

Perspectives de thérapie génique de la resténose

Laurent J. Feldman
Ph. Gabriel Steg

Le traumatisme infligé à l'artère athéromateuse, que l'on dilate à l'aide d'un ballonnet, entraîne dans 30 % des cas une resténose dans les six mois suivant l'intervention. La réduction du calibre artériel est liée à l'hyperplasie intimale et au remodelage artériel. Le transfert dans les cellules musculaires lisses de la paroi artérielle de gènes codant pour des inhibiteurs de la prolifération cellulaire semble une voie thérapeutique prometteuse. Les produits des gènes thérapeutiques cytotoxiques (thymidine kinase du virus herpès associée à un traitement par le ganciclovir) ou cytostatiques (protéines Rb, Gax, eNOS) inhibent efficacement la prolifération des cellules musculaires lisses et l'hyperplasie de l'intima. De nombreux problèmes restent néanmoins à régler avant que la thérapie génique n'entre en pratique clinique: améliorer le vecteur (construction de vecteurs adénoviraux de deuxième et troisième générations, moins immunogènes) et l'efficacité du transfert génique dans les artères athéromateuses, mais aussi empêcher la dissémination du vecteur dans les autres organes.

L'angioplastie coronaire percutanée est la technique de revascularisation myocardique la plus utilisée chez les patients souffrant d'insuffisance coronarienne. Le principe est d'introduire dans le réseau artériel coronaire un cathéter muni à son extrémité d'un ballonnet, d'avancer le cathéter jusqu'au niveau d'une sténose critique, et de gonfler le ballonnet en regard de cette lésion afin de l'écraser contre la paroi et de rétablir ainsi un calibre coronaire permettant une perfusion myocardique suffisante. Le formidable essor de l'angioplastie coronaire (plus de 50 000/an en France et 500 000/an aux États-Unis) est cependant limité par la réapparition, le plus souvent dans les six mois suivant la procédure, d'une nouvelle lésion au site dilaté, ou

resténose. L'incidence de la resténose est d'environ 30 %, ce qui en fait un véritable problème de santé publique, responsable d'un coût estimé à 2 milliards de dollars par an aux États-Unis. A ce jour, aucun traitement pharmacologique n'a fait la preuve d'une efficacité sans équivoque pour prévenir la resténose [1], malgré de très nombreux essais cliniques contrôlés (plus de 60) totalisant plus de 20 000 patients. Mais des bases physiopathologiques incertaines, l'utilisation de modèles animaux inadéquats, et l'administration par voie systémique des médicaments testés, contrastant avec le caractère focal de la resténose, expliquent en grande partie ces échecs. La mise au point de techniques efficaces de transfert de gène artériel *in vivo* et l'individualisation de certains

ADRESSE

L.J. Feldman : docteur en médecine, interne des Hôpitaux de Paris. P.G. Steg : professeur des universités, praticien hospitalier. Unité physiopathologie du cœur et des artères et service de cardiologie A, hôpital Bichat, 46, rue Henri-Huchard, 75018 Paris, France.

TIRÉS À PART

L.J. Feldman.

RÉFÉRENCES

1. Feldman LJ, Riessen R, Steg PG. Prevention of restenosis after coronary angioplasty: towards a molecular approach? *Fundam Clin Pharmacol* 1995; 9: 8-16.
2. Isner JM, Feldman LJ. Gene therapy for arterial disease. *Lancet* 1994; 344: 1653-4.
3. Nabel EG. Gene therapy for cardiovascular disease. *Circulation* 1995; 91: 541-8.
4. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-9.
5. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Mechanisms of stenosis after arterial injury. *Lab Invest* 1983; 49: 208-15.
6. Schwartz SM, de Blois D, O'Brien ERM. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 1995; 77: 445-65.
7. Levitzki A, Gazit A. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* 1995; 267: 1782-8.
8. Marx J. How p53 suppresses cell growth. *Science* 1993; 262: 1644-5.
9. Furukawa Y, DeCaprio JA, Freedman A, et al. Expression and state of phosphorylation of the retinoblastoma susceptibility gene product in cycling and noncycling human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2770-4.
10. Gorski DH, LePage DF, Patel CV, Copeland NG, Jenkins NA, Walsh K. Molecular cloning of a diverged homeobox gene that is rapidly down-regulated during the G0/G1 transition in vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 3722-33.
11. Lafont A, Guzman LA, Whitlow PL, Goormastic M, Cornhill JF, Chisolm GM. Restenosis after experimental angioplasty. Intimal, medial, and adventitial changes associated with constrictive remodeling. *Circ Res* 1995; 76: 996-1002.
12. 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: 2809-15.

gènes dont la surexpression, locale et prolongée, pourrait avoir un effet préventif sur la resténose, permettent d'envisager une approche moléculaire de la prévention de la resténose [2, 3]. Le but de cet *article de synthèse* est de faire une revue critique des méthodes de transfert de gène artériel et des résultats expérimentaux obtenus dans la prévention de la resténose par thérapie génique.

Physiopathologie de la resténose

La resténose constitue une forme accélérée d'athérosclérose [4] dont les déterminants sont encore imparfaitement connus. Schématiquement, on distingue deux mécanismes qui concourent à la réduction chronique du calibre artériel après une angioplastie: l'hyperplasie intimale et le remodelage artériel (*figure 1*).

• L'hyperplasie intimale

Essentiellement décrite dans des modèles d'abrasion de l'artère

carotide de rat [5], elle est constituée de cellules musculaires lisses « activées » par le traumatisme artériel, qui prolifèrent dans la média, migrent de la média dans l'intima, prolifèrent dans l'intima, et synthétisent une volumineuse matrice extracellulaire [6]. L'activation des cellules musculaires lisses est secondaire à la libération locale de facteurs de croissance et de cytokines « pro-proliférants » (bFGF, PDGF...), mais aussi à la suppression de la synthèse de certains peptides endothéliaux « antiproliférants », qui jouent un rôle physiologique dans le maintien de l'homéostasie artérielle (tels que l'oxyde nitrique, NO). Les voies de transduction activées par ces nombreux facteurs de croissance (la mieux connue est celle du PDGF [7]) sont multiples, redondantes, et se chevauchent, si bien qu'il est difficile de toutes les inhiber. En revanche, ces différentes voies « convergent » vers un tronc commun correspondant à l'activation du cycle cellulaire, qui constitue une cible de choix pour

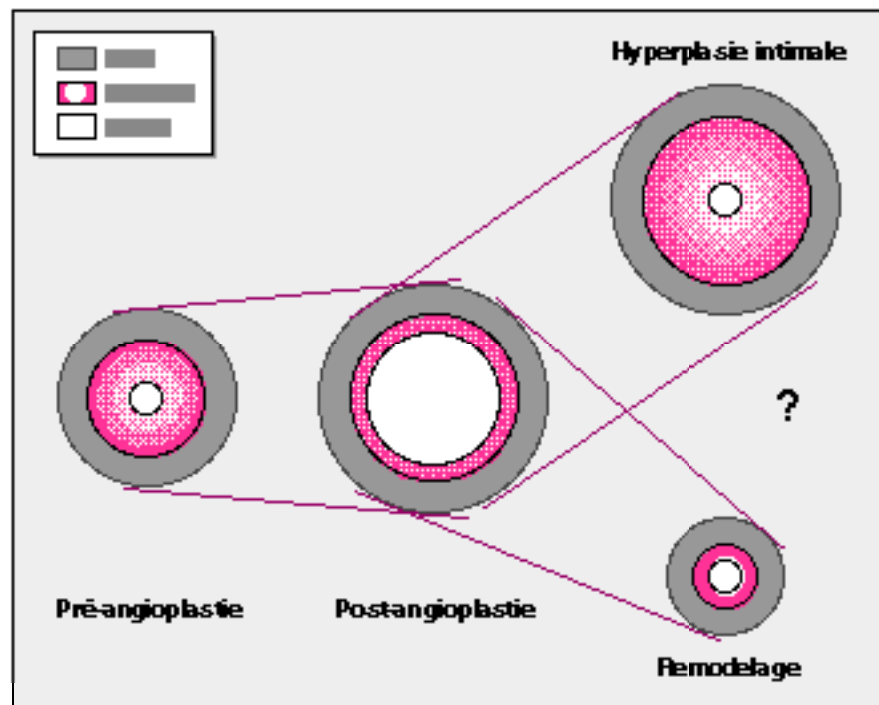


Figure 1. **Physiopathologie de la resténose.** Les deux principaux mécanismes intervenant dans la resténose sont l'hyperplasie intimale, constituée de cellules musculaires lisses et de matrice extracellulaire, et le remodelage constrictif (diminution chronique du diamètre artériel). La part précise de ces deux mécanismes chez l'homme est inconnue.

RÉFÉRENCES

13. Gertz SD, Gimple LW, Banai S, Ragosta M, Powers ER, Roberts WC, Perez LS, Sarembock IJ. Geometric remodeling is not the principal pathogenetic process in restenosis after balloon angioplasty. Evidence from correlative angiographic-histomorphometric studies of atherosclerotic arteries in rabbits. *Circulation* 1994; 90: 3001-8.
 14. Mulligan RC. The basic science of gene therapy. *Science* 1993; 260: 926-32.
 15. Riessen R, Isner JM. Prospects for site-specific delivery of pharmacologic and molecular therapies. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23: 1234-44.
 16. Nabel EG, Plautz G, Nabel GJ. Site-specific gene expression *in vivo* by direct gene transfer into the arterial wall. *Science* 1990; 249: 1285-8.
 17. Takeshita S, Gal D, Leclerc G, Pickering JG, Riessen R, Weir L, Isner JM. Increased gene expression after liposome-mediated arterial gene transfer associated with intimal smooth muscle cell proliferation. *In vitro* and *in vivo* findings in a rabbit model of vascular injury. *J Clin Invest* 1994; 93: 652-61.
 18. Riessen R, Rahimizadeh H, Takeshita S, Gal D, Barry JJ, Isner JM. Successful vascular gene transfer using a hydrogel coated balloon angioplasty catheter. *Hum Gene Ther* 1993; 4: 749-58.
 19. Lemarchand P, Jones M, Yamada I, Crystal RG. *In vivo* gene transfer and expression in normal uninjured blood vessels using replication-deficient recombinant adenovirus vectors. *Circ Res* 1993; 72: 1132-8.
 20. Steg PG, Feldman LJ, Scoazec J-Y, Tahlil O, Barry JJ, Boulechfar S, Ragot T, Isner JM, Perricaudet M. Arterial gene transfer to rabbit endothelial and smooth muscle cells using percutaneous delivery of an adenoviral vector. *Circulation* 1994; 90: 1648-56.
 21. Feldman LJ, Steg PG, Zheng LP, Chen D, Kearney M, McGarr SE, Barry JJ, Dedieu J-F, Perricaudet M, Isner JM. Low-efficiency of percutaneous adenovirus-mediated arterial gene transfer in the atherosclerotic rabbit. *J Clin Invest* 1995; 95: 2662-71.
 22. Stratford-Perricaudet LD, Makeh I, Perricaudet M, Briand P. Widespread long-term gene transfer to mouse skeletal muscles and heart. *J Clin Invest* 1992; 90: 626-30.
- la thérapie génique antiproliférative de la resténose. Certains facteurs bloquant le cycle cellulaire lors de la transition G1-S (p53 [8], Rb [9]) ou lors de la transition G0-G1 (Gax, *growth arrest-specific homeobox*) [10]) ont été récemment identifiés et utilisés dans des modèles expérimentaux de resténose.
- **Le remodelage artériel**
Au décours de l'angioplastie, le remodelage artériel est un phénomène d'individualisation récente qui avait été initialement décrit dans l'athérosclérose et l'artériopathie hypertensive, et qui joue sans doute un rôle non négligeable dans la resténose. Schématiquement, et par opposition à l'hyperplasie intimale, le remodelage participe à la diminution de la lumière artérielle par une réduction du calibre artériel sans modification de l'épaisseur de la paroi. En réalité, le remodelage recouvre un large spectre de modifications structurelles de la paroi artérielle allant d'une réduction de calibre [11] à une dilatation compensatrice [12]. Parfois même, aucun remodelage n'est retrouvé, et l'hyperplasie intimale est seule responsable de la resténose [13]. L'incidence précise du remodelage sur la resténose est donc imprévisible. Par ailleurs, les déterminants moléculaires du remodelage étant inconnus, seule une intervention « mécanique » serait susceptible de prévenir un remodelage constrictif excessif. Ainsi, l'implantation de prothèses endocoronaires réduit, dans certaines indications bien précises, la fréquence de la resténose. Pour toutes ces raisons, les stratégies actuelles de thérapie génique sont orientées vers l'inhibition de l'hyperplasie intimale et non du remodelage.
- nomène biologique naturel. Il faut donc utiliser des vecteurs de transfert pour faciliter l'entrée de l'ADN dans la cellule, puis le ciblage intracellulaire de l'ADN au noyau [14]. Dans le cas du transfert de gène artériel, le problème est particulièrement complexe car les cellules cibles sont en permanence lavées par le flux sanguin à haute pression, qui constitue une barrière mécanique au transfert. Pour cette raison, des systèmes de délivrance locale ont été développés qui permettent d'isoler un segment artériel du sang circulant et de transférer le gène étranger dans ce segment dans des conditions contrôlées (pour une revue générale, voir [15]). Avec le cathéter à double ballonnet, la solution de transfert diffuse passivement dans la paroi du segment situé entre les deux ballonnets gonflés. Au contraire, le cathéter à hydrogel est un véritable cathéter d'angioplastie dont le ballonnet est recouvert d'une matrice polymérique qui adsorbe la solution de transfert et la fait pénétrer dans la paroi artérielle lors du gonflage du ballonnet. Des cathéters à ballonnet poreux permettent également de faciliter le transfert en instillant le vecteur de transfert dans la paroi sous pression. De nombreux vecteurs ont été proposés pour le transfert de gène artériel *in vivo*. Les premières expériences effectuées avec des rétrovirus déficients pour la réplication [16], des liposomes cationiques [17], voire même de l'ADN seul [18], ont eu le mérite de démontrer la faisabilité de la méthode mais ont été décevantes en termes d'efficacité de transfert, la très faible efficacité des rétrovirus et des liposomes s'expliquant en partie par le faible taux de prolifération cellulaire dans la paroi artérielle normale ou athéroscléreuse. Il est difficile de comparer rigoureusement ces différentes techniques car l'efficacité du transfert n'est pas exprimée de la même façon selon les équipes. Il peut s'agir, soit du pourcentage d'animaux chez lesquels l'expression du gène transféré (ou transgène) est détectable, soit du pourcentage de cellules exprimant le transgène dans la paroi artérielle, soit, enfin, de la quantité de protéine recombinante

Les techniques de transfert d'ADN dans la paroi artérielle

Le transfert d'un gène étranger dans une cellule n'est pas un phé-

RÉFÉRENCES

23. Berkner KL. Expression of heterologous sequences in adenoviral vectors. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992; 158: 39-66.

24. Schulick AH, Dong G, Newman KD, Virmani R, Dichek DA. Endothelium-specific *in vivo* gene transfer. *Circ Res* 1995; 77: 475-85.

25. Cassels W, Willerson JT. Amphotropic but not atherotropic: another caveat for adenoviral gene therapy. *J Clin Invest* 1995; 95: 2425-6.

26. Dedieu JF, Vigne E, Orsini C, Deneffe P, Perricaudet M, Yeh P. Improvement of adenoviral vectors for human gene therapy: E1 and E4 deleted recombinant adenoviruses. In: March KL, ed. *Gene transfer in cardiovascular biology: experimental approaches and therapeutic implications*. Dordrecht: Kluwer, 1996 (sous presse).

27. Harats D, Kurihara H, Belloni P, Oakley H, Ziober A, Ackley D, Cain G, Kurihara Y, Lawn R, Sigal E. Targeting gene expression to the vascular wall in transgenic mice using the murine preproendothelin-1 promoter. *J Clin Invest* 1995; 95: 1335-44.

28. Wu GY, Zhan P, Sze LL, Rosenberg AR, Wu CH. Incorporation of adenovirus into a ligand-based DNA carrier system results in retention of original receptor specificity and enhances targeted gene expression. *J Biol Chem* 1994; 269: 11542-6.

29. Feldman LJ, Steg PG, Zheng LP, Barry JJ, Perricaudet M, Isner JM. Efficient percutaneous adenovirus-mediated arterial gene transfer using a channeled angioplasty balloon catheter. *Circulation* 1994; 90: I-20.

30. Schulick AH, Newman KD, Virmani R, Dichek DA. *In vivo* gene transfer into injured carotid arteries. Optimization and evaluation of acute toxicity. *Circulation* 1995; 91: 2407-14.

31. Pastore C, Feldman LJ, Perricaudet M, Steg PG. Intraluminal delivery of a pluronic gel enhances adenovirus-mediated arterial gene transfer: a morphometric study. *Circulation* 1994; 90: I-517.

32. Moolten F. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res* 1986; 46: 5276-81.

33. Chen S-H, Shine HD, Goodman JC, Grossman RG, Woo SLC. Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus mediated gene transfer *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3054-7.

codée par le transgène, produite par le segment d'artère dans lequel a été effectué le transfert. Dans le cas de la resténose, le critère le plus important est probablement le pourcentage de cellules exprimant le transgène (cellules transduites), car les gènes candidats pour une thérapie génique de la resténose (*voir plus loin*) codent le plus souvent pour des protéines intracellulaires (par opposition aux protéines sécrétées dans le milieu extracellulaire): seul un pourcentage élevé de cellules transduites est donc susceptible d'inhiber la resténose [2]. En utilisant ce critère, l'efficacité des vecteurs de transfert précités est extrêmement faible et ne dépasse pas 1/10 000.

Le problème de l'efficacité du transfert a été, en partie, résolu

par l'utilisation des vecteurs adénoviraux [19-21]. Il s'agit d'adénovirus rendus défectueux pour la réplication par la suppression de la région E1 [22], et dont le génome recombinant exprime un gène d'intérêt qui peut être, soit un gène rapporteur (β -galactosidase, luciférase...), soit un gène thérapeutique ayant un effet biologique mesurable. Les vecteurs adénoviraux sont particulièrement efficaces pour le transfert de gène en général, et le transfert de gène artériel en particulier, en raison de la présence de leur récepteur membranaire dans de nombreux types cellulaires, et de leur propriété d'endosomolyse qui permet à l'ADN transféré d'échapper à la dégradation par les enzymes lysosomiales [23].

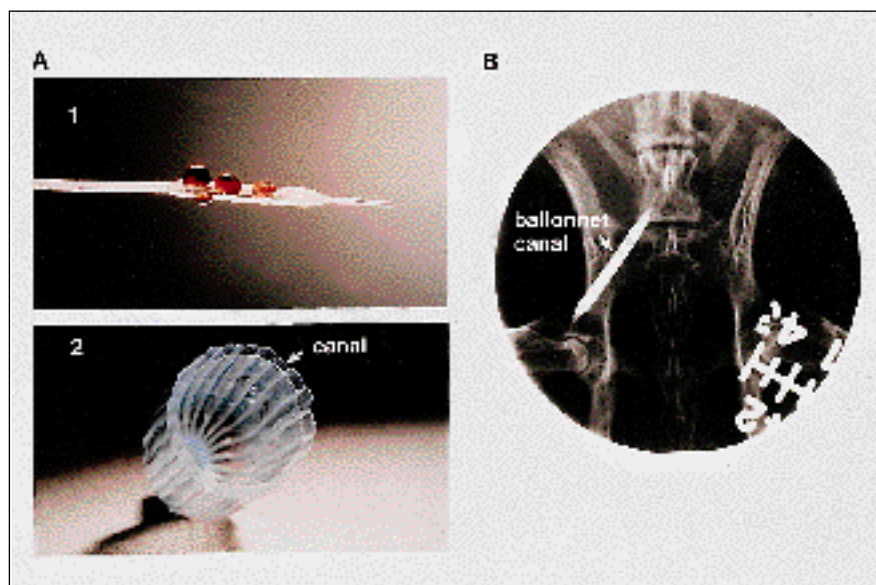


Figure 2. **Les cathéters de délivrance locale : exemple du cathéter à ballonnet recouvert de canaux perforés.** (A). Le ballonnet d'angioplastie est recouvert de canaux (canal) longitudinaux perforés dont la lumière est indépendante de celle du ballonnet. Il est donc possible, lors de l'angioplastie, d'instiller la solution de transfert (gouttes rouges) sous une faible pression peu traumatique pour la paroi. (B). Radiographie du ballonnet (ballonnet-canal) gonflé dans l'artère iliaque de lapin lors du transfert du gène codant pour la β -galactosidase par un vecteur adénoviral. (D'après Feldman et al. [21], avec la permission des auteurs.)

RÉFÉRENCES

34. Ohno T, Gordon D, San H, Pompili VJ, Imperiale MJ, Nabel GJ, Nabel EG. Gene therapy for vascular smooth muscle cell proliferation after arterial injury. *Science* 1994; 265: 781-4.
35. Guzman RJ, Hirschowitz EA, Brody SL, Crystal RG, Epstein SE, Finkel T. *In vivo* suppression of injury-induced vascular smooth muscle cell accumulation using adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 10732-6.
36. Tahlil O, Branell D, Aubailly N, Dedieu JF, Lefeuvre C, Ratet N, Caillaud J-M, Barry JJ, Perricaudet M, Feldman LJ, Denèfle P, Steg PG. Reduction of restenosis after angioplasty by gene therapy with *HSV-tk* and ganciclovir. Results from a double injury model in the hypercholesterolemic rabbit. *Circulation* 1995; 92: 1-295.
37. Chang MW, Barr E, Seltzer J, Jiang Y-Q, Nabel GJ, Nabel EG, Parmacek MS, Leiden JM. Cytostatic gene therapy for vascular proliferative disorders with a constitutively active form of the retinoblastoma gene product. *Science* 1995; 267: 518-22.
38. Branelec D, Pastore C, Dedieu JF, Smith R, Berthelot K, Feldman L, Benoit P, Isner JM, Walsh K, Denèfle P. A recombinant adenovirus encoding gax can efficiently block vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* 1995; 92: 1-634.
39. 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: 1774-7.
40. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-12.
41. Hamon M, Vallet B, Bateurs C, Wernert N, McFadden EP, Lablanche J-M, Dupuis B, Bertrand ME. Long-term oral administration of L-arginine reduces intimal thickening and enhances neoendothelium-dependant acetylcholine-induced relaxation after arterial injury. *Circulation* 1994; 90: 1357-62.
42. von der Leyen HE, Gibbons GH, Morishita R, Lewis NP, Zhang L, Nakajima M, Kaneda Y, Cooke JP, Dzau VJ. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: *in vivo* transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1137-41.
43. Epstein SE, Speir E, Finkel T. Do anti-sense approaches to the problem of restenosis make sense? *Circulation* 1993; 88: 1351-4.

Grâce à ces nouveaux vecteurs, l'efficacité de transfert a été nettement améliorée. On distingue différents cas de figure selon la nature de l'artère « transfectée » et le type de cathéter employé. Lorsque l'artère est normale, le transfert est habituellement limité aux cellules endothéliales [19, 20, 24], et jusqu'à 100 % des cellules endothéliales dans le segment transfecté expriment le transgène.

Les lésions de resténose surviennent cependant sur des lésions d'athérosclérose préexistantes, et l'endothélium de ces lésions est totalement détruit par la procédure d'angioplastie. Par ailleurs, la cible des stratégies moléculaires de prévention de la resténose est la cellule musculaire lisse qui joue un rôle essentiel dans l'hyperplasie intimale. Dans des expériences utilisant des cathéters de délivrance locale permettant de réaliser simultanément une angioplastie et le transfert de gène – des conditions donc proches de celles de l'angioplastie coronaire – nous avons montré qu'un transfert très efficace aux cellules musculaires lisses pouvait être obtenu dans les couches superficielles de la média avec le cathéter à ballonnet enrobé d'hydrogel [20], voire même dans toute l'épaisseur de la média avec le cathéter à ballonnet recouvert de canaux perforés (*figures 2, 3*) [21]. Dans ces conditions, le rendement moyen est d'environ 5 % de cellules musculaires lisses transduites. Cette efficacité est substantiellement plus faible (environ 10 fois) lorsque ces mêmes techniques sont appliquées à des artères athéroscléreuses [21], probablement en raison de l'obstacle mécanique que constitue la plaque d'athérome [25].

Malgré leur grande efficacité, les vecteurs adénoviraux de première génération posent cependant de nombreux problèmes, en grande partie liés à leur immunogénicité, responsable de la décroissance rapide de l'expression du transgène dans la paroi artérielle. Le caractère transitoire de l'expression du transgène n'est pas nécessairement un inconvénient car la resténose est un phénomène lui-même limité dans le temps. Il pourrait même constituer un avantage

en limitant les éventuels effets secondaires liés à une surexpression du gène transféré. Il semble cependant que la durée d'expression des adénovirus de première génération (environ 2 semaines) soit encore insuffisante pour espérer inhiber durablement la resténose. Les vecteurs *E1-* posent également le problème du risque de recombinaison avec des adénovirus sauvages, conduisant à l'apparition de souches répliquantes. Ces problèmes semblent pouvoir être résolus par les vecteurs adénoviraux de seconde et troisième générations [26]. Un autre problème, plus spécifique à la thérapie génique artérielle, est le risque de dissémination des vecteurs adénoviraux dans la circulation systémique, source de contamination d'organes situés à distance du site de transfert [21]. Même si le confinement des particules virales peut sans doute être amélioré par des cathéters de délivrance locale mieux adaptés [20], il est illusoire de penser qu'un simple facteur mécanique suffise à assurer la spécificité du transfert. L'utilisation de séquences promotrices spécifiques des cellules vasculaires, comme la préproendothéline [27], ou de complexes adénovirus-ligand permettant de cibler le transfert de gène dans un type cellulaire particulier [28], constituent des voies de recherche très intéressantes. Enfin, comme nous l'avons signalé plus haut, l'efficacité du transfert demeure insuffisante dans les artères athéroscléreuses. Il est possible d'améliorer le transfert en prolongeant le temps d'incubation des vecteurs adénoviraux [29] ou en utilisant des solutions adénovirales plus concentrées [30]. Ces méthodes ne sont pas applicables en clinique car elles aggraveraient, respectivement, le risque d'ischémie myocardique et la toxicité tissulaire des adénovirus (*figure 4*). Nous développons donc d'autres stratégies consistant à associer les particules adénovirales à des agents adjuvants facilitant le transfert. L'un de ces agents, le poloxamer 407 (un polymère de la famille des *block-copolymères*), semble particulièrement efficace en augmentant environ 3 fois le rendement du transfert [31].

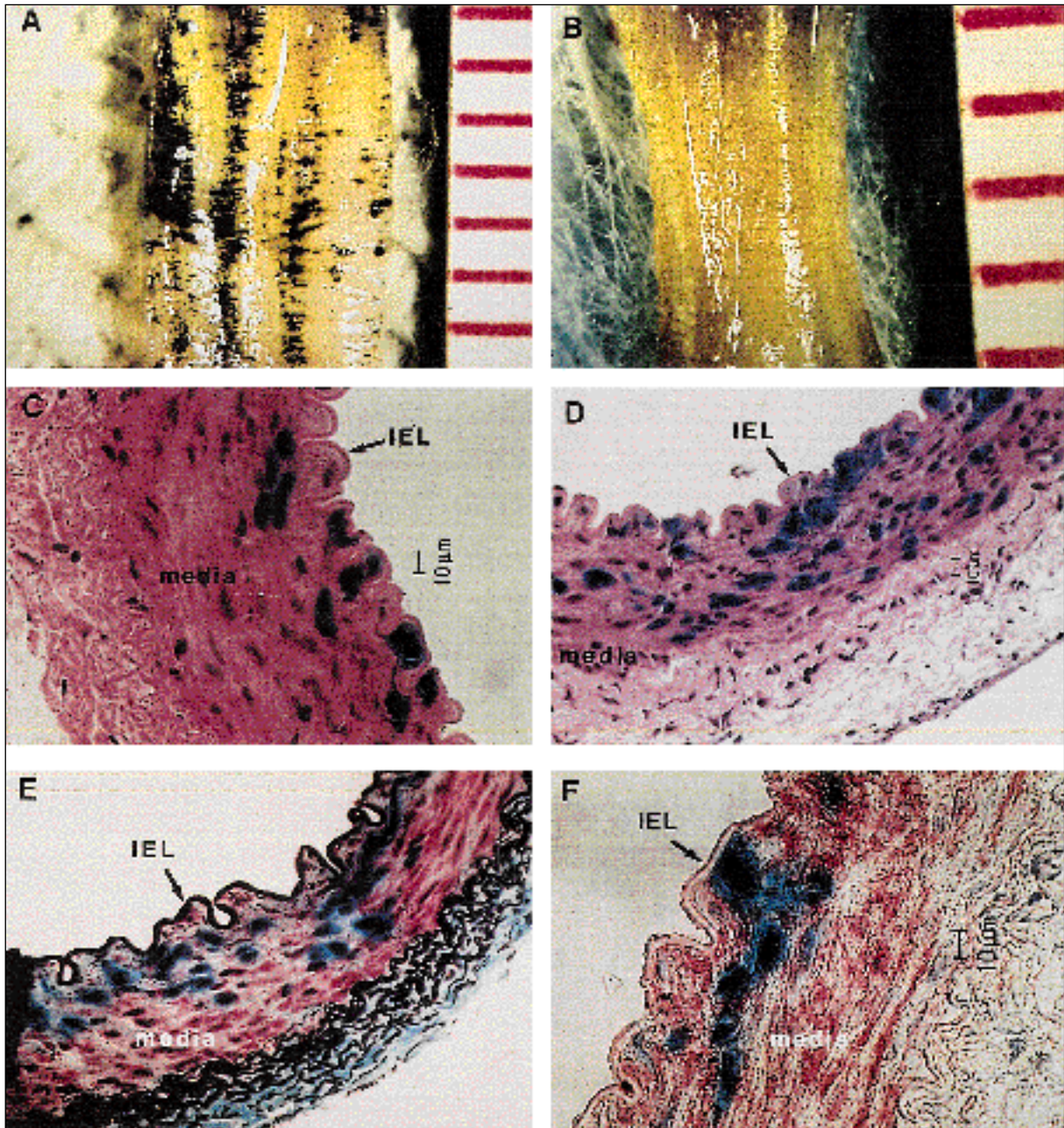


Figure 3. **Transfert du gène codant pour la β -galactosidase (β -gal) nucléaire aux cellules musculaires lisses de la média par un vecteur adénoviral.** Le vecteur est délivré localement dans l'artère iliaque de lapin à l'aide d'un cathéter à ballonnet recouvert de canaux perforés. Dans ce cas, l'endothélium est totalement abrasé par l'inflation du ballonnet lors du transfert de gène. **(A)**. Trois jours après le transfert, une activité β -gal intense, révélée par le colorant X-gal, est présente au site de l'angioplastie (coloration bleutée). **(B)**. Aucune activité β -gal n'est retrouvée dans l'artère controlatérale transfectée avec un vecteur adénoviral témoin. **(C, D)**. Coupes microscopiques de **(A)**: les cellules transfectées (noyaux bleutés) sont situées dans les couches superficielles **(C)**, mais aussi dans les couches plus profondes **(D)** de la média. **(E)**. Coupe microscopique de **(A)** contre-colorée par le trichrome de Masson: la limitante élastique interne (IEL) est intègre et ne semble donc pas être une barrière mécanique infranchissable pour les vecteurs adénoviraux. Noter les nombreuses cellules transfectées dans la média (noyaux bleutés). **(F)**. Coloration immunohistochimique avec un anticorps monoclonal spécifique de l' α -actine du muscle lisse: les cellules transfectées (noyaux bleutés) dans la média fixent également l'anticorps monoclonal (cytoplasme rouge); il s'agit donc de cellules musculaires lisses. (D'après Feldman et al. [21] avec la permission des auteurs.)

RÉFÉRENCES

44. Bennett MR, Schwartz SM. Antisense therapy for angioplasty restenosis. Some critical considerations. *Circulation* 1995; 92: 1981-93.
45. Simons M, Edelman ER, DeKeyser JL, Langer R, Rosenberg RD. Antisense c-myc oligonucleotides inhibit intimal arterial smooth muscle cell accumulation *in vivo*. *Nature* 1992; 359: 67-70.
46. Bennett MR, Anglin S, McEwan JR, Jago R, Newby AC, Evan G. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation *in vitro* and *in vivo* by c-myc antisense oligodeoxynucleotides. *J Clin Invest* 1994; 93: 820-8.
47. Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Nakajima M, Zhang L, Kaneda Y, Ogihara T, Dzau VJ. Single intraluminal delivery of antisense cdc2 kinase and proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotides results in chronic inhibition of neointimal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8474-8.
48. Simons M, Edelman ER, Rosenberg RD. Antisense proliferating cell nuclear antigen oligonucleotides inhibit intimal hyperplasia in a rat carotid artery injury model. *J Clin Invest* 1994; 93: 2351-6.
49. Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Nakajima M, von der Leyen H, Zhang L, Kaneda Y, Ogihara T, Dzau VJ. Intimal hyperplasia after vascular injury is inhibited by antisense cdk 2 kinase oligonucleotides. *J Clin Invest* 1994; 93: 1458-64.
50. Woolf TM, Melton DA, Jennings CGB. Specificity of antisense oligonucleotides *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7305-9.
51. Villa AE, Guzman LA, Poptic EJ, Labhassetwar V, D'Souza S, Farrell CL, Plow EF, Levy RJ, DiCorleto PE, Topol EJ. Effects of antisense c-myc oligonucleotides on vascular smooth muscle cell proliferation and response to vessel wall injury. *Circ Res* 1995; 76: 505-13.
52. Morishita R, Gibbons GH, Horiuchi M, Ellison KE, Nakajima M, Zhang L, Kaneda Y, Ogihara T, Dzau VJ. A gene therapy strategy using a transcription factor decoy of the E2F binding site inhibits smooth muscle proliferation *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5855-9.
53. Marshall E. Gene therapy's growing pains. *Science* 1995; 269: 1050-5.

m/s n° 1, vol. 12, janvier 96

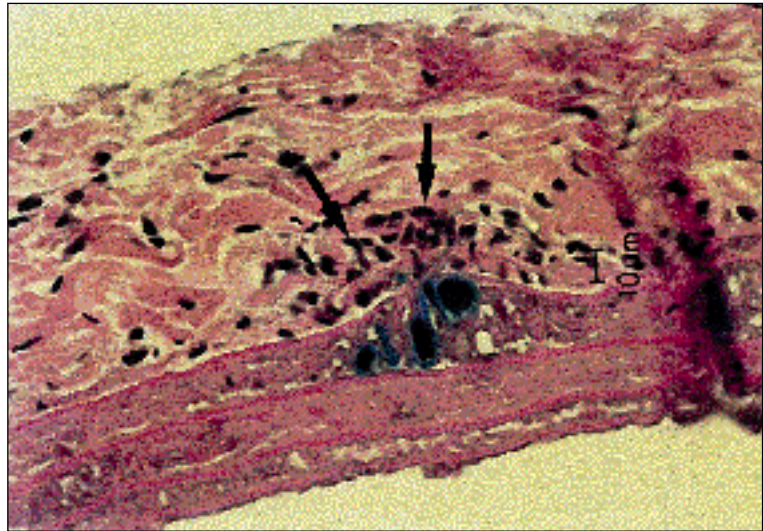


Figure 4. **Toxicité tissulaire des vecteurs adénoviraux.** Réaction inflammatoire 3 jours après la délivrance locale du gène codant pour la β -galactosidase dans l'artère carotide de rat par un vecteur adénoviral. Noter l'infiltrat inflammatoire riche en cellules mononucléées (flèches) formé autour d'un groupe de cellules musculaires lisses transfectées dans la média (noyaux bleutés après coloration X-gal).

Vers une thérapie génique de la resténose ?

L'accumulation de données expérimentales concordantes concernant la faisabilité et l'efficacité du transfert de gène artériel par des vecteurs adénoviraux a abouti à l'élaboration de stratégies de thérapie génique préventive de la resténose dont la cible est l'hyperplasie intimale et, plus précisément, la prolifération des cellules musculaires lisses. Schématiquement, on distingue les stratégies cytotoxiques et cytostatiques.

• Les stratégies cytotoxiques

L'exemple type de thérapie génique cytotoxique consiste à utiliser le gène codant pour la thymidine kinase du virus de l'*Herpes simplex* (*tk*) (*m/s n° 7, vol. 8, p. 728*) [32] pour détruire sélectivement les cellules musculaires lisses proliférant au site de l'angioplastie. La protéine intracellulaire Tk n'est pas spontanément toxique. En revanche, si la cellule exprimant *tk* reçoit secondairement du ganciclovir, un analogue de la guanosine, celui-ci est métabolisé en un dérivé triphos-

phorylé qui bloque la synthèse de l'ADN dans les cellules en phase de répllication. Le produit du gène *tk* est donc une toxine dont l'action est doublement conditionnée : il faut que la cellule reçoive du ganciclovir et qu'elle se divise pour que Tk soit cytotoxique. En outre, l'un des avantages de cette stratégie est le phénomène appelé effet *bystander* [33] : les cellules proliférantes voisines de celles exprimant *tk* sont elles aussi soumises à une action cytotoxique du ganciclovir, même si elles n'ont pas été transduites, ce qui fait suspecter l'existence de phénomènes de coopération métabolique entre cellules voisines, peut-être par l'intermédiaire de jonctions communicantes. L'effet *bystander* rend cette stratégie particulièrement efficace, même lorsque le rendement du transfert de gène est limité.

Le transfert du gène *tk* à l'aide d'un vecteur adénoviral déficient (*Ad-tk*) a été utilisé par deux équipes pour inhiber l'hyperplasie intimale secondaire à une abrasion endothéliale chez le porc (*m/s n° 1, vol. 11, p. 136*) [34] et le rat [35]. Deux à trois semaines après l'abra-

sion, l'hyperplasie intimale, mesurée par le rapport des surfaces intimaux et médiales, est diminuée d'environ 50 % chez les animaux ayant reçu la combinaison Ad-*tk*/ganciclovir comparés à ceux ayant été traités par Ad-*tk* ou le ganciclovir seuls, démontrant à la fois l'efficacité et la spécificité de la combinaison Ad-*tk*/ganciclovir. Une étude en cours dans notre laboratoire [36] suggère que ces résultats, obtenus dans des artères normales, soient reproduits dans un véritable modèle de resténose après angioplastie d'artères athéroscléreuses par un cathéter à ballonnet recouvert d'hydrogel. Dans ce modèle, l'amplitude de l'inhibition de la resténose est bien supérieure au rendement du transfert du gène *tk*, suggérant l'existence d'un effet *bystander in vivo*.

• Les stratégies cytostatiques

On regroupe sous le terme de stratégies cytostatiques les méthodes visant à bloquer la prolifération cellulaire, sans pour autant tuer la cellule transfectée. La cible de ces stratégies est le cycle cellulaire vers lequel convergent l'ensemble des voies de transmission impliquées dans la prolifération cellulaire. On peut utiliser un gène, un oligonucléotide antisens, ou un oligonucléotide « leurre » (*decoy*) pour bloquer le cycle cellulaire.

La liste des gènes cytostatiques candidats pour une thérapie génique de la resténose n'est pas longue. Par exemple, le gène *Rb* [9] est un inhibiteur naturel du cycle cellulaire dont le produit est, dans sa forme non phosphorylée, un puissant chélateur de facteurs transcriptionnels. L'équipe de J.M. Leiden (Chicago, IL, USA) a récemment fait la démonstration que les facultés anti-proliférantes de *Rb* pouvaient être utilisées pour inhiber efficacement l'hyperplasie intimale [37]. Dans cette étude, les auteurs ont construit un adénovirus recombinant porteur d'un gène *Rb* mutant exprimant une forme hypophosphorylable et constitutivement active de *Rb*. L'instillation locale de ce vecteur (Ad- Δ Rb) dans la carotide de rat préalablement abrasée réduit de 70 % l'activité proliférante des cellules musculaires lisses médiales, et de

50 % l'hyperplasie intimale 20 jours après l'abrasion. Cet effet n'est pas spécifique au modèle de rat puisqu'un effet similaire est retrouvé dans l'artère iliaque de porc après angioplastie et délivrance locale percutanée de Ad- Δ Rb.

Notre laboratoire s'intéresse particulièrement au gène *Gax* qui est un nouvel inhibiteur du cycle cellulaire, spécifique des cellules musculaires lisses vasculaires et du myocarde [10]. Des expériences de cotransfection de cellules musculaires lisses en culture suggèrent que l'activité proliférante des cellules ayant incorporé *gax* est réduite de 50 % à 80 % (K. Walsh, communication personnelle). Des résultats préliminaires obtenus en collaboration avec le laboratoire de J.M. Isner (Boston MA, USA) suggèrent qu'un adénovirus recombinant exprimant *Gax* inhibe l'hyperplasie intimale de la carotide de rat après abrasion endothéliale [38].

Un autre candidat pour une thérapie génique de la resténose est le gène *eNOS* codant pour la NO synthase endothéliale, l'enzyme responsable de la production de NO lors de la transformation de la L-arginine en L-citrulline (*m/s n° 12, vol. 11, p. 1743*). L'effet vasodilatateur du NO ainsi que ses propriétés inhibitrices sur la prolifération des cellules musculaires lisses suggèrent que le NO est une molécule de choix pour inhiber la resténose [39, 40]. L'administration orale prolongée de L-arginine, le précurseur naturel du NO, inhibe en effet l'hyperplasie intimale de l'artère iliaque de lapin après abrasion endothéliale [41]. L'équipe de V. Dzau (Stanford, CA, USA) a récemment démontré [42] que le transfert local du gène *eNOS* dans l'artère carotide de rat, immédiatement après une abrasion endothéliale, s'accompagne également d'une réduction de 70 % de l'hyperplasie intimale.

• Le transfert local d'oligonucléotides antisens

Ce transfert constitue une autre stratégie moléculaire de prévention de la resténose [43, 44]. Des résultats encourageants suggèrent que des oligonucléotides antisens dirigés contre *c-MYB* [45], *c-MYC* [46],

PCNA [47, 48], les gènes codant pour les cyclines dépendantes des kinases *Cdc2* [47] et *Cdk2* [49], inhibent efficacement l'hyperplasie intimale provoquée par l'abrasion endothéliale de la carotide de rat. Plusieurs problèmes limitent cependant l'application clinique des stratégies antisens au problème de la resténose. La faible efficacité du transfert des oligonucléotides antisens et leur instabilité dans le milieu intracellulaire rendent nécessaire l'utilisation de fortes concentrations d'oligonucléotides pour les applications *in vivo*. L'utilisation de vecteurs conjugués constitués du virus HVJ (*hemagglutinating virus of Japan* ou virus Sendai) et de liposomes complexés aux oligonucléotides antisens augmenterait substantiellement l'efficacité du transfert [47, 49]. Certaines modifications biochimiques des oligonucléotides permettraient, par ailleurs, de les rendre plus résistants à l'hydrolyse par les endonucléases et d'allonger leur demi-vie [45]. En fait, le principal problème posé par les oligonucléotides antisens est celui de leur spécificité d'action [50]. Ils peuvent, en effet, non seulement interagir avec l'ARN messager spécifique contre lequel ils sont dirigés, mais également avec de nombreux autres ARN messagers pour lesquels ils n'ont qu'une complémentarité partielle, et, de façon surprenante, avec des protéines dont ils peuvent modifier la fonction. Il n'est donc pas impossible que l'inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses par les oligonucléotides antisens soit due à un mécanisme non spécifique. Il a été démontré que l'un de ces mécanismes pourrait être l'effet inhibiteur non spécifique de la séquence G-G-G-G sur la prolifération cellulaire [51].

Comme on le voit, les stratégies de thérapie génique de la resténose sont en développement permanent et les résultats expérimentaux encourageants, obtenus avec des gènes antiproliférants ou des oligonucléotides antisens, ont eu le mérite de démontrer qu'il était possible de modifier localement la biologie vasculaire dans le sens d'une moindre réponse au traumatisme artériel. Il est probable que

d'autres stratégies moléculaires d'inhibition de l'hyperplasie intinale, encore plus efficaces, seront bientôt disponibles. Par exemple, des oligonucléotides « leurres » (*decoy*), agissant comme de puissants chélateurs du facteur transcriptionnel E2F, constituent une nouvelle méthode originale de blocage du cycle des cellules musculaires lisses [52].

La thérapie génique est-elle adaptée au problème de la resténose ?

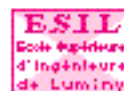
Le contexte actuel de scepticisme qui entoure la thérapie génique en général [53] doit faire porter un regard critique sur les résultats expérimentaux de thérapie génique de la resténose. La plupart de ces résultats ont, en effet, été obtenus dans des modèles d'hyperplasie intinale pure, très éloignés de la

resténose telle qu'on l'observe chez l'homme après une angioplastie coronaire. En particulier, il est probable que l'efficacité du transfert de gène dans des artères normales ne reflète pas le rendement du transfert que l'on peut espérer obtenir dans des artères athérosclérotiques, même avec des vecteurs adénoviraux [21]. Par ailleurs, il n'est pas certain que des stratégies géniques, dont la cible est uniquement l'hyperplasie intinale, suffisent à inhiber un phénomène non univoque comme la resténose. Les données récentes démontrant le rôle sans doute important que joue le remodelage artériel dans la resténose [12] font penser que de nouvelles stratégies associant, par exemple, une thérapie génique antiproliférante à une prévention du remodelage par l'implantation de prothèses endocoronaires auront sans doute une efficacité plus grande ■

Summary

Gene therapy for restenosis

Recurrent luminal diameter narrowing following balloon angioplasty of coronary arteries, referred to as restenosis, remains the main limitation of interventional cardiology. Restenosis is an important target for gene therapy since it is frequent (30 % of patients), costly (estimated \$2 billion annually), refractory to all pharmacological therapies, and related to smooth muscle cell proliferation which is an inviting target for molecular strategies based on our knowledge of gene-regulated cellular proliferation. Because cell division is ultimately controlled by intranuclear events, the protein product of genes selected for their antiproliferative effects usually remain inside the cells. Consequently, transfer of growth inhibitory genes needs to be efficient, *i.e.* to involve a large proportion of smooth muscle cells populating the angioplasty site. To date, adenoviral vectors are, by far, the most efficient vectors to perform *in vivo* arterial gene delivery in normal as well as atherosclerotic arteries. These vectors, as well as others, have been recently used to demonstrate that therapeutic genes encoding cytolytic (herpes virus thymidine kinase gene combined with ganciclovir treatment) or cytostatic (hypophosphorylatable Rb, Gax, eNOS...) products successfully inhibit smooth muscle cell proliferation and related intimal hyperplasia. Despite substantial progress, major technical issues remain to be addressed before gene therapy is applied to clinical restenosis. First generation recombinant adenoviruses evoke both cellular and humoral immune responses leading to local toxicity and transient gene expression. Moreover, low-efficiency of gene transfer to atherosclerotic arteries may further impair the biological effect of antiproliferative genes. Finally, local gene delivery in the vasculature poses the risk of vector dissemination as well as unexpected transgene expression in organs remote from the transfected site.



Département Génie Biologique et Microbiologie Appliquée, ESGBMA



XVI^{es} Journées Méditerranéennes des Glucides L'Isle-sur-la-Sorgue 20-24 mai 1996

Le Groupe Français des Glucides (GFG) tiendra ses XVI^{es} Journées en accueillant ses membres et ses collègues espagnols, portugais et italiens en un Colloque Méditerranéen destiné à promouvoir les multiples aspects de la glycobiochimie. Suivant une tradition bien établie, cette réunion scientifique a pour but de réunir chimistes, biochimistes et industriels travaillant dans les domaines des glucides tels que par exemple, la synthèse organique d'oligosaccharides, l'étude et l'utilisation des polysaccharides ou des glycoconjugués d'intérêt industriel et pharmaceutique.

A l'occasion des Journées, seront distingués les lauréats de la Fondation Bernard Fournet et du Prix du Groupe Français des Glucides qui bénéficie du soutien de la Fondation Benjamin Delessert (Industries Sucrées).

PROGRAMME PRÉLIMINAIRE

Bio-ingénierie des glucides
Synthèse d'oligosaccharides et relations structure-fonction
Analyses structurales
Glycoprotéines recombinantes
Glycosyltransférases
Glycannes et reconnaissance cellulaire
Ciblage à l'aide d'oligosaccharides
Des démonstrations de produits et matériels nécessaires aux glycotecnologies sont prévues.

ORGANISATEURS

Pr. Catherine RONIN (Marseille)
Pr. André PAVIA (Montpellier)
Dr Serge PEREZ (Nantes)
ESIL-GBMA (Dir. Pr. Jean-Pierre BELAICH)

DATE LIMITE D'INSCRIPTION : 31 MARS 1996

Renseignements et bulletins de préinscription peuvent être obtenus auprès de

Pr. Catherine Ronin
Centre de Biotechnologies
ESIL-GBMA Case 925
Faculté des Sciences de Luminy
13288 Marseille Cedex 9
FRANCE
Fax : 33.91.82.86.21