de l'ARNm à partir d'un gène commun (121, 165, 189 et 206 acides aminés) (Ferrara 1997). La forme VEGF 165 est la forme prédominante. Le gène du VEGF est composé de huit exons. La structure de ce gène comprend une séquence signal qui permet à la protéine d'être sécrétée (Leung 1989).

II.2 Distribution et rôles biologiques du VEGF

La distribution du VEGF dans l'organisme est très large. On peut ainsi l'isoler dans les myocytes cardiaques, le cerveau, la glande pituitaire, le rein, le foie ou l'ovaire (Ferrara 1992) ainsi que dans les CMLs. Les cellules cibles du VEGF sont les cellules endothéliales vasculaires, les monocytes et les précurseurs hématopoiétiques (Ferrara 1997). Au niveau des lésions athéroscléreuses humaines, le VEGF est exprimé dans les régions du néo-intima riches en macrophages et en CMLs et dans les régions riches en cellules spumeuses, où il est autant exprimé à la surface des cellules que dans l'espace extra cellulaire (Ramos 1998, Chen 1999). Alors qu'à l'état de base l'expression du VEGF est uniquement retrouvée au niveau des cellules endothéliales du vaisseau, après dénudation artérielle par ballonnet, l'expression du VEGF est induite dans le néo-intima et la média (Ruef 1997). L'expression de l'ARNm du VEGF a été corrélée dans le temps et dans l'espace à la prolifération de néovaisseaux, ce qui très tôt a suggéré un rôle très important de ce facteur de croissance dans les réactions d'angiogenèse. Des études ont permis de démontrer les effets salutaires du VEGF dans le développement de la circulation collatérale chez le lapin (Takeshita 1994, Bauters 1994, Bauters 1995). D'autre part l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre le VEGF a permis de limiter l'extension de certaines tumeurs richement vascularisées dans divers modèles expérimentaux. Au niveau de la paroi vasculaire, les cellules cibles du VEGF sont exclusivement les cellules endothéliales. Le VEGF stimule in vitro la prolifération et la migration des cellules endothéliales et leur organisation en microtubes. Le VEGF a également une action de régulation de la perméabilité capillaire, en favorisant l'extravasation de protéines telles que le fibrinogène, permettant ainsi la formation d'un gel de fibrine propice à la migration et à l'organisation des cellules endothéliales. Enfin, le VEGF stimule l'expression et le relargage de différentes enzymes protéolytiques telles que la serine protease urokinasetype, le tissue-type plasminogen activator, les métalloprotéinases et les collagénases, favorisant la lyse de la membrane basale et de la MEC, préalable indispensable à l'invasion du tissu périadventiciel par des néovaisseaux (Ferrara 1992, Ferrara 1993).

II.3 Récepteurs et voies de signalisation du VEGF

Les récepteurs du VEGF ont une répartition ubiquitaire dans tout l'arbre vasculaire. Deux classes de récepteurs de haute affinité ont été isolées. Ils sont retrouvés à la surface des cellules endothéliales micro- et macrovasculaires, des monocytes et des précurseurs des cellules hématopoiétiques à l'exclusion d'autres lignées cellulaires comprenant les CMLs vasculaires (Ferrara 1997, Shen 1993, Barleon 1996). Les récepteurs du VEGF sont exprimés en permanence, indépendamment de l'état de quiescence cellulaire (Ferrara 1993). Les deux types de récepteurs du VEGF (flt-1/fms/VEGFR-1 et flk-1/KDR/VEGFR-2) ont une organisation semblable : un domaine extracellulaire de sept sous-unités présentant des analogies avec les chaînes d'immunoglobulines, un domaine hydrophobe transmembranaire et deux autres domaines cytoplasmiques, l'un porteur d'une kinase et l'autre d'une tyrosine kinase. Le récepteur flk-1/KDR a une affinité plus basse que flt-1 et serait responsable de l'activité mitogénique du VEGF (Waltenberger 1994, Millauer 1993). Deux autres récepteurs à

activité tyrosine kinase (tie-1 et tie-2) sont exprimés sélectivement par les cellules endothéliales, le premier étant susceptible de jouer un rôle dans le maintien de la fonction des cellules endothéliales, le second dans le développement de l'arbre vasculaire artériel et veineux (Sato 1993).

Les héparanes-sulfates de la MEC peuvent constituer une forme supplémentaire de " récepteur " à basse affinité pour le VEGF. En effet, le VEGF présente une forte affinité pour l'héparine et les héparanes-sulfates (Gitay-Goren 1992). Les héparanes-sulfates, qui constituent un contingent important parmi les composants de la MEC, vont donc pouvoir fixer le VEGF. La fixation du VEGF à la matrice favorise la fixation sur les récepteurs endothéliaux du fait de la proximité entre la matrice et les cellules endothéliales (Gitay-Goren 1992).

Les voies de signalisation intracellulaire mises en jeu par l'activation d'un récepteur du VEGF sont mal connues. Il a été démontré dans différentes lignées cellulaires que l'interaction VEGF/récepteur provoquait une entrée massive de calcium dans la cellule, à des concentrations proches de celles observées lorsque les cellules endothéliales entrent en cycle de réplication. D'autre part, il a été rapporté une activation de la phospholypase C, suggérant l'implication en second messager de la voie des phosphoinositides (Ferrara 1992).

Physiopathologie :

Le VEGF est produit par les CMLs de la paroi vasculaire. Une libération de VEGF au moment du traumatisme par ballonnet a récemment été suggérée chez l'homme où une

élévation plasmatique du VEGF a pu être détectée dans les suites d'une procédure d'angioplastie (Lam 1996). En raison de l'absence de récepteur, le VEGF est dépourvu d'effet direct au niveau des CMLs. Par contre, son administration chez le rat stimule la réendothélialisation et par ce biais réduit la formation de l'hyperplasie néointimale (Asahara 1995A).

III.Les fibroblast Growth Factors (FGF)

III.1. FGF : généralités

Les fibroblast growth factors (FGF) sont issus d'une famille multigénique caractérisée par sept isoformes exerçant leur action après liaison à une famille de récepteurs à haute affinité. Ils ont été isolés il y a une dizaine d'années par extraction au niveau du tissu cérébral. Les deux molécules les plus représentatives et les mieux connues sont l'acidic growth factor (aFGF ou FGF-1) et le basic fibroblast growth factor (bFGF ou FGF-2). Les autres représentants de cette famille sont les int-2/FGF-3, hst/kaposiFGF/FGF-4, FGF-5, FGF-6 et le KGF/FGF-7 (Hughes 1993 B).

III.1.1 L'acidic et le basic fibroblast growth factor

Les gènes de l'acidic et du basic fibroblast growth factor (aFGF et bFGF) sont localisés respectivement sur les chromosomes 3 et 4, et présentent une organisation génomique voisine constituée de trois exons séparés par deux introns. Ils sont tous deux traduits en de simples chaines polypeptidiques de poids moléculaires variables (18 à 24 kDa) avec 55% d'homologie entre les deux protéines, ce qui évoque un gène ancestral commun (Hughes 1993 B, Esch 1985).

Le bFGF, dans sa forme la plus fréquente, est constitué de 146 acides aminés, l'aFGF de 140 acides aminés. Ces deux protéines n'ont pas la séquence signale que l'on retrouve généralement sur les peptides sécrétés et leur mode de sécrétion reste inconnu (Folkman 1987, Schott 1993, Abraham 1986). Leur transport à l'extérieur de la cellule serait assuré par l'association à des protéines transmembranaires. De plus, un mode de relargage original pourrait faire intervenir un mécanisme d'exocytose indépendant de l'appareil de Golgi, un choc thermique, la mort cellulaire, le " shear stress " (force laminaire de cisaillement), ou des microtraumatismes au niveau de la membrane plasmique (Schott 1993, Abraham 1986, Sterpetti 1994, Gajdusek 1989).

III.1.2 Rôles biologiques du basic fibroblast growth factor

Le bFGF présente quatre isoformes : trois de haut poids moléculaire (22, 22,5 et 24 kDa) et une de poids moléculaire plus petit (18 kDa). Le rôle spécifique de chaque isoforme n'est pas déterminé avec certitude. Le bFGF de 18 kDa se trouve principalement dans le cytoplasme alors que les formes de plus haut poids moléculaire sont localisées essentiellement dans le noyau (Hughes 1993 B).

Le bFGF joue un rôle in vitro dans la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire (Biro 1994, Lindner 1990, Reidy 1993). Il intervient également en tant qu'agent

neurotrophique et angiogénique (Hughes 1993 B, Folkman 1987, Schott 1993). In vivo, il est impliqué dans des processus physiologiques aussi complexes que le développement embryonnaire et néonatal, l'angiogénèse ou la cicatrisation (Hughes 1993 B, Asahara 1995 B, Schott 1993, Hughes 1993 A), ainsi que dans de nombreuses situations pathologiques telles que l'athérosclérose, les processus néoplasiques, la maladie d'Alzheimer ou la dystrophie musculaire. On le trouve dans une variété de tissus richement vascularisés comme le cerveau, l'hypophyse, la rétine, la glande surrénale, le foie, le rein, le corps jaune ou le placenta (Hughes 1993 A, Hughes 1993 B). Des cytokines comme l'Il-1 diminuent l'effet du bFGF sur la prolifération des CMLs et induit la production de NO de la part de ces cellules (Scott Burden 1992).

Dans le système cardiovasculaire, le bFGF joue un rôle clef dans le développement du coeur et de la circulation, il est impliqué dans les phénomènes d'angiogénèse, de vasculogénèse et de cardiomyogénèse (Hughes 1993 B, Schott 1993, Engelmann 1993). Des études ont permis de démontrer les effets salutaires du bFGF à court terme (5 semaines) dans le développement de la circulation collatérale chez le chien (Unger 1994, Lazarous 1995, Lazarous 1996, Rajanayagam 1996). En 1997, une étude de Matie Shou et coll a cependant démontré une absence d'effet de la part du bFGF dans le développement de la circulation collatérale chez le chien (Shou 1997).

Au niveau de la paroi endothéliale, la cellule endothéliale et la CML expriment le gène du bFGF (deux ARNm de taille différente ont été retrouvés in vitro) puis produisent et relarguent ce facteur de croissance (Schweigerer 1987, Gospodarowicz 1988). L'effet du bFGF au niveau des cellules cibles que sont les cellules endothéliales est probablement

prolongé par le stockage au niveau de la MEC du FGF (Vlodavsky 1987) et amplifié par une augmentation de l'expression des récepteurs FGF dans les cellules endothéliales après traumatisme vasculaire (Lindner 1993). L'effet angiogénique du bFGF est l'effet le plus documenté dans la littérature. Le bFGF joue un rôle clef dans toutes les étapes aboutissant à la formation de néovaisseaux. D'une part, il stimule la production et le relargage d'enzymes (protéases, activateurs du plasminogène, collagénases, métalloprotéinases) nécessaires à la digestion de la membrane basale et de la MEC. D'autre part, il stimule la prolifération et l'organisation des cellules endothéliales en microtubes (Montesano 1986, Schweigerer 1987).

La localisation du bFGF est caractéristique puisqu'il est séquestré dans des compartiments intracellulaires ou lié à la MEC où il reste inaccessible pour les CMLs. Dans le vaisseau normal, il ne peut donc être retrouvé dans le milieu extracellulaire comme les autres facteurs de croissance. Cependant, immédiatement après l'angioplastie, la mort de nombreuses CMLs permet une libération soudaine et importante de bFGF au niveau du site d'agression ce qui entraîne la prolifération des CMLs. L'utilisation de composés mimant l'héparine peut modifier l'effet du bFGF (Medalion 1997). L'héparinase et les enzymes protéolytiques sécrétés par les leucocytes et les macrophages infiltrés dans la région blessée assurent également la libération du bFGF de la MEC. Le bFGF libéré consécutivement à l'angioplastie exerce une puissante action mitogène sur les CMLs de la média. Ces cellules ont la capacité de se répliquer à des niveaux élevés pendant plus de deux semaines.

III.1.3 Les récepteurs du bFGF

Les récepteurs du bFGF présentent de nombreuses homologies avec les récepteurs de type tyrosine kinase appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Hughes 1993 B, Folkman 1987). Les tyrosines kinases sont intimement impliquées dans la croissance et la différenciation cellulaire et sont largement exprimées dans les tissus embryonnaires.

Quatre récepteurs du bFGF ont été isolés et leurs ADN complémentaires clonés et séquencés : FGF-R-1 (gène *flg*), FGF-R-2 (gène *bek*), FGF-R-3 et FGF-R-4. Ces quatre protéines ont une structure semblable : un domaine extracellulaire de liaison au ligand présentant des analogies avec les chaînes d'immunoglobulines, un domaine hydrophobe transmembranaire et deux autres domaines cytoplasmiques, l'un porteur d'une kinase et l'autre d'une tyrosine kinase.

FGF-R-1 et FGF-R-2 sont des récepteurs de haute affinité tandis que FGF-R-3 et FGF-R-4 sont des récepteurs de basse affinité pour le bFGF (Hughes 1993 B). Au niveau vasculaire, on les retrouve à la surface des cellules endothéliales et des CMLs (Hughes 1993 A). Au niveau cardiaque, ils sont exprimés à la surface des myocytes cardiaques pendant les périodes foetale et néonatale ; leur expression décroît ensuite pour disparaître rapidement après la naissance (Engelman 1993, Hughes 1993 B).



La complexité des familles multigéniques de bFGF et de ses récepteurs est encore compliquée par les nombreux isoformes de ces récepteurs ainsi que par les sites de liaison à basse affinité dans la MEC et à la surface des cellules endothéliales au niveau des héparanes sulfates protéoglycanes (Vlodavsky 1987).

Ainsi, les récepteurs FGF-R-1 et FGF-R-2 se caractérisent par plusieurs isoformes, issues d'un épissage alternatif au moment de la maturation de l'ARNm, permettant de réguler les interactions bFGF-FGF-R et de diversifier les réponses cellulaires (Blanquet 1995). Au moins 12 isoformes du seul récepteur FGF-R-1 ont été dénombrées. Ces différents isoformes présentent des affinités différentes pour le ligand et des localisations différentes : récepteur lié à la membrane, récepteur sécrété dans l'espace extracellulaire ou intracellulaire. Cette dernière forme autorise à penser que le bFGF puisse exercer un rôle de facteur de croissance intracrine. La forme sécrétée a été invoquée dans la régulation locale de la biodisponibilité du bFGF.

La signalisation fonctionnelle de toutes ces isoformes reste encore à déterminer mais il est fort probable qu'elles permettent, à partir d'un nombre limité de gènes (au moins quatre), d'obtenir une variété de protéines permettant de réguler les réponses cellulaires de manière fine en fonction du stimulus et du site d'expression.

La répartition ubiquitaire du bFGF et de ses récepteurs contraste avec les faibles taux d'ARNm habituellement retrouvés ce qui suggère une régulation post-transcriptionnelle des différents gènes et une libération de bFGF à partir des sites de stockage intra- et extracellulaires. D'autre part, il pourrait exister une régulation négative de l'expression des récepteurs dans la paroi vasculaire quiescente qui serait levée lors d'un traumatisme aigu ou chronique. Ainsi, l'absence de récepteurs au niveau de la paroi vasculaire saine expliquerait le défaut d'action du bFGF sur l'artère normale. L'expression de ceux-ci serait majorée lorsque le vaisseau est lésé, permettant la liaison au bFGF.

III.1.4 Stockage du bFGF dans la matrice extracellulaire

La MEC a un rôle connu depuis longtemps dans la prolifération et la morphogénèse des cellules endothéliales vasculaires. Celles-ci nécessitent en effet un milieu approprié sur lequel elles puissent s'attacher et se développer. La MEC sert de réservoir pour le bFGF qui peut être utilisé par les cellules environnantes présentant des récepteurs de haute affinité pour le FGF c'est à dire des récepteurs FGF-R-1 (Daley 1994).

Des cellules endothéliales mises en cultures prolifèrent en présence de bFGF exogène dans le milieu de culture (Schweigerer 1987). Privées de ce facteur de croissance, leur prolifération s'arrête mais, étalées sur un milieu de culture contenant une MEC synthétisée par des cellules endothéliales, leur réplication reprend. Ceci suggère la présence d'un facteur de croissance dans ce milieu (Schweigerer 1987). Le bFGF a pu être isolé de cette MEC (Vlodavsky 1987, Folkman 1988). Ainsi la matrice extracellulaire semble pouvoir jouer un rôle de réservoir pour le bFGF.

La MEC sous-endothéliale contient de l'élastine, du collagène et des protéoglycanes. L'héparane-sulfate représente plus de 90% des chaînes glycosaminoglycanes et se dépose à la surface de la membrane plasmique des cellules endothéliales. Le bFGF a une affinité pour l'héparine et les dérivés hépariniques dont l'héparane sulfate, qui ont la propriété de stabiliser le bFGF en le protégeant de la dénaturation protéique, des températures extrêmes et de pH (Hughes 1993 A, Schott 1993). Ainsi la MEC constituerait un site de stockage dans lequel serait concentré et stabilisé environ 30% du bFGF synthétisé par les cellules endothéliales, permettant à ce facteur de croissance de jouer un rôle autocrine sur les cellules adjacentes (Schott 1993, Vlodavsky 1987). Cet effet interviendrait après liaison au récepteur et internalisation du bFGF pour lesquelles la liaison à l'héparane sulfate protéoglycane aurait son importance. Le relargage du bFGF de ses sites de stockage extracellulaires interviendrait lorsque les cellules endothéliales subissent un traumatisme physique ou chimique. Ces sites de liaison pourraient également expliquer la persistance de l'effet mitogène lorsque l'on administre à des cellules endothéliales en culture des anticorps spécifiques anti-bFGF éliminant la forme soluble du bFGF. La liaison à l'héparane-sulfate pourrait en effet masquer les épitopes immunoréactifs et ainsi neutraliser l'action des anticorps.

III.2 FGF : effets sur les vaisseaux

III.2.1 Effet sur la fonction endothéliale

Les effets bénéfiques du FGF sur la régénération endothéliale étant clairement démontrés, il est également important d'évaluer l'effet de l'administration de ce facteur de croissance sur la fonction du néo-endothélium. Meurice et coll ont rapporté les effets de l'administration chronique de bFGF sur les réponses vasomotrices endothélium dépendantes après traumatisme vasculaire (Meurice 1996). Dans cette étude, l'administration de faibles doses de bFGF était associée à un effet significatif sur la réendothélialisation. Quatre semaines après la dénudation, la vasorelaxation endothélium dépendante induite par l'acétylcholine était significativement améliorée chez les animaux recevant le bFGF (Meurice 1996). Les mécanismes par lesquels le bFGF améliore la relaxation à l'acétylcholine ne sont pas complètement compris mais la normalisation des réponses endothélium-dépendantes observées sous bFGF n'est probablement pas le simple reflet de la repousse endothéliale. En effet, il a précédemment été démontré que les anomalies de la réponses endothéliumdépendante persistaient après réendothélialisation complète (Weidinger 1990). Ceci suggère que le bFGF, en plus de ses effets trophiques, pourrait également modifier certaines des propriétés des cellules endothéliales. La démonstration d'effets fonctionnels du bFGF dans un modèle très différent, celui de l'athérosclérose induite par un régime enrichi en cholestérol, tend à confirmer cette hypothèse (Meurice 1997). En effet, dans ce modèle d'athérosclérose animale, il existe d'importantes anomalies des réponses endothélium-dépendantes bien qu'il n'y ait pas de modification anatomique de l'endothélium (Bossaler 1987, Weidinger 1991, Jayakody 1987). On considère que ces anomalies sont en rapport soit avec une diminution de
la production soit avec une augmentation de la destruction de l'EDRF/NO (Girerd 1990, Keaney 1995, Ohara 1995).

Une des explications de l'effet du bFGF dans ces modèles pourrait être que le bFGF augmente la synthèse de la NOS. En effet, les facteurs de croissance de l'endothélium tels que le FGF ou le VEGF induisent un signal de phosphorylation et de mobilisation du calcium dans la cellule endothéliale. De ce fait ils sont capables d'activer la sécrétion de NO par l'endothélium. L'injection de ces facteurs de croissance par voie intraveineuse s'accompagne d'une hypotension transitoire en rapport avec l'augmentation de sécrétion de NO (Michel 1997 A). En plus de son effet mitogénique, le bFGF pourrait donc exercer un effet direct sur la fonction des cellules endothéliales.

III.2.2. Effet sur l'hyperplasie intimale

L'effet de l'administration de FGF sur l'hyperplasie néointimale n'est pas complètement éclairci. Lindner et coll, utilisant des doses élevées de basic FGF (12 µg/jour pendant deux semaines chez le rat) ont retrouvé une augmentation significative de l'hyperplasie intimale (Lindner 1991 A). Plus récemment, Lazarous et coll ne retrouvent pas d'augmentation de l'hyperplasie intimale dans un modèle de traumatisme artériel fémoral chez le chien après administration systémique de bFGF (Lazarous 1996). Enfin, dans les études de Meurice et coll, le même degré d'hyperplasie intimale était retrouvé dans des modèles de traumatisme par ballonnet ou d'hypercholestérolémie (Meurice 1996, Meurice 1997). L'ensemble de ces études suggère que l'effet final du bFGF sur l'hyperplasie intimale est probablement la conséquence d'un équilibre entre des effets stimulants et inhibiteurs de la prolifération des CMLs. Comme cela a été préalablement discuté, de nombreuses études suggèrent que les propriétés de l'endothélium telles que la production de NO sont importantes dans la formation de l'hyperplasie intimale (Guo 1994, Hamon 1994). L'accélération du processus de réendothélialisation par le bFGF a ainsi tendance à réduire l'hyperplasie intimale. D'un autre côté, le bFGF par ses effets trophiques directs sur les CMLs vasculaires peut augmenter la formation d'une néo-intima (Lindner 1991 A, Lindner 1991B). Des éléments tels que la dose utilisée, la durée d'administration ou le modèle animal étudié peuvent donc expliquer les différences entre ces études.

Résultats

La resténose après angioplastie et l'athérosclérose sont deux des domaines les plus étudiés en recherche cardiovasculaire. L'endothélium joue un rôle clé dans ces deux pathologies tant au niveau structural que fonctionnel.

Dans la resténose, on observe une restauration endothéliale incomplète et un maintien de la dysfonction endothéliale. Il a été précédemment observé qu'après angioplastie expérimentale, l'hyperplasie intimale est moins marquée au niveau des zones recouvertes d'endothélium (Reidy 1988). Ce phénomène pourraît être lié à l'inhibition de la prolifération des CMLs vasculaires par des substances dérivées de l'endothélium. Nous avons donc étudié l'implication du facteur relaxant dérivé de l'endothélium (NO) sur la régénération endothéliale après angioplastie par ballonnet.

Dans l'athérosclérose, on observe également une altération de la fonction endothéliale malgré la persistance d'un endothélium intact. Les monocytes et les macrophages sont impliqués dans la progression de l'athérosclérose (Ross 1993). Les monocytes peuvent exprimer le FT qui est présent dans les plaques d'athérome (Wilcox 1989, Annex 1995). De plus il apparaît que le FT est le contributeur majeur à la thrombogénicité des plaques rompues (Fuster 1996). Le NO ayant des propriétés antiathérogènes (Cooke 1992), nous nous sommes intéressés aux effets de la L-arginine, le précurseur du NO, dans un modèle d'athérosclérose.

De nombreux travaux ont prouvé le rôle bénéfique des facteurs de croissance dans la restauration de la fonction endothéliale dans des modèles de circulation collatérale

expérimentale (Bauters 1995) ou d'angioplastie par ballonnet (Meurice 1996). Une étude préliminaire a permis de démontrer l'effet bénéfique du bFGF sur la fonction endothéliale dans un modèle d'athérosclérose chez le lapin (Meurice 1997). Etant donné que dans ce modèle la dysfonction survient en l'absence de désendothélialisation, l'effet bénéfique du bFGF peut difficilement être attribué à un effet purement anatomique et la question d'un effet qualitatif (modification phénotypique de la cellule endothéliale normalisant les réponses endothéliumdépendantes) est clairement posée.

Pour tenter de répondre à cette question nous avons analysé l'effet de l'administration précoce de bFGF, simultanée à la mise sous régime enrichi en cholestérol, en fonction des régimes enrichis en cholestérol (0,2 ou 2% de cholestérol) et en fonction de la durée du régime (5 semaines à 6 mois). Les éléments de cette analyse ont été anatomiques (analyse de l'importance de l'athérosclérose et de la composition des plaques d'athérosclérose) et fonctionnels (analyse de la fonction endothéliale in vitro).

Compte tenu du caractère prothrombotique du FT, nous avons également étudié l'expression du FT dans un modèle d'athérosclérose après administration de bFGF.

I. IMPLICATION DU NO DANS LE PROCESSUS DE REENDOTHELIALISATION APRES AGRESSION PAR BALLONNET

Article n°1 : Six I, Van Belle E, Bordet R, Corseaux D, Callebert J, Dupuis B, Bauters C, Bertrand ME. L-Arginine and L-NAME have no effects on the reendothelialization process after arterial balloon injury.

Cardiovascular Research 1999;43: 731-738.

Les réponses du mur artériel après agression endoluminale ont largement été étudiées dans le passé. La dénudation par ballonnet des vaisseaux sanguins induit la prolifération et la migration des CMLs et l'accumulation de grandes quantités de matrice extracellulaire (Casscells 1992). L'endothélium joue un rôle fondamental dans le contrôle du tonus vasculaire et régule la croissance des CMLs sous-jacentes (Casscells 1992, Reidy 1988). Après angioplastie expérimentale, les zones présentant un endothélium régénéré ont une hyperplasie néointimale moins importante que les zones sans endothélium (Reidy 1988). Cette observation peut être liée à l'inhibition de la prolifération des CMLs vasculaires par des substances dérivées de l'endothélium.

Le facteur relaxant dérivé de l'endothélium, identifié comme étant le monoxyde d'azote (NO) a des propriétés de régulation de la croissance des CMLs ou des cellules endothéliales en culture (Ziche 1993, Ziche 1994). Le NO est dérivé du métabolisme de la L-arginine qui est transformée en citrulline par la NO synthétase et le L-NAME est un inhibiteur de la NO synthétase. Il a été précédemment démontré que l'administration au long cours de L-arginine permet d'améliorer la fonction endothéliale et d'inhiber le développement de l'athérosclérose

77

chez des lapins hypercholestérolémiques (Cooke 1991, Cooke 1992). De plus l'administration de L-arginine permet également de réduire l'épaississement intimal et améliore le fonction endothéliale après agression artérielle et dénudation endothéliale (Taguchi 1993, McNamara 1993, Hamon 1994). Il a été supposé que cet effet pourrait être du à un effet inhibiteur de l'endothélium régénéré sur la prolifération des CMLs.

Le but de cette étude a été d'étudier l'effet du précurseur du NO, la L-arginine, et de l'inhibiteur de la NO synthétase, le L-NAME, sur le processus de réendothélialisation après dénudation artérielle des artères iliaques de lapins normocholestérolémiques.



Cardiovascular Research 43 (1999) 731-738

Cardiovascular Research

www.elsevier.com/locate/cardiores www.elsevier.nl/locate/cardiores

L-Arginine and L-NAME have no effects on the reendothelialization process after arterial balloon injury

Isabelle Six^a, Eric Van Belle^b, Régis Bordet^a, Delphine Corseaux^a, Jacques Callebert^c, Bernard Dupuis^a, Christophe Bauters^{b,*}, Michel E. Bertrand^b

> ^aDepartment of Pharmacology, University of Lille. 59037 Lille Cedex, France ^bDepartment of Cardiology, University of Lille, 59037 Lille Cedex, France ^cDepartment of Biochemistry, Hôpital Lariboisière, 75010 Paris Cedex, France

> > Received 11 August 1998; accepted 4 February 1999

Abstract

Objective: Growth regulatory properties of nitric oxide (NO) in cultured endothelial cells is controversial. The aim of our study was to investigate the effect of L-arginine, the endogenous NO precursor, and L-NAME, an inhibitor of NO synthase on the reendothelialization process after angioplasty. **Methods:** Fifty-five New Zealand White rabbits underwent denudation of the left iliac artery. After injury the rabbits were randomized in three groups: L-arginine 2.25% (L-arginine, n=19); N^{G} -nitro-L-arginine methyl ester 15 mg/kg/day (L-NAME, n=19); and placebo (controls, n=17). Treatment was solubilized in drinking water. Reendothelialization was evaluated at 4 weeks by macroscopic evaluation of Evans blue staining and endothelial-specific immunostaining (CD-31) on cross sections. Intimal hyperplasia was evaluated by morphometric analysis. **Results:** Despite a significant increase in plasma arginine (P=0.001) and a reduction in intimal hyperplasia (P=0.003) with L-arginine, neither agent had a significant effect on reendothelialization at 4 weeks (controls= $36\pm4\%$, L-arginine= $43\pm3\%$, L-NAME= $33\pm4\%$; NS). **Conclusion:** These results suggest that, in spite of previously demonstrated effects on neointimal hyperplasia, the NO pathway does not influence the regrowth of macrovascular endothelial cells in vivo. © 1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Experimental: Vasculature; Circulatory physiology arteries; Endothelial factors; Nitric oxide; Angioplasty

1. Introduction

The response of the arterial wall to experimental endoluminal injury has been studied extensively during the past few years. Balloon denudation of blood vessels induces proliferation and migration of smooth muscle cells and accumulation of a large amount of extracellular matrix [1]. Endothelium plays a fundamental role in controlling vessel tone and, in addition, may regulate the growth of the underlying smooth muscle cells [1,2]. After experimental angioplasty, areas where the endothelium rapidly regenerates have less marked intimal thickening than areas where endothelial regeneration occurs later [2]. This observation may be related to inhibition of vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation by endothelium-derived substances.

Endothelium-derived relaxing factor (EDRF), identified as nitric oxide (NO) [3], has been shown to have growthregulatory properties in cultured smooth muscle cells and cultured endothelial cells [4,5]. NO is derived from the metabolism of L-arginine to citrulline by nitric oxide synthase and L-NAME is an inhibitor of NO synthase. Long-term therapy with L-arginine, markedly reduced endothelial dysfunction and inhibited the development of atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits [6,7]. Moreover, long-term oral administration of L-arginine

^{*}Corresponding author. Present address: Service de Cardiologie B, Hôpital Cardiologique, Boulevard du Professeur J. Leclercq, 59037 Lille Cedex, France. Tel.: +33-320-445302; fax:+33-320-535874.

E-mail address: cbauters@chru-lille.fr (C. Bauters)

Time for primary review 31 days.

reduces intimal thickening and enhances neoendotheliumdependent acetylcholine-induced relaxation after arterial injury and endothelial denudation [8–10]. It was speculated that these effects might partly relate to an inhibitory effect of regeneration of the endothelium on smooth muscle hyperplasia.

The aim of our study was to investigate the effect of the NO precursor, L-arginine, and an inhibitor of NO synthase, L-NAME, on the reendothelialization process after balloon denudation of iliac arteries in normocholesterolemic rabbits.

2. Methods

2.1. Study protocol

Fifty-five male New Zealand White rabbits (3-3.5 kg), fed normal rabbit chow, underwent balloon denudation of one iliac artery (see below). Immediately after the procedure the rabbits were randomized into three groups: 19 rabbits received 2.25% L-arginine hydrochloride (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) solubilized in 200 ml drinking water (L-arginine group); 19 rabbits received 15 mg/kg/day of N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; Sigma) solubilized in 200 ml drinking water (L-NAME group); and 17 rabbits received 200 ml normal drinking water alone as a placebo (control group). The dose of L-arginine was chosen because it has been shown by our group and by others [10-12] to result in a six-fold increase in daily L-arginine intake and in a reduction of intimal hyperplasia in rabbits. The dose of L-NAME was chosen because it has been used in rabbits, either by oral or subcutaneous administration, to inhibit NO production and achieve biological effects without significant changes in arterial pressure [12-15]. All animals were sacrificed 4 weeks later for analysis of the reendothelialization process. Forty-two animals were used for macroscopic evaluation of reendothelialization and 13 for histological analysis. The investigation conforms with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No 85-23, revised 1996).

2.2. Balloon denudation

All rabbits were anesthetized with ethyl carbamate (1 g/kg i.v.). After exposure of the left femoral artery, a 3F Fogarty balloon catheter was passed retrogradely to the junction of aorta with the iliac artery and inflated until contact was made with the endothelium. Left iliac artery deendothelialization was accomplished by advancing and withdrawing the catheter three times [10]. This technique has previously been shown to produce effective deendothelialization and a detectable loss of VSMCs in this model [10]. The catheter then was removed, the femoral

artery was ligated, and 125 mg amoxicillin was applied locally.

2.3. Biochemical and physiological measurements

Blood samples were obtained at the time of the procedure, before first treatment administration, and at 3 weeks for measurement of plasma-free arginine levels. Plasma was deproteinized with 10% sulfosalicylic acid and analyzed for free-arginine with an automated amino-acid analyzer (model LC 300, Biotronic Instruments).

In biological fluids nitric oxide is rapidly deactivated by oxidation to nitrite (NO_2) and nitrate (NO_3) by physically dissolved oxygen and water. To ensure that treatment with L-arginine was associated with an increase in NO production, NOx measurements were performed in blood samples in L-arginine and control groups according to the method described by Giovannoni et al. [16]. Nitrate was stoichiometrically reduced to nitrite by incubation for 15 min. at 37°C with reduced nicotinamide adenine dinucleotide (Sigma) and nitrate reductase (Boehringer Mannheim). After incubation at room temperature for 15 min, the resulting solution was incubated with sulfanilamide and N-(1-naphtyl)-ethylenediamine dihydrochloride to give a red-violet diazo dye. Absorbance was read at 550 nm. Nitrite concentration was determined from a linear standard curve between 6.25 and 150 µM potassium nitrate. Measurements were performed in quadruplicate.

Blood pressure was measured under anesthesia via a catheter inserted into the carotid artery at the time of sacrifice (4 weeks) in the three groups.

2.4. Macroscopic evaluation of reendothelialization

Forty-two animals were sacrificed at 4 weeks to perform macroscopic evaluation of reendothelialization. This evaluation was performed by examining fresh iliac artery specimens following in vivo injection of 5 ml 1% Evans blue, as previously described [17,18]. Specimen were macrophotographed, the resulting pictures were digitized and planimetric analysis was performed using computerized sketching program (COLORIMAGE 1.32, NIMH, Bethesda, MD) by a single observer, who was unaware of the treatment allocation. The initially denuded area was defined as the total surface of the iliac segment. The reendothelialized area was defined as the total surface step as the total surface of the area that was not stained with Evans blue.

2.5. Histological morphometry

Thirteen animals were sacrificed at 4 weeks to perform histological analysis. A catheter was introduced into the abdominal aorta and the iliac arteries were fixed by perfusion in situ with 4% paraformaldehyde at a pressure of 110 mmHg over 30 min to maintain the vessels in their in vivo dimensions for subsequent histological analysis. After further immersion fixation (in 4% paraformaldehyde for 24 h), each iliac artery was divided in three equal portions (proximal, middle and distal), cryoprotected by immersion in sucrose (30% for 4 h), embedded in OCT and frozen in isopentane. Three non-consecutive $6-\mu$ m thick sections stained with orcein and selected at random in each of the three predefined portions of the iliac artery were analyzed. Morphometric analysis of the sections was performed with a digital macroscopic planimetry system (Morphometry-System, Bioblock Scientific, Illkirch, France). Neointimal and medial areas were measured in each section and the neointima/media ratio was calculated.

2.6. Endothelial immunostaining

To confirm the endothelial versus vascular smooth muscle cells origin of the cells present at the luminal surface of the vessel wall, endothelial immunostaining was



Fig. 1. Examples of complete (A) and partial (B) reendothelialization as demonstrated on cross sections by endothelial immunostaining (CD31).

I. Six et al. / Cardiovascular Research 43 (1999) 731-738

Table 1								
Effects o	f L-NAME	and	L-arginine	on	arterial	blood	pressure	

	Controls	L-arginine	L-NAME	Р
Systolic arterial pressure (mmHg)	120±4	112±7	115±4	NS
Mean arterial pressure (mmHg)	106±3	93±8	100 ± 5	NS
Diastolic arterial pressure (mmHg)	94±3	84±7	90±5	NS

performed in the animals sacrificed for histological analysis. Cryosections were incubated with peroxidase blocking reagent, rinsed in PBS for 10 min and in 10% horse serum in PBS for 10 min. A mouse prepared monoclonal primary antibody to CD31 (Dakopatts A/S, Copenhagen, Denmark), diluted to 1:20 in PBS was incubated at 37°C overnight. After extensive washing, anti-mouse biotinylated secondary antibody was applied for 1 h. After washing in PBS, sections were incubated for 1 h in a solution of avidin-biotin-peroxidase preformed complex (ABC Vector-Vectastain kit, Vector laboratories Inc., Burlingame, CA). The peroxidase activity was revealed using hydrogen peroxide and diamino-benzidine, as a chromogen, and counterstaining was performed with hematoxylin. Three arterial cryosections selected at random in three of the predefined portions (proximal, middle and distal) were analyzed. The percent endothelialization in each section was measured with use of a computerized



Fig. 2. Plasma arginine values at baseline and 3 weeks after the beginning of the diet. Measurements were performed in animals fed a normal diet (controls) or a diet supplemented with 2.25% L-arginine (L-arginine) or 15 mg/kg/day L-NAME (L-NAME). * P=0.001 versus L-arginine.





734

sketching program (Morphometry-System, Bioblock Scientific). Examples of sections with various degree of endothelialization are shown in Fig. 1.

2.7. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm S.E.M. Data were analyzed by ANOVA followed by Scheffé's *F*-test. Statistical significance was assumed at P < 0.05.

3. Results

3.1. Biochemical and physiological measurements

Plasma-free arginine levels were similar in the three groups at baseline. At 3 weeks, these plasma levels were significantly higher in animals whose diet was supplemented with L-arginine (L-arginine) compared with animals on normal diet (control; P=0.001) or on normal diet with L-NAME (P=0.001, Fig. 2). In the L-arginine group, the increase in plasma-free arginine was associated with an increase in NOx ($124\pm11 \mu$ mol/l) compared to controls ($86\pm11 \mu$ mol/l, P=0.04). At the time of sacrifice, there were no significant differences in hemodynamic measurements between the three groups (Table 1).

3.2. Effects of L-arginine and L-NAME on reendothelialization

Macroscopic analysis of reendothelialization was performed using Evans blue staining. The initially denuded area was similar among groups (controls= 110 ± 2 , L-arginine= 110 ± 6 , L-NAME= 111 ± 5 mm²; Fig. 3A). At 4 weeks, the reendothelialized area did not differ significantly among the groups (controls= 39 ± 4 , L-arginine= 49 ± 4 , L-NAME= 37 ± 4 mm²; ns, Fig. 3A). Analysis of percent reendothelialization defined as the ratio of the reendothelialized area divided by the initially denuded area (×100), confirmed these results (controls= $36\pm4\%$, L-arginine= $43\pm3\%$, L-NAME= $33\pm4\%$; ns, Fig. 3B).

Representative examples of control, L-arginine, and L-NAME treated animals are shown in Fig. 4. Analysis of Evans blue pattern demonstrated that reendothelialization was most complete in the midportion, close to the origin of the internal iliac artery, and was less marked in the proximal and distal portions.

Microscopic assessment of reendothelialization was performed using endothelial immunostaining on cross sections. This immunostaining confirmed the endothelial origin of the cells at the luminal surface of the vessel wall and the lack of difference in reendothelialization among groups (controls= $43\pm7\%$, L-arginine= $51\pm8\%$, L-NAME= $40\pm2\%$; ns, Fig. 5). Separate analysis in the three different segments (proximal, middle and distal) confirmed these results. Consistent with the macroscopic findings, a







Fig. 4. Representative examples of Evans blue staining 28 days after denudation of one iliac artery in a control (A), L-arginine (B), and L-NAME animal (C).

I. Six et al. / Cardiovascular Research 43 (1999) 731-738



Fig. 5. Quantification of CD-31 immunostaining on cross-sections confirms the absence of effect of L-arginine and L-NAME on reendothelialization in each of the three pre-defined areas (proximal, middle and distal).

trend for a greater degree of reendothelialization was seen in middle segments (Fig. 5).

3.3. Effects of L-arginine and L-NAME on intimal hyperplasia

Histomorphometric analysis revealed that the neointimal area was decreased in animals receiving L-arginine supplementation compared to controls (P=0.003) and L-NAME treated animals (P=0.02; Fig. 6). Intimal area was reduced from 0.33 ± 0.01 and 0.30 ± 0.01 mm² in the control and L-NAME groups, respectively, to 0.19 ± 0.01 mm² in the L-arginine group.

4. Discussion

Our results demonstrate that long-term administration of L-arginine, the precursor of EDRF-NO, or of L-NAME, an inhibitor of NO synthase, have no effects on the reendothelialization process after angioplasty in the rabbit iliac artery. These results have several implications in the understanding of the response of the vessel wall after injury, in particular the response of endothelial cells.

Even though NO is considered as a growth factor for microvascular endothelial cells, our results suggest that it is not the case for macrovascular endothelial cells in vivo. Ziche et al. have demonstrated that NO donors induce proliferation and migration of microvascular endothelial



Fig. 6. Quantitative analysis of the effect of L-arginine and L-NAME on intimal hyperplasia.

736

cells [4] and stimulate microvascular formation (angiogenesis) in vivo [5]. Similarly, L-arginine was recently shown to stimulate angiogenesis in vivo in response to ischemia [19]. Little data are available, however, on the effect of NO of endothelial cells of macrovascular vessels. The absence of effect of L-arginine and L-NAME on endothelial regrowth in our model suggests that NO is not a growth factor for these cells. Our results are supported by the observations of Yang et al. [20]. In their study the application of exogenous NO was not associated with an induced proliferative response of cultured bovine aortic endothelial cells, but rather with a slight decrease in ³[H]thymidine incorporation. Taken together, these results suggests that the effect of NO on endothelial cells may depend on the vascular bed. It is interesting to point out that a similar dual response, dependent on the vascular origin of the endothelial cells, was previously reported with another 'growth factor'; angiotensin II. Indeed, while angiotensin II inhibits proliferation of macrovascular endothelial cells [21], it induces proliferation of endothelial cells from the microvascular bed [22].

Our results provide also additional information on the mechanisms by which L-arginine may affect the response of the vessel wall to injury. Considering the ability of the L-arginine diet to improve endothelial dysfunction in situations without endothelial cell loss, such as hypercholesterolemic models [6,23], as well as in situations with a initial loss of endothelial cells such as balloon injury models [10], an effect of L-arginine-induced NO production on endothelial regrowth was suspected. The reduction of intimal hyperplasia achieved by L-arginine [8-10], an effect usually induced by the recovery of a functional endothelial monolayer [1], was consistent with this hypothesis. Our results suggest that it is not the case and that L-arginine alters the response of the vessel wall and reduces intimal hyperplasia without a significant effect on endothelial regrowth. Such an effect may be achieved through the restoration of endothelial properties, without increasing the number of cells, [6,10,23] and through a direct inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation [24].

This finding is also important in the understanding of the mechanisms underlying the effects of some molecules and growth factors on endothelial regrowth. Indeed some of them; including angiotensin converting enzyme inhibitors, vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF); stimulate both NO production [15,25,26] and endothelial regrowth [18,27,28]. In that regard, it was previously shown that the effect of VEGF on microvascular endothelial cell proliferation and angiogenesis was mediated through the stimulation of NO production [29]. A similar mechanism was suggested to explain the effect of VEGF on endothelial regrowth [25]. The absence of significant effect of L-arginine and L-NAME on endothelial regrowth, as observed in the present study, does not support this hypothesis.

Our study confirms and extends the results of earlier studies using Evans blue staining [30], suggesting a critical role of major side branches as a reservoir for endothelial cells in the regeneration of the endothelial monolayer. As in those earlier studies, the results of Evans blue staining in our model of denudation of the common iliac-external iliac artery tract suggested that areas close to the origin of the internal iliac artery were more prone to re-endothelialize. In view of the recent demonstration that circulating endothelial progenitor cells are involved in angiogenesis [31] and reendothelialization [32], our results suggest that propagation of endothelial cells from adjacent areas remains a major mechanism of the regrowth of the endothelial monolayer.

In conclusion, L-arginine levels, and L-NAME have no effects on reendothelialization after balloon injury in rabbit iliac artery. These results suggest that, in spite of previously demonstrated beneficial effects in various models of balloon injury, the NO pathway does not influence the regrowth of macrovascular endothelial cells in vivo.

References

- Casscells W. Migration of smooth muscle and endothelial cells. Critical events in restenosis. Circulation 1992;86:723-729.
- [2] Reidy MA. Endothelial regeneration. VII. Interaction of smooth muscle cells with endothelial regrowth. Lab Invest 1988;59:36-43.
- [3] Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature 1987;327:524–526.
- [4] Ziche M, Morbidelli L, Masini E et al. Nitric oxide promotes DNA synthesis and cyclic GMP formation in endothelial cells from post capillary venules. Biochem Biophys Res Commun 1993;192:1198– 1203.
- [5] Ziche M, Morbidelli L, Masini E et al. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. J Clin Invest 1994:94:2036-2044.
- [6] Cooke JP, Andon NA, Girerd XJ, Hirsch AT, Creager MA. Arginine restores cholinergic relaxation of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. Circulation 1991:83:1057-1062.
- [7] Cooke JP, Singer A, Tsao P et al. Anti-atherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. J Clin Invest 1992;90:1168-1172.
- [8] Taguchi J, Abe J, Okasaki H, Takuwa Y, Kurokawa L K. L-arginine inhibits neointimal formation following balloon injury. Life Sci 1993;53:387–392.
- [9] McNamara DB, Bedi B, Aurora H et al. L-arginine inhibits balloon catheter-induced intimal hyperplasia. Biochem Biophys Res Commun 1993;193:291-296.
- [10] Hamon M, Vallet B, Bauters C et al. 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.
- [11] Tarry WC, Makhoul L RG. L-arginine improves endothelium-dependent vasorelaxation and reduces intimal hyperplasia after balloon angioplasty. Arterioscler Thromb 1994;14:938–943.
- [12] Le Tourneau T, Van Belle E, Corseaux D et al. Role of NO 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.

I. Six et al. / Cardiovascular Research 43 (1999) 731-738

- [13] Naruse K, Shimizu K, Muramatsu M et al. Long term inhibition of NO synthesis promotes atherosclerosis in the hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. PGH2 does not contribute to impaired endothelium-dependent relaxation. Arterioscler Thromb 1994;14:746– 752.
- [14] Cayatte AJ, Palacino AJ, Horten K, Cohen RA. Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. Arterioscler Thromb 1994;14:753-759.
- [15] Van Belle E, Vallet B, Auffray JL et al. NO synthesis is involved in structural and functional effects of ACE inhibitors in injured arteries. Am J Physiol 1996;270:H298-H305.
- [16] Giovannoni G, Land JM, Keir G, Thompson EJ, Heales SJ. Adaptation of the nitrate reductase and Griess reaction methods for the measurement of serum nitrate plus nitrite levels. Ann Clin Biochem 1997:34:193–198.
- [17] Meurice T, Bauters C, Auffray JL et al. Basic fibroblast growth factor restores endothelium-dependent responses after balloon injury of rabbit arteries. Circulation 1996;93:18–22.
- [18] Van Belle E, Meurice T, Tio FO et al. ACE inhibition accelerates endothelial regrowth in vivo: A possible explanation for the benefit observed with ACE inhibitors following balloon angioplasty. Biochem Biophys Res Commun 1997:231:577–581.
- [19] Murohara T, Asahara T, Silver M et al. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. J Clin Invest 1998;101:2567–2578.
- [20] Yang W, Ando J, Korenaga R, Toyo-oka T, Kamiya A. Exogenous nitric oxide inhibits proliferation of cultured vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 1994;203:1160–1164.
- [21] Stoll M, Steckelings UM, Paul M et al. The angiotensin AT2receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. J Clin Invest 1995;95:651–657.
- [22] LeNoble FA, Schreurs NH, vanStraaten HW et al. Evidence for a novel angiotensin II receptor involved in angiogenesis in chick embryo chorioallantoic membrane. Am J Physiol 1993;264:R460– R465.

- [23] Girerd XJ, Hirsch AT, Cooke JP, Dzau VJ, Creager L MA. Larginine augments endothelium-dependent vasodilation in cholesterol-fed rabbits. Circ Res 1990;67:1301–1308.
- [24] Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8bromo-cyclic-guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. J Clin Invest 1989;83:1774–1777.
- [25] Tsurumi Y, Murohara T, Krasinski K et al. Reciprocal relationship between VEGF and NO in the regulation of endothelial integrity. Nature Med 1997;3:879–886.
- [26] Cuevas P, Carceller F, Ortega S, Zazo M, Nieto I, Gimenez-Gallego G. Hypotensive activity of fibroblast growth factor. Science 1991;254:1208–1210.
- [27] Asahara T, Bauters C, Pastore C et al. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid arterly. Circulation 1995:91:2793-2801.
- [28] Lindner V, Majack RA, Reidy MA. Basic fibroblast growth factor stimulates endothelial regrowth and proliferation in denuded arteries. J Clin Invest 1990:85:2004–2008.
- [29] Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R et al. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not fibroblast growth factor-induced angiogenesis. J Clin Invest 1997;99:2625-2634.
- [30] Schwartz SM, Haudenschild CC, Eddy EM. Endothelial regeneration. I. Quantitative analysis of intimal stages of endothelial regeneration in rat aortic intima. Lab Invest 1978;38:568–580.
- [31] Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 1997;275:964–967.
- [32] Asahara T, Krasinski KL, Chen D et al. Circulating endothelial progenitor cells in peripheral blood incorporate into re-endothelialization after vascular injury [abstract]. Circulation 1997:96:I-725.

738

II. EFFETS DE LA L-ARGININE DANS L'ATHEROSCLEROSE

Article n°2 : Corseaux D, Le Tourneau T, Six I, Ezekowitz MD, Mc Fadden EP, Meurice T,
Asseman P, Bauters C, Jude B. Enhanced monocyte tissue factor response
after experimental balloon angioplasty in hypercholesterolemic rabbit :
inhibition with dietary L-arginine.

Circulation 1998;98:1776-1782.

Les monocytes et les macrophages sont impliqués dans la progression de l'athérosclérose et dans la pathogénicité de la thrombose (Ross 1993, Ruf 1994). Les monocytes peuvent exprimer le FT (Neri Serneri 1995, Jude 1994) qui est présent dans les plaques athéromateuses (Wilcox 1989, Annex 1995). De plus le FT est le contributeur majeur de la thrombogénicité des plaques rompues (Fuster 1996).

Le NO possède des propriétés antiathérogènes et antithrombotiques. Il a été supposé que le contact entre les plaques athéroscléreuses et le sang pourrait augmenter l'expression de FT par les monocytes circulants et que le NO pourrait limiter cette réponse. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé un modèle d'athérosclérose chez le lapin (dénudation des artères iliaques et régime enrichi en cholestérol), et nous avons réalisé une angioplastie quand les lésions athéroscléreuses étaient présentes. Dans ce modèle, nous avons étudié les effets de la L-arginine, le précurseur endogène du NO, sur l'expression du FT par les monocytes circulants.

Basic Science Reports

Enhanced Monocyte Tissue Factor Response After Experimental Balloon Angioplasty in Hypercholesterolemic Rabbit: Inhibition With Dietary L-Arginine

Delphine Corseaux, PhD; Thierry Le Tourneau, MD; Isabelle Six; Michael D. Ezekowitz, MD, PhD; Eugene P. Mc Fadden, MRCPI; Thibaud Meurice, MD; Philippe Asseman, MD; Christophe Bauters, MD; Brigitte Jude, MD

- **Background**—There is evidence that tissue factor (TF) is a major contributor to the thrombogenicity of a ruptured atherosclerotic plaque. Nitric oxide (NO) has antiatherogenic and antithrombotic properties. We investigated whether L-arginine (L-arg), the endogenous precursor of NO, might affect the ability of monocytes to produce TF.
- Methods and Results—We studied TF expression in 18 rabbits with atherosclerosis induced by bilateral iliac damage and 10 weeks of a 2% cholesterol diet. Six weeks after the initiation of the diet, an angioplasty was performed. After angioplasty, the surviving rabbits (n=15) were randomized to receive L-arg (2.25%) supplementation in drinking water (L-arg group, n=8) or no treatment (untreated group, n=7). TF expression was evaluated in mononuclear cells from arterial blood in the presence and absence of endotoxin stimulation. Monocyte TF expression, as assessed with an amidolytic assay, did not differ significantly before or after the induction of atherosclerotic lesions (87 ± 15 versus 70 ± 12 mU of TF/1000 monocytes, P=NS). Endotoxin-stimulated TF activity increased significantly 4 weeks after angioplasty (138 ± 22 versus 70 ± 12 mU of TF/1000 monocytes, P=0.02). This increase was blunted by L-arg (43 ± 16 mU of TF/1000 monocytes, P=0.01).
- Conclusions—This study demonstrates that angioplasty-induced plaque rupture is associated with a marked increase in monocyte TF response that is blunted by the oral administration of L-arg. This suggests that the documented antithrombotic properties of NO may be related in part to an inhibitory effect on monocyte TF response. (Circulation. 1998;98:1776-1782.)

Key Words: tissue factor monocytes nitric oxide atherosclerosis

Monocytes and macrophages are involved in the progression of atherosclerosis and in the pathogenesis of thrombosis.^{1,2} Monocytes can express tissue factor (TF),^{3,4} which is present in atheromatous plaques.^{5,6} There is evidence that TF is a major contributor to the thrombogenicity of ruptured plaques.⁷

The TF gene in monocytes is controlled by several transcription factors activated by external signals, such as growth factors, inflammatory cytokines (interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α), oxidized LDLs, and endotoxin. The induction of the TF gene in monocytes stimulated by endotoxin is mediated by the interaction of transcription factors such as activator protein-1 (AP-1) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) with their corresponding binding sites that are present in the TF promoter region.⁸ The TF gene shares these regulatory mechanisms with other genes involved in leukocyte adhesion to endothelial cells, activated through a common oxidantsensitive transcriptional pathway leading to the expression of endothelial proteins (eg, vascular cell adhesion molecule-1, intercellular adhesion molecule-1, and monocyte chemoat-tractant protein-1).^{9,10}

Nitric oxide (NO) plays an important role in vascular regulation through its vasodilatory,¹¹ antiatherogenic,¹² and antithrombotic properties. NO inhibits platelet adhesion and aggregation¹³ and modulates smooth muscle cell proliferation and migration.¹⁴ NO limits cytokine-induced endothelial activation^{15,16} and modulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in cultured endothelial cells¹⁷ through a decrease in NF- κ B–binding activity. L-Arg decreases the adhesiveness of monocytes to the endothelium through inhibition of endothelium/leukocyte adhesion molecule transcription¹⁸; L-arg limits the progression of atherosclerosis,^{12,19} restores endothelium-dependent vasodilation,^{20,21} and limits intimal proliferation of vascular smooth muscle cells after angioplasty.^{21,22}

We hypothesized that contact between atherosclerotic plaques and blood could increase TF expression by circulat-

Received February 11, 1998; revision received June 3, 1998; accepted June 5, 1998.

From the Laboratoire d'Hématologie (D.C., B.J.), Service de Cardiologie et Hémodynamique (C.B., E.P.M.), Service des Soins Intensifs (P.A.), Service Commun d'Imagerie Interventionnelle (T.L.T., I.S., T.M.), Centre Hospitalier Régional Universitaire and Faculté de Médecine, Lille, France, and Section of Cardiovascular Medicine (M.D.E.), Yale University, New Haven, Conn.

Correspondence to Brigitte Jude, MD, Laboratoire d'Hématologic, Hôpital Cardiologique, Boulevard du Professeur J Leclercq, 59037 Lille Cedex, France. E-mail b.jude@chru_lille.fr

^{© 1998} American Heart Association, Inc.

Corseaux et al October 27, 1998 1777

ing monocytes and that NO might limit this response. To test these hypotheses, we used a rabbit model of induced atherosclerosis (bilateral iliac injury and an atherogenic diet), and we performed angioplasty when atherosclerotic lesions were established. In this model, we studied the effect of L-arg, the endogenous NO precursor, on TF expression by circulating monocytes.

Methods

Male New Zealand White rabbits (Charles River, Saint Aubin lès Elbrug, France) with an initial body weight of 3.0 to 3.5 kg were used for this study. All experiments were conducted in compliance with the position of the American Physiological Society on research animal use.

Induction of Atherosclerosis

Bilateral iliac atherosclerosis was induced according to the method described by Kakuta et al.²³ Rabbits were anesthetized with ethyl carbamate (1 g/kg IV): after exposure of the femoral arteries, a 3F Fogarty balloon catheter was inserted to a distance of 20 cm, inflated until contact was made with the endothelium, and pulled back (3 times in each iliac artery). All animals were placed on a rabbit chow diet (200 g/d) containing 2% cholesterol. After 6 weeks, angiography was performed to confirm the existence of iliac lesions. Angioplasty was performed immediately after angiography.

Angioplasty

Rabbits were anesthetized as described above. A 2.5-mm Bard coronary transluminal balloon angioplasty catheter was introduced via the carotid artery, and the balloon was positioned under fluoroscopy at the site of the iliac artery stenosis. Three successive 1-minute inflations at 6 atm were performed. After angioplasty, rabbits were again fed the cholesterol-supplemented diet and were randomized into 2 groups. The active treatment group (L-arg group, n=8) received 2.25% L-arg hydrochloride (Sigma Chemical Co) in a limited quantity of drinking water (200 mL) every morning for 4 weeks. The untreated group (n=7) received an equal quantity of plain drinking water each morning. When the animals had drunk this water, they were allowed free access to drinking water for the remainder of the day. The dose of L-arg (2.25%) was chosen based on the previous studies of Cooke et al,¹² who demonstrated that this dose was well tolerated and resulted in an increase in plasma free arginine levels compared with controls. Typical angiographic findings before and after angioplasty and a histological cross section of iliac artery after angioplasty are shown in Figure 1.

Study Groups

Blood samples were taken at 3 time points (before angioplasty) in all the rabbits to establish baseline characteristics for the entire population: at baseline (n=18), at 3 weeks after iliac denudation and the initiation of a high cholesterol diet (n=18), and at 6 weeks (just before angioplasty) in the surviving rabbits (n=15) (Figure 2). Additional blood samples were taken 4 weeks after angioplasty in the L-arg-treated rabbits (n=8) and in the untreated rabbits (n=7).

Blood Samples

Blood samples were taken under sterile conditions from the ear artery. Three samples of blood were obtained from each rabbit: 5 mL was collected in lithium heparin (143 USP units) for mononuclear isolation, 2 mL was collected in sodium citrate (1:10, 3.8%) for plasma analyses, and 1 mL was collected in EDTA for hematological analyses (Coulter MAXM). The total white blood cell counts were verified manually. Peripheral blood smears for the differential white cell counts were stained with May-Grünwald-Giemsa. Each count was performed by 3 investigators, who were blinded to treatment allocation.

Blood samples collected in lithium heparin and in EDTA were diluted to decrease measurement artifacts due to severely lipemic blood.

Isolation of Mononuclear Cells and Cell Culture

The mononuclear cells were isolated by gradient centrifugation (MSL, density=1.077 \pm 0.001, Eurobio), washed 2 times, and resuspended in RPMI 1640 (GIBCO) (3×10⁶ cells/mL). Cell viability was >98% (trypan blue test). Monocytes composed 12 \pm 1% (mean \pm SEM) of the cells.

All reagents and culture supplies used in the study were free of endotoxin (chromogenic limulus amebocyte lysate [LAL] assay sensitivity, 0.025 endotoxin unit [EU]/mL). An aliquot of the freshly isolated mononuclear cells, referred to as noncultured cells, was frozen at -80° C. Other aliquots of cell preparations (3×10^{6} cells/mL) suspended in RPMI 1640 without fetal calf serum were cultured for 16 hours at 37° C in a humidified 5% CO₂ atmosphere, without or with stimulation by endotoxin at 5000 EU/mL (*Escherichia coli* 055:B5; Sigma Chemical); these are referred to as unstimulated and stimulated cells, respectively. At the end of the incubation period, monocytes were resuspended and frozen at -80° C.

TF Activity Assay

The frozen cells were lysed by the addition of 0.05 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 0.1% Triton X-100, and 0.1% BSA (60 μ L/mL) for 30 minutes at 37°C with serial vortex mixing. TF activity was determined with a modified amidolytic assay.²⁴ Briefly, lysed cell suspensions (50 μ L) were incubated at 37°C in a microtiter plate (2 minutes) and mixed with 0.25 M CaCl₂ (50 μ L) (3-minute incubation) and prothrombin concentrate complex (Laboratoire de Fractionnement et des Biotechnologies) as a source of factor VII (50 μ L, 3 UI/mL). After the addition of 50 μ L of the chromogenic substrate S2765 (Biogenic), the change in optical density at 410 nm was quantified with a microplate reader and converted to units of TF activity from log-log plots of serial dilutions of a rabbit brain thromboplastin (CI+; Stago). Arbitrarily, 1 mL of thromboplastin was assigned a value of 1000 U/mL TF. Results were expressed as mU/1000 monocytes and as mU of TF/mL of blood.

The amidolytic activity was characterized as TF according to a neutralization procedure using mouse monoclonal antibody antirabbit-TF (AP-1): diluted (1:18) antibody (25 μ L) was incubated with diluted TF standard or lysed cell suspensions for 30 minutes at 37°C. Then, the mixture was tested for amidolytic activity.

Immunocytochemical Staining

Immunocytochemical staining was performed on cytocentrifuged preparations with the use of AP-1 or mouse negative control (DAKO) and alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase complex (APAAP Kit system; DAKO).

Cells were fixed in buffered acetone/acetone/paraformaldehyde 4%. Mouse isotype antibody was used as a negative control. Anti-TF labeling is seen as a bright red color in the cytoplasm, with membrane reinforcement in the most positive cells (Figure 3).

Assays on Plasma Samples

Plasma samples were diluted to decrease measurement artifacts due to severely lipemic plasma.

Serum total cholesterol and triglyceride (TG) levels were determined with enzymatic assays using cholesterol esterase plus cholesterol oxidase and glycerol-3-phosphate oxidase, respectively (Biomerieux). The L-arg level was determined after deproteinization with 10% sulfosalicylic acid and was analyzed for free arginine (LC 300; Biotronic Instrument). Prothrombin time was measured by use of an automated clotting assay with calcified thromboplastin (Biomerieux). Fibrinogen levels were measured according to the Clauss technique (Biomerieux).

Factors II, V, and VII + X levels were determined by an automated clotting assay (STA; Stago) with the use of calcified rabbit brain thromboplastin and human factor-deficient plasma (Stago).



A

С

Figure 1. Iliac angiograms before (A) and immediately after (B) angioplasty. Stenosis that was dilated is indicated by arrows. After angioplasty, stenosis was significantly less severe (B). D indicates right side. C, Orcein Van Gieson-stained photomicrograph of representative histological section of iliac artery immediately after angioplasty. Arrow shows intimal dissection. L indicates vessel lumen; I, intima; EEL, external elastic lamina; M, media; and IEL, internal elastic lamina. Magnification, ×38.

Statistical Analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. Data were analyzed using a nonparametric test (Kruskal-Wallis) to determine significant differences (*P*<0.05) in mean values between groups, followed by the Mann-Whitney *U* test to test the significance of differences between groups.

Results

Blood Lipid and L-Arg Levels

B

Serum cholesterol and TG levels were significantly higher in animals after 6 weeks on a high cholesterol diet (6 weeks: cholesterol, 3052 ± 278 mg/dL; TG, 489 ± 147 mg/dL; base-



Figure 2. Flow chart giving overview of study.

line: cholesterol, 37 ± 3 mg/dL; TG, 108 ± 17 mg/dL; *P*<0.004) and remained unchanged 4 weeks after angioplasty, with no difference between the L-arg group and the untreated group. The L-arg supplementation resulted in an increase in plasma arginine level (315 ± 65 versus $124\pm11 \mu$ mol/L in the untreated animals, *P*=0.04).

Total White Blood Cell, Monocyte, and Platelet Counts

The total white blood cell count was significantly increased at 6 weeks (just before angioplasty) compared with baseline but did not differ significantly from baseline at the other time points (Table 1). There were no significant changes in the levels of circulating monocytes, although the monocyte count was slightly lower at 3 weeks. A progressive decrease in the platelet count was observed, with the lowest level observed 4 weeks after angioplasty.

There was no difference between the L-arg group and the untreated group for any of these parameters.

Monocyte TF Activity

Amidolytic activity was detectable in mononuclear cells after a 16-hour culture. Neutralization assay with TF antibody confirmed that the amidolytic activity was TF in all cases.

Early Effects of Hypercholesterolemia and Iliac Denudation

In unstimulated cells, a decrease in TF activity was observed 3 weeks after bilateral iliac injury and initiation of the atherogenic diet (20 ± 3 versus 66 ± 20 mU of TF/1000 monocytes, P=0.02) and remained lower than the baseline value at all subsequent time points (Figure 4A).

In stimulated cells, a significant decrease in monocyte TF activity was observed at 3 weeks (30 ± 6 versus 87 ± 15 mU of TF/1000 monocytes, P<0.005), followed by a trend toward normalization after 6 weeks (70 ± 12 mU of TF/1000 monocytes, P<0.005 versus 3 weeks) (Figure 4A).

The results were similar when TF monocyte content was expressed per milliliter of blood (Figure 4B).

Effects of Angioplasty With and Without L-Arg Supplementation

In unstimulated cells, no significant difference in TF activity was observed between the group that received L-arg and the untreated group; TF activity was lower in rabbits with L-arg, but the difference was not statistically significant (Figure 5A).

In stimulated cells, TF activity was significantly greater 4 weeks after angioplasty in the untreated group compared with the value observed just before angioplasty (138 ± 22 versus 70 ± 12 mU of TF/1000 monocytes, P=0.02). This increase in stimulated TF activity was significantly less in the L-arg group than in the untreated group (43 ± 16 versus 138 ± 22 mU of TF/1000 monocytes, P=0.01) (Figure 5A).

Figure 3. Representative example of monocytes with (A) and without (B) qualitative evidence of TF expression. Magnification, $\times 1250$.

	Total White Blood Cells, 10 ⁹ /L	Monocytes, 109/L	Platelets, 10 ⁹ /L
Baseline	7.4±0.5	0.23±0.04	464±28
3 wk	7.5±0.4	0.15±0.02	373±22*
6 wks, before angioplasty	10.1±0.6†	0.22±0.05	321±29†
After angioplasty			
Untreated group (n=7)	8.5±1.1	0.33±0.13	238±44†
L-Arg group (n=8)	9.4±0.9	0.34±0.11	274±20†

 TABLE 1.
 Effect of Hypercholesterolemia, Angioplasty, and L-Arg on Total White

 Blood Cell, Monocyte, and Platelet Counts

Values are mean±SEM.

*P<0.05 vs baseline, +P<0.005 vs baseline.

The results were similar when TF monocyte content was expressed per milliliter of blood (Figure 5B).

Immunocytochemistry

The results of immunocytochemical staining with anti-TF antibody in stimulated monocytes were concordant with the results of the functional TF assays. At baseline, 71% of stimulated monocytes were TF positive; 63% were TF positive at 3 weeks, and 81% were positive at 6 weeks. At 4 weeks after angioplasty, 92% were TF positive in untreated animals versus 65% in the L-arg group.

Changes in Other Parameters

After 3 weeks on a high cholesterol diet, there was a significant increase in factor II ($149\pm7\%$ versus $94\pm5\%$ at baseline, P<0.0001) and factor VII+X ($151\pm7\%$ versus $92\pm4\%$ at baseline, P<0.0001), which remained significant at all the subsequent time points studied. No significant difference in factor V levels was observed ($115\pm8\%$ versus $103\pm10\%$ at baseline, P=NS). Fibrinogen levels were significantly lower after 6 weeks in animals receiving a high cholesterol diet compared with baseline (2.9 ± 0.3 versus 4.6 ± 0.4 g/L, P=0.0004), and levels remained at this level 4 weeks after angioplasty (2.4 ± 0.3 g/L).

There was no difference between the L-arg group and the untreated group with respect to the levels of plasma coagulation factors (Table 2).

Discussion

The major finding of this study was the demonstration that the performance of angioplasty in a rabbit model of atherosclerosis induced by a high cholesterol diet and iliac denudation is associated with a significant increase in monocyte TF response, which is blunted by dietary L-arg supplementation. This is the first study to investigate monocyte TF responses in vivo in a rabbit model of induced atherosclerosis and to study the effect of the NO precursor L-arg in this model.

Effect of Endothelial Denudation and Hypercholesterolemia

We observed a decrease in monocyte TF activity in the weeks after initiation of a high cholesterol diet associated with bilateral iliac injury. The reasons for this decrease are unclear, but they could be related to the disappearance from the bloodstream of the most active monocytes; this hypothesis is supported by the observation that the monocyte count tended to decrease over the same period. This may reflect an increase in monocyte adhesion and penetration into the vascular wall.^{1,25} Alternatively, hypercholesterolemia could modify the lipidic composition of cell membranes, modulating TF activity, or it increase the specific TF pathway inhibitor, as previously shown in humans.²⁶

Additional significant changes in the levels of coagulation factors and platelets were observed. A decrease in the platelet count and the levels of fibrinogen occurred, suggesting an associated consumption process. Vitamin K-dependent factors (factors VII and X) increased significantly, as reported previously.^{27,28} This increase has been shown to reflect an increase in the rate of synthesis, or activation.

Effects of Angioplasty

At 4 weeks after angioplasty, we observed an increased monocyte TF response to endotoxin. This probably reflects an increase in the degree of activation of circulating monocytes,

Figure 4. Effect of endothelial denudation and high cholesterol diet on monocyte TF activity. Open bars indicate mononuclear cells cultured without endotoxin; solid bars, mononuclear cells cultured with endotoxin (5000 EU/mL). Results are expressed as mU of TF/10³ monocytes (A) or as mU of TF/mL of blood (B) for baseline (n=18), 3 weeks (n=18), or 6 weeks, just before angioplasty (n=15). *0.004≤P<0.05 versus baseline. §0.003≤P<0.05 versus 3 weeks.





Corseaux et al October 27, 1998 1781

Figure 5. Effect of angioplasty and L-arg supplementation on monocyte TF activity. Open bars indicate mononuclear cells cultured without endotoxin; solid bars, mononuclear cells cultured with endotoxin (5000 EU/mL). Results are expressed as mU of TF/10³ monocytes (A) or as mU of TF/mL of blood (B) at 6 weeks, just before angioplasty (preangioplasty, n=15); 4 weeks after angioplasty without L-arg supplementation (untreated group, n=7); or 4 weeks after angioplasty with L-arg supplementation (L-arg group, n=8). \$P<0.05 versus 6 weeks. #P<0.05 versus 6 weeks.

as already described in human coronary disease, specifically inh in unstable coronary syndromes.^{3,4} Leukocyte activation has inh been described in the early days after coronary angioplasty in To humans,²⁹ but no previous study has investigated leukocyte activation several weeks after balloon injury. A potential Bri hypothesis is that the rupture of lipid-rich atheromatous creat plaque by angioplasty allows direct contact between the plaque components, including foam cells, activated T cells, and activated macrophages, which could produce inflammatory cytokines and activate the TF gene.³⁰ This hypothesis is supported by the observation that animals that received a high cholesterol diet over an equivalent time period but were not subjected to iliac denudation did not have demonstrable changes in levels of TF response (data not shown), as previously reported.³¹

Effect of L-Arg

Dietary L-arg supplementation had a significant effect on monocyte TF response. The increase in stimulated monocyte TF response that occurred in untreated animals was significantly blunted by oral administration of L-arg. The mechanisms of the inhibitory effect of L-arg on monocyte TF activity are unclear. This effect could be related to the antiatherogenic effect of L-arg: it has been demonstrated that hypercholesterolemia increases the generation of superoxide anion in endothelial cells, which plays a key role in the pathogenesis of atherosclerosis,^{32,33} and this process is limited by L-arg supplementation.^{12,19}

NO can also inhibit the transcriptional protein NF- κ B or scavenge the superoxide anion that activates NF- κ B.^{15,16,18,34} Because TF gene activation by endotoxin is mediated by NF- κ B activation, the modulation by NO of monocyte TF response in our model could occur through limitation of this common oxidant-sensitive transcriptional pathway. Indeed, recent data indicate that an antioxidant phytoelement can

TABLE 2. Factors II, V, and VII Plus X and Fibrinogen Levels in Untreated and L-Arg Groups

A set of the		
	Untreated Group $(n=7)$	L-Arg Group (n=8)
Factor II, %	151±12	177±15
Factor V, %	76±11	106±13
Factor VII plus X, %	153±7	187±16
Fibrinogen, g/L	2.4±0.3	2.4±0.2

Values are mean±SEM.

inhibit cytokine-induced TF gene expression in part through inhibition of NF- κ B activation in cultured endothelial cells.³⁵ To our knowledge, the effect of NO on monocyte TF response had not previously been studied. Alternatively, Brisseau et al³⁶ demonstrated in vitro that antioxidants decreased TF expression by monocytes/macrophages through a post-transcriptional effect. These elements combined suggest that NO may reduce monocyte TF response through direct transcriptional or post-transcriptional mechanisms. Monocyte TF mRNA determination will provide further insights into the relative contribution of these two possible mechanisms.

Study Limitations

The extrapolation of data from any animal model to human atherosclerosis requires caution. However, the atherosclerotic rabbit model we used has been demonstrated to have several features in common with human atherosclerosis, and its reproducibility has been demonstrated in several previous studies.^{23,37} A diet supplemented with 2% cholesterol results in very high cholesterol levels in this model and severe atherosclerotic lesions and is associated with significant morbidity rates in the animals. The results of the present study might differ in animals with lesser degrees of cholesterol supplementation. Similarly, stimulation with endotoxin may not reflect the pathophysiological changes seen in atherosclerosis; however, it is a powerful stimulator of TF gene, and infectious agents are possible aggravating factors in the evolution of atherosclerosis.³⁸

In summary, exogenous administration of L-arg, the NO precursor, blunts the increase of TF response in stimulated monocytes after angioplasty in a rabbit model of induced atherosclerosis. These results suggest that the antithrombotic properties of NO could also be related to an inhibitory effect on monocyte TF response, in addition to its known effects on endothelial and platelet functions. Local generation of sufficiently high amounts of NO by endothelial cells or macrophages, through oral L-arg supplementation, may induce a reduction in TF-mediated hemostatic activation in complicated atherosclerosis. L-Arg is known to restore endotheliumdependent dilation and to inhibit platelet aggregation in humans.^{39,40} As a therapeutic agent, L-arg may have a potential clinical impact via these antithrombotic properties in the treatment or the prevention of human vascular diseases, including atherosclerosis, thrombosis, and septic shock. A complete understanding of the physiological and pathophysiological roles of L-arg must await further studies. 93

1782 Angioplasty, L-Arginine, and Tissue Factor

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Direction de la Recherche et des Etudes Doctorales (EA 1044), the Centre Hospitalier et Universitaire de Lille (grant 96/35/9506), and Région Nord-Pas de Calais France. Dr Corseaux was a recipient of a 2-year doctoral grant from CHRU Lille and Région Nord Pas de Calais. We thank the Laboratory of Biochemistry of Pr Formstecher (CHRU de Lille) for assistance with the measurement of plasma cholesterol and TG. We thank the Laboratory of Anatomocytology of Pr Gosselin (CHRU de Lille) for tissue preparations.

References

- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature. 1993;362:801-809.
- Ruf W, Edgington TS. Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis in vivo. FASEB J. 1994;8:385-390.
- Neri Serneri G, Modesti PA, Gensini GF, Branzi A, Melandri G, Poggesi L, Rostagno C, Tamburini C, Carnovali M, Magnani B. Randomised comparison of subcutaneous heparin, intravenous heparin, and aspirin in unstable angina. *Lancet.* 1995;345:1201–1204.
- Jude B, Agraou B, McFadden EP, Susen S, Bauters C, Lepelley P, Vanhaesbroucke C, Devos P, Cosson A, Asseman P. Evidence for timedependent activation of monocytes in the systemic circulation in unstable angina but not in acute myocardial infarction or in stable angina. *Circulation.* 1994;90:1662–1668.
- Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:2839–2843.
- Annex BH, Denning SM, Channon KM, Sketch MH, Stack RS, Morrissey JH, Peters KG. Differential expression of tissue factor protein in directional atherectomy specimens from patients with stable and unstable coronary syndromes. *Circulation*, 1995;91:619-622.
- Fuster V, Badimon JJ, Chesebro JH, Fallon JT. Plaque rupture, thrombosis, and therapeutic implications. *Haemostasis*. 1996;26(suppl 4):269-284.
- Mackman N. Regulation of the tissue factor gene. FASEB J. 1995;9: 883-889.
- Marui N, Offerman MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW, Medford RM. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest*. 1992;92:1866-1874.
- Peng HB, Libby P, Liao JK. Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. J Biol Chem. 1995; 270:14214-14219.
- Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:3375–3378.
- Cooke JP, Singer AH, Tsao P, Zera P, Rowan RA, Billingham ME. Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. J Clin Invest. 1992;90:1168-1172.
- Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:5193–5197.
- Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. J Clin Invest. 1989;83:1774–1777.
- De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr, Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokineinduced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest*. 1995;96:60-68.
- Adams MR, Jessup W, Hailstones D, Celermajer DS. L-Arginine reduces human monocyte adhesion to vascular endothelium and endothelial expression of cell adhesion molecules. *Circulation*. 1997;95:662–668.
- Zeiher AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, Busse R. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res.* 1995;76:980–986.
- Tsao PS, McEvoy LM, Drexler H, Butcher EG, Cooke JP. Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L-arginine. *Circulation*. 1994;89:2176-2182.
- Wang BY, Singer AH, Tsao PS, Drexler H, Kosek J, Cooke JP. Dietary arginine prevents atherogenesis in the coronary artery of the hypercholesterolemic rabbit. J Am Coll Cardiol. 1994;23:452–458.

- Girerd XJ, Hirsch AP, Cooke JP, Dzau VJ, Creager MA. L-Arginine augments endothelium-dependent vasodilation in cholesterol-fed rabbits. *Circ Res.* 1990;67:1301–1308.
- Hamon M, Vallet B, Bauters C, Wernert N, McFadden EP, Lablanche J, 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.
- Schwarzacher SP, Lim TT, Wang B, Kernoff RS, Niebauer J, Cooke JP, Yeung AC. Local intramural delivery of L-arginine enhances nitric oxide generation and inhibits lesion formation after balloon angioplasty. *Circulation*. 1997;95:1863–1869.
- 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.
- Carson SD. Continuous chromogenic tissue factor assay: comparison to clot-based assays and sensitivity established using pure tissue factor. *Thromb Res.* 1987;47:379-387.
- Kim WM, Merskey C, Deming QB, Adel HN, Wolinsky H, Clarkson TB, Lofland HB. Hyperlipidemia, hypercoagulability, and accelerated thrombosis: studies in congenitally hyperlipidemic rats and in rats and monkeys with induced hyperlipidemia. *Blood*. 1976;47:275–286.
- Novotny WF, Brown SG, Miletich JP, Rader DJ, Broze GJ Jr. Plasma antigen levels of the lipoprotein associated coagulation inhibitor in patients samples. *Blood.* 1991;78:387–393.
- Mitropoulos KA, Esnouf MP. Turnover of factor X and of prothrombin in rabbits fed on a standard or cholesterol-supplemented diet. *Biochem J*. 1987;244:263-269.
- Mitropoulos KA, Walter SJ, Meade TW, Esnouf MP. Increased factor VII reactivity in the rabbit following diet-induced hypercholesterolaemia. *Thromb Haemost.* 1987;58:273.
- 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.
- Van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal ruphure or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*. 1994;89:36–44.
- Semeraro N, Montemurro P, Giordano D, Pasquetto N, Curci E, Triggiani R, Colucci M. Increased macrophage procoagulant activity but normal endothelial thrombomodulin in rabbits fed an atherogenic diet. *Athero-sclerosis.* 1990;20:54-61.
- Minor RL Jr, Myers PR, Guerra R Jr, Bates JN, Harrison DG. Dietinduced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. J Clin Invest. 1990;86:2109-2116.
- Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. J Clin Invest. 1993;91: 2546-2551.
- Tsao PS, Buitrago R, Chan JR, Cooke JP. Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness: nitric oxide and transcriptional regulation of VCAM-1. *Circulation*. 1996;94:1682–1689.
- 35. Bierhaus A, Zhang Y, Quehenberger P, Luther T, Haase M, Müller M, Mackman N, Ziegler R, Nawroth PP. The dietary pigment curcumin reduces endothelial tissue factor gene expression by inhibiting binding of AP-1 to the DNA and activation of NF-κB. *Thromb Haemost*. 1997;77:772–782.
- Brisseau GF, Dackiw APB, Cheung PYC, Christie N, Rotstein OD. Posttranscriptional regulation of macrophage tissue factor expression by antioxidants. *Blood.* 1995;85:1025–1035.
- Sarembock IJ, LaVeau PJ, Sigal SL, Timms I, Sussman J, Haudenschild C, Ezekowitz MD. Influence of inflation pressure and balloon size on the development of intimal hyperplasia after angioplasty: a study in the atherosclerotic rabbit. *Circulation*. 1989;80:1029-1040.
- Maseri A. Inflammation, atherosclerosis, and ischemic events exploring the hidden side of the moon. N Engl J Med. 1997;336: 1014-1016.
- Creager MA, Gallagher SJ, Girerd XJ, Coleman SM, Dzau VJ, Cooke JP. L-Arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. J Clin Invest. 1992;90:1248-1253.
- Adams MR, Forsyth CJ, Jessup W, Robinson J, Celermajer DS. Oral L-arginine inhibits platelet aggregation but does not enhance endothelium-dependent dilation in healthy young adults. J Am Coll Cardiol. 1995;26:1054-1061.

III.EFFETS DES FACTEURS DE CROISSANCE DANS L'ATHEROSCLEROSE

Parmi les nombreuses cytokines et facteurs de croissance impliqués dans la formation des plaques d'athérome figure le basic fibroblast growth factor ou bFGF (Brogi 1993). Les cellules endothéliales et les CMLs expriment le gène du bFGF puis produisent et relarguent ce facteur de croissance en cas d'agression (Schweigerer 1987, Lindner 1990). Bien que classiquement le bFGF ait été catalogué comme un facteur pro-athérogène du fait de sa stimulation de la croissance des CMLs (Lindner 1991 A), de nombreux travaux ont prouvé le rôle bénéfique des facteurs de croissance dans la restauration de la fonction endothéliale dans des modèles de circulation collatérale expérimentale (Bauters 1995) ou d'angioplastie par ballonnet (Meurice 1996). Une étude préliminaire a permis de démontrer l'effet bénéfique du bFGF sur la fonction endothéliale dans un modèle d'athérosclérose chez le lapin (Meurice 1997). III.1- Evaluation des effets à court terme du bFGF dans un modèle d'athérosclérose

Article n°3 : Six I, Van Belle E, Corseaux D, Bordet R, Le Tourneau T, Vallet B,
Dupuis B, Bauters C, Bertrand ME. Protective effects of basic
fibroblast growth factor in early atherosclerosis.
Soumis

Le rôle du bFGF dans la formation de la plaque athéroscléreuse n'est pas complètement compris. Il est supposé que le bFGF pourrait agir comme facteur proathérogène. Cette supposition est liée à l'effet stimulateur du bFGF sur la croissance des CMLs (Gospodarowicz 1991). Des études récentes suggèrent que le bFGF pourrait avoir des effets bénéfiques en réversant la dysfonction endothéliale dans des modèles expérimentaux (Meurice 1996, Meurice 1997).

Une meilleure connaissance des effets du bFGF sur la formation de la plaque athéroscléreuse est importante. Ceci permettra d'approfondir la connaissance des mécanismes pathophysiologiques. Ces études sont aussi importantes parce que les facteurs de croissance angiogéniques, dont le bFGF, sont en projet d'utilisation, chez l'homme, dans le but de développer une circulation collatérale chez des patients présentant une ischémie sévère (Baumgartner 1998, Asahara 1995, Casscells 1995, Selke 1998).

La première étude a permis d'analyser les effets fonctionnels et anatomiques de l'administration de bFGF sur les vaisseaux athéroscléreux. Une étude complémentaire a permis d'étudier les effets délétères du bFGF après une administration à long terme.

96

PROTECTIVE EFFECTS OF BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR IN EARLY ATHEROSCLEROSIS

Isabelle Six¹, Eric Van Belle², Delphine Corseaux¹, Régis Bordet¹, Thierry Le Tourneau¹, Benoît Vallet¹, Bernard Dupuis¹, Christophe Bauters² and Michel E. Bertrand².

Department of Pharmacology¹ and Cardiology², University of Lille, 59037 Lille Cedex,

France.

Running title: FGF and early atherosclerosis

Corresponding author:

Christophe Bauters, MD Service de Cardiologie B Hôpital Cardiologique Boulevard du Professeur J Leclercq 59037 Lille Cedex France **Telephone:** (+33) 3.20.44.53.02 **Fax:** (+33) 3.20.53.58.74 **E-mail:** cbauters@chru-lille.fr

ABSTRACT

Background The role of basic fibroblast growth factor (bFGF) on plaque formation in the course of atherosclerosis is unclear.

Method and Results We investigated the effect of bFGF or placebo (2.5 µg IV twice a week), begun on the same day as a cholesterol (2%) diet, on in vitro reactivity, VCAM-1 expression, and plaque development in rabbit aorta. Results were compared to those of rabbits fed with a normal chow (normal animals).

At 5 weeks, relaxation to acetylcholine (ACh) was reduced and VCAM-1 expression was increased in hypercholesterolemic-placebo-animals (n=6) compared to normals (n=6; p<0.05). This was prevented by treatment with bFGF (n=6). Relaxation to A-23187 was preserved in all 3 groups.

At 10 weeks, relaxation to ACh and A-23187 was similarly reduced in hypercholesterolemic-placebo (n=6) and hypercholesterolemic-bFGF (n=5) groups compared to normals (n=8; p<0.05). At this time point, VCAM-1 expression was also similar in hypercholesterolemic-placebo and hypercholesterolemic-bFGF groups.

Hypercholesterolemic diet was associated with a time-dependent increase in plaque size (p=0.01) that was not modified by bFGF. At 5 weeks however, plaque in bFGF-animals contained less macrophages and more smooth muscle cells (SMC) than in placebo-animals (p=0.02). At 10 weeks, the ratio macrophages/SMC was similar in the 2 hypercholesterolemic groups.

Conclusion Basic FGF administration is associated with important beneficial stuctural and functional effects in the early stage of experimental atherosclerosis. These results may help us to understand the role of growth factors in atherosclerosis and to anticipate their effects in human arteries if they are used to improve collateral vessel formation in patients with severe ischemia.

CONDENSED ABSTRACT

We investigated the effect of bFGF or placebo (2.5 μ g IV twice a week), begun on the same day as a cholesterol (2%) diet, and continued for 5 or 10 weeks, on functional and structural development of atherosclerosis in rabbit aorta. At 5 weeks, bFGF administration was associated with an improvement in endothelial function as documented by in vitro vasoreactivity and VCAM-1 expression and with a decrease in the macrophage content of the plaque. This preventive effect was lost at 10 weeks. These results may help to understand the role of growth factors in atherosclerosis and to anticipate their effects in human arteries if they are used to treat patients.



INTRODUCTION

Atherosclerotic plaque formation is a complex phenomenon involving various processes such as lipid accumulation, endothelial activation, infiltration of monocytes/macrophages and their transformation into foam cells, or migration and proliferation of smooth muscle cells ¹. Among the numerous cytokines and growth factors that have been implicated in atherosclerotic plaque formation, basic fibroblast growth factor (bFGF) may play an important role ²,³. Basic FGF is a growth factor active on different cell types including vascular cells such as endothelial or smooth muscle cells ⁴⁻⁷.

The role of bFGF in atherosclerotic plaque formation is incompletely understood. Although it has been postulated that it may act as a proatherogenic factor due to its stimulatory effect on smooth muscle cell growth 4,7, more recent studies have suggested that it may also have some beneficial effects by reversing endothelial dysfunction in experimental models 8,9.

A better knowledge of the effects of bFGF on atherosclerotic plaque formation would be important not only in term of pathophysiological mechanisms but also because angiogenic growth factors, including bFGF, are currently under investigation in humans to develop collateral vessel growth in patients with severe ischemia ¹⁰⁻¹³. If bFGF is going to be clinically used in this indication, it will be of major importance to have information on the possible effects that the growth factor may have on the multiple atherosclerotic plaques of such patients.

The present study was thus designed to analyze the effects of bFGF administration on atherosclerotic vessels using both anatomic and functional endpoints.

METHODS

Study protocol

A total of 37 male New Zealand White rabbits (3.0-3.5 kg, Charles River, St Aubin les Elbeuf, France) were studied. Eighteen animals were killed 5 weeks after the beginning of the study, whereas 19 animals were killed after 10 weeks.

Six animals in the 5 weeks group and 8 in the 10 weeks group were fed a normal diet ('*normal 5 weeks*' and '*normal 10 weeks*'). Plasma cholesterol levels at sacrifice were 25 ± 4 mg/dL at 5 weeks and 24 ± 2 mg/dL at 10 weeks.

Twelve animals in the 5 weeks group and 11 in the 10 weeks group were fed a high cholesterol (2%) diet. Plasma cholesterol levels at sacrifice were 1245 ± 116 mg/dL at 5 weeks (p<0.0001 vs normal 5 weeks) and 1666 ± 107 mg/dL at 10 weeks (p<0.0001 vs normal 10 weeks). The hypercholesterolemic animals were randomized to a treatment with either bFGF (*'hypercholesterolemic bFGF 5 weeks'*, n=6; *'hypercholesterolemic bFGF 10 weeks'*, n=6) or placebo (*'hypercholesterolemic control 5 weeks'*, n=6; *'hypercholesterolemic control 10 weeks'*, n=5). Basic FGF-treated animals received twice-weekly intravenous boluses of human recombinant bFGF (2.5µg bFGF in 1 mL 0.5% rabbit albumin per injection); placebo-treated animals received vehicle injections. The treatment was started at the beginning of the hypercholesterolemic diet and was continued until sacrifice.

At the end of the study, the animals were killed for assessment of in vitro vasoreactivity and for histological analysis. All experiments were conducted in compliance with the position of the American Heart Association on research animal use.

Vascular responses

The animals were anesthetized with 1 g/kg ethyl carbamate, and their thoracic aortas were excised quickly and placed in oxygenated Krebs-Henseleit solution containing (mmol/L) 118 NaCl, 4.6 KCl, 27.2 NaHCO₃, 1.2 MgSO₄, 1.2 KH₂PO₄, 1.75 CaCl₂, 0.03 Na₂ -EDTA, and 11.1 D-glucose (pH 7.35 - 7.45). Intravenous heparin (1,000 IU) was given before removal of the vessels, to prevent coagulation. The descending thoracic aortas were cleaned of

surrounding fat and connective tissue and cut into 4.5- to 5-mm-long rings. For each aorta, two rings chosen at random were studied. Rings were then suspended in organ chambers (Radnoti Glass Technology, Monravia, CA) filled with 40 ml of warmed (37°C) and oxygenated (95% O₂ - 5% CO₂) Krebs- Henseleit solution. Rings were connected to force transducters, and changes in isometric force were recorded continuously. During a 60-min period, the vascular rings were stretched to 8.0 g, previously determined as the optimal point of their lengthtension relation. The output from the transducters was amplified by signal conditioners and sent to an Intel 486-based computer for analog-digital conversion. All rings were preconstricted with phenylephrine (10⁻⁹ to 3.10⁻⁵ mol/L). Endothelium-dependent or -independent relaxant effects were then established when the constrictor response to phenylephrine was stable. First, the relaxant response to acetylcholine (10⁻⁹ to 3.10⁻⁵ mol/L; 2 rings per aorta) was measured. When the maximal responses produced by this agonist were stable, the rings were washed and allowed to stabilize at resting tension. The vessels were then again preconstricted with phenylephrine (3.10⁻⁵ mol/l) and the relaxant responses to sodium nitroprusside (10⁻⁹ to 3.10⁻⁵ mol/L; 1 ring per aorta) and calcium ionophore A-23187 (10⁻⁹ to 3.10⁻⁶ mol/L; 1 ring per aorta) were measured.

Histological morphometry

After excision, the thoracic aortas were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde for 24h. Each thoracic aorta was divided in 3 equal segments (proximal, mid, distal) cryoprotected by immersion in sucrose (30% for 4 hours), embedded in OCT and frozen in isopentane. Three non consecutive 6µm-thick sections stained with orcein-van Gieson and selected at random in each segment were analyzed. Morphometric analysis of the sections was performed with a digital macroscopic planimetry system (Morphometry-System, Bioblock Scientific, Illkirch, France). Plaque and medial areas were measured in each section and averaged for each aorta.

Immunostainings

To identify the origin of the cells present in the vessel, endothelial, macrophage and smooth muscle cell immunostainings were performed. To study activation of the endothelial cells, immunostaining for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) was also performed. Three non consecutive sets of 6 μ m-thick sections selected at random in each segment were analyzed. Cryosections were incubated with peroxydase blocking reagent, rinsed in PBS for 10 minutes and in 10% horse serum in PBS for 10 minutes. A mouse prepared monoclonal primary antibody to CD-31 Dakopatts A/S (Copenhagen, Denmark), diluted to 1:20 in PBS was incubated at 37°C overnight for the detection of endothelial cells. A mouse prepared monoclonal primary antibody to RAM 11 Dakopatts A/S, diluted to 1:50 in PBS was incubated 1h at room temperature for the detection of macrophages. A mouse prepared monoclonal primary antibody to α actin (Boehringer Mannheim Biochemica corp, Mannheim, Germany), diluted to 1:40 in PBS was incubated at 4°C 24 h for the detection of smooth muscle cells. A goat prepared polyclonal primary antibody to VCAM-1 (C-19, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA), diluted to 1:27 in PBS was incubated at 4°C overnight for the detection of VCAM-1 expression on endothelial cells.

After extensive washing, anti-mouse or anti-goat biotinylated secondary antibody was applied for 1 hour. After washing in PBS, sections were incubated for 1 hour in a solution of avidin-biotin-peroxidase preformed complex (ABC Vector-Vectastain kit, Vector laboratories Inc., Burlingame, CA). The peroxidase activity was revealed using hydrogen peroxide and diamino-benzidine, as a chromogene, and counterstaining was performed with hematoxylin.

Cross sections were analyzed by two independent observers unaware of the study design. Cross sections stained for CD-31 and VCAM-1 were studied to quantify immunostaining at luminal surface. In each section, percent endothelialization and percent coverage by VCAM-1 were measured with use of a computerized sketching program (Morphometry-System, Bioblock Scientific). To assess plaque composition, serial cross sections stained for α actin and RAM 11 were studied. Each section was graded from 0 to 6 according to the intensity of the staining for macrophages and smooth muscle cells within the plaque. The *relative macrophage content* of the plaque area, defined as the ratio macrophage grade/ [macrophage grade + smooth muscle cell grade] in the plaque area, was calculated in each section. Percent endothelialization, percent coverage by VCAM-1, and relative macrophage content were averaged for each aorta.

Drugs

Human recombinant bFGF, rabbit albumin, ethyl carbamate, L-phenylephrine hydrochloride, acetylcholine chloride, calcium ionophore A-23187, and sodium nitroprusside were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO). Basic FGF ($2.5 \mu g/mL$) was dissolved in 0.5% rabbit albumin. Drugs used for vasomotor experiments were dissolved in 0.9% NaCl solution. Gases were purchased from the Compagnie Française des Produits Oxygénés (Paris, France) and were within a tolerance of 1% of the desired mixture.

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SEM. Comparisons between two groups were performed by Student's *t* test or Mann-Whitney *U* test as appropriate. When more than two means were compared, an analysis of variance was used. If a significant value was found, Scheffé's test for multiple comparisons was used to identify differences among groups. A value of p<0.05 was considered to indicate statistical significance.

RESULTS

Administration of bFGF during a 5-weeks hypercholesterolemic diet

Effects on vascular reactivity At 5 weeks, the degree of preconstriction achieved by phenylephrine $(3.10^{-5} \text{ mol/L})$ was similar in normal, hypercholesterolemic control, and hypercholesterolemic bFGF rabbits (Table). Similarly, the relaxant response to the endothelium-independent agonist sodium nitroprusside did not differ significantly among the three groups (Table).

Five weeks after the beginning of the hypercholesterolemic diet, the relaxation induced by acetylcholine was significantly reduced in hypercholesterolemic control animals compared with the response observed in the vessels from normal animals. In hypercholesterolemic animals treated with bFGF, the response to acetylcholine was significantly greater than in hypercholesterolemic controls (p<0.0.5) and was similar to that observed in normal animals (Fig. 1A). The relaxation induced by the calcium ionophore A-23187 was not altered after 5 weeks of hypercholesterolemic diet; the treatment with bFGF had no effect on the response of hypercholesterolemic rabbits to A-23187 (Fig. 2A).

Effects on VCAM-1 expression Five weeks after the beginning of the diet, CD 31 immunostaining demonstrated an apparently intact endothelial layer in vessels from normal, hypercholesterolemic control or hypercholesterolemic bFGF rabbits (Fig. 3). VCAM-1 expression at the luminal surface of the vessels, however, was higher in hypercholesterolemic control animals than in normal animals (p=0.02) and than in hypercholesterolemic animals treated with bFGF (p=0.005). VCAM-1 expression was similar in hypercholesterolemic animals treated with bFGF and in normal animals (Fig. 4 and 5)

Effects on plaque formation At 5 weeks, atherosclerotic plaques were found in thoracic aorta of hypercholesterolemic control animals. Treatment with bFGF had no effect on the extent of plaque formation (Fig. 6 and 7). Plaque composition, however, was affected by bFGF treatment: plaques from hypercholesterolemic bFGF animals contained less macrophages and more smooth muscle cells, and thus had a lower *relative macrophage content* than hypercholesterolemic control animals (p=0.01; Fig. 8 and 9).
Administration of bFGF during a 10-weeks hypercholesterolemic diet

Effects on vascular reactivity At 10 weeks, the degree of preconstriction in response to phenylephrine $(3.10^{-5} \text{ mol/L})$ and the relaxant response to the endothelium-independent agonist sodium nitroprusside did not differ significantly among the three groups (Table).

Ten weeks after the beginning of the hypercholesterolemic diet, the relaxation induced by acetylcholine (p<0.0001) and by A-23187 (p<0.05) was significantly reduced in vessels from hypercholesterolemic control animals compared with responses observed in normal animals. At this time point, hypercholesterolemic animals treated with bFGF no longer demonstrated any improvement in the response to acetylcholine (Fig. 1B). The response to A-23187 was also similarly reduced in hypercholesterolemic control and bFGF treated animals (Fig. 2B).

Effects on VCAM-1 expression At 10 weeks, CD 31 immunostaining demonstrated complete endothelial coverage in all groups (Fig. 3). In hypercholesterolemic controls, there was a trend for a decrease in VCAM-1 expression at the luminal surface of the vessels from 5 to 10 weeks (- 17 %, ns). At this time point, VCAM-1 expression was similar in hypercholesterolemic control and FGF animals (Fig. 4).

Effects on plaque formation In hypercholesterolemic controls, a dramatic increase in plaque size was observed between 5 and 10 weeks (p=0.01, Fig. 6 and 7). At the 10 weeks time point, the extent of plaque formation was similar in hypercholesterolemic control and hypercholesterolemic bFGF animals (Fig. 6 and 7). At 10 weeks, the *relative macrophage content* of plaque areas observed in hypercholesterolemic controls was slightly higher than at 5 weeks (+ 0.13, p=0.06), but did not differ between controls and FGF animals (Fig. 8 and 9).

DISCUSSION

Our results demonstrate that exogenous administration of bFGF can have important structural and functional effects (improved endothelium-dependent relaxation, decreased endothelial activation, decreased macrophage content of the plaque) in the early stage of dietinduced experiment atherosclerosis. These beneficial effects, however, are lost when the hypercholesterolemic diet is continued over a longer period of time. These results support a key role of bFGF during the course of atherosclerosis and provide new information on these effects. Indeed, to the best of our knowledge, this is the first demonstration that bFGF may modulate 1) the activation of endothelial cells in vivo in an animal model of atherosclerosis and 2) the composition of the atherosclerotic plaque. In addition, the lack of deleterious effect of bFGF on plaque growth over a 10 weeks period in our model is encouraging in the perspective of using bFGF for "therapeutic angiogenesis" in patients with diffuse atherosclerotic plaques.

Diet-induced experimental atherosclerosis

The hypercholesterolemic rabbit model is frequently used as an experimental model for atherosclerosis 9,14-16. In these models, the degree of atherosclerosis can be assessed by functional, immunohistological and/or anatomic endpoints: analysis of endothelium-dependent relaxation 9,16, histology of the atherosclerotic lesions 9,14,16 and expression of adhesion molecules 14,15.

While abnormal functional responses of arterial rings to endothelium-dependent agonists have been consistently observed in hypercholesterolemic rabbit models, endothelial cell immunostaining unvariably shows a complete endothelial layer 9,17, except in the very advanced stages of atherosclerosis ¹⁸. These abnormal functional responses are likely to be related to either reduced synthesis ¹⁹ or enhanced destruction ²⁰ of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide (EDRF/NO). In the present study, we sought to perform a time course analysis of endothelial dysfunction. We observed a significant decrease in relaxation to the receptor-dependent agonist acetylcholine after 5 weeks of hypercholesterolemic diet; at this stage, the relaxation to the receptor-independent agonist calcium ionophore A23187 was

unchanged. After 10 weeks of hypercholesterolemic diet, however, the responses to both agonists were severely altered. These results are concordant with previous observations 9,21, and suggest that the early stages of endothelial dysfunction in response to an hypercholesterolemic diet are related to selective alterations in endothelial cells while later stages are related to more global alterations. As suggested by studies in the pig model, early stages of endothelial dysfunction may be the consequence of an impairment in endothelial signal transduction due to dysfunction of Gi proteins 21.

In the rabbit model, aortic plaque development is a function of time and severity of the hypercholesterolemic diet 9,14-16. In the present study, a severe (2% cholesterol) diet was associated with significant plaque formation at 5 weeks and with dramatic progression from 5 to 10 weeks by quantitative analysis. We also performed immunohistochemical studies to assess the composition of the aortic lesions. As previously reported 14,16, macrophages and smooth muscle cells were the major contributors to plaque formation in this model.

Macrophage accumulation within the plaque is considered to be the result of the infiltration of circulating monocytes through a macroscopically intact endothelial monolayer. This process is permitted by the activation of endothelial cells and the expression of adhesion molecules such as P-selectin, ICAM-1, or such as VCAM-1 as shown in our model and as previously described 14,15.

Effects of bFGF on vascular reactivity

Several studies have already demonstrated that administration of angiogenic growth factors may help to restore normal responses in different animal models of endothelial dysfunction ^{8,9,22,23}. We have recently reported that administration of bFGF over a 3 weeks period may significantly improve the functional responses of aortic rings from rabbits previously treated with a 2% cholesterol diet during 6 weeks ⁹. The present study, in which bFGF administration and hypercholesterolemic diet were started simultaneously, provides evidence for a *preventive* effect of bFGF on the development of endothelial dysfunction.

Administration of bFGF during the first 5 weeks of hypercholesterolemic diet almost completely prevented the development of endothelial dysfunction (Fig. 1). By contrast, after 10 weeks of hypercholesterolemic diet the level of endothelial dysfunction was similar in bFGF-treated versus control animals. As stated above, the early stages of diet-induced endothelial dysfunction are related to selective alterations in endothelial cells. Our results thus suggest that bFGF may modulate some qualitative aspects of endothelial cells to prevent the early stages of endothelial dysfunction. Further studies will be needed to determine the exact mechanism(s) underlying the protective effect of bFGF on endothelial function. An interesting study hypothesis would be that bFGF may have an impact on coupling proteins such as G proteins.

Effects of bFGF on VCAM-1 expression

Previous studies have shown that bFGF may prevent induction of VCAM-1 expression in cultured endothelial cells in vitro 24,25 and decrease adhesion to endothelial cells in vivo in a model of tumor angiogenesis 24 . Our study, is the first to demonstrate similar results in vivo, in a model of atherosclerosis.

The exact mechanism(s) of this effect are unknown. Induction of VCAM-1 in endothelial cells is considered to be mediated by two different pathways dependent on the activation of two transcription factors: AP-1 and NF-kappaB ^{26,27}. To date, there is no or limited evidence that bFGF may directly downregulate these two transcription factors ^{28,29}. Other properties of bFGF however, including its ability to stimulate or maintain NO production, could explain its effect on VCAM-1 expression. Indeed, short term administration of bFGF is known to induce NO release ³⁰, while chronic treatment, as demonstrated in the present study, may prevent endothelial dysfunction and maintain the ability of the endothelial monolayer to release NO. L-arginine and NO donors have been shown to decrease VCAM-1 expression in endothelial cells in vitro ³¹ and administration of L-NAME in rats has been associated with an increase in VCAM-1 expression ³². The effect of NO on VCAM-1 expression is considered to be mediated through an inhibition of the NF-kappaB pathway via the induction of I-kappaB ³³. The fact that in our study, there is a clear relationship between the status of endothelial function and the degree of VCAM-1 expression provides additional support for this hypothesis.

Effects of bFGF on plaque formation

Basic FGF is a potent growth factor for smooth muscle cells and may directly enhance neointimal formation and plaque formation 4,7. However, recent studies have shown that administration of relatively low doses of bFGF can have beneficial effects on vascular endothelium without a significant increase in neointimal thickening or in plaque formation 8,9,34. These studies suggest that the overall effect of bFGF on plaque formation may be the result of complex interactions between the effects on the different cellular components of the lesion.

In the present study, bFGF administration had no significant impact on the overall size of aortic plaques after either 5 or 10 weeks of hypercholesterolemic diet; these results are concordant with those of previous studies using similar doses of bFGF 9. Our immunohistochemical analyses, however, showed that at 5 weeks bFGF may significantly affect plaque composition; plaques from bFGF-treated animals had a significant decrease in the proportion of macrophages (versus smooth muscle cells). The design of our study does not allow us to determine the exact mechanism(s) underlying these differences in plaque composition but an attractive explanation would be that the documented beneficial effect of bFGF on endothelial function and adhesion molecule expression after 5 weeks of hypercholesterolemic diet limits monocytes/macrophages infiltration/accumulation in the subendothelial space; this decrease in the number of macrophages having, however, no effect on the overall plaque size due to an increase in the number of smooth muscle cells possibly related to stimulation by bFGF 4,7. This hypothesis is supported by a previous study showing that treatment with blocking antibody against adhesion molecules may reduce macrophage recruitment in a mouse model of atherosclerosis 35. The lack of difference in plaque composition after 10 weeks of hypercholesterolemic diet may be explained by the very severe and similar endothelial dysfunction in both groups and by the dramatic growth of aortic lesions between 5 and 10 weeks.

Study limitations

Human atherosclerosis is a very complex and progressive disease and is clearly different from what can be obtained in experimental models and in the rabbit hypercholesterolemic model in particular. This model is, however, useful to evaluate some of the processes that are known to occur in human atherosclerosis such as endothelial dysfunction, expression of adhesion molecules, cholesterol/macrophages infiltration, and smooth muscle cell migration and proliferation.

The very severe hypercholesterolemic diet (2%) used in the present study is associated with a very rapid progression of the lesions; further studies testing the preventive effect of bFGF in the setting of moderate hypercholesterolemic diet (0.1-0.2%) would be interesting. Alternatively, and to try to address the role of angiogenesis in plaque progression, that cannot addressed with the present model, a longer time course may be useful ³⁶. It would also be interesting to study in this model the effects of angiogenic growth factors with no effect on vascular smooth muscle cell proliferation (e.g.; vascular endothelial growth factor) ³⁷ on plaque progression.

Conclusions

Basic FGF administration is associated with important beneficial structural and functional effects in the early stage of diet-induced experimental atherosclerosis. These results may allow a better understanding of the role of growth factors in atherosclerosis. In addition, our results provide important information on the impact of bFGF on atherosclerotic arteries; such information would be important to anticipate the effects of bFGF on human arteries if it is clinically used to improve collateral vessel formation in patients with severe ischemia 10,12,13.

Acknowledgments

We thanks Thierry Couffinhal (INSERM U441, Pessac, France) for its helpful assistance in conducting immunostaining experiments. Isabelle Six was supported in part by combined grants from the Centre Hospitalier Régionale et Universitaire de Lille and the Région Nord.

References

1. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362:801-809.

2. Hughes SE, Crossman D, Hall PA. Expression of basic and acidic fibroblast growth factors and their receptor in normal and atherosclerotic human arteries. *Cardiovasc Res.* 1993;27:1214-1219.

3. Peoples GE, Blotnick S, Takahashi K, Freeman MR, Klagsbrun M, Eberlein TJ. T lymphocytes that infiltrate tumors and atherosclerotic plaques produce heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor: a potential pathologic role. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:6547-6551.

4. Gospodarowicz D. Biological activities of fibroblast growth factors. Ann NY Acad Sci. 1991;638:1-8.

5. Lindner V, Majack RA, Reidy MA. Basic fibroblast growth factor stimulates endothelial regrowth and proliferation in denuded arteries. *J Clin Invest*. 1990;85:2004-2008.

6. Biro S, Yu ZX, Fu YM, Smale G, Sasse J, Sanchez J, Ferrans VJ, Casscells W. Expression and subcellular distribution of basic fibroblast growth factor are regulated during migration of endothelial cells. *Circ Res.* 1994;74:485-494.

7. 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.

8. Meurice T, Bauters C, Auffray JL, Vallet B, Hamon M, Valero F, Van Belle E, Lablanche JM, Bertrand ME. Basic fibroblast growth factor restores endothelium-dependent responses after balloon injury of rabbit arteries. *Circulation*. 1996;93:18-22.

9. Meurice T, Bauters C, Vallet B, Corseaux D, Van Belle E, Hamon M, Dupuis B, Lablanche JM, Bertrand ME. Basic fibroblast growth factor restores endothelium-dependent responses of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. *Am J Physiol*. 1996;272:H613-H617.

10. Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, Isner JM. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation*. 1998;97:1114-1123.

11. Asahara T, Bauters C, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation*. 1995;92(9 Suppl):II365-II371.

12. Casscells W. Growth factor therapies for vascular injury and ischemia. *Circulation*. 1995;91:2699-2702.

13. Sellke FW, Laham RJ, Edelman ER, Pearlman JD, Simons M. Therapeutic angiogenesis with basic fibroblast growth factor: technique and early results. *Ann Thorac Surg.* 1998;65:1540-1544.

14. Sakai A, Kume N, Nishi E, Tanoue K, Miyasaka M, Kita T. P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 are focally expressed in aortas of hypercholesterolemic rabbits before intimal accumulation of macrophages and T lymphocyte. *Circulation*. 1997;17:310-316.

15. Cybulsky MI, Gimbrone MAJr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*. 1991;251:788-791.

16. Cooke JP, Singer A, Tsao P, Zera P, Rowan R, Billingham M. Anti-atherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest*. 1992;90:1168-1172.

17. Krejcy K, Schwarzacher S, Ferber W, Plesch C, Cybulsky MI, Weidinger FF. Expression of VCAM-1 in rabbit iliac arteries is associated with vasodilatator dysfunction of regenerated endothelium following balloon injury. *Atherosclerosis*. 1996;122:59-67.

18. Kolodgie FD, Virmani R, Rice HE, Mergner WJ. Vascular reactivity during the progression of atherosclerotic plaque: a study in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circ Res.* 1990;66:1112-1126.

19. Cooke JP, Andon NA, Girerd XJ, Hirsch AT, Creager MA. Arginine restores cholinergic relaxation of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. *Circulation*. 1991;83:1057-1062.

20. Ohara Y, Peterson TE, Zheng B, Kuo JF, Harrison DG. Lysophosphatidylcholine increases vascular superoxide anion production via protein kinase C activation. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:1007-1013.

21. Shimokawa H, Flavahan NA, Vanhoutte PM. Loss of endothelial pertussis toxin-sensitive G protein function in atherosclerotic porcine coronary arteries. *Circulation*. 1991;83:652-660.

22. Sellke FW, Wang SY, Friedman M, Harada K, Edelman ER, Grossman W, Simons M. Basic FGF enhances endothelium-dependent relaxation of the collateral-perfused coronary microcirculation. *Am J Physiol*. 1994;267:H1303-H1311.

23. Bauters C, Asahara T, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Recovery of disturbed endothelium-dependent flow in the collateral-perfused rabbit ischemic hindlimb after administration of vascular endothelial growth factor. *Circulation*. 1995;91:2802-2809.

24. Melder RJ, Koenig GC, Witwer BP, Safabakhsh N, Munn LL, Jain RK. During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium. *Nat Med.* 1996;2:992-997.

25. Griffioen AW, Damen CA, Blijham GH, Groenewegen G. Tumor angiogenesis is accompagnied by a decreased inflammatory response of tumor-associated endothelium. *Blood*. 1996;88:667-673.

26. Ahmad M, Theofanidis P, Medford RM. Role of activating protein-1 in the regulation of the vascular cell adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem.* 1998;273:4616-4621.

27. Iademarco MF, MCQuillan JJ, Dean DC. Vascular cell adhesion molecule 1: contrasting transcriptional control mechanisms in muscle and endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:3943-3947.

28. Ryder K, Nathans D. Induction of protooncogene c-jun by serum growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:8464-8467.

29. Chaturvedi MM, Higuchi M, Aggarwal BB. Effects of tumor necrosis factors, interferons, interleukins, and growth factors on the activation of NF-kappa B: evidence for lack of correlation with cell proliferation. *Lymphokine cytokine Res.* 1994;13:309-313.

30. Cuevas P, Carceller F, Ortega S, Zazo M, Nieto I, Gimenez-Gallego G. Hypotensive activity of fibroblast growth factor. *Science*. 1991;254:1208-1210.

31. Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:9114-9119.

32. Luvara G, Pueyo ME, Philippe M, Mandet C, Savoie F, Henrion D, Michel JB. Chronic blockade of NO synthase activity induces a proinflammatory phenotype in the arterial wall: prevention by angiotensin II antagonism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1408-1416.

33. Spiecker M, Peng HB, Liao JK. Inhibition of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by nitric oxide involves the induction and nuclear translocation of IkappaB alpha. *J Biol Chem.* 1997;272:30969-30974.

34. Lazarous DF, Shou M, Scheinowitz M, Hodge E, Thirumurti 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.

35. Patel SS, Thiagarajan R, Willerson JT, Yeh ETH. Inhibition of alpha4 integrin and ICAM-1 markedly attenuate macrophage homing to atherosclerotic plaques in ApoE-deficient mice. *Circulation*. 1998;97:75-81.

36. Moulton KS, Heller E, Konerding MA, Flynn E, Palinski W, Folkman J. Angiogenesis inhibitors endostatin and TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 1999;99:1726-1732.

37. Asahara T, Bauters C, Pastore C, Kearney M, Rossow S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation*. 1995;91:2793-2801.

Figure legends

Fig. 1 Endothelium-dependent responses to acetylcholine in normal, hypercholesterolemic control, and hypercholesterolemic bFGF animals. Ring segments from thoracic aorta were constricted with 3.10^{-5} mol/L PE and exposed to increasing concentrations of acetylcholine. Values are presented as percentage of relaxation relative to the preconstricted state. A: 5-weeks groups. *: p<0.05 between *hypercholesterolemic control* and *normal* animals, †: p<0.05 between *hypercholesterolemic control* and *hypercholesterolemic FGF* animals. B: 10-weeks groups. ‡: p<0.0001 between *normal* animals and the two other groups.

Fig. 2 Endothelium-dependent responses to the calcium ionophore A-23187 in normal, hypercholesterolemic control, and hypercholesterolemic bFGF animals. A: 5-weeks groups. B: 10-weeks groups. * p<0.05 between *normal* animals and the two other groups.

Fig. 3 Representative examples of endothelial immunostaining (CD-31) after 5 weeks (A, C) and 10 weeks (B,D) of hypercholesterolemic diet. A complete endothelial layer was observed at both time-points in control (A, B) and bFGF-treated (C, D) animals. Magnification X 10.

Fig. 4 VCAM-1 immunostaining. VCAM-1 is expressed as the ratio: luminal circumference positive for VCAM-1/total luminal circumference. At 5 weeks, expression in *hypercholesterolemic control* animals is higher than in *normal* animals (*: p=0.02) and than in *hypercholesterolemic FGF* animals (†: p=0.005). At 10 weeks, no difference was found among groups.

Fig. 5 Representative examples of VCAM-1 immunostaining at 5 weeks in *normal* animals (A), *hypercholesterolemic controls* (B) and *hypercholesterolemic FGF* animals (C).

Fig. 6 Quantitative analysis of plaque formation in hypercholesterolemic rabbits. In *hypercholesterolemic controls*, plaque size increased dramatically between 5 and 10 weeks

(p=0.01). At each time point, no difference in plaque size was observed between *hypercholesterolemic control* and *hypercholesterolemic FGF* animals.

Fig. 7 Representative examples of plaque formation after 5 weeks (A, C) and 10 weeks (B,D) of hypercholesterolemic diet. The extent of plaque formation was similar in control (A, B) and bFGF-treated (C, D) animals. Staining: orcein - van Gieson. Magnification: X 10.

Fig. 8 Plaque composition in hypercholesterolemic rabbits. In *hypercholesterolemic controls*, the *relative macrophage content* increased slightly from 5 to 10 weeks (p=0.06). At 5 weeks, the *relative macrophage content* was significantly lower in *hypercholesterolemic FGF* animals than in *hypercholesterolemic controls* (* p=0.01).

Fig. 9 Representative examples of macrophage (A, C; RAM 11) and smooth muscle cell (B, D; α actin) immunostainings after 5 weeks of hypercholesterolemic diet in control (A, B) and bFGF-treated (C, D) animals. Plaques from control animals contained predominantly macrophages whereas plaques from bFGF-treated animals contained predominantly smooth muscle cells.

Representative examples of macrophage (E, G; RAM11) and smooth muscle cell (F, H; α actin) immunostainings after 10 weeks of hypercholesterolemic diet in control (E, F) and bFGF-treated (G, H) animals. The relative composition of the plaques (macrophages/smooth muscle cells) was similar in control and bFGF-treated animals.

Table:Endothelium-independent responses to phenylephrine and sodiumnitroprusside.

	Preconstriction to phenylephrine 3.10 ⁻⁵	Maximal relaxation to sodium nitroprusside (%
	mol/L (g)	of preconstricted state)
5 weeks		
Normal	20±1	70±4
Hypercholesterolemic controls	22±1	68±7
Hypercholesterolemic bFGF	22±1	74±3
10 weeks		
Normal	21±1	60±3
Hypercholesterolemic controls	22±1	53±5
Hypercholesterolemic bFGF	22±1	47±3

A



B

A







Fig. 2





Fig. 4







Fig. 6





Fig. 8







III.2- Evaluation des effets à long terme du bFGF dans un modèle d'athérosclérose

Après avoir démontré les effets à court terme du bFGF sur la formation de la plaque athéroscléreuse et la fonction endothéliale, nous avons cherché à étudier les effets à long terme du bFGF. Le modèle d'athérosclérose utilisé est un régime enrichi en cholestérol plus faible (0,2%) que celui utilisé précédemment (2%). Les animaux ont reçu ce régime pendant une période de 3 à 6 mois. Nous avons réalisé une étude de la vasoréactivité in vitro ainsi qu'une étude morphologique de la taille des plaques d'athérosclérose après administration de bFGF prolongée afin de déterminer s'il existe un effet délétère du bFGF à long terme. En effet, le bFGF est un agent mitogène pour les CMLs, il est donc intéressant de vérifier si l'effet bénéfique du bFGF sur les cellules endothéliales n'est pas antagonisé par un effet délétère sur les CMLs.

METHODES

Protocole d'étude

Un total de 34 lapins mâles blancs New Zealand (3,0-3,5 kg, Charles River, St Aubin les Elbeuf, France) ont été étudiés. Dix huit animaux ont été sacrifiés 13 semaines après le début de l'étude, alors que 16 animaux ont été sacrifiés après 26 semaines.

Six animaux dans le groupe 13 semaines et 6 dans le groupe 26 semaines ont été placés sous régime normal (*13 semaines normaux* et *26 semaines normaux*). Les niveaux de cholestérol plasmatique au moment du sacrifice étaient de 25 ± 2 mg/dL à 13 semaines et 29 ± 1 mg/dL à 26 semaines.

Douze animaux dans le groupe 13 semaines et 10 dans le goupe 26 semaines ont été placés sous régime enrichi en cholestérol (0.2%). Les niveaux de cholestérol plasmatiques, au moment des sacrifices, étaient de 594±55 mg/dL à 13 semaines (p<0,00001 vs contrôles 13 semaines) et 951±115 mg/dL à 26 semaines (p<0,0001 vs contrôles 26 semaines). Les animaux hypercholestérolémiques ont été randomisés en deux groupes. Dans l'un des groupes, les animaux reçoivent un traitement par le bFGF (hypercholestérolémiques bFGF 13 semaines, n=6; hypercholestérolémiques bFGF 26 semaines, n=5). Dans l'autre groupe, les animaux (hypercholestérolémiques contrôles 13 semaines. recoivent un placébo n=6: hypercholestérolémiques contrôles 26 semaines, n=5). Les animaux traités par le basic FGF ont reçu une injection intraveineuse de bFGF humain recombinant par semaine (2,5µg de bFGF dans 1 ml de serum albumine de lapin à 0,5% par injection); les animaux traités par le placébo ont reçu une injection par semaine de serum albumine de lapin à 0,5%. Le traitement a été débuté au moment de la mise sous régime enrichi en cholestérol et maintenu jusqu'au sacrifice.

A la fin de l'étude, les animaux sont sacrifiés afin d'étudier la vasoréactivité in vitro et de réaliser une analyse morphométrique des plaques d'athérosclérose selon les mêmes protocoles que précédemment.

Les analyses statistiques ont fait appel aux mêmes méthodes que précedemment.

RESULTATS

Administration de bFGF durant un régime hypercholestérolémiques de 13 semaines

Effets sur la réactivité vasculaire A 13 semaines, le degré de contraction obtenu avec la $^{-5}$ mol/L) est similaire chez les lapins normaux, hypercholestérolémiques contrôles et hypercholestérolémiques bFGF (Tableau). De même, la relaxation endothélium-indépendante au nitroprussiate de soude ne varie pas de façon significative entre les trois groupes (Tableau).

Treize semaines après le début du régime enrichi en cholestérol, la relaxation induite par l'acétylcholine est significativement réduite chez les animaux hypercholestérolémiques contrôles comparée à la réponse obtenue avec les vaisseaux des animaux normaux. Chez les animaux hypercholestérolémiques ayant reçu du bFGF, la réponse en acétylcholine est significativement plus importante que celle obtenue chez les animaux hypercholestérolémiques contrôles (p<0,05) et est similaire à celle observée chez les animaux normaux (Fig. 1A). La relaxation induite par le calcium ionophore A-23187 n'est pas altérée de façon significative après 13 semaines de régime enrichi en cholestérol; le traitement par le bFGF n'a pas d'effet sur la réponse en A-23187 (Fig. 2A).

Effets sur la formation de la plaque A 13 semaines, des plaques d'athérosclérose ont été retrouvées dans l'aorte thoracique des animaux hypercholestérolémiques contrôles. Le traitement par le bFGF n'a pas d'effet sur l'importance des plaques à 13 semaines (Fig. 3 et 4).

Administration de bFGF durant un régime hypercholestérolémique de 26 semaines

Effets sur la réactivité vasculaire A 26 semaines, la contraction en réponse à la phényléphrine $(3x10^{-5} \text{ mol/L})$ est altérée chez les animaux recevant du bFGF (p<0,05). La relaxation endothélium-indépendante en réponse au nitroprussiate de soude ne diffère pas significativement entre les trois groupes (Tableau).

26 semaines après le début de la mise sous régime enrichi en cholestérol, la relaxation induite par l'acétylcholine (p<0,05) et par l'A-23187 (p<0,05) est significativement reduite dans les vaisseaux des animaux hypercholestérolémiques contrôles comparée aux réponses observées chez les animaux normaux. Les réponses en acétylcholine et en A-23187 sont reduites de façon similaire chez les animaux hypercholestérolémiques contrôles ou chez les animaux traités par le bFGF (Fig. 1B et Fig. 2B).

Effets sur la formation de la plaque Chez les animaux hypercholestérolémiques contrôles la taille des plaques augmente de façon très importante entre 13 et 26 semaines (p=0,001 Fig. 3 et 4). A 26 semaines, la taille des plaques augmente de façon très importante chez les animaux hypercholestérolémiques traités par le bFGF comparés aux animaux hypercholestérolémiques contrôles (p=0,002 Fig. 3 et 4).

Légendes des figures

Fig. 1 Réponses endothélium-dépendantes à l'acétylcholine chez les animaux normaux, hypercholestérolémiques contrôles et hypercholestérolémiques bFGF. Les anneaux d'aorte thoracique ont été précontractés par la phényléphrine $3x10^{-5}$ mol/L et exposés à des doses croissantes d'acétylcholine. Les valeurs sont représentées en pourcentage de relaxation par rapport au stade de précontraction. A: groupes 13 semaines. *: p<0,05 entre hypercholestérolémiques contrôles et les animaux normaux, †: p<0,05 entre hypercholestérolémiques contrôles et les animaux normaux, t: p<0,05 entre hypercholestérolémiques contrôles et les animaux hypercholestérolémiques FGF. B: groupes 26 semaines. ‡: p<0,05 entre les animaux normaux et les deux autres groupes.

Fig. 2 Réponses endothélium-dépendantes au calcium ionophore A-23187 chez les animaux normaux, hypercholestérolémiques contrôles et hypercholestérolémiques FGF. A: groupes 13 semaines. B: groupes 26 semaines. ‡: p<0,05 entre les animaux *normaux* et les deux autres groupes.

Fig. 3 Analyse quantitative de la formation des plaques chez les lapins hypercholestérolémiques. Chez les *hypercholestérolémiques contrôles*, la taille des plaques augmente de façon importante entre 13 et 26 semaines (*: p=0,001). A 26 semaines, la taille des plaques augmente de façon significative (†: p=0,0002) entre les animaux *hypercholestérolémiques contrôles* et *hypercholestérolémiques FGF*.

Fig. 4 Exemples représentatifs de la formation des plaques après 13 semaines (A, C) et 26 semaines (B,D) de régime enrichi en cholestérol. A 13 semaines, la taille des plaques est identique entre les animaux contrôles (A) et les animaux bFGF (B). A 26 semaines, la taille des plaques augmente entre les animaux contrôles (B) et les animaux traités par le bFGF (D). Marquage: orcéin - van Gieson. Grossissement: X 10.

Tableau: Réponses	endothélium-indépendante à	la phényléphrine et au	
nitroprussiate de soude			
	Précontraction à la	Relaxation maximale au	
	phényléphrine 3x10 ⁻⁵	nitroprussiate de soude	
	mol/L (g)	(% de relaxation)	
13 semaines			
Normaux	20±1	58±4	
Hypercholestérolémiques contrô	oles 20±1	56±5	
Hypercholestérolémiques bFGF	20±1	56±5	
26 semaines			
Normaux	21±1	59±3	
Hypercholestérolémiques contró	iles 22±1	36±7	
Hypercholestérolémiques bFGF	17±1*	47±9	

* : p<0,05 entre les animaux normaux et les animaux hypercholestérolémiques bFGF.

A

13 semaines



B





Acétylcholine (log M)

_Hypercholestérolémiques bFGF

A

13 semaines

26 semaines

B









Hypercholestérolémiques bFGF

139

Fig. 3


III.3- Evaluation des effets du bFGF sur l'expression du facteur tissulaire

Article n°5 : Corseaux D, Meurice T, Six I, Rugeri L, Ezekowitz MD, Rouvier P, Bauters C, Jude B. Basic fibroblast growth factor increases tissue factor expression in circulating monocytes in vascular wall.
Soumis.

Les facteurs de croissance, dont le bFGF, permettent l'activation de nombreux gènes ce qui peut entrainer des effets indésirables. Le FT joue un rôle important dans la thrombogénèse et l'angiogénèse. Compte tenu du caractère prothrombotique du FT et de la possibilité de contrôle du gène du FT par les facteurs de croissance, nous avons étudié l'expression du FT dans un modèle d'athérosclérose après administration de bFGF. Nous avons évalué l'expression de FT au niveau des monocytes circulants et au niveau du mur vasculaire chez des lapins normaux et hypercholestérolémiques traités par bFGF.

Basic Fibroblast Growth Factor Increases Tissue Factor Expression in Circulating Monocytes and in Vascular Wall

Delphine Corseaux, PhD, Thibaud Meurice, MD, Isabelle Six, Lucia Rugeri, MD, Michael D Ezekowitz, MD, PhD, Philippe Rouvier, MD, Christophe Bauters, MD, Brigitte Jude, MD.

Running title: bFGF and Tissue Factor Upregulation

From the Laboratoire d'Hématologie, Service de Cardiologie et Hémodynamique, Service Commun d'Imagerie Interventionnelle, Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques C, Centre Hospitalier Régional Universitaire and Faculté de Médecine, Lille, France, and Section of Cardiovascular Medicine, Yale University, New Haven, CT, USA.

Correspondence to: Brigitte Jude, MD Laboratoire d'Hématologie, Hôpital Cardiologique Boulevard du Professeur J Leclercq 59037 Lille cedex - France Telephone (+33) 3 20 44 59 38 Fax number (+33) 3 20 44 69 89 Email b-jude@chru-lille.fr

ABSTRACT

Background-Basic fibroblast growth factor (bFGF) promotes vascular repair and angiogenesis and can induce *in vitro* tissue factor (TF), a potent agent initiating thrombogenesis which probably plays a role in angiogenesis. We investigated whether bFGF administration induced TF expression by monocytes and vascular cells.

Methods and Results-We studied TF expression in normally fed (n=16) and cholesterol fed (2% for 6 weeks, n=16) rabbits. Animals were then randomized to receive intravenous bFGF (2.5 μ g twice weekly for 3 weeks) or saline injections. TF expression was evaluated in mononuclear cells from arterial blood, and in aortic sections by an immunohistochemical assay using a monoclonal anti-rabbit TF antibody (AP-1). Monocyte TF expression was increased by bFGF administration in both normal and hypercholesterolemic rabbits (129 ± 45 versus 19 ± 3 mU TF/1000 monocytes, P<0.05 and 31 ± 12 versus 7 ± 1 mU TF/1000 monocytes, P<0.05 respectively), and was further increased by stimulation of monocytes by endotoxin *in vitro*. TF expression was lower in hypercholesterolemic rabbits than in normal rabbits. In the media of the vascular wall, bFGF induced strong TF expression in normal rabbits and only weak TF expression in hypercholesterolemic ones.

Conclusions-This study demonstrates that systemic administration of bFGF induces an impressive increase of TF expression in circulating monocytes and in the vascular wall in normal and to a lower extent in hypercholesterolemic rabbits. The significance of this observation in terms of inducing thrombosis *in vivo* needs clarification.

CONDENSED ABSTRACT

Basic fibroblast growth factor (bFGF) promotes vascular repair and angiogenesis and can induce Tissue factor (TF) expression *in vitro*. We investigated the effect of bFGF administration on the ability of monocytes and vascular cells to produce TF in normally fed and cholesterol fed (2% for 6 weeks) rabbits, which were randomized to receive intravenous bFGF (2.5 μ g) or saline injections. The results demonstrate that bFGF administration induces an increase of TF expression both in monocytes and in the vascular wall. However, the effect of bFGF was stronger in normally fed rabbits than in cholesterol fed rabbits.

Key words: tissue factor, bFGF, monocytes, vascular wall, animal model

INTRODUCTION

Growth factors induce the proliferation and migration of endothelial cells and play a role in angiogenesis and in the restoration of endothelial integrity after trauma.¹

Of particular interest, basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) can stimulate proliferation, morphologic changes and migration of vascular smooth muscle cells (SMC) and vascular endothelial cells in vitro; in vivo bFGF has been shown to promote reendothelialization with functional endothelium after balloon injury or induced-atherosclerosis.²⁻⁵ While these findings are advantageous, numerous genes can be activated by growth factors including bFGF which may produced undesired effects. For instance, tissue factor (TF) plays an important role in both thrombogenesis⁶ and angiogenesis.⁷⁻⁹ The regulation of the TF gene is controlled by several transcription factors activated by inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF α), oxidized low density lipoproteins (oxLDL) and endotoxin.¹⁰⁻¹¹ In vitro, growth factors such as PDGF, FGF, TGF β or EGF can induce TF expression in fibroblasts and SMC.¹²⁻¹⁵ The induction of TF expression is mediated by the interaction of transcriptional factor Sp1 and Egr-1 (Early Growth Response Gene 1) with their corresponding binding sites that are present in the TF promoter region.¹⁶ It is possible that the induction of TF could spur intravascular thrombosis.

Therefore, the aim of this study was to investigate whether bFGF administration upregulates TF expression in the vasculature. We evaluated TF expression in monocytes and in the vascular wall in normal and in hyperchole terolemic rabbits treated with bFGF.

METHODS

Study protocol

A total of 32 male New Zealand White rabbits (3-3.5 kg, Charles River France) were studied. Sixteen animals were fed a standard rabbit diet and were randomized to a 3 week treatment with either bFGF (bFGF group, n=8) or placebo (control group, n=8). Plasma cholesterol levels were 32 ± 2 mg/dL. Sixteen other rabbits were placed on a 200 g/day rabbit chow diet containing 2% cholesterol for 6 weeks; plasma cholesterol increased to 1950 \pm 354 mg/dL (p<0.0001). Animals were then transferred to a standard rabbit diet and were randomized to a 3 week treatment with either bFGF (hypercholesterolemic bFGF group, n=8) or placebo (hypercholesterolemic control group, n=8). At the end of the 3-week treatment period, plasma cholesterol had decreased to 908 \pm 183 mg/dL (hypercholesterolemic bFGF group) and to 1053 ± 122 mg/dL (hypercholesterolemic control group).

In the normocholesterolemic and in the hypercholesterolemic rabbits assigned to bFGF treatment, human recombinant bFGF boluses (2.5 μ g bFGF in 1 mL 0.5% albumin per injection, Sigma) were administrated twice weekly intravenously during a 3 week period. The rabbits assigned to placebo treatment received vehicle injections of albumin twice weekly.

Blood was obtained 3 days after the last injection of bFGF or placebo. All animals were then sacrificed for histological studies. All experiments were conducted in compliance with the position of the American Physiological Society on research animal use.

Blood samples

Blood was sampled under sterile conditions from the ear artery, 5 mL collected in lithium heparin (143 USP units) for mononuclear cell isolation, 2 mL collected in sodium citrate (1:10, 3.8 %) for coagulation and lipid analysis and 1 mL collected in EDTA for blood cell counts. Samples collected on sodium citrate were centrifuged (1500g, 15 min., +4°C) and separated. The resulting plasma was frozen (-80°C) for further analysis.

Samples collected on EDTA were used for hematological analyses using a Coulter MAXM (Coulter, USA). The total white blood cell counts were verified manually. Peripheral blood smears for differential white cell counts were stained with May Grünwald Giemsa. Each count was performed by 3 investigators, who were blinded to the treatment allocation.

Isolation of mononuclear cells and cell culture conditions

The mononuclear cells were isolated by gradient centrifugation (MSL, d=1.077 \pm 0.001, Eurobio, USA), washed twice and then resuspended in RPMI 1640 (Gibco, USA) (3.10⁶ cells/mL). Cell viability was > 98% as assessed by the trypan blue test.

All reagents, test tubes and culture supplies used were free of endotoxin, as determined by the chromogenic limulus amoebocyte lysate LAL assay. The sensitivity of this assay was 0.025 endotoxin unit (EU)/mL.

Aliquots of cell preparations (3.10⁶ cells/mL) suspended in RPMI 1640 without fetal calf serum were cultured for 16 hours at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere, without or with stimulation by endotoxin (5000 EU/mL, *Escherichia coli* 055:B5, Sigma, USA); these are referred to as unstimulated and stimulated cells respectively. At the end of the incubation period, cells were resuspended and frozen at -80°C.

Tissue factor activity assay

The frozen cells were lysed by addition of 0.05 M Tris/HCl. 0.1 M NaCl. 0.1% Triton X100. 0.1% BSA (60 μ l/mL) for 30 minutes at 37°C associated with serial vortex mixing. TF activity was determinated by a modified amidolytic assay derived from the method of Carson.¹⁷ Briefly, lysed cell suspensions (50 μ l) were incubated at 37°C in a microtiter plate (2 minutes), mixed with CaCl₂ 0.25 M (50 μ l) (3 minutes incubation), and prothrombin concentrate complex (Laboratoire de Fractionnement et des Biotechnologies, France) as a source of factor VII (50 μ l, 3 UI/mL). After addition of 50 μ l of the chromogenic substrate S2765 (Biogenic, Sweden), the change in optical density at 410 nm was quantified with a microplate reader and converted to units of TF activity from log-log plots of serial dilutions of a rabbit brain thromboplastin (CI+, Stago, France). Arbitrarily, 1 mL of thromboplastin was assigned a value of 1000 U/mL of TF. Results were expressed as mU/1000 monocytes.

The procoagulant activity (PCA) was characterized as TF by a neutralization procedure using mouse monoclonal antibody anti-rabbit-TF (AP-1, gift from Pr. Ezekowitz, Yale University Connecticut): diluted (1/18) antibody (25 μ l) was incubated with diluted TF standard or lysed cell suspensions for 30 minutes at 37°C. Then the mixture was tested for PCA. The percentage neutralization was calculated using the rabbit brain thromboplastin without and with antibody as 0% and 100% respectively.

Additional assays on plasma samples

Prothrombin time was measured by an automated clotting assay using calcified thromboplastin (Biomerieux, France). Fibrinogen levels were measured by the Clauss technique (Biomerieux, France). Factor II, V and VII+X levels were determined by an automated clotting assay (STA, Stago, France) using calcified rabbit thromboplastin and human factor deficient plasma (Stago, France). Briefly, 50 μ l of diluted plasma sample (1/10 except for F V determination 1/100) was incubated with 50 μ l of human factor deficient plasma at 37°C for 4 minutes. The reaction was started with the addition of 100 μ l of calcified rabbit thromboplastin. Coagulation times were then expressed as percentages by comparison to standard curves constructed with serial dilutions of standard rabbit plasma in Owren Koller buffer (1/10 to 1/40 for factor II and factor VII+X, and 1/100 to 1/400 for factor V).

Immunocytochemical staining

Immunocytochemical staining was performed on cytocentrifuged preparations of mononuclear cells using mouse monoclonal anti-rabbit-TF (AP-1), mouse negative control (Dako), and alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase complex (Dako APAAP KIT system, Dako).

Cells were fixed in buffered acetone/acetone/paraformaldehyde 4%. An irrelevant isotype mouse antibody was used as a negative control. Anti-TF labeling was seen as a bright red color in the cytoplasm, with membrane reinforcement in the most positive cells.

Histological studies

Abdominal aorta of all animals was dissected and cleaned by brief immersion in phosphatebuffered saline (PBS), fixed by immersion in 4% paraformaldehyde for 10 minutes and then maintained in 30% sucrose/distilled water for 4 hours at room temperature. Tissues were embedded in OCT (methyl methacrylate) compound, quick-frozen in isopentane and stored at -80° C. Sections (6 µm) of the frozen tissues mounted on glass slides (Superfrost Plus) were immunohistochemically labeled with a murine monoclonal antibody against rabbit TF (AP-1). Briefly, frozen sections were air-dried for 1 hour, blocked with 10% horse serum for 10 minutes at room temperature. TF antibody was diluted at 1/200 in PBS and incubated for 1 hour at 37°C. In parallel, a negative control without primary antibody was performed. Samples were washed 3 times with PBS and incubated with a biotinylated anti-mouse IgG (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories) diluted in PBS for 1 hour at room temperature. Samples were washed 3 times with PBS, incubated with ABC reagent for 1 hour, and colordeveloped for peroxidase using diaminobenzidine (12 µl H₂O₂, 15 mL PBS) for 3 minutes. After washing with water, the samples were counterstained with hematoxylin, dehydrated in graded ethanols and mounted with Eukitt (Pertex, Histolab).

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. Data were analysed using a nonparametric test (Kruskal Wallis) to determine significant differences (p<0.05) in means between groups followed by Mann-Whitney U test to test the significance of differences between groups.

RESULTS

Total white blood cell and monocyte counts

The total white blood cell and monocyte counts are presented in Table I. There was no significant difference in the total white blood cell count among all groups. The monocyte count in the hypercholesterolemic bFGF group was significantly higher than the other groups.

Monocyte TF activity

In all groups, procoagulant activity was detectable in mononuclear cells after 16 hour culture. Neutralization assay with TF antibody confirmed that procoagulant activity was due to TF expression in all cases. The levels of TF activity in stimulated and unstimulated cells in the 4 groups are shown in Figure 1.

- Effect of bFGF administration in normal rabbits

TF activity was higher in the bFGF group than in the control group. This difference was significant in unstimulated cells (129 ± 45 versus 19 ± 3 mU/1000 monocytes, P<0.05) but was not significant in stimulated cells (124 ± 38 versus 50 ± 11 mU/1000 monocytes, P=NS).

- Effect of hypercholesterolemia

TF activity in unstimulated cells was significantly lower in the hypercholesterolemic control group than in the control group (7 \pm 1 versus 19 \pm 3 mU/1000 monocytes, P<0.05). TF activity in stimulated cells was the same in the 2 groups (53 \pm 12 versus 50 \pm 11 mU/1000 monocytes, P=NS).

- Effect of bFGF administration in hypercholesterolemic rabbits

TF activity was higher in the hypercholesterolemic bFGF group than in the hypercholesterolemic control group. This difference was significant in unstimulated cells (31 \pm 12 versus 7 \pm 1 mU TF/1000 monocytes, P<0.005) and in stimulated cells (185 \pm 26 versus 53 \pm 12 mU TF/1000 monocytes, P<0.005). However, this increase was not as high as it was in the normocholesterolemic rabbits treated with bFGF (31 \pm 12 versus 129 \pm 45 mU TF/1000 monocytes, P<0.05).

Monocyte TF immunostaining

The results of immunocytochemical TF staining with anti-TF antibody in monocytes were concordant with the results of the functional TF assay (data not shown).

Histological studies

Abdominal vessels were studied by immunohistochemistry to map the TF distribution in the vessel wall.

TF positivity was found predominantly in the adventitia in all groups. There was no TF expression in the intima and in the media of control rabbits (Figure 2a). In rabbits treated with bFGF, TF was found in the intima and in the media. Endothelial staining was particularly evident (Figure 2b). In hypercholesterolemic control rabbits, minimal amounts of TF were detected in the media but none in the intima (Figure 2c). After bFGF treatment in hypercholesterolemic rabbits, a moderate increase of TF expression was seen in the media but not in the intima (Figure 2d). It is noteworthy that induction of TF expression by bFGF was not as high in cholesterol fed rabbits than in normally fed rabbits (Figure 2d and 2b).

Changes in other parameters

In normal rabbits (Table II), bFGF induced a decrease of the factor VII+X level, and an increase of the fibrinogen level and platelet count. In the hypercholesterolemic groups, however, factor II, V, VII+X levels and platelet counts increased and fibrinogen levels decreased with no further effect of bFGF.

DISCUSSION

This is the first *in vivo* study to investigate the relationship of bFGF and TF expression on circulating monocytes and in the vessel wall. The major finding of this study is the demonstration that the administration of bFGF induced a significant increase in TF response in circulating monocytes and in the vascular wall. However, the effect of bFGF appears different when administrated to normally fed rather than cholesterol fed rabbits.

Effect of bFGF administration in normal rabbits

The induction of TF gene by growth factors has already been demonstrated in fibroblasts and SMC. Our results indicate that bFGF induces TF expression *in vivo* in monocytes and in vascular cells. Four types of FGF receptors have been identified; these are present either in monocytes/macrophages, endothelial cells or in SMC.¹⁸⁻²⁰ The binding of bFGF to its specific receptor triggers a cascade of events leading to signal transduction by ERK, MAPK, Ras and PKC pathways.²¹⁻²² Little is known about the induction mechanisms of TF expression by bFGF. However, a recent study has demonstrated that PDGF induces TF expression in human SMC by a ERK pathway-dependent mechanism and, in part, by Ras and PKC pathway-dependent mechanisms.¹² It is possible that bFGF could act in the same manner on TF expression in circulating monocytes and in cells of the vascular wall.

In bFGF-treated rabbits, stimulation of monocytes by endotoxin *in vitro*, failed to induce a further increase of TF activity. Endotoxin is known to induce TF expression by a PKC pathway-dependent mechanism²³ leading to activator protein 1 (AP-1) and NF κ B

transcription factor activation. Because this pathway is also stimulated by growth factors and serum²⁴, it seems possible that the preliminary effect of bFGF has saturated the endotoxin activation pathway at the second messenger or at the transcription factor levels. Interestingly, Pendurthi et al. have recently demonstrated that bFGF pretreatment of endothelial cells prevents TF expression in response to phorbol myristate acetate.²⁵ Taken together, these results indicate that cellular effects of bFGF are contrasted according to the stimulation context.

Effect of hypercholesterolemia

In hypercholesterolemic rabbits, TF staining was observed in the media (not at all in the intima), indicating that TF induction was present in this group as compared to control. By contrast, in circulating monocytes, TF response was lower than in the control group. This confirms data reported by our group²⁶ and others.²⁷ The reasons for this lower TF activation are unclear. The effects of lipids on monocyte TF response are complex. Monocyte TF response is decreased by LDL and lysophosphatidylcholine²⁸⁻²⁹ but is increased by oxidized LDL and free cholesterol.³⁰⁻³¹ Moreover, hypercholesterolemia induces monocyte adhesion, penetration and transformation into foam cells into the vascular wall.³² Since, we observed that circulating monocytes decreased in hypercholesterolemic rabbits. It seems possible that these monocytes in hypercholesterolemic rabbits are a subset of the total monocyte population with impaired capacity to respond to stimulation.

Effect of bFGF administration in hypercholesterolemic rabbits

In hypercholesterolemic rabbits, bFGF induced an increase of TF expression in circulating monocytes and in the vessel wall. In unstimulated monocytes, bFGF restored TF activity identically in both the hypercholesterolemic and the control groups. However, TF induction in unstimulated monocytes by bFGF remained less important than in normocholesterolemic rabbits. By contrast, in hypercholesterolemic rabbits treated by bFGF, endotoxin induced a strikingly TF response, indicating a "priming" effect of bFGF. In the vascular wall of hypercholesterolemic rabbits, bFGF induced TF expression only in the media, no TF detection was observed in the intima. The effect of bFGF was less important than in the normocholesterolemic rabbits.

The different effect of bFGF in hypercholesterolemic and control rabbits are unclear. Hypercholesterolemia may interfere with the relationship between bFGF and its membrane receptors. Physiologically, bFGF is stored in the extracellular matrix³³ and is associated to cell surface membranes³⁴ by heparan sulfate proteoglycan (HSPG) binding. Moreover, HSPG are necessary for the bFGF binding to its receptors in order to exert both autocrine and paracrine effects.³⁵ But, atherosclerosis involves the decrease of HSPG.³⁶ Thus, hypercholesterolemia could decrease the affinity and/or the binding of bFGF to its receptors. On the other hand, hypercholesterolemia may modulate the expression of the different bFGF receptors^{20,37}. It is noteworthy that, in this model, hypercholesterolemia did not impair the monocyte TF response to endotoxin.

Possible consequences of induction of TF by bFGF

TF is known as a potent activator of blood coagulation. The exposure of TF to blood and FVII and its activation could lead to thrombosis mediated by bFGF treatment, shown particularly in the normal animals. While this is theoritically possible, we found no evidence of coagulation factor consumption or a decrease platelet count 3 days after the last bFGF injection.

TF seems to be an important angiogenesis factor. TF regulates angiogenic properties of tumor cells in mice.⁷ TF stimulated tumor cell growth and vascularization by increasing angiogenic factor (VEGF) and decreasing anti-angiogenic factor (thrombospondin) productions.⁷ TF is involved in embryogenesis⁸⁻⁹ and promotes metastasis of melanoma cells.³⁸ The cytoplasmic domain of TF is thought necessary for these effects by a mechanism of signal transduction. It was recently demonstrated that the TF-FVIIa complex can also induce VEGF production.³⁹ TF could, in association with bFGF, play an important role in the transduction of a signal that promotes cell proliferation and facilitates reendothelialization. A cholesterol rich diet in rabbits induces partial endothelium denudation and loss of functional properties. In our model, it was previously demonstrated that bFGF induces rapid reendothelialization, restores endothelial functions and plays role in angiogenesis.⁵ Little is known on the interaction of bFGF and TF in these processes. Importantly, it has been demonstrated in an other model of vascular balloon injury that vascular cells can release both endogenous bFGF⁴⁰ and TF.⁴¹

Study limitations

The extrapolation of data from any animal model to humans requires caution. A diet supplemented with 2% cholesterol results in very high cholesterol levels and is associated with a rapid progression of the vascular lesions. This hypercholesterolemic rabbit model has been demonstrated to have features in common with humans and its reproductibility has been demonstrated in several previous studies.^{5,42} This model is useful to understand the processes occurring in humans and to anticipate the effects of bFGF on human blood cells and arteries.

Administration of angiogenic growth factors is an interesting new therapeutic approach for ischemic heart disease. Basic FGF administration improves collateral vessel formation in various models of ischemia.⁴³⁻⁴⁴ Our results indicate that this particular dose regimen of bFGF used in this study induces TF expression in circulating monocytes and in the vascular wall in normal and in hypercholesterolemic rabbits. TF can increase the thrombogenicity of the vascular wall, and this effect can have important clinical implications. However, no evidence of consumption coagulopathy was found. On the other hand, TF is also an important angiogenic factor, and can supplement to the beneficial effects of angiogenic growth factor therapy. Further studies are necessary to understand the role of bFGF induced TF expression and the therapeutic effect of bFGF.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Direction de la Recherche et des Etudes Doctorales (EA 1044), the Centre Hospitalier et Universitaire de Lille (grant 96/35/9506), and Région Nord-Pas de Calais France. Delphine Corseaux was a recipient of a 2-year doctoral grant from CHRU Lille and Région Nord Pas de Calais.

We thank the Laboratory of Biochemistry of Pr. Formstecher (CHRU de Lille) for assistance with measurement of plasma cholesterol and triglycerides, and the Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies for expert performance of LAL assays.

REFERENCES

- Asahara T, Bauters C, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation*. 1992;92:II365-II371.
- Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L. Fibroblast growth factor: structural and biological properties. J Cell Physiol. 1987;5:15-26.
- Klagsbrun M, Edelman ER. Biological and biochemical properties of fibroblast growth factors: implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Arteriosclerosis*. 1989;9:269-278.
- Meurice T, Bauters C, Auffray JL, Vallet B, Hamon M, Valero F, Van Belle E, Lablanche JM, Bertrand ME. Basic fibroblast growth factor restores endothelium-dependent responses after balloon injury of rabbit arteries. *Circulation*. 1996;93:18-22.
- Meurice T, Bauters C, Vallet B, Corseaux D, Van Belle E, Hamon M, Dupuis B, Lablanche JM, Bertrand ME. BFGF restores endothelium-dependent responses of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. *Am J Physiol*. 1997;272:H613-H617.
- Speidel CM, Eisenberg PR, Ruf W, Edgington TS, Abendschein DR. Tissue factor mediates prolonged procoagulant activity on the luminal surface of balloon-injured aortas in rabbits. *Circulation*. 1995;92:3323-3330.
- Zhang Y, Deng Y, Luther T, Müller M, Ziegler R, Waldherr R, Stern DM, Nawroth PP. Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. *J Clin Invest*. 1994;94:1320-1327.

- Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Van Vlaenderen I, Demunck H, Hasper M, Breier G, Evrard P, Müller M, Risau W, Edgington T, Collen D. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature*. 1996;383:73-75.
- 9. Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM, Stanton JJ, Broze GJ. Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. *Blood.* 1996;88:1583-1587.
- 10.Edgington TS, Mackman N, Brand K, Ruf W. The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thromb Haemost*. 1991;66:67-69.
- 11.Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Fiers W, Cotran RS, Gimbrone MA Jr. Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin-1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83:4533-4537.
- 12.Xuereb JM, Sie P, Boneu B, Constans J. Up-regulation of tissue factor expression by platelet-derived growth factor in human vascular smooth muscle cells in culture. *Thromb Haemost.* 1997;78:1520-1526.
- 13.Taubman MB, Marmur JD, Rosenfield CL, Guha A, Nichtberger S, Nemerson Y. Agonistmediated tissue factor expression in cultured vascular smooth muscle cells. Role of Ca²⁺ mobilization and protein kinase C activation. *J Clin Invest.* 1993;91:547-552.
- 14.Hartzell S, Ryder K, Lanahan A, Lau LF, Nathans D. A growth factor-responsive gene of murine BALB/c 3T3 cells encodes a protein homologous to human tissue factor. *Mol cell Biol.* 1989;9:2567-2573.
- 15.Ranganathan G, Blatti SP, Subramaniam M, Fass DN, Maihle NJ, Getz MJ. Cloning of murine tissue factor and regulation of gene expression by transforming growth factor type 1. J Biol Chem. 1991;266:496-501.

16.Mackman N. Regulation of the tissue factor gene. FASEB J. 1995;9:883-889.

- 17.Carson SD. Continuous chromogenic tissue factor assay: comparison to clot-based assays and sensitivity established using pure tissue factor. *Thromb Res.* 1987;47:379-387.
- 18.Berardi AC, Wang A, Abraham J, Scadden DT. Basic fibroblast growth factor mediates its effect on committed myeloid progenitors by direct action and has no effect on hematopoietic stem cells. *Blood*. 1995;86:2123-2129.
- 19.Olwin BB, Hauschka SD. Cell type and tissue distribution of the fibroblast growth factor receptor. *J Cell Biochem*. 1989;39:443-454.
- 20.Hughes SE, Crossman D, Hall PA. Expression of basic and acidic fibroblast growth factors and their receptor in normal and atherosclerotic human arteries. *Cardiovasc Res.* 1993;27:1214-1219.
- 21.Friesel RE, Maciag T. Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction. *FASEB J.* 1995;9:919-925.
- 22.Kent KC, Mii S, Harrington EO, Chang JD, Mallette S, Ware JA. Requirement for protein kinase C activation in basic fibroblast growth factor-induced human endothelial cell proliferation. *Circ Res.* 1995;77:231-238.
- 23.Ternisien C, Ramani M, Ollivier V, Khechai F, Vu T, Hakim J, de Prost D. Endotoxininduced tissue factor in human monocytes is dependent upon protein kinase C activation. *Thromb Haemost*. 1993;70:800-806.
- 24.Felts SS, Stoflet ES, Eggers CT, Getz MJ. Tissue factor gene transcription in serumstimulated fibroblasts is mediated by recruitment of c-Fos into specific AP-1 DNA-binding complexes. *Biochemistry*. 1995;34:12355-12362.

- 25.Pendurthi UR, Williams JT, MohanRao LV. Acidic and basic fibroblast growth factors suppress transcriptional activation of tissue factor and other inflammatory genes in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:940-946.
- 26.Corseaux D, Le Tourneau T, Six I, Ezekowitz MD, McFadden EP, Meurice T, Asseman P, Bauters C, Jude B. Enhanced monocyte tissue factor response after experimental balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit. Inhibition with dietary L-arginine. *Circulation.* 1998;98:1776-1782.
- 27.Semeraro N, Montemurro P, Giordano D, Pasquetto N, Curci E, Triggiani R, Colucci M. Increased macrophage procoagulant activity but normal endothelial thrombomodulin in rabbits fed an atherogenic diet. *Atherosclerosis*. 1990;20:54-61.
- 28.Schwartz BS, Levy GA, Curtiss LK, Fair DS, Edgington TS. Plasma lipoprotein induction and suppression of the generation of cellular procoagulant activity in vitro. Two procoagulant activities are produced by peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Invest*. 1981;67:1650-1658.
- 29.Engelmann B, Zieseniss S, Brand K, Page S, Lentschat A, Ulmer AJ, Gerlach E. Tissue factor expression of human monocytes is suppressed by lysophosphatidylcholine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:47-53.
- 30.Brand K, Banka CL, Mackman N, Terkeltaub RA, Fan ST, Curtiss LK. Oxidized LDL enhances lipopolysaccharide-induced tissue factor expression in human adherent monocytes. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:790-797.
- 31.Lesnik P, Rouis M, Skarlatos S, Fruth HS, Chapman MJ. Uptake of exogenous free cholesterol induces upregulation of tissue factor expression in human monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:10370-10374.

- 32.Ross R. The pathogenesis of atheroclerosis: a perspective for the 1990s. Nature. 1993;362:801-809.
- 33.Vlodavsky I, Folkman J, Sullivan R, Fridman R, Ishai-Michaeli R, Sasse J, Klagsbrun M. Endothelial cell derived basic fibroblast growth factor: synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84:2292-2296.
- 34.Bashkin P, Neufeld G, Gitay-Goren H, Vlodavsky I. Release of cell surface associated basic fibroblast growth factor by glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase C. J Cell Physiol. 1992;151:126-137.
- 35.Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell*. 1991;64:841-848.
- 36.Volker W, Schmidt A, Oortmann W, Broszey T, Faber V, Buddecke E. Mapping of proteoglycans in atherosclerotic lesions. *Eur Heart J.* 1990;11:29-40.
- 37.Brogi E, Winkles JA, Underwood R, Clinton SK, Alberts GF, Libby P. Distinct patterns of expression of fibroblast growth factors and their receptors in human atheroma and nonatherosclerotic arteries. Association of acidic FGF with plaque microvessels and macrophages. J Clin Invest. 1993;92:2408-2418.
- 38.Bromberg ME, Konigsberg WH, Madison JF, Pawashe A, Garen A. Tissue factor promotes melanoma metastasis by a pathway independent of blood coagulation. *Proc Natl* Acad Sci USA. 1995;92:8205-8209.
- 39.Ollivier V, Bentolila S, Chabbat J, Hakim J, de Prost D. Tissue-factor dependent VEGF production by human fibroblasts in response to activated factor VII. *Blood*. 1998;91:2698-2703.

- 40.Villaschi S., Nicosia RF. Angiogenic role of endogenous basic fibroblast growth factor released by rat aorta after injury. *Am J Pathol*. 1993;143:181-190.
- 41.Marmur JD, Rossikhina M, Guha A, Fyfe B, Friedrich V, Mendlowitz M, Nemerson Y, Taubman MB. Tissue factor is rapidly induced in arterial smooth muscle after balloon injury. J Clin Invest. 1993;91:2253-2259.
- 42.Jeremy RW, McCarron H, Sullivan D. Effects of dietary L-arginine on atherosclerosis and endothelium-dependent vasodilatation in the hypercholesterolemic rabbit. *Circulation*. 1996;94:498-506.
- 43.Baffour R, Berman J, Garb JL, Ree SW, Kaufman J, Friedmann P. Enhanced angiogenesis and growth of collaterals by in vivo administration of recombinant basic fibroblast growth factor in a rabbit model of acute lower limb ischemia: dose response effect of basic fibroblast growth factor. *J Vasc Surg.* 1992;16:181-191.
- 44.Lazarous DF, Scheinowitz M, Shou M, Hodge E, Rajanayagam S, Hunsberger S, Robinson WG Jr, Stiber JA, Correa R, Epstein SE, Unger EF. Effects of chronic systemic administration of basic fibroblast growth factor on collateral development in the canine heart. *Circulation*. 1995;91:145-153.

Fig 1. Monocyte TF expression in control, in bFGF, in hypercholesterolemic control and in hypercholesterolemic bFGF rabbits. Open bars represent mononuclear cells cultured without endotoxin, solid bars mononuclear cells cultures with endotoxin (5000 EU/mL). Results are expressed as mU of TF/ 1000 monocytes. * P<0.05 versus control group; **§** P<0.005 versus hypercholesterolemic control group; **§** P<0.05 versus bFGF group.

Fig 2. Photomicrographs show localization of tissue factor (TF) in control (a), in bFGF (b), in hypercholesterolemic control (c) and in hypercholesterolemic bFGF (d) rabbit abdominal artery. TF was localized in the adventitia (A) of all groups, in the media (M) and intima (I) of bFGF rabbits (b) and in the media of hypercholesterolemic control and hypercholesterolemic bFGF rabbits (d). Note that, in normocholesterolemic bFGF rabbits, immunohistochemical detection of TF is more intensive than in hypercholesterolemic bFGF rabbits. Magnification, x32.

TABLE I. Total white blood cell and monocyte counts in control, in bFGF, in hypercholesterolemic control and in hypercholesterolemic bFGF rabbits.

	Total white blood cells 10 ⁹ /L	Monocytes 10 ⁹ /L	
control group, n=8	8.4±0.5	0.37±0.07	
bFGF group, n=8	10.5±2.7	0.29±0.12	
Hypercholesterolemic control group, n=8	9.2±0.8	0.27±0.07	
Hypercholesterolemic bFGF group, n=8	10.4±1.1	0.59±0.12*§	

Values are means \pm SEM.

* P<0.05 versus hypercholesterolemic control group, § P<0.05 versus bFGF group.

	Factor II %	Factor V %	Factor VII+X %	Fibrinogen g/L	Platelets 10 ⁹ /liter
control group, n=8	97±3	88±3	101±4	3.4±0.2	302 ± 26
bFGF group, n=8	91±2	117±11	88±3\$	5.1±0.6	420 ± 46\$
Hypercholesterolemic control group, n=8	144±9*	121±10*	142±7*	2.7±0.2\$	550 ± 61 \$
Hypercholesterolemic bFGF group, n=8	129±11 \$§	136±13\$	143±12 \$§	2.4±0.3\$§	576 ± 80\$

TABLE II. Factor II, V, VII+X, fibrinogen levels and platelet count in control, in bFGF, in hypercholesterolemic control and in hypercholesterolemic bFGF rabbits.

Values are means \pm SEM.

* P≤0.002 versus control group; \$ P<0.05 versus control group; § P<0.01 versus bFGF group.





Discussion générale

La fonction de l'endothélium vasculaire a longtemps été considérée comme se limitant à celle d'une barrière semi-perméable inerte et uniforme, mais l'évolution des connaissances a donné à l'endothélium un statut de tissu fonctionnel. Le rôle fondamental de la cellule endothéliale a été démontré dans deux pathologies vasculaires majeures que sont la resténose après angioplastie et l'athérosclérose. Les résultats des expériences visant à moduler la réponse de la cellule endothéliale dans ces deux situations, ont apporté des arguments supplémentaires pour un rôle moteur de cette cellule dans le processus de réparation vasculaire.

Dans la resténose après angioplastie, la régénération endothéliale commence dès les premières heures suivant la dénudation et cesse six à dix semaines plus tard selon les modèles et les espèces animales (Fishman 1975, Stemerman 1977). Elle s'effectue par prolifération et migration des cellules endothéliales à partir des zones bordant la lésion initiale et à partir des orifices des branches collatérales. Même si elle peut être complète, la régénération endothéliale est très souvent partielle. L'endothélium régénéré présente des caractéristiques morphologiques différentes de l'endothélium normal, perte de l'alignement dans le sens du flux et aspect polygonal des contours (Haudenschild 1979, Reidy 1983).

Les modifications structurales décrites ci-dessus sont associées à des modifications fonctionnelles. En effet, l'endothélium régénéré est dysfonctionnant, perdant ses propriétés de régulation de la vasoréactivité. Sur le plan expérimental, cela se traduit par une altération très sévère des réponses vasomotrices endothélium-dépendantes à des agonistes vasodilatateurs tel que l'acétylcholine (Weidinger 1990). Cette dysfonction endothéliale serait due à une diminution de production ou de relargage du NO, favorisant le spasme, l'adhésion leucocytaire, l'agrégation plaquettaire et la croissance des CMLs (Palmer 1987).

La régénération endothéliale (sur le plan anatomique et fonctionnel) joue vraisemblablement un rôle régulateur de la quantité d'hyperplasie néo-intimale qui va se développer en réponse au traumatisme artériel. En effet, l'épaisseur de la néo-intima après dénudation par ballonnet est étroitement dépendante de la présence d'un endothélium régénéré. Il a ainsi été démontré que les zones non réendothélialisées étaient celles où l'épaississement intimal était le plus important. En effet, l'endothélium, en plus de son rôle fondamental dans la régulation de la vasomotricité, de la perméabilité, de la thrombogénicité et de l'adhésion leucocytaire, peut inhiber la croissance des CMLs, par la production de médiateurs tels que le NO.

Les médiateurs de la voie du NO ont un effet bénéfique sur la fonction des cellules endothéliales régénérées (Hamon 1994). Nous avons démontré que cet effet bénéfique sur la fonction endothéliale n'est pas accompagné d'une augmentation de la réendothélialisation par la L-arginine, précurseur du NO, ou d'une inhibition de la réendothélialisation par le L-NAME, inhibiteur des NO synthétases. Il reste à réaliser d'autres études afin de déterminer de quelle façon le NO agit sur l'amélioration de la fonction endothéliale.

Dans l'athérosclérose, on observe également une altération de la fonction endothéliale malgré la persistance d'un endothélium intact. Les monocytes et les macrophages sont impliqués dans la progression de l'athérosclérose (Ross 1993). Les monocytes peuvent exprimer le FT qui est présent dans les plaques d'athérome (Wilcox 1989, Annex 1995). De

172

plus, le FT est le contributeur majeur à la thrombogénicité des plaques rompues (Fuster 1996). Le NO ayant des propriétés antiathérogènes et antithrombotiques (Cooke 1992), nous nous sommes intéressés aux effets de la L-arginine, le précurseur du NO, dans un modèle d'athérosclérose. Nous avons démontré que la rupture de plaque induite par l'angioplastie est associée à une augmentation marquée de l'expression de FT monocytaire, et que cette expression est réduite après administration de L-arginine. Le mécanisme de l'effet inhibiteur de la L-arginine sur l'expression de FT n'est pas connu avec certitude. Cependant, cette inhibition pourrait être reliée à l'effet antiathérogène de la L-arginine; il a été demontré que l'hypercholestérolémie augmente la génération d'anion superoxyde dans les cellules endothéliales ce qui a pour effet d'aggraver l'athérosclérose (Minor 1990, Ohara 1993), et que ce processus est limité après administration de L-arginine (Cooke 1992, Wang 1994). De plus, le NO pourrait limiter l'activité transcriptionnelle de la protéine NF-κB ou séquestrer l'anion superoxyde activant NF-κB.

Ces résultats suggèrent donc que l'activité antithrombotique du NO pourrait aussi être liée à un effet inhibiteur sur l'expression de FT monocytaire, en plus des effets connus sur les fonctions endothéliales et plaquettaires. D'autres études seront nécessaires afin de mieux connaître le rôle de la L-arginine.

De nombreux travaux ont montré le rôle bénéfique des facteurs de croissance dans la restauration de la fonction endothéliale dans des modèles de circulation collatérale expérimentale (Bauters 1995) ou d'angioplastie par ballonnet (Meurice 1996). Une étude préliminaire a permis de démontrer l'effet bénéfique du bFGF sur la fonction endothéliale dans un modèle d'athérosclérose chez le lapin (Meurice 1997). Etant donné que dans ce modèle la

dysfonction survient en l'absence de désendothélialisation, l'effet bénéfique du bFGF peut difficilement être attribué à un effet purement anatomique et la question d'un effet qualitatif (modification phénotypique de la cellule endothéliale normalisant les réponses endothéliumdépendantes) est clairement posée. Nos travaux ont permis de démontrer que l'administration de bFGF permet de restaurer une fonction endothéliale normale dans les premiers stades de l'athérosclérose (5 semaines à 2% de cholestérol). Après un régime enrichi en cholestérol prolongé (10 semaines à 2%), l'administration de bFGF ne permet pas de restaurer la fonction endothéliale. En effet, le régime enrichi en cholestérol administré pendant une durée de 10 semaines induit l'apparition d'une dysfonction endothéliale récepteur - dépendante et indépendante et de ce fait la sévérité de l'altération ne permet pas au bFGF d'améliorer les fonctions endothéliales. Dans ce protocole, l'administration de bFGF permet également de modifier la composition des plaques d'athérome sans modifier leur taille. Le bFGF permet d'obtenir des plaques plus riches en CMLs et appauvries en macrophages. Ceci pourrait être dû à l'effet prolifératif du bFGF sur les CMLs vasculaires et à son effet inhibiteur sur les molécules d'adhésion ce qui a pour effet de limiter l'extravasation des leucocytes au niveau de la paroi vasculaire et donc de limiter le contenu en macrophages.

Nous avons souhaité étudier les éventuels effets délétères du bFGF après administration à long terme. Pour ce faire, nous avons utilisé un régime enrichi en cholestérol moins important afin d'augmenter les durées d'administration du bFGF sans toutefois aggraver le pronostic vital des animaux et afin d'obtenir un modèle à progression de l'athérosclérose plus lente, plus proche de la réalité retrouvée chez l'homme. Après 13 semaines de régime enrichi en cholestérol à 0,2%, le bFGF permet d'améliorer la fonction endothéliale, sans
influencer la taille des plaques athéroscléreuses. Après 26 semaines de régime enrichi en cholestérol à 0,2%, le bFGF n'a plus d'effet bénéfique sur la fonction endothéliale pour les mêmes raisons que dans l'étude précédente. A ce temps précis, le bFGF aggrave de façon importante la taille des lésions athéroscléreuses. Cette étude constitue la première démonstration d'un effet délétère du bFGF après administration prolongée dans un modèle d'athérosclérose expérimentale. Une étude immunohistochimique sera nécessaire afin de déterminer la composition des plaques athéroscléreuses ainsi que la répartition des molécules d'adhésion au niveau vasculaire.

Il nous paraît également très intéressant d'orienter notre étude sur un autre facteur de croissance spécifique des cellules endothéliales qui est le VEGF. Une étude de la réactivité vasculaire sera réalisée chez des animaux ayant reçu un régime enrichi en cholestérol et un traitement par le VEGF pendant des durées de 13 semaines et 26 semaines. L'utilisation de ce facteur de croissance chez le lapin pose quelques problèmes quant à la dose à utiliser. Pour y remédier, nous avons choisi une dose équimolaire par rapport au bFGF. Une analyse histologique sera également réalisée afin de déterminer la taille des lésions athéroscléreuses et leur composition cellulaire. Une étude de la répartition des molécules d'adhésion au niveau du vaisseau sera effectuée. En effet, le VEGF possède des propriétés de régulations négatives des molécules d'adhésion moins importantes que le bFGF. En outre, le VEGF par son effet cible sur les cellules endothéliales nous permettra peut être d'abolir les effets délétères obtenus avec l'utilisation du bFGF, tout en améliorant les fonctions endothéliales et en améliorant la composition des plaques d'athérome. De plus, l'utilisation du VEGF nous permettra d'émettre ou de confirmer quelques hypothèses quant au mécanisme d'action du bFGF.

175

Compte tenu du caractère prothrombotique du FT, nous avons également étudié l'expression du FT dans un modèle d'athérosclérose après administration de bFGF. Notre étude a permis de démontrer que l'administration de bFGF induit une augmentation de l'expression de FT au niveau des monocytes circulants et au niveau du mur vasculaire chez les effet normocholestérolémiques et à plus faible chez les animaux animaux hypercholestérolémiques. Le bFGF est en voie d'utilisation chez les patients présentant une ischémie afin de développer une circulation collatérale de suppléance. L'induction de l'expression du FT, et par conséquent l'augmentation des risques thrombotiques, après administration de bFGF, peuvent avoir un impact clinique important. Cependant le FT, par ses effets angiogéniques importants, pourrait augmenter les effets bénéfiques induits par les thérapies utilisant les facteurs de croissance.

Conclusion

De nombreuses études expérimentales sont axées sur la recherche des mécanismes impliqués dans des pathologies cardio vasculaires telles que la resténose et l'athérosclérose. En effet, les maladies cardio vasculaires sont la première cause de mortalité dans les pays industrialisés. Depuis quelques années, de nombreuses substances ont prouvé leur rôle bénéfique dans les modèles animaux reproduisant la resténose ou l'athérosclérose mais aucun médicament n'a pu prouvé son efficacité dans les pathologies humaines.

Le NO impliqué dans de nombreux mécanismes biologiques, a été étudié dans les modèles de resténose après dénudation par ballonnet. L'une des premières approches testée a été de compenser les anomalies endothéliales en augmentant la quantité de NO disponible au niveau de la paroi artérielle. L'administration de L-arginine (le précurseur métabolique du NO), de donneurs de NO ou l'inhalation de NO ont été associées à une réduction de l'hyperplasie néo-intimale postangioplastie et à une amélioration de la relaxation endothélium-dépendante des segments dilatés (Schwarzacher 1997, Lee 1996, De Meyer 1995). Nous avons démontré que les améliorations fonctionnelles médiées par le NO ne sont pas accompagnées d'améliorations anatomiques. Par contre dans les modèles d'athérosclérose, le NO possède un effet inhibiteur sur l'expression de FT. A ce jour, le mécanisme d'action de ce médiateur n'est pas connu. Il possède néanmoins un effet bénéfique dans ces pathologies très graves. Il convient donc de déterminer les mécanismes impliqués avant d'utiliser le NO en thérapie.

De nombreuses études expérimentales in vitro et in vivo, ainsi que des analyses de tissus cardio-vasculaires humains suggèrent un rôle important des facteurs de croissance dans la réponse du système cardio vasculaire à différentes "agressions" (traumatisme mécanique, ischémie, hypoxie) et dans la genèse et/ou l'entretien des mécanismes d'adaptation à ces états pathologiques (resténose après angioplastie, développement d'une circulation collatérale de suppléance). La découverte de l'importance des facteurs de croissance vasculaire et la possibilité de production "industrielle" de ces protéines régulatrices ont entraîné le développement d'un domaine de recherche visant à utiliser ces facteurs de croissance en tant qu'outils thérapeutiques. La première application thérapeutique à être envisagée a été le développement d'une circulation collatérale de suppléance en cas d'ischémie myocardique ou périphérique. L'utilisation de facteurs de croissance dans le cadre de la resténose et/ou de l'athérosclérose est aussi à l'étude. Jusqu'à présent, une possible modulation dans le système cardio vasculaire a surtout été envisagée en terme d'inhibition de la prolifération musculaire lisse dans le cadre de la resténose ou de l'athérosclérose. Il devient maintenant possible d'imaginer favoriser à titre thérapeutique la croissance des cellules endothéliales. Ces travaux ne sont plus uniquement du domaine de l'expérimental. Une étude clinique visant à développer la circulation collatérale par transfert du gène du VEGF dans la paroi artérielle a débuté aux Etats-Unis en décembre 1994 (Isner 1995). Les résultats obtenus chez les premiers patients inclus dans cette étude ont été rapportés récemment (Isner 1996). Les prochaines années verront sans doute se développer ce type de recherche. Nos études démontrent l'intérêt d'utiliser ces facteurs de croissance dans ces pathologies mais obligent également à la prudence. Le point primordial sera surtout la mise au point de traitements sélectifs qui pourront favoriser la croissance du système vasculaire là où elle est souhaitable (membre ou myocarde ischémiques) et non là où elle est néfaste (rétinopathie diabétique, tumeur). Il faut en effet savoir, par exemple, que la néovascularisation d'une tumeur est l'un des déterminants les plus importants de son potentiel métastatique et il est très instructif de remarquer que l'engouement pour les drogues anti-angiogenèse en cancérologie est au moins aussi élevé que celui pour les drogues pro-angiogenèse en cardiologie.

Références bibliographiques

Abraham JA, Mergia A, Whang JL, Tumolo A, Friedman J, Hjerrild KA, Gospodarowick D, Fiddes JL. Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. Science 1986;233:545-548.

Adams MR, Jessup W, Hailstones D, Celermajer DS. L-arginine reduces human monocyte adhesion to vascular endothelium and endothelial expression of cell adhesion molecules. Circulation 1997;95:662-668.

Adrie C. Propriétés antiplaquettaires du monoxyde d'azote. Arch. Mal. Cœur 1996;89:1527-1531.

Annex BH, Denning SM, Channon KM, Sketch MH, Stack RS, Morrissey JH, Peters KG. Differential expression of tissue factor protein in directional atherectomy specimens from patients with stable and unstable coronary syndromes. Circulation. 1995;91:619-622.

Asahara T, Bauters C, Pastore C, Kearney M, Rossow S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. Circulation 1995;91:2793-2801. A

Asahara T, Bauters C, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner J. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. Circulation 1995;92 [suppl II]:II-365-II-371. B

Asahara T, Chen D, Tsurumi Y, Kearney M, Rossow S, Passeri J, Symes JF, Isner JM. Accelerated restitution of endothelial integrity and endothelium-dependent function after phVEGF165 gene transfer. Circulation 1996;94:3291-3302.

Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. Blood 1996;87:3336-3343.

Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, Isner JM. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. Circulation 1998;97:1114-1123.

Bauters C, Asahara T, Takeshita S, Zheng LP, Horowitz J, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Physiologic assessment of angiogenesis induced by a single intra-arterial bolus of vascular endothelial growth factor in the rabbit ischemic hindlimb. Am. J. Physiol. 1994;36:H1263-H1271.

Bauters C, Asahara T, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner J. Recovery of disturbed endothelium-dependent flow in the collateral-perfused rabbit ischemic hindlimb after administration of vascular endothelial growth factor. Circulation 1995;91:2802-2809.

Bauters C, Meurice T, Hamon M, McFadden EP, Lablanche JM, Bertrand ME. Mechanisms and prevention of restenosis : from experimental models to clinical practice. Cardiovasc. Res. 1996;31:835-846.

Berkenboom G, Depierreux M, Fontaine J. The influence of atherosclerosis on the mechanical responses of human isolated coronary arteries to substance P, isoprenaline and noradrenaline. Br. J. Pharmacol. 1987;92:113-120.

Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Fiers W, Cotran RS, Gimbrone MA. Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin-1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986;83:4533-4537.

Birnbaum Y, Fishbein MC, Luo H, Nishioka T, Siegel RJ. Regional remodeling of atherosclerotic arteries: a major determinant of clinical manifestations of disease. J. Am. Coll. Cardiol. 1997;30:1149-1164.

Biro S, Yu ZX, Fu YM, Smale G, Sasse J, Sanchez J, Ferrans VJ, Casscells W. Expression and subcellular distribution of basic fibroblast growth factor are regulated during migration of endothelial cells. Circ. Res. 1994;74:485-494.

Blanquet PR. Les signaux des FGF : un mécanisme qui commence à être déchiffré. M/S 1995;12:303-312.

Böger RH, Bode-Böger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Frölich JC. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. Circulation 1997;95:2068-2074.

Bombeli T, Karsan A, Tait JF, Harlan JM. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. Blood. 1997;89:2429-2442.

Bossaler C, Habib GB, Yamamoto H, Williams C, Wells S, Henry PD. Impaired muscarinic endothelium-dependent relaxation and cyclic guanosine 5'-monophosphate formation in atherosclerotic human coronary artery and rabbit aorta. J. Clin. Invest. 1987;79:170-174.

Brogi E, Winkles L, Underwood R, Clinton S, Alberts G, Libby P. Distinct patterns of expression of fibroblast growth factors and their receptors in human atheroma and nonatherosclerotic arteries. Association of acidic FGF with plaque microvessels and macrophages. J. Clin. Invest. 1993;92:2408-2418.

Caldwell PRB, Seegal BC, Hsu KC, Das M, Soffer RL. Angiotensin-converting enzyme: vascular endothelial localization. Science 1976;191:1050-1051.

Capron L, Blaes N, Wautier JL, Chapman J, Cambien F. Actualités de l'athérosclérose. J. Mal. Vasc. 1990; 15:380-389.

Carlos TM, Harlan JM. Leucocyte-endothelial adhesion molecules. Blood 1994;84:2068-2101.

Casscells W. Migration of smooth muscle and endothelial cells. Critical events in restenosis. Circulation 1992;86:723-729.

Casscells W. Growth factor therapies for vascular injury and ischemia. Circulation 1995;91:2699-2702.

Castellot JJ, Wright TC, Karnovsky MJ. Regulation of vascular smooth muscle cell growth by heparin and heparan sulfates. Semin. Thromb. Hemost. 1987;13:489-503.

Chamley-Campbell JH, Campbell GR, Ross R. Phenotype dependent response of cultured aortic smooth muscle to serum mitogens. J. Cell. Biol. 1981;89:379-383.

Chappey O, Wautier MP, Boval B, Wautier JL. Endothelial cells in culture. An experimental model for the study of vascular dysfunctions. Cell. Biol. Toxicol. 1996;12:199-205.

Chen YX, Nakashima Y, Tanaka K, Shiraishi S, Nakagawa K, Sueishi K. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in atherosclerotic intimas of human coronary arteries. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1999;19:131-139.

Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. Lab. Invest. 1983;49:327-333.

Cooke JP, Andon NA, Girerd XJ, Hirsch AT, Creager MA. Arginine restores cholinergic relaxation of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. Circulation 1991;83:1057-1062.

Cooke JP, Singer A, Tsao P, Zera P, Rowan R, Billingham M. Anti-atherogenic effects of Larginine in the hypercholesterolemic rabbit. J. Clin. Invest. 1992;90:1168-1172.

Davies PF. Vascular cell interactions with special reference to the pathogenesis of atherosclerosis. Lab. Invest. 1986;55:5-24.

Daley SJ, Klemp KF, Guyton JR, Rogers KA. Cholesterol-fed and casein-fed rabbit models of atherosclerosis. Part 2: Differing morphological severity of atherogenesis despite matched plasma cholesterol levels. Arterioscler. Thromb. 1994;14:105-141.

De Meyer GR, Bult H, Üstünes L, Kockx MM, Feelisch M, Herman AG. Effect of nitric oxide donors on neointima formation and vascular reactivity in the collared carotid artery of rabbits. J. Cardiovasc. Pharmacol. 1995;26:272-279.

Delomenie C, Wautier MP, Chappey O, Wautier JL. Modulation of human endothelial cell activation by antiproliferative cytokines: exploration of arachidonic acid and intracellular cytokine pathways as a possible mechanisms of action. Exp. Cell. Res. 1993;207:122-130.

Diquelou A, Dupouy D, Gaspin D, Constans J, Sié P, Boneu B, Sakariassen KS, Cadroy Y. Relationship between endothelial tissue factor and thrombogenesis under flow conditions. Thromb. Haemost. 1995;74:778-783.

Dosquet C, Weill D, Wautier JL. Cytokines and thrombosis. J. Cardiovasc. Pharmacol. 1995;25[suppl2]:S13-S19.

Duplaa C, Couffinhal T, Labat L, Fawaz J, Moreau C, Bietz I, Bonnet J. Monocyte adherence to endothelial cells in patient with atherosclerosis: relationships with risk factors. Eur. J. Clin. Invest. 1993; 23:474-479.

Dvorak HD, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hypermeability and angiogenesis. Am. J. Pathol. 1995;271:603-606.

Elices MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowsky S, Hemler M, Lobb RR. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leucocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. Cell 1990;60:577-584.

Engelmann GL, Dionne CA, Jaye MC. Acidic fibroblast growth factor and heart development: Role in myocyte proliferation and capillary angiogenesis. Circ. Res. 1993;72:7-19.

Esch F, Baird A, Ling N, Ueno N, Hill F, Denoroy L, Klepper R, Gospodarowicz D, Böhlen P, Guillemin R. Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985;82:6507-6511.

Farhy RD, Carretero OA, Ho KL, Scicli AG. Role of kinins and nitric oxide in the effects of angiotensin converting enzyme inhibitors on neointima formation. Circ. Res. 1993;72:1202-1210.

Felton CV, Crook D, Davies MJ, Olivier MF. Relation of plaque lipid composition and morphology to the stability of human aortic plaques. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1997;17:1337-1345.

Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. J. Biol. Chem. 1996;271:22810-22814.

Feron O, Dessy C, Moniotte S, Desager JP, Balligand JL. Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. J. Clin. Invest. 1999;103:897-905.

Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. Endocr. Rev. 1992;13:18-32.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. Trends Cardiovasc. Med. 1993;3:244-250.

Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr. Rev. 1997;18:4-25.

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.

Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. Science 1987;235:442-447.

Folkman J, Klagsburn M, Sasse J, Wadzinski M, Ingber D, Vlodavsky I. A heparin-binding angiogenic protein-basic fibroblast growth factor is stored within basement membrane. Am. J. Pathol. 1988;130:393-400.

Förstermann U, Mügge A, Alheid U, Haverich A, Frölich JC. Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilatation in atherosclerotic human coronary arteries. Circ. Res. 1988;62:185-190.

Förstermann U, Gorsky LD, Pollock JS, Schmidt HHW, Heller M, Murad F. Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990;168:727-732.

Freiman PC, Mitchell GG, Heistad DD, Armstrong ML, Harrison DG. Atherosclerosis impairs endothelium-dependent vascular relaxation to acetylcholine and thrombin in primates. Circ. Res. 1986;58:783-789.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 1980;288:373-376.

Fuster V, Badimon JJ, Chesebro JH, Fallon JT. Plaque rupture, thrombosis, and therapeutic implications. Haemostasis 1996;26(suppl 4):269-284.

Fuster V, Fallon JT, Badimon JJ, Nemerson Y. The unstable atherosclerotic plaque : clinical significance and therapeutic intervention. Thromb. Haemost. 1997;78:247-255.

Gadjusek CM, Carbon S. Injury-induced release of basic fibroblast growth factor from bovine aortic endothelium. J. Cell. Physiol. 1989;139:570-579.

Gallo R, Fallon JT, Toschi V, Gertz SD, Padurean A, Nemerson Y, Chesebro JH, Fuster V, Badimon JJ. Bi-phasic increase of tissue factor activity after angioplasty in porcine coronary arteries. Circulation 1995;92:I-354. Garcia-Gardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, Lisanti MP, Sessa WC. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. J. Biol. Chem. 1997;272:25437-25440.

Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic-guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. J. Clin. Invest. 1989;83:1774-1777.

Gerrity RG, Goss JA, Soby L. Control of monocyte recruitment by chemotactic factor(s) in lesion-prone areas of swine aorta. Arteriosclerosis 1985;5:55-66.

Gertler JP, Abbott WM. Prothrombotic and fibrinolysis function of normal and perturbed endothelium. J. Surg. Res. 1992;52:89-95.

Gimbrone MA. Vascular endothelium in health and disease. In : Haber E (ed). Molecular cardiovascular medicine. New York : Scientific American Medicine, 1995: 49-61.

Girerd XJ, Hirsch AT, Cooke JP, Dzau VJ, Creager MA. L-arginine augments endotheliumdependent vasodilatation in cholesterol-fed rabbits. Circ. Res. 1990;67:1301-1308.

Gitay-Goren H, Soker S, Vlodavsky I, Neufeld G. The binding of vascular endothelial growth factor to its receptors is dependent on cell surface-associated heparin-like molecules. J. Biol. Chem. 1992;267:6093-6098.

Gospodarowicz D, Ferrara N, Haaparanta T, Neufeld G. Basic fibroblast growth factor: Expression in cultured bovine vascular smooth muscle cells. Eur. J. Cell. Biol. 1988;46:144-151.

Gospodarowicz D. Biological activities of fibroblast growth factor. Ann. NY. Acad. Sci. 1991;638:1-8.

Griffioen AW, Damen CA, Blijham GH, Groenewegen G. Tumor angiogenesis is accompanied by a decreased inflammatory response of tumor-associated endothelium. Blood 1996;88:667-673. A

Griffioen AW, Damen CA, Martinotti S, Blijham GH, Groenewegen G. Endothelial intercellular adhesion molecule-1 expression is suppressed in human malignancies : the role of angiogenic factors. Cancer Res. 1996;56:1111-1117. B

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.

Gryglewski RJ, Botting RM, Vane JR. Mediators produced by the endothelial cell. Hypertension 1988;12:530-548.

Guo J, Milhoan KA, Tuan RS, Lefer AM. Beneficial effect of SPM-5185, a cysteinecontaining nitric oxide donor, in rat carotid artery intimal injury. Circ. Res. 1994;75:77-84.

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.

Hanke H, Strohschneider T, Oberhoff M, Betz E, Karsch K. Time course of smooth muscle cell proliferation in the intima and media of arteries following experimental angioplasty. Circ. Res. 1990;67:651-659.

Haudenschild CC, Schwartz SM. Endothelial regeneration. II. Restitution of endothelial continuity. Lab. Invest. 1979;41:407-418.

Henninger DD, Panés J, Eppihimer M, Russell J, Gerritsen M, Anderson DC, Granger DN. Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. J. Immunol. 1997;158:1825-1832.

Hickey KA, Rubanyi GM, Paul RJ, Highsmith RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. Am. J. Physiol. 1985;248:C550-C556.

Hughes SE, Crossman D, Hall PA. Expression of basic and acidic fibroblast growth factors and their receptor in normal and atherosclerotic human arteries. Cardiovasc. Res. 1993;27:1214-1219. A

Hugues SE, Hall PA. Overview of the fibroblast growth factor and receptor families: Complexity, functional diversity, and implications for future cardiovascular research. Cardiovasc. Res. 1993;27:1199-1203. B

Ignarro LJ, Byrns RE, Wood KS. Biochemical and pharmacological properties of endotheliumderived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radical. In: Vanhoutte PM, editor. Mechanisms of Vasodilatation. New York: Raven Press, 1988:427-435.

Isner JM, Walsh K, Symes JF, Pieczek A, Takeshita S, Lowry J, Rosenfield K, Weir L, Brogi E, Jurayj D. Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. Circulation 1995;91:2687-2692.

Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, Rosenfield K, Razvi S, Walsh K, Symes J. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. Lancet 1996;348:370-374.

Jayakody L, Senaratne M, Thomson A, Kappagoda T. Endothelium-dependent relaxation in experimental atherosclerosis in rabbit. Circ. Res. 1987;60:251-264.

Jeremy RW, McCarron H, Sullivan D. Effects of dietary L-arginine on atherosclerosis and endothelium-dependent vasodilatation in the hypercholesterolemic rabbit. Response according to treatment duration, anatomic site, and sex. Circulation 1996;94:498-506.

Ju H, Zou R, Venema VJ, Venema RC. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. J. Biol. Chem. 1997;272:18522-18525.

Jude B, Agraou B, McFadden EP, Susen S, Bauters C, Lepelley P, Vanhaesbroucke C, Devos P, Cosson A, Asseman P. Evidence for time-dependent activation of monocytes in the systemic circulation in unstable angina but not in acute myocardial infarction or in stable angina. Circulation 1994;90:1662-1668.

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.

Kasper HU, Schmidt A, Roessner A. Expression of adhesion molecules ICAM, VCAM, and ELAM in the arteriosclerotic plaque. Gen. Diagn. Pathol. 1995;141:289-294.

Keaney JF, Xu A, Cunningham D, Jackson T, Frei B, Vita JA. Dietary probucol preserves endothelial function in cholesterol-fed rabbits by limiting vascular oxydative stress and superoxide generation. J. Clin. Invest. 1995;95:2520-2529.

Kimura T, Kaburagi S, Tamura T, Yokoi H, Nakagawa Y, Yokoi H, Hamasaki N, Nosaka H, Nobuyoshi M, Mintz G, Popma J, Leon M. Remodeling of human coronary arteries undergoing coronary angioplasty or atherectomy. Circulation 1997;96:475-483.

Kolodgie FD, Virmani R, Rice HE, Mergner WJ. Vascular reactivity during the progression of atherosclerotic plaque. A study in Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbits. Circ. Res. 1990;66:1112-1126.

Lafont A, Guzman LA, Whitlow PL, Goormastic M, Cornhill JF, Chisolm GM. Restenosis after experimental angioplasty. Intimal, medial and adventicial changes associated with constrictive remodeling. Circ. Res. 1995;76:996-1002.

Lam MH, Bouchart M, Martel R, Fleser A, Leclerc G. Circulating serum levels of bFGF, VEGF and TGF- β 1 in patients undergoing PTCA. J. Am. Coll. Cardiol. 1996;27:363 A.

Lazarous DF, Scheinowitz M, Shou M, Hodge E, Rajanayagam S, Hunsberger S, Robinson WG, Stiber JA, Correa R, Epstein SE. Effects of chronic systemic administration of basic fibroblast growth factor on collateral development in the canine heart. Circulation 1995;91:145-153

Lazarous DF, Shou M, Scheinowitz M, Hodge E, Thirumurti 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.

Lee JS, Adrie C, Jacob HJ, Roberts JD, Zapol WM, Bloch KD. Chronic inhalation of nitric oxide inhibits neointimal formation after balloon-induced arterial injury. Circ. Res. 1996;78:337-342.

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science 1989;246:1306-1309.

Levin ER. Endothelins. N. Engl. J. Med. 1995;333:356-363.

Lewis TV, Cooper BA, Dart AM, Chin-Dusting JPF. Responses to endothelium-dependent agonists in subcutaneous arteries excised from hypercholesterolaemic men. Br. J. Pharmacol. 1998;124:222-228.

Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Libby P. Inducible expression of vascular cell adhesion molecule-1 by vascular smooth muscle cells in vitro and within rabbit atheroma. Am. J. Pathol. 1993;143:1551-1559.

Libby P, Sukhova G, Kranzhöfer R, Tanaka H. Cellular activation in restenosis following angioplasty. Atherosclerosis X. Ed: Woodford F, Davignon J, Sniderman A. 1995:690-693.

Libby P. Atheroma : more than much. Lancet 1996;348:S4-S7.

Lindner V, Majack RA, Reidy MA. Basic fibroblast growth factor stimulates endothelial regrowth and proliferation in denuded arteries. J. Clin. Invest. 1990;85:2004-2008.

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. A

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.B

Lindner V, Reidy MA. Expression of basic fibroblast growth factor and its receptor by smooth muscle cells and endothelium in injured rat arteries. Circ. Res. 1993;73:589-595.

Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. Prog. Cardiovasc. Dis. 1995;38:87-104.

Loskutoff DJ, Edgington TS. Synthesis of a fibrinolytic activator and inhibitor by endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1977;74:3903-3907.

Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. N. Engl. J. Med. 1986;315:1046-1051.

Makowski S, Lecompte T. Angioplastie endoluminale coronaire et traitements antithrombotiques. Eds Masson, M. Samama, J. Acar Traitements antithrombotiques 1995;5:98-117.

Mantovani A, Dejana E. Cytokines as communication signals between leucocytes and endothelial cells. Immunol. Today 1989;10:370-375.

Marmur JD, Rossikhina M, Guha A, Fyfe B, Friedrich V, Mendlowitz M, Nemerson Y, Taubman MB. Tissue factor is rapidly induced in arterial smooth muscle after balloon injury. J. Clin. Invest. 1993;91:2253-2259.

Marmur JD, Thiruvikraman SV, Fyfe BS, Guha A, Sharma SK, Ambrose JA, Fallon JT, Nemerson Y, Taubman MB. Identification of active tissue factor in human coronary atheroma. Circulation 1996;94:1226-1232.

McNamara DB, Bedi B, Aurora H, Tena L, Ignarro LJ, Kadowitz PJ, Akers DL. L-arginine inhibits balloon catheter-induced intimal hyperplasia. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993;193:291-296.

Medalion B, Merin G, Aingorn H, Miao HQ, Nagler A, Elami A, Ishai-Michaeli R, Vlodavsky I. Endogenous basic fibroblast growth factor displaced by heparin from the luminal surface of human blood vessels is preferentially sequestred by injured regions of the vessel wall. Circulation 1997;95:1853-1862.

Melder RJ, Koenig GC, Witwer BP, Safabakhsh N, Munn LL, Jain RK. During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium. Nat. Med. 1996; 2:992-997.

Meurice T, Bauters C, Auffray JL, Vallet B, Hamon M, Valero F, Van Belle E, Lablanche JM, Bertrand ME. Basic fibroblast growth factor restores endothelium-dependent responses after balloon injury of rabbit arteries. Circulation 1996;93:18-22.

Meurice T, Bauters C, Vallet B, Corseaux D, Van Belle E, Hamon M, Dupuis B, Lablanche JM, Bertrand ME. bFGF restores endothelium-dependent responses of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. Am. J. Physiol. 1997;272:H613-H617.

Michel JB. Rôle du monoxyde d'azote endothélial dans la régulation du tonus artériel. La revue du Praticien 1997;47:2251-2256. A

Michel JB, Feron O, Sacks D, Michel T. Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca^{2+} - calmodulin and caveolin. J. Biol. Chem. 1997;272:15583-15586. B

Millauer B, Wizigmann-Voss S, Schnurch H, Martinez R, Moller NPH, Risau W, Ulrich A. Hight affinity VEGF binding and developmental expression suggest *Flk*-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. Cell 1993;72:835-846.

Minor RL Jr, Myers PR, Guerra R Jr, Bates JN, Harrison DG. Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. J. Clin. Invest. 1990;86:2109-2116.

Miwa K, Igawa A, Inoue H. Soluble E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 levels in systemic and coronary circulation in patients with variant angina. Cardiovasc. Res. 1997;36:37-44.

Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂, and prostacyclin. Pharmacol. Rev. 1978;30:293-331.

Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. N. Engl. J. Med. 1993;329:2002-2012.

Montesano R, Vassalli JD, Baird A, Guillemin R, Orci L. Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986;83:7297-7301.

Moreno PR, Bernardi VH, Lopez-Cuéllar J, Murcia AM, Palacios IF, Gold HK, Mehran R, Sharma SK, Nemerson Y, Fuster V, Fallon JT. Macrophages, smooth muscle cells, and tissue factor in unstable angina. Circulation. 1996;94:3090-3097.

Morisaki N, Kanzaki T, Motoyama N, Saito Y, Yoshida S. Cell cycle-dependent inhibition of DNA synthesis by prostaglandin I_2 in cultured rabbit aortic smooth muscle cells. Atherosclerosis 1988;71:165-171.

Neri Serneri G, Modesti PA, Gensini GF, Branzi A, Melandri G, Poggesi L, Rostagno C, Tamburini C, Carnovali M, Magnani B. Randomised comparison of subcutaneous heparin, intravenous heparin, and aspirin in unstable angina. Lancet 1995;345:1201-1204.

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.

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 expressed in human coronary atherosclerotic plaques. J. Clin. Invest. 1993;92:945-951.

Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. J. Clin. Invest. 1993;91:2546-2551.

Ohara Y, Peterson TE, Sayegh HS, Subramanian RR, Wilcox JN, Harrison DG. Dietary correction of hypercholesterolemia in the rabbit normalizes endothelial superoxide anion production. Circulation 1995;92:898-903.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature 1987;327:524-526.

Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from Larginine. Nature 1988;333:664-666.

Panés J, Perry M, Granger DN. Leucocyte-endothelial cell adhesion : avenues for therapeutic intervention. Br. J. Pharmacol. 1999;126:537-550.

Pawashe AB, Golino P, Ambrosio G, Migliaccio F, Ragni M, Pascucci I, Chiariello M, Bach R, Garen A, Konigsberg WK, Ezekowitz MD. A monoclonal antibody against rabbit tissue factor thrombus formation in stenotic injured rabbit carotid arteries. Circ. Res. 1994;74:56-63.

Popma J, Califf R, Topol E. Clinical trials of restenosis after coronary angioplasty. Circulation 1991;84:1426-1436.

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 normal rabbit and in the hypercholesterolemic Yucatan micropig. Circulation 1994;89:2816-2821.

Powell JS, Müller RKM, Kuhn H, Hefti F, Baumgartner HR. Inhibitors of angiotensinconverting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. Science 1989;245:186-188.

Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. Lancet 1987;2:1057-1058. A

Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. Br. J. Pharmacol. 1987;92:639-646. B.

Rajanayagam S, Shou M, Thirumurti V. Two intracoronary doses of basic fibroblast growth factor enhance collateral blood flow in dogs [abstract]. J. Am. Coll. Cardiol. 1996; 27 Suppl A:36A.

Ramos MA, Kuzuya M, Esaki T, Miura S, Satake S, Asai T, Kanda S, Hayashi T, Iguchi A. Induction of macrophage VEGF in response to oxidized LDL and VEGF accumulation in human atherosclerotic lesions. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1998;18:1188-1196.

Reidy MA, Clowes AX, Schwartz SM. Endothelial regeneration. V. Inhibition of endothelial regrowth in arteries of rat and rabbit. Lab. Invest. 1983;49:569-575.

Reidy MA. Endothelial regeneration. VII. Interaction of smooth muscle cells with endothelial regrowth. Lab. Invest. 1988;59:36-43.

Reidy MA, Fingerle J, Lindner V. Factors controlling the development of arterial lesions after injury. Circulation 1992;86[suppl III]:III-43-III-46.

Reidy MA. Neointimal proliferation: the role of basic FGF on vascular smooth muscle cell proliferation. Thromb. Haemost. 1993;70:172-176.

Reidy MA, Irvin C, Lindner V. Migration of arterial wall cells. Expression of plasminogen activators and inhibitors in injured rat arteries. Circ. Res. 1996;78:405-414.

Romer LH, Mclean NV, Yan HC, Daise M, Sun J, Delisser HM. IFN- γ and TNF- α induce redistribution of PECAM-1 (CD31) on human endothelial cells. J. Immunol. 1995;154:6582-6592.

Ross R, Vogel A, Glomset J, Kariya B, Raines E, Rivest MJ. Platelet factor the principal stimulant in serum for DNA synthesis of cells in culture. J. Cell. Biol. 1977;75:86-92.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature 1993;362:801-808.

Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow induced release of endothelium-derived relaxing factor. Am. J. Physiol. 1986;250:H1145-H1147.

Rubanyi GM. Endothelium-derived vasoconstrictor factors. In :Ryan US, ed. Endothelial cells, vol. II. Boca Raton, FL :CRC Press, 1988:61-74.

Ruef J, Hu ZY, Yin LY, Wu Y, Hanson SR, Kelly AB, Harker LA, Rao GN, Runge MS, Patterson C. Induction of vascular endothelial growth factor in balloon-injured baboon arteries. A novel role for reactive oxygen species in atherosclerosis. Circ. Res. 1997;81:24-33.

Ruf W, Edgington TS. Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis in vivo. FASEB J. 1994;8:385-390.

Ryan US, Ryan JW. The ultrastructural basis of endothelial surface functions. Biorheology 1984;21:155-170.

Sanders M. Molecular and cellular concepts in atherosclerosis. Pharmac. Ther. 1994;61:109-153.

Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W, Qin Y. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. Nature 1993;376:70-74.



Scalia R, Appel III JZ, Lefer AM. Leucocyte-endothelium interaction during the early stages of hypercholesterolemia in the rabbit. Role of P-Selectine, ICAM-1 and VCAM-1. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1998;18:1093-1100.

Schmidt HHW, Pollock JS, Nakane M, Gorsky LD, Förstermann U, Murad F. Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991;88:365-369.

Schott RJ, Morrow LA. Growth factors and angiogenesis. Cardiovasc. Res. 1993;27:1155-1161.

Schwartz SM, Campbell GR, Campbell JH. Replication of smooth muscle cells in vascular disease. Circ. Res. 1986;58:427-444.

Schwartz SM, Heimark RL, Majesky MW. Developmental mechanisms of underlying pathology of arteries. Physiol. Rev. 1990;70:1177-1209.

Schwarzacher SP, Lim TT, Wang B, Kernoff RS, Niebauer J, Cooke JP, Yeung AC. Local intramural delivery of L-arginine enhances nitric oxide generation and inhibits lesion formation after balloon angioplasty. Circulation 1997;95:1863-1869.

Schweigerer L, Neufeld G, Friedman J. Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. Nature 1987;325:257-259.

Scott-Burden T, Buhler FR. Regulation of smooth muscle proliferative phenotype by heparinoid-matrix interactions. Trends Pharmacol. Sci. 1988;9:94-98.

Scott-Burden T, Schini VB, Elizondo E, Junquero DC, Vanhoutte PM. Platelet-derived growth factor suppresses and fibroblast growth factor enhances cytokines-induced production of nitric oxide by cultured smooth muscle cells. Circ. Res. 1992;71:1088-1100.

200

Scott-Burden T, Vanhoutte PM. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. Circulation 1993;87[suppl V]:V-51-V-55.

Selke FW, Laham RJ, Edelman ER, Pearlman JD, Simons M. Therapeutic angiogenesis with basic fibroblast growth factor : technique and early results. Ann. Thorac. Surg. 1998;65:1540-1544.

Serruys PW, Luijten K, Beatt KJ, Geuskens R, Defeyter PJ, Van Den Brand M, Reiber JHC, Ten Katen HJ, Van Es GA, Hugenholtz PG. Incidence of restenosis after successful angioplasty : a time-related phenomenon. Circulation 1988;77:361-371.

Shen H, Clauss M, Ryan J, Schmidt AM, Tijburg P, Borden L, Connoly D, Stern D, Kao J. Characterization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor receptors on mononuclear phagocytes. Blood 1993;81:2767-2773.

Shimokawa H, Vanhoutte P. Impaired endothelium-dependent relaxation to aggregating platelets and related vasoactive substances in porcine coronary arteries in hypercholesterolemia and atherosclerosis. Circ. Res. 1989;64:900-914.

Shin ES, Hong YH, Peng HB, De Caterina R, Libby P, Liao JK. Nitric oxide attenuates vascular smooth muscle cell activation by interferon- γ . J. Biol. Chem. 1996;271:11317-11324.

Shou M, Thirumurti V, Rajanayagam S, Lazarous D, Hodge E, Stiber JA, Pettiford M, Elliott E, Shah SM, Unger EF. Effect of basic fibroblast growth factor on myocardial angiogenesis in dogs with mature collateral vessels. J. Am. Coll. Cardiol. 1997;29:1102-1106.

Simionescu N, Simionescu M. Endothelial cell biology in health and disease. New York: Plenum Press 1988:327.

Speidel CM, Eisenberg PR, Ruf W, Edgington TS, Abendschein DR. Tissue factor mediates prolonged procoagulant activity on the luminal surface of balloon-injured aortas in rabbits. Circulation. 1995;92:3323-3330.

Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. Nature 1990;346:425-434.

Staunton DE, Dustin ML, Erickson HP, Springer TA. The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. Cell 1990;61:243-254.

Stemerman M, Spaet TH, Pitlick F, Cintron J, Lejnieks I, Tiell ML. The pattern of reendothelialization and intimal thickening. Am. J. Pathol. 1977;87:125-142.

Sterpetti AV, Cucina A, Fragale A, Lepidi S, Cavallaro A, Santora d'Angelo L. Shear stress inflluences the release of platelet-derived growth factor and basic fibroblast growth factor by arterial smooth muscle cells. Eur. J. Vasc. Surg. 1994;8:138-142.

Suzuki H, Chen G. Endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) an endogenous potassium-channel activator. TIPS 1990;5:212-215.

Taguchi J, Abe J, Okazaki H, Takuwa Y, Kurokawa K. L-arginine inhibits neointimal formation following balloon injury. Life Sci. 1993;53:387-392.

Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Asahara T, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Therapeutic angiogenesis: a single intra-arterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hindlimb model. J. Clin. Invest. 1994;93:662-670.

Thiruvikraman SV, Guha A, Roboz J, Taubman MB, Nemerson Y, Fallon JT. In situ localization of tissue factor in human atherosclerotic plaques by binding of digoxigenin-labeled factors VIIa and X. Lab. Invest. 1996;75:451-461.

Tipping PG, Malliaros J, Holdsworth SR. Procoagulant activity expression by macrophages from atheromatous vascular plaques. Atherosclerosis. 1989;79:237-243.

Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz SD, Fernandez-Ortiz A, Chesebro JH, Badimon L, Nemerson Y, Fuster V, Badimon JJ. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. Circulation 1997;95:594-599.

Tsao PS, McEvoy LM, Drexler H, Butcher EC, Cooke JP. Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L-arginine. Circulation 1994;89:2176-2182.

Unger EF, Banai S, Shou M, Lazarous DF, Jaklitsch MT, Scheinowitz M, Correa R, Klingbeil C, Epstein SE. Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in a canine model. Am. J. Physiol. 1994;266:H1588-H1595.

Van Belle E, Vallet B, Auffray JL, Bauters C, Hamon M, McFadden E, Lablanche JM, Dupuis B, Bertrand ME. NO synthesis is involved in structural and functional efffects of ACE inhibitors in injured arteries. Am. J. Physiol. 1996;270:H298-H305.

Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction and atherosclerosis. Eur. Heart J. 1997;18(Supplement E):E19-E29.

Vilette D, Setiadi H, Wautier MP, Caen J, Wautier JL. Identification of an endothelial cell growth inhibitory activity produced by human monocytes. Exp. Cel. Res. 1990;188:219-225.

Vlodavsky I, Folkman J, Sullivan R, Fridman R, Ishai-Michaeli R, Sasse J, Klagsburn M. Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: Synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987;84:2292-2296.

Von Der Leyen V, Gibbons GH, Morishita R. Overexpression of constitutive, endothelialtype nitric oxide synthase as an in vivo gene transfer approach to prevent neointima formation after vascular injury. Clin. Res. 1994;42:180A.

Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Differential signal transduction properties of KDR and Flt-1, two receptors for vascular endothelial growth factor. J. Biol. Chem. 1994;269:26988-26995.

Wang B, Singer A, Tsao P, Drexler H, Kosek J, Cooke JP. Dietary arginine prevents atherosclerosis in the coronary artery of the hypercholesterolemic rabbit. J. Am. Coll. Cardiol. 1994;23:452-458.

Weidinger FF, McLenachan JM, Cybulsky MI, Gordon JB, Rennke HG, Hollenberg NK, Fallon JT, Ganz P, Cooke JP. Persistent dysfunction of regenerated endothelium after balloon angioplasty of rabbit iliac artery. Circulation 1990;81:1667-1679.

Weidinger FF, McLenachan JM, Cybulsky MI, Fallon JT, Hollenberg NK, Cooke JP, Ganz P. Hypercholesterolemia enhances macrophage recruitment and dysfunction of regenerated endothelium after balloon injury of the rabbit iliac artery. Circulation 1991;84:755-767.

Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989;86:2839-2843.

Zeldis S, Nemerson Y, Pitlick R, Lentz T. Tissue factor (thromboplastin): localization by peroxidase conjugated antibodies. Science. 1972;175:766-768.

204

Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Granger HJ, Geppti P, Ledda F. Nitric oxide promotes DNA synthesis and cyclic GMP formation in endothelial cells from post capillary venules. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993;192:1198-1203.

Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, Geppetti P, Ledda F. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. J. Clin. Invest. 1994;94:2036-2044.

Zwaginga JJ, De Boer HC, Ijsseldijk MJW, Kerkhof A, Muller-Berghaus G, Gruhlichhenn J, Sixma JJ, De Groot PG. Thrombogenicity of vascular cells. Comparison between endothelial cells isolated from different sources and smooth muscle cells and fibroblasts. Arteriosclerosis 1990;10:437-448.

