



HAL
open science

Remodelage de la paroi artérielle : étude des aspects de destruction et de reconstruction

Fabrice Schneider

► **To cite this version:**

Fabrice Schneider. Remodelage de la paroi artérielle : étude des aspects de destruction et de reconstruction. Sciences agricoles. Université Paris-Est, 2011. Français. NNT : 2011PEST0101 . tel-00734365

HAL Id: tel-00734365

<https://theses.hal.science/tel-00734365>

Submitted on 21 Sep 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT
UNIVERSITÉ 
— PARIS-EST

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité PHARMACOLOGIE ET BIOTHÉRAPIES

Présentée par

M. Fabrice SCHNEIDER

NÉ LE 24 JUIN 1971 à La Ferté-Bernard

Soutenue le Novembre 2011

**REMODELAGE DE LA PAROI ARTÉRIELLE :
ÉTUDE DES ASPECTS DE DESTRUCTION ET
DE RECONSTRUCTION**

Devant le jury constitué de :

Dr. Véronique EDER
Dr. Yann GOUEFFIC
Pr. Didier PLISSONNIER
Pr. Thierry HAUET
Dr. Nathalie CHEVALLIER
Pr. Eric ALLAIRE

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de Thèse

« Dans tout ce qu'on entreprend, il faut donner les deux tiers à la raison, et l'autre tiers au hasard. Augmentez la première fraction, et vous serez pusillanime. Augmentez la seconde, vous serez téméraire. »

Napoléon Bonaparte-Extrait du *Mémorial de Saint-Hélène*

A mes parents, qui m'ont toujours soutenu malgré les moments difficiles. Je vous aimerai toujours.

A mes enfants, Margot et Maximilien, vous êtes ma fierté et ma plus grande réussite.

A Aude, la vie a décidé que l'on ne poursuive pas notre route ensemble mais ce travail n'aurait jamais été initié sans toi.

A la mémoire de mon grand-père Michel qui était ouvrier, courage, honnêteté, ténacité.

A ma famille, c'est dans ses racines que l'on puise son énergie.

A mes amis Kasra, Olivier et Franck. Il faut aller aux quatre coins de la France pour partager un moment avec vous.

Au Pr. Eric Allaire qui a été l'initiateur de ce travail et m'a donné le goût de la recherche fondamentale. Il restera un modèle pour moi.
Je le remercie pour avoir dirigé ce travail et m'avoir supporté « si longtemps ».

A Marianne Gervais, qui a partagé son expertise avec moi.

A Jian Ping Dai, qui m'a initié aux techniques de micro -chirurgie, quel dératiseur !!!

A Anne-Marie Guinault qui m'a guidé dans mes premiers pas dans le monde du laboratoire comme une « maman ».

A mes collègues doctorants, Faïza et Grégory, pour avoir participé activement à ce travail.

A l'ensemble de l'équipe de l'unité CNRS UMR 7054 au sein du Centre de Recherches Chirurgicales Dominique Chopin.

Au Dr Peter Libby, qui m'a accueilli dans son groupe. J'y ai découvert l'excellence et la compétitivité dans le bon sens du terme.

A Dr Guo Ping Shi, la personne la plus ingénieuse que j'ai cotoyé.

Au Dr. Galina Sukhova, pour sa gentillesse et sa grande expertise en histologie.

A Stéphanie Schulte, ma voisine de « bench ».

A mes collègues et amis expatriés européens, Norbert Gerdes, Andreas Zirlik les teutons, à René Packard, le suisse stambouliote.

A James Canner et Lindsay MacFarlane, l'élève a dépassé les maîtres pour l'anglais de la rue.

Aux membres de mon jury, qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail.

Aux rats Fisher 344 et aux souris C57/BL6. Sans eux, ce travail n'aurait pu se faire.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION GÉNÉRALE	p. 13
DONNEES DE LA LITTERATURE	p. 20
I : Le système artériel et les caractéristiques de la paroi artérielle	p. 20
I.1. Système artériel	p. 20
I.2. Morphologie et composition cellulaire des parois artérielles saines	p. 20
I.2.1 Morphologie de l'artère saine	p. 20
a) intima	p. 20
b) média	p. 21
c) adventice	p. 21
I.2.2 Composition cellulaire de l'artère saine	p. 22
a) cellule endothéliale	p. 22
b) cellule musculaire lisse (CML)	p. 22
c) fibroblaste	p. 23
I.2.3 La matrice extracellulaire (MEC) de la paroi artérielle saine	p. 23
a) Collagène	p. 24
b) Elastine	p. 24
c) Les protéoglycannes (PGs)	p. 25
d) Les glycoprotéines de structure (GPS)	p. 25
I.3. La dégradation de la matrice extracellulaire	p. 25
I.3.1 Les métalloprotéinases matricielles (MMP)	p. 26
a) Caractéristiques des métalloprotéases (MMP)	p. 26
b) Les inhibiteurs des MMP	p. 27
c) La régulation de l'expression des MMP/TIMPs	p. 28
I.3.2 Le système d'activation du plasminogène	p. 29
I.3.3 Les cystéines-protéases et leurs inhibiteurs	p. 29
II : La formation et l'évolution de la plaque athéromateuse chez l'homme	p. 30
II.1 Description et gradation de la maladie athéromateuse	p. 30
II.2 Eléments cellulaires au cours de l'athérosclérose	p. 33
II.3 Les facteurs de croissance	p. 36
II.4 Les facteurs de risque cardio-vasculaires	p. 42
II.5 Physiopathologie de la paroi artérielle au cours de la maladie athéromateuse	p. 45
II.5.1 La réponse adaptative	p. 45
II.5.2 Caractéristiques histologiques de l'athérosclérose	p. 46
II.5.3 Localisation de l'athérosclérose	p. 50
a) considérations hémodynamiques	p. 51
b) notion de cinétique de la paroi artérielle	p. 53
c) effets de l'exercice physique	p. 53

d) localisations préférentielles	p. 54
II.5.4 Evolution de l'athérosclérose	p. 56
a) initiation de la plaque	p. 56
b) progression de la plaque	p. 56
c) régression de la plaque	p. 58
d) plaque stable et compliquée	p. 58
III : La formation et l'évolution de l'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA) chez l'homme	p. 59
III.1. Incidence	p. 59
III.2. Histoire naturelle des AAA	p. 61
III.3. Physiopathologie de la maladie anévrysmale	p. 61
III.4. Contrôle de la formation d'AAA expérimentaux	p. 65
IV : Mmp14 dans la paroi artérielle et les lésions d'athérome et d'anévrisme	p. 65
IV.1. Généralités sur les MMPs	p. 65
IV.2. Structure de MMP-14/MT1/MMP	p. 68
IV.3. Fonction de MMP-13/MT1-MMP	p. 69
a) collagénase interstitielle	p. 70
b) clivage des glycoprotéines et du protéoglycans de la MEC	p. 70
c) clivage de protéines solubles	p. 71
d) clivage de molécules de surface cellulaire	p. 72
IV.4. Régulation de l'activité MMP-14/MT1-MMP	p. 74
IV.5. MMP-14, athérome et anévrisme artériel	p. 75
V : Les Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM)	p. 77
V.1. Caractéristiques in vitro et in vivo des CSM-MO	p. 79
V.2. L'immunomodulation des MSCs	p. 81
V.3. Rôle des CSMs dans l'hématopoïèse	p. 83
V.4. Les CSMs au sein des systèmes de réparation tissulaire	p. 84
VI : Les traitements actuels de la maladie artérielle chez l'homme	p. 86
VI.1. Concept actuel de la plaque athéromateuse: rôle de l'inflammation et ses conséquences thérapeutiques	p. 86
a) l'inflammation dans l'athérogénèse	p. 86
b) conséquences de l'inflammation sur la thérapeutique	p. 90
VI.2. traitements chirurgicaux ou endoprothèses : avantages de l'approche endovasculaire	p. 91
VII : Modélisation animale de la pathologie humaine	p. 93
VII.1. Modélisations animales utilisées pour l'étude sur l'athérome	p. 93

VII.1.1. modèle de la plaque athéromateuse chez la souris : souris LDLr KO	p. 93
VII.1.2. modèle de souris Mmp14 KO	p. 95
VII.2. Modélisation des AAA	p. 99
VII.2.1. modèle d'anévrisme chez le rat	p. 99
VII.2.2. modèle d'organo culture avec des échantillons d'origine humaine	p. 105
VIII Thérapie cellulaire pour les AAA expérimentaux	p. 107
VIII.1 Intérêt des CML pour la thérapie cellulaires des AAA	p. 107
VII.2 La stabilisation d'AAA chez le rat par l'ensemencement des CML syngéniques par voie endovasculaire	p. 109
IX : présentation du projet de thèse	p. 113
IX.1. Intérêt de la compréhension physiopathologique de la rupture de plaque athéromateuse localisée au coronaire	p. 113
IX.2. intérêt de thérapeutiques biologiques utilisant une délivrance endovasculaire	p. 116
IX.3. les objectifs du travail	p. 119
PRESENTATION DES TRAVAUX-ARTICLES	p. 120
I. mise en évidence du rôle collagénolytique de Mmp14 dans un modèle d'athérome chez la souris	p. 120
a) article	p. 120
b) discussion	p. 121
II. Thérapie cellulaire endovasculaire des anévrismes expérimentaux utilisant des cellules souches mésenchymateuses	p. 124
a) article	p. 124
b) discussion	p. 130
DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	p. 134
I. Quels sont les enseignements du rôle collagénolytique de MMP-14 au cours de l'athérome ?	p. 134
II. Quelles sont les controverses issues de l'utilisation des CSMs pour une thérapie cellulaire des AAA au cours de notre étude ?	p. 142
CONCLUSION	p. 154
REFERENCES	p. 155
ANNEXES	p. 231

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La pathologie artérielle est principalement représentée par deux mécanismes diamétralement opposés avec d'un côté une forme de diminution du diamètre de la lumière artérielle, voire une occlusion et l'autre une dilatation de la lumière artérielle. Le premier mécanisme représente l'athérome et le deuxième l'anévrisme. Ces deux mécanismes ont en commun un déséquilibre du remodelage de la paroi artérielle entre la destruction et la reconstruction. L'athérome est caractérisé par un épaissement de la paroi artérielle. L'anévrisme aortique abdominal (AAA) est caractérisé par une altération progressive de la matrice extracellulaire (MEC) dans la paroi aortique soumise à la contrainte hémodynamique. Cette altération entraîne la faiblesse et la dilatation de la paroi, pouvant aboutir à une rupture d'aorte dont la mortalité est de 90%. Une fois formé et sans traitement efficace, l'AAA va continuer de croître jusqu'à la rupture. Le risque de rupture est proportionnel au diamètre externe de l'AAA. Les AAA asymptomatiques d'un diamètre de moins de 50 mm sont surveillés par des méthodes d'imagerie médicale. Au-delà de 50 mm de diamètre, un traitement de remplacement ou de renforcement de la paroi des AAA est proposé, le risque annuel de rupture égalant alors le risque périopératoire du traitement chirurgical. Actuellement, le principe du traitement des AAA est de soustraire la paroi fragilisée de la contrainte hémodynamique, soit par un remplacement aortique lors d'une intervention chirurgicale, soit en déployant une prothèse par voie endovasculaire (endoprothèse). La chirurgie de l'AAA s'accompagne d'une morbi-mortalité importante chez des patients souvent âgés et porteurs de maladies

associées, cardiovasculaires ou autres. La procédure de mise en place d'une endoprothèse a une mortalité moindre que la chirurgie conventionnelle, mais son applicabilité et sa durabilité sont moindres en raison de contraintes anatomiques, et de la possible ré-exposition de la paroi anévrysmale à une contrainte hémodynamique forte, en raison d'endofuites (circulation de sang sous pression entre l'endoprothèse et la paroi anévrysmale) ou d'endotensions (mise en pression du sac anévrysmal sans endofuite décelable, par transmission de la contrainte hémodynamique à travers du thrombus au niveau du collet ou à travers l'endoprothèse). Ces inconvénients limitent l'utilisation des endoprothèses.

Les thérapies biologiques pourraient être une solution alternative aux traitements prothétiques des AAA. Au lieu de remplacer complètement la paroi anévrysmale ou de la soustraire de la contrainte hémodynamique par endoprothèse, une thérapie biologique consisterait, via des agents biologiques (molécules, cellules, médicaments etc...), à diminuer le processus de dégénérescence de la paroi anévrysmale et/ou à promouvoir la réparation de la paroi aortique dégradée. Les thérapies biologiques seront issues de la connaissance de la physiopathologie des AAA. Du fait de la possibilité d'utiliser les techniques endovasculaires pour délivrer les agents biologiques au contact de la lésion aortique, les thérapies biologiques devraient avoir un taux de morbi-mortalité moins important que la chirurgie, à l'instar du traitement endoprothétique. La thérapie génique et la thérapie cellulaire sont deux approches de traitement évaluées dans d'autres pathologies cardiovasculaires, mais pas dans les anévrysmes. Le transfert de matériel vivant à la paroi malade devrait permettre une évolution conjointe de la lésion anévrysmale et des gènes ou des cellules, sans le conflit

entre le vivant et le biomatériau que l'on observe avec les endoprothèses, et ainsi devrait avoir une durabilité supérieure.

Le rôle physiologique de la MEC est d'assurer la solidité et l'élasticité de la paroi artérielle soumise à la contrainte hémodynamique artérielle. L'infiltration par des cellules inflammatoires, le déséquilibre de la balance protéases/anti-protéases vers la protéolyse, et l'insuffisance des activités de réparation de la MEC altérée (cicatrisation) sont responsables de la formation et sans doute de la progression des AAA. Le but des thérapies biologiques est d'inhiber le processus de destruction, d'augmenter la réparation de la paroi.

Il n'existe pas à ce jour un modèle animal idéal pour modéliser la formation et l'évolution des AAA. Nous avons adapté à la thérapie cellulaire un modèle d'AAA par xéno greffe aortique chez le rat. Ce modèle a plusieurs points physiopathologiques communs avec les AAA chez l'humain. Il est très reproductible contrairement au modèle à l'élastase, et la période de croissance du diamètre est suffisamment longue pour programmer un geste interventionnel endovasculaire à visée thérapeutique. Ces caractéristiques du modèle ont permis son utilisation pour démontrer la faisabilité d'une thérapie cellulaire endovasculaire. Ce travail a été possible sur des AAA déjà constitués dans un but thérapeutique (stabiliser la dilatation continue de d'un AAA formé), mais pas dans un but préventif (empêcher une aorte saine de devenir anévrysmale), comme cela avait été publié dans tous les autres travaux expérimentaux utilisant des modèles animaux. Cette modélisation de traitement d'une lésion déjà existante est indispensable au développement des concepts de biothérapie et à leur

validation préclinique, car l'efficacité du traitement est conditionnée par l'environnement cellulaire et moléculaire rencontré dans la paroi par le matériel biologique transféré.

Au cours d'un travail antérieur au sein de l'UMR CNRS 7054, des AAA expérimentaux ont été stabilisés et « cicatrisés » par l'ensemencement endoluminal de cellules musculaires lisses (CML) autologues. Le choix des CML a été motivé en raison de la diminution de 75% du nombre de CML dans la média des AAA chez l'humain. Il a été observé dans les AAA stabilisés une inhibition de l'expression de métalloprotéases, de l'infiltrat inflammatoire, une induction de leurs inhibiteurs et de la synthèse de collagène, de manière paracrine, c'est-à-dire dans le tissu anévrysmal situé en périphérie des cellules ensemencées.

En vue d'un transfert clinique de cette observation, le candidat cellulaire idéal pour cette approche de biothérapie doit être autologue pour se soustraire aux problèmes de rejet immunologique et répondre à plusieurs critères :

- prélèvement et culture faciles
- disponibilité en quantité importante

Or les CML ne répondent pas à ces critères car leur isolement est difficile et leur nombre limité surtout chez des patients âgés qui représentent la grande majorité des patients porteurs d'un AAA.

Les Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM) possèdent l'ensemble de ces caractéristiques car leurs prélèvements et leur amplification in vitro sont de pratiques courantes en clinique et ces cellules ont un caractère multipotent permettant leur différenciation en de nombreux types cellulaires dont les CML. Nous avons donc testé l'ensemencement endovasculaire des CSM sur l'évolution de notre modèle de

xélogreffe aortique et testé son impact sur la balance destruction/reconstruction de la paroi aortique au niveau cellulaire et moléculaire.

Ces CSM ont introduit le concept de niche de différenciation faisant partie intégrante du système de réparation de l'organisme pour répondre à toute agression. On peut donc extrapoler un nouvel aspect de la physiopathologie des anévrismes où la maladie serait secondaire à un déficit des processus de cicatrisation. L'anévrisme serait donc assimilé à une « plaie » aortique. Nous avons donc testé la présence des CSM et leur altération fonctionnelle à partir de fragments de AAA humains.

Conscient que notre modèle de xélogreffe ne peut être assimilé aux AAA athéroscléreux chez l'Homme, nous avons utilisé un système d'organoculture de fragments de AAA d'origine humaine prélevés au bloc opératoire. Ce système nous a permis de tester plusieurs types cellulaires dont les CML et les CSM sur la protéolyse, un effecteur de la destruction inflammatoire de la paroi aortique dans le modèle et dans les anévrismes athérosclérotiques. Ces organocultures nous ont permis de nous rapprocher de la maladie humaine.

A l'opposé, l'athérosclérose est caractérisée par une prolifération des CML au sein de la média correspondant à l'hyperplasie myo-intimale. L'athérosclérose entraîne un rétrécissement de la lumière artérielle pouvant aboutir à des symptômes cliniques en fonction du territoire artériel atteint. Au maximum, cet athérome se complique d'une thrombose complète de la lumière artérielle créant une ischémie tissulaire sous-jacente. Une localisation carotidienne se manifeste par des accidents ischémiques artériels régressifs ou non, avec ou sans séquelle. Une localisation coronarienne aboutit à une angine de poitrine ou angor d'effort et sa thrombose se manifeste par un infarctus du

myocarde. Une localisation aux membres inférieurs aboutit à une claudication intermittente compliquée au stade ultime par une nécrose plus ou moins étendue du membre inférieur. Parmi ces 3 localisations, l'atteinte coronarienne a connu une remarquable évolution dans la compréhension de sa physiopathologie. L'athérogénèse est perçue comme le résultat d'une interaction complexe entre les cellules de la paroi artérielle, le sang et les messages moléculaires échangés entre eux. L'inflammation semble jouer un rôle essentiel à chaque étape de cette athérogénèse. L'ensemble des manifestations secondaires à la thrombose d'une artère coronaire est regroupé sous le terme de Syndrome Coronarien Aigu (SCA). Les $\frac{3}{4}$ des SCA semblent être secondaires à une rupture de la plaque athéromateuse mettant ainsi en contact le centre lipidique de la plaque avec les éléments figurés du sang induisant ainsi la thrombose « in situ ». Cette rupture de plaque est initiée par la rupture du collagène interstitiel, l'élément le plus solide de la Matrice Extra-Cellulaire (MEC). A ce jour, 3 collagénases interstitielles ont été isolées et démontrées. Il s'agit de MMP-1, MMP-8 et MMP-13. Ces 3 enzymes appartiennent à la super famille des métallo-protéases (MMPs) dont la structure commune est la nécessité d'un ion métallique comme co-facteur au sein du site catalytique. A l'heure actuelle, vingt-huit membres ont été décrits. Parmi cette famille, MMP-14 (ou MT1-MMP) est une MMP trans membranaire. Aucune étude *in vivo* n'avait prouvé son activité collagénolytique malgré des preuves *in vitro*. Ainsi pour illustrer le catabolisme de la paroi artérielle, nous nous sommes intéressés à l'activité collagénolytique de MMP-14 dans un modèle *in vivo* d'athérome. Nous avons utilisé le modèle « classique » de l'athérome correspondant à la souris mutante LdLr-KO. La création de la souche murine LdLr-KO/MMP-14-KO a nécessité le passage par une étape

de transplantation de moëlle osseuse chez des souris irradiées. Nous avons élaboré conjointement un test *in vitro* de l'activité collagénolytique utilisant un substrat fluorescent.

DONNEES DE LA LITTERATURE

I : Le système artériel et les caractéristiques de la paroi artérielle

I.1 Le système artériel

La paroi artérielle est un tissu composé de cellules et d'une Matrice ExtraCellulaire (MEC) dont une partie est fibrillaire et assure la solidité de la paroi. Stimulée par différents types d'agressions, la paroi artérielle est capable de développer plusieurs types de réponses, dont certaines sont à l'origine de manifestations pathologiques. La composante fibrillaire hydrophobe et insoluble de la matrice extracellulaire assure la fonction la plus élémentaire de la paroi artérielle qui est de contenir le sang dans la lumière vasculaire. Les anévrysmes, les dissections ou les ruptures artérielles correspondent à des pertes partielles ou totales de la fonction de contention du sang, en rapport avec une atteinte de cette composante de la MEC qui ne peut être dégradée que par des protéases et des forces mécaniques, ou l'association des deux.

I.2. Morphologie et composition cellulaire des parois artérielles saines

I.2.1 Morphologie de l'artère saine (figure 1)

a) intima

L'intima est composée d'une monocouche de cellules endothéliales composant l'interface entre le sang et les vaisseaux et reposant sur une lame basale. La limite entre l'intima et la média est marquée par la limitante élastique interne (LEI). Dans des situations d'adaptation au flux et dans des situations pathologiques de réponse à des stimuli d'expansion cellulaire et d'accumulation de la MEC, l'intima peut devenir hyperplasique et constituer une perturbation et/ou un obstacle à l'écoulement sanguin.

b) média

La média est composée des cellules musculaires lisses (CML) contenues dans une matrice extracellulaire riche en collagènes fibrillaires de types I et III et en fibres élastiques. Le nombre de lames élastiques est plus important dans l'aorte ascendante (environ 56) et décroît tout le long de l'aorte descendante pour arriver à environ 26 lames dans l'aorte abdominale. La média constitue un élément important rendant compte des propriétés mécaniques de la paroi. La média artérielle est responsable des fonctions vasomotrices, de contention du sang, d'amortissement des variations de pression artérielle et de restitution de l'énergie en diastole.

c) adventice

L'adventice est la tunique la plus externe de la paroi artérielle. Elle est formée de fibroblastes et de tissu conjonctif lâche très riche en collagènes fibrillaires qui confèrent à l'artère sa résistance à la rupture. L'adventice et la média sont séparées par une limitante élastique externe (LEE).

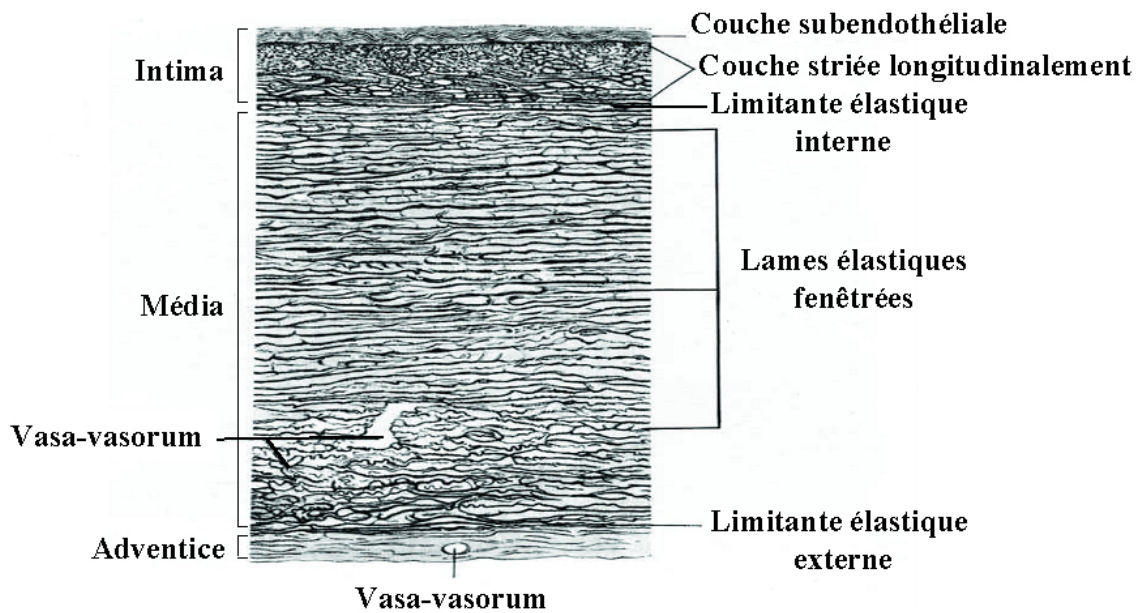


Figure 1: Structure de la paroi artérielle

I.2.2 Composition cellulaire de l'artère saine

a) cellule endothéliale

Les cellules endothéliales forment une monocouche qui tapisse la face luminale des artères et exercent un rôle essentiel dans plusieurs fonctions physiologiques (Braquet et al 1994, Beagehold 1998). Elles constituent une surface anti-thrombotique en inhibant la coagulation et induisant la fibrinolyse : la synthèse d'activateur tissulaire de plasminogène (t-PA), de thrombomoduline et de prostacycline (PGI₂), qui est un puissant inhibiteur de l'aggrégation plaquettaire, lui confère ses propriétés anti-coagulantes.

b) cellule musculaire lisse (CML)

Les CML sont multifonctionnelles. Elles contrôlent le tonus artériel (équilibre vasoconstriction/vasodilatation). La régulation de ce tonus artériel s'effectue

principalement selon deux modalités : signaux peptidiques (angiotensine II...) et nerveux (système sympathique). D'autre part, les CML sont les principales cellules qui élaborent la matrice extracellulaire (MEC) de la média et de l'intima (Schwartz et al 1995). Les CML participent à la stabilisation et à l'adaptation de la paroi artérielle en réponse aux contraintes et aux lésions mécaniques, par hypertrophie et par hyperplasie. Enfin, des résultats accumulés dans l'UMR 7054 suggèrent que les CML jouent un rôle central dans l'homéostasie de la paroi artérielle en la protégeant de l'inflammation et de la protéolyse. Cet aspect sera largement développé dans notre travail.

c) fibroblaste

Les fibroblastes sont principalement localisés à l'adventice de l'artère. Leur rôle primordial est la synthèse des éléments de la MEC et notamment les collagènes et l'élastine. Les fibroblastes expriment de manière constitutive du Facteur Tissulaire, un activateur de la voie extrinsèque de la coagulation, limitant ainsi l'extravasation sanguine lors des ruptures de la paroi artérielle.

I.2.3 La matrice extracellulaire (MEC) de la paroi artérielle saine

La MEC assure aux tissus leurs propriétés mécaniques et physico-chimiques et fournit un échafaudage pour l'ancrage et la migration des cellules, influence leur phénotype et leur fonction et ainsi confère ou maintient la différenciation cellulaire. C'est un réservoir des facteurs de croissance et autres morphogènes. La MEC est composée de plusieurs éléments assurant chacun des fonctions spécifiques: les collagènes fibrillaires assurent la résistance mécanique; l'élastine confère l'élasticité aux tissus; les

protéoglycannes contrôlent l'hydratation, l'équilibre hydroélectrique et fixent de nombreuses cytokines; et les glycoprotéines de structure assurent la jonction entre les cellules et la matrice extracellulaire.

a) Collagènes (Robins et al. 1995, Robert et al 1987)

Les collagènes de types I et III, de structure fibrillaire, sont présents dans toute la paroi vasculaire où ils représentent environ 80-90% des collagènes totaux. Ils sont synthétisés par les fibroblastes et les cellules musculaires lisses. Dans l'intima, les cellules endothéliales synthétisent du collagène de type III. Le collagène de type I, le plus abondant, assure le support structural du vaisseau, le collagène de type III est impliqué dans l'élasticité et l'extensibilité de la paroi. Une mutation sur le gène codant pour le collagène de type I chez la souris est associée à des ruptures léthales des vaisseaux (Lohler et al 1984). Le collagène de type V est localisé autour des CML et près des membranes basales qui régulent la migration, la croissance et la différenciation cellulaire. Le collagène de type IV est spécifique des membranes basales soutenant les cellules endothéliales et entourant les CML des vaisseaux.

b) Elastine (Robins et al 1995, Robert et al 1987, Jacob 1993)

L'élastine est une protéine fibreuse formée essentiellement d'acides aminés hydrophobes. Elle représente le composant majoritaire des fibres élastiques (70-90%) qui jouent un rôle primordial dans l'élasticité et l'extensibilité de la paroi artérielle. La teneur en élastine dans les vaisseaux est directement proportionnelle aux forces de pression exercées sur ces vaisseaux: les artères proches du coeur sont riches en élastine; à

l'inverse, les vaisseaux soumis à des pressions plus faibles sont riches en collagènes. L'élastine est synthétisée par les cellules endothéliales, les CML et les fibroblastes. Dans les CML, les contraintes mécaniques, le GMPc (Guanosine monophosphate cyclique), les glucocorticoïdes, le TGF- β augmentent la synthèse d'élastine.

c) Les protéoglycannes (PGs) (Fosang et Hardingham 1996)

Les PGs contrôlent la perméabilité tissulaire et les mouvements des ions à cause de leur forte charge électrostatique négative. Leur localisation à l'interface membrane plasmique/MEC leur permet de contrôler l'intégrité structurale des tissus et d'influencer de nombreuses fonctions cellulaires comme la croissance, la différenciation, l'adhésion et la migration. Enfin, de par leur aptitude à former des complexes avec les autres molécules de la MEC, les PGs sont considérés comme essentiels pour le dépôt de la matrice synthétisée par les CML vasculaires.

d) Les glycoprotéines de structure (GPS)

Elles sont caractérisées par une grande insolubilité et leur rôle est d'assurer la cohésion entre les membranes cellulaires et la MEC.

I.3. La dégradation de la matrice extracellulaire

L'hydrolyse des macromolécules de la MEC est impliquée au cours de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques tels que l'involution utérine du post-partum, la morphogénèse, la croissance, l'angiogénèse, la migration cellulaire, la cicatrisation etc... La dégradation de la MEC peut être accomplie par deux mécanismes

distincts (Murphy et al 1992, Alexander et al. 1999) : la sécrétion extracellulaire d'enzymes protéolytiques actives à pH neutre et l'internalisation des éléments matriciels et leur dégradation dans les lysosomes par l'intermédiaire des enzymes lysosomiales fonctionnant à pH acide. Les principaux rôles de la protéolyse extracellulaire, non inflammatoire, appartiennent à la classe des protéases fonctionnant à pH neutre et sont regroupés en deux grandes familles : les protéases à sérine (activateurs de plasminogène : u-PA, t-PA) et les métalloprotéinases matricielles ("Matrix Metalloproteinases" ou MMP) (Dollery et al 1995, Mignatti 1995). Les sérines-protéases sont les activateurs des MMP.

Les cystéines-protéases (cathepsines) sont une troisième famille de protéases actives sur la MEC artérielle impliquée dans le remodelage vasculaire (Turk et al.1991).

I.3.1 Les métalloprotéinases matricielles (MMP)

Les MMP constituent une sous-famille des métalloprotéinases à zinc. Elles sont synthétisées le plus souvent sous forme inactive par de nombreuses cellules mésenchymateuses, cellules épithéliales, cellules hématopoïétiques dont les monocytes/macrophages, lymphocytes et polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs). Une faible quantité de MMP est présente sous forme active dans les tissus sains. Elles ont la capacité de dégrader la quasi-totalité des composants de la matrice extracellulaire (MEC) (Barro et al 1996, Nagase et Woessner 1999). Les MMP ont d'autres substrats non matriciels qui en font des acteurs importants de la survie cellulaire et de processus comme l'inflammation et la fibrinolyse. L'activité protéasique est régulée par le rapport entre les protéases actives et leurs inhibiteurs.

a) Caractéristiques des métalloprotéases (MMP)

On distingue 6 groupes de MMP classés selon leurs structures primaires et leurs spécificités de substrats (Cuvelier et al 1997) :

1) Les collagénases : MMP-1, MMP-8 et MMP-13

2) Les gélatinases : MMP-2 et MMP-9

3) Les protéoglycannases : MMP-3, MMP-10, MMP-11

4) Les élastases : MMP-7, MMP-12

5) Les métalloprotéinases membranaires : MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP, MT5-MMP, MT6-MMP

6) Autres

Les gélatinases sont caractérisées par leur capacité à dégrader les collagènes dénaturés mais peuvent aussi cliver les collagènes natifs de types IV, V, VII, X et l'élastine. La capacité élastolytique de la MMP-9 représente environ 30 % de celle de l'élastase leucocytaire.

Les MT-MMP possèdent un domaine transmembranaire, ne sont pas sécrétées mais restent fixées à la surface cellulaire. MT1-MMP est la mieux étudiée et se comporte comme un récepteur cellulaire de la MMP-2. TIMP-2 et TIMP-3 réguleraient l'activité de MT1-MMP en inhibant de façon compétitive sa liaison à la proMMP-2.

La plupart des MMP sont synthétisées sous forme de zymogène et nécessitent un clivage protéolytique pour leur activation (Cuvelier et al 1997, Nagase 1997). L'activation, *in vivo* des MMP ferait intervenir une cascade protéolytique impliquant des sérine-protéases, dont la trypsine et la plasmine, ainsi que des MMP (Murphy et al 1992).

b) Les inhibiteurs des MMP

L'activité catalytique des MMP est contrôlée par les TIMP "Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase". Quatre TIMPs (TIMP-1, 2, 3 et 4) sont aujourd'hui connus (Gomez et al 1997, Edwards et al 1996). TIMP-1 et TIMP-2 peuvent inhiber l'activité de toutes les MMP. En dehors de leur propriété inhibitrice, les TIMP sont de véritables facteurs de croissance vis-à-vis de nombreuses cellules (Hayakawa et al 1992): le TIMP-1 stimule, *in vitro*, la croissance des CML, fibroblastes et cellules endothéliales; le TIMP-2 induit la croissance des fibroblastes (Hayakawa et al 1994). Ainsi, les TIMP pourraient jouer un rôle non seulement en protégeant la dégradation de la matrice mais également en participant à la cicatrisation tissulaire après un endommagement.

c) La régulation de l'expression des MMP/TIMPs

La régulation de l'expression des MMP/TIMPs est modulée par les facteurs de croissance, les hormones et les cytokines (Borden et Heller 1997). La plupart des MMP, à l'exception de la MMP-2 et des MT-MMP ne sont pas exprimées de manière constitutive dans les tissus sains. Leur expression est fortement régulée par les interactions matrice-cellule par l'intermédiaire d'intégrines, et cellule-cellule, par exemple par l'intermédiaire du couple CD40 - CD40 L entre les lymphocytes T et les CML. Les cytokines jouant un rôle dans la stimulation ou l'induction de la synthèse des MMP sont: IL-1 β , PDGF, TNF- α ... et les esters de phorbol (Galis et Muszynski et al 1994). A l'inverse, le TGF β 1 (Edwards et al 1987), les corticostéroïdes et l'acide rétinoïque ont un rôle plutôt inhibiteur. Les interleukines (IL-1 β , IL-6), les esters de phorbol, le TGF β 1, les acides rétinoïques, l'EGF et l'oncostatine stimulent l'expression de TIMP-1.

Ainsi, l'expression des MMP et de leurs inhibiteurs est modulée dans le contexte du tissu pathologique, entraînant une dégradation de la MEC ou, à l'inverse, une accumulation de MEC et de tissu. Toute cellule, capable d'exprimer des MMP, exprime également l'un ou l'autre des TIMPs. La protéolyse terminale dépend donc des types cellulaires dans les tissus, et des stimuli qui déterminent leur phénotype.

I.3.2 Le système d'activation du plasminogène

Le système fibrinolytique se compose de plusieurs membres comportant des enzymes protéolytiques appartenant à la classe des protéases à sérine: activateur du plasminogène de type urokinase (u-PA), activateur du plasminogène tissulaire (t-PA), plasmine. Les inhibiteurs de ces enzymes sont les inhibiteurs des activateurs du plasminogène (PAI) et l' α_2 -antiplasmine (Dollery et al 1995, Mignatti 1995, Vassalli et al 1991). Lorsque le plasminogène est activé en plasmine, celle-ci peut non seulement dégrader la MEC telle que la fibrine, mais aussi activer les pro-MMP en MMP. Par exemple, ces sérines protéases sont capables d'activer la proMMP-3 en MMP-3, qui peut à son tour activer la proMMP-1 et la proMMP-9 (Newman et al 1994). Si les enzymes du système d'activation du plasminogène ne sont pas actives directement sur la MEC, elles modulent la protéolyse matricielle de façon déterminante par ses activations sur les autres protéases (Bobik et al 2003, Allaire et al. 1998).

I.3.3 Les cystéines-protéases et leurs inhibiteurs

Les cystéines-protéases sont une autre famille de protéases, comprenant cathepsin B, L and S. Leurs activités protéolytiques sont contrôlées par les inhibiteurs : stéfine, cystatine et kininogène (Turk et Bode1991).

II : La formation et l'évolution de la plaque athéromateuse chez l'homme

II.1 Description et graduation de la maladie athéromateuse

La plaque d'athérome a été traditionnellement divisée en 3 catégories selon les caractéristiques morphologiques et la chronologie de la lésion.

- la *strie lipidique* correspond au stade précoce de la maladie : elle est présente dans l'enfance. L'examen macroscopique montre des bandes jaunes à la surface de l'intima au niveau de bifurcation artérielle. L'examen histologique montre des lymphocytes T et des macrophages riches en lipide : les cellules spumeuses (« *foam cells* »). (Stary 1989).
- *La lésion fibrolipidique* est l'étape suivante. On retrouve à l'examen histologique une alternance de couches cellulaires de macrophages et lymphocytes T intercalées avec des couches de CML. L'ensemble est entouré d'une Matrice Extra Cellulaire riche en collagène, fibres élastiques et protéglycanes (Ross 1995).
- *La plaque fibreuse* est le stade avancé de la maladie. On retrouve à l'examen macroscopique une réduction du diamètre interne de l'artère provoquant des symptômes cliniques. Il existe un « cœur lipidique » entouré d'une coque fibreuse composée d'un nombre plus ou moins important de CML et de tissu conjonctif principalement représenté par le collagène. Les lésions avec une coque fibreuse

épaisse et dense ont tendance à être stables alors que les plaques ayant une coque irrégulière et fine sont jugées instables. (Ross 1995)

En 1995, l'American Heart Association (AHA) a proposé une graduation des lésions athéromateuses humaines basée sur les données histologiques et structurales des plaques (Stary 1995)(fig. 2). Les lésions de type I et II sont des stades précoces infra-clinique observés dans l'enfance et chez l'adulte jeune.

- Lésions de type I : elles correspondent à une augmentation du nombre de macrophages intimaux et à l'accumulation de lipides au sein des macrophages, phase initiale de la formation des cellules spumeuses.
- Lésions de type II : elles incluent les « stries lipidiques » mais pas uniquement. Elles sont caractérisées par une augmentation des cellules spumeuses et de macrophages et la présence de CML riches en lipide. Des lymphocytes T et des mastocytes sont aussi présents.
- Lésions de type III : elles sont intermédiaires entre les lésions de type II et de type IV correspondant à l'athérome mature. On retrouve les mêmes caractéristiques que les lésions de type II mais complétées de dépôts extra cellulaires de lipide désorganisant les couches de CML.
- Lésions de type IV ou *athéroma*: elles sont caractérisées par la présence d'un « cœur lipidique » au sein de la paroi due à la confluence des dépôts lipidiques extra-cellulaires. On observe à ce stade un épaissement de la paroi artérielle sans modification du diamètre de la lumière artérielle.

- Lésions de type V : On observe à ce stade une coque fibreuse due à la prolifération de tissu conjonctif. Elles apparaissent le plus fréquemment au cours de la 4^e décennie et peuvent provoquer des symptômes cliniques.
- Lésions de type VI : ce sont les plaques compliquées. Elles sont responsables de la morbi-mortalité imputable à l'athérosclérose. Il existe une rupture de l'intima responsable au niveau macroscopique d'une ulcération et/ou hémorragie de la plaque. Ce phénomène peut être la source de complications emboliques ou thrombotiques, elles-mêmes provoquant la plupart du temps une ischémie aiguë. Cette ischémie peut mettre en jeu le pronostic vital du patient ou son pronostic fonctionnel en fonction du territoire atteint.

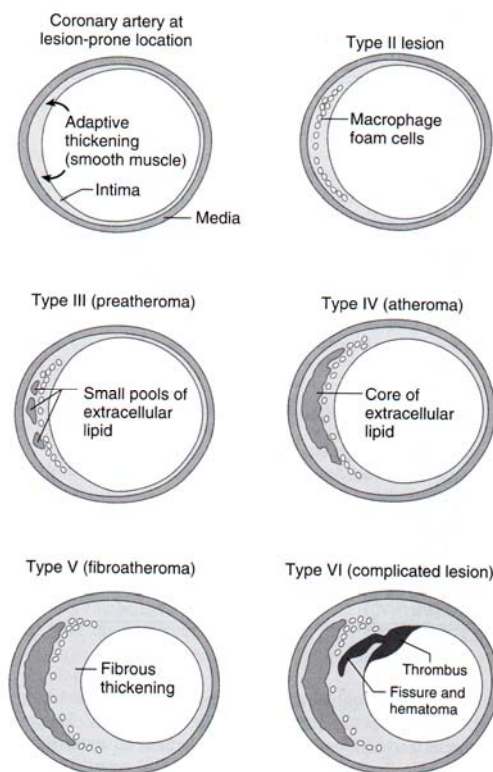


Fig. 2 Classification des lésions athéromateuses selon AHA 1995.

Les lésions sont classées de I à VI en fonction des caractéristiques histologiques et structurales des plaques athéromateuses

II.2 Eléments cellulaires au cours de l'athérosclérose

- Les cellules endothéliales

La dysfonction des cellules endothéliales est un événement initial conduisant à la formation de la plaque athéromateuse. Les cellules endothéliales ont plusieurs fonctions incluant la régulation de la coagulation, le contrôle de la perméabilité et l'échange de fluide et/ou molécules entre le plasma et la paroi artérielle. Le tonus vasculaire est modulé par la production et la sécrétion d'oxyde nitrique (NO), prostacycline (PGI₂), endothéline et d'angiotensine II par l'endothélium. Les cellules endothéliales produisent et secrètent également un nombre important de facteurs de croissance et de cytokines.

La dysfonction endothéliale apparaît précocement au cours de l'athérogénèse malgré l'absence de rupture de l'intégrité de l'endothélium. Une de ces manifestations est l'atteinte du transport du LDL-oxydé à travers l'endothélium aboutissant à l'accumulation de LDL-oxydé en sous-intimal. Ces LDL-oxydés altèrent le métabolisme du NO induisant une vasoconstriction anormale et une augmentation de l'adhérence et de l'aggrégation plaquettaire à la surface endoluminale de l'endothélium (Flavahan 1992).

Au stade précoce de l'athérosclérose, on observe une production importante par les cellules endothéliales de molécules d'adhésion inter cellulaire telles que ICAM-1, Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) et Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule (PECAM). Ces molécules favorisent l'adhérence de cellules inflammatoires telles que lymphocytes et monocytes, ainsi que les plaquettes à la surface de l'endothélium (Springer 1990, Berliner et al. 1990).

Sous stimulation, les cellules endothéliales secrètent de nombreuses cytokines et facteurs de croissance tels que Platelet-derived Growth Factor (PDGF), basic Fibroblast Growth

Factor (FGF), Transforming Growth Factor- β (TGF β), Insulin-like Growth Factor-I (IGF-1) et l'Interleukine 7 (IL7). L'ensemble aboutit à l'attraction et à la prolifération de CML et de cellules inflammatoires (Ross 1995).

- Les macrophages

Les macrophages sont observés au stade précoce de la maladie athéromateuse. Leur rôle normal est la présentation anti génique aux lymphocytes T. Ils sont issus de l'adhérence des monocytes circulants du sang à la surface de l'endothélium puis à leur migration dans l'espace sous endothélial où ils se différencient en macrophages. En phagocytant le LDL-oxydé, ils se transforment en cellules spumeuses (ou *foam cells*). Ainsi activées, elles produisent des cytokines stimulant les cellules endothéliales à produire plus de chémo attractant vis à vis des monocytes circulants du sang. L'ensemble aboutit à un rétro contrôle positif. Parmi les facteurs de croissance et cytokines produites par les *foam cells*, on retrouve Monocyte Colony-Stimulating Factor (M-CSF), Granulocyte-Monocyte CSF (GM-CSF), PDGF, Epidermal Growth Factor (EGF), FGF, TGF- α , TGF- β , Vascular Endothelial cell Growth Factor (VEGF), Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) (Ross 1995).

- Les lymphocytes T

Malgré la présence de lymphocytes T au sein des plaques athéromateuses, leur rôle reste non élucidé. Ces cellules produisent des chémo-attractants et des cytokines, tels Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), interféron- α (INF- α), GM-CSF et Il-2, capables de stimuler et d'activer les CML et les macrophages au sein de la plaque (Ross 1995). La présence de lymphocytes polyclonales de type CD4 et CD8 suggère une part immunologique dans la genèse de l'athérosclérose ; ces lymphocytes T sont présentes sous forme activées car

elles expriment un taux élevé de Récepteur à l'IL2 et IFN- α . (Hansson et al 1989). De plus, l'initiation et la progression de la maladie athéromateuse pourraient être dues en partie à l'activation du complément. Cette activation du complément se fait par la voie classique, par dépôt de complexe immunitaire au sein de la paroi artérielle ou par création d'un complexe anticorps-antigène, ou par une autre voie indépendante des anti-corps. Le cholestérol est un activateur potentiel du complément (Torzewski et al 1997).

Cette activation du complément aboutit à la production de molécules pro-inflammatoires telles que C5a et C3a, modifiant la perméabilité membranaire et activant le recrutement des leucocytes, ainsi que la production de MAC (Membrane Attack Complex). Ce dernier, dont la présence au sein de la coque fibreuse de la plaque a déjà été démontrée (Rus et al 1986), stimule la production et la sécrétion de nombreux facteurs de croissance tels que FGF, PDGF, MCP-1, de cytokines (TNF- α , IL-8) ou de molécules d'adhésion (P-selectine, ICAM-1) par les CML et les cellules endothéliales (Torzewski et al 1997).

- Les Cellules Musculaires Lisses (CML)

Elles sont normalement localisées au niveau de la média. Au cours de l'athérogénèse, il existe une migration des CML dans l'intima provoquant un épaissement de celle-ci. Cette migration est sous le contrôle d'au moins 20 différents chémo-attractants sécrétés par les cellules endothéliales, les plaquettes, les macrophages et les CML eux-mêmes (Corson et Berk 1993). La prolifération des CML au sein de l'intima participe au rétrécissement de la lumière artérielle au cours de l'athérosclérose. On retrouve 2 phénotypes (Aaronson 1991). La forme « contractile » où les cellules sont riches en myofilaments dans le cytosol ; elles régulent le tonus pariétal de l'artère. Après stimulation, ces cellules peuvent se transformer en un phénotype « sécrétant », où il

existe une disparition des myofilaments au profit d'un important réticulum endoplasmique et d'appareil de Golgi. Ce phénotype est capable de produire et de sécréter une grande quantité de cytokines, de facteurs de croissance ainsi que des éléments de MEC dont le collagène.

- Les Plaquettes

L'adhésion et l'aggrégation plaquettaire apparaissent au stade précoce de l'athérosclérose. Outre la formation de thrombus directement responsable des complications thrombo-emboliques au cours de l'athérosclérose, les plaquettes produisent des facteurs de croissance et des molécules vaso-actives telles que PDGF, TGF- α , TGF- β , EGF, IGF-1, Thromboxane A₂, sérotonine et les P-sélectine (Ross 1995). Ces molécules sont responsables du recrutement et de l'activation des CML et des leucocytes. L'importance des plaquettes au cours de la formation de l'athérosclérose a été démontrée par des expérimentations *in vivo*. Des modèles expérimentaux chez le lapin et le cochon ont montré que la création de thrombopénie ou la mutation du facteur von Willebrand diminuaient la formation d'athérome après régime riche en cholestérol (Moore et al 1976, Fuster et al 1978).

II.3 Les facteurs de croissance au cours de l'athérosclérose

Ils influencent la différenciation et la prolifération cellulaires afin de maintenir la croissance de l'organisme. Ils interviennent aussi dans les processus pathologiques telles que l'athérosclérose en influençant le cycle cellulaire ainsi que la mobilité cellulaire, principalement les CML (Zerwes et Risau 1987). Leur mécanisme est médié par la liaison à un récepteur spécifique au niveau de la membrane intercellulaire entraînant une cascade

de réactions aboutissant à une modification de la différenciation, la prolifération, ou le chimotactisme (Baird et Bohlen 1990, Zerwes et Risau 1987, Ross et al 1974).

- cycle cellulaire et rôle des facteurs de croissance.

La prolifération cellulaire impose le passage des cellules de la phase quiescente (G_0) à la phase G_1 sous le contrôle de PDGF, FGF, et EGF. La progression dans cette phase impose des facteurs tels que l'insuline et IGF-1. Si la progression en phase G_1 stoppe, les cellules retournent en phase G_0 , sinon elles passent en phase S. La phase S implique la duplication de l'ADN et la réplication chromosomique. La mitose interviendra à la phase M après le passage en phase G_2 . Certains facteurs de croissance tel que TGF- β peuvent inhiber la progression des cellules dans la dernière partie du cycle cellulaire.

- Récepteurs des facteurs de croissance et signal de transduction.

Ces récepteurs appartiennent la famille des Récepteurs Tyrosine Kinases (RTK). Ces récepteurs comportent une structure commune comportant un domaine extra-cellulaire (où se localise le site récepteur au facteur de croissance), un domaine trans membranaire assurant l'ancrage du récepteur à la membrane cellulaire, un domaine intra-cellulaire en contact avec le cytoplasme de la cellule (fig 3). Ces récepteurs sont répartis en 3 classes en fonction des sous unités présentes et de la présence ou non de zone riche en cystéine (Yarden et Ulrich 1988) (fig. 4).

Le domaine intra cellulaire joue un rôle crucial dans la transduction du signal (Brugge 1993). La fixation du facteur de croissance entraîne la dimérisation ou la polymérisation d'au moins 2 domaines intra-cellulaires. Lesquels sont activés par phosphorylation. Cette phosphorylation entraîne alors la fixation sur des sites spécifiques de molécules intra cellulaires qui sont activées à leur tour par phosphorylation. Ces sites de reconnaissance

intra cellulaire sont Src Homologue-2 et -3 (SH-2 et SH-3) (fig. 5). Ces molécules sont spécifiques de voie de signalisation intra cellulaire. Des molécules telles que Guanosine triphosphate-activating protein (GAP), Phospholipase-C (PLC), et Phosphatidylinositol-3 Kinase (PIK-3) sont concernées par la cascade d'activation des RTK. Les voies de signalisation sont par exemple la voie *Ras* et *Jak-STAT*. La voie *Ras* comporte l'activation par phosphorylation de la protéine *Ras* fixée à la face cytoplasmique de la membrane cellulaire. Celle-ci active à son tour la protéine *Raf-1* qui phosphoryle *MAPK* (Mitogen-Activated Protein Kinase). Une fois activée, *MAPK* stimule la phosphorylation de facteur de transcription dans le noyau (Brugge 1993). La voie *Jak-STAT* (Signal Transducers and Activators of Transcription) comporte l'activation de *STAT* par les enzymes kinases *Jak* (Schindler et al 1992, Zhong et al 1994). L'activation des gènes sous la dépendance des facteurs de transcription activés entraîne l'effet biologique du facteur de croissance.

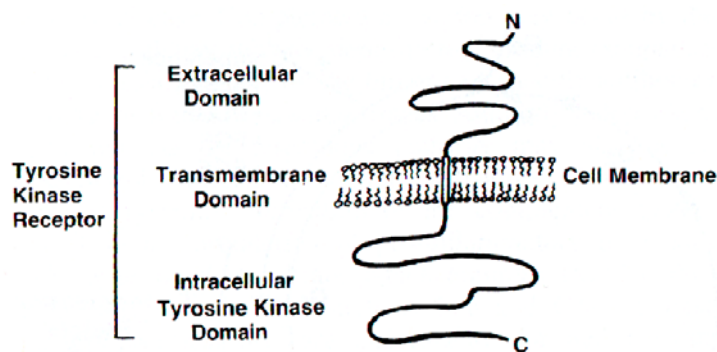


Fig.3 : Structure générale des Récepteurs Tyrosine Kinase

Le segment N-terminal est extra cellulaire et le segment C-terminal est intra-cytoplasmique. (D'après : Sidway AN. Peptide growth factors and their role in the proliferative diseases of the vascular system. Dans Sidway AN, Sumpio BE, DePalma RG : The Basic Science of Vascular Disease. Armonk, NY, Futura Publishing, 1997, pp 127-149)

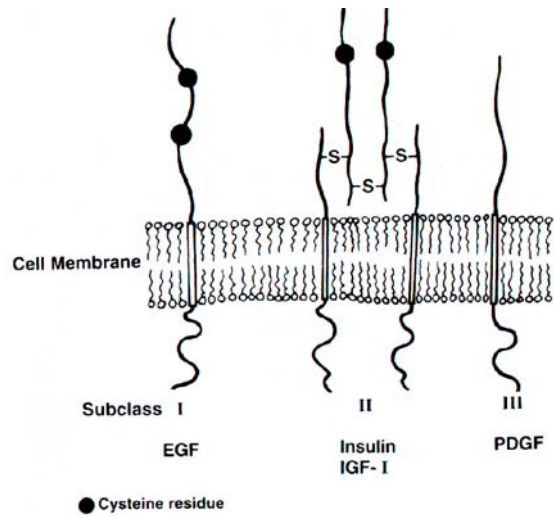


Fig.4 : Les sous-classes de Récepteurs Tyrosine Kinase

La Sous-classe I est représentée par le récepteur à l'EGF composé de 2 domaines riches en cystéine (●). La sous-classe II est représentée par les récepteurs à l'insuline et à l'IGF-I. Elles est composée de 2 sous-unités α et 2 sous-unités β reliées entre elles par des ponts di sulfures. Les domaines riches en cystéine sont localisés sur les sous-unités α . La sous classe III est représentée par le récepteur au PDGF où il n'existe aucun domaine riche en cystéine. (D'après : Sidway AN. Peptide growth factors and their role in the proliferative diseases of the vascular system. Dans Sidway AN, Sumpio BE, DePalma RG : The Basic Science of Vascular Disease. Armonk, NY, Futura Publishing, 1997, pp 127-149)

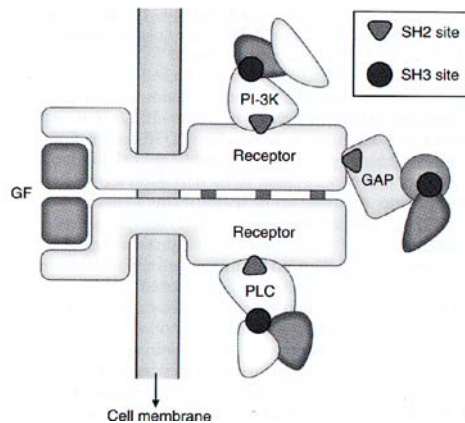


Fig. 5 : Mode de transduction intra cellulaire du signal

Après fixation sur le domaine extra cellulaire, le domaine intra cellulaire interréagit avec les domaines SH-2 et SH-3 au niveau de molécules intra cellulaire impliquées dans la cascade de transduction. Ces molécules sont Guanosine triphosphate-Activating Protein (GAP, Phospholipase-C (PL-C) et Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI-3K) binding protein.

- Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)

Initialement isolé à partir des plaquettes, ce facteur est sécrété par de nombreux types cellulaires incluant les CML vasculaire (CML_v), les fibroblastes et les cellules endothéliales (Dicorleto 1983, Seifert et al 1984). Ce facteur comporte 3 isoformes (AA, BB et AB) et agit via un récepteur ayant 2 sous-unités α et β (Seifert et al 1989). Le PDGF a un rôle vaso constricteur dose-dépendant (Berk 1986). Son action principale est de stimuler la différenciation et la prolifération des CML_v ; cette action semble être principalement par mode paracrine ou autocrine car sa durée de demi-vie, très courte, est de l'ordre de 2 min (Seifert et al 1984). Ce facteur joue aussi un rôle dans le remodelage tissulaire en stimulant la sécrétion de collagène mais aussi de collagénase par les fibroblastes (Owen et al 1982, Bauer et al 1985). Enfin le PDGF a un effet chémotactique sur les CML_v mais aussi les neutrophiles et les fibroblastes.

- Fibroblast Growth Factor (FGF)

Il existe plusieurs formes de ce facteur qui est sécrété par de nombreux types cellulaires. Son action principale est le remodelage de la MEC en stimulant la production de collagène (Saksela et al 1988). Il stimule aussi l'angiogénèse en provoquant la prolifération des cellules endothéliales et des CML_v dans un contexte de modèle d'athérome induite par traumatisme endoluminal (Linder et al 1990).

- Insuline et Insulin-like Growth Factors (IGF)

En dehors du rôle majeur de l'insuline dans la régulation de la glycémie, celle-ci ainsi que les IGF ont un rôle mitogène non négligeable. La sécrétion de l'insuline s'effectue par le pancréas de façon discontinue alors que la sécrétion des IGF se fait par le foie et les tissus de façon continue. De plus, IGF circule dans le sang lié à une protéine de transport.

Les structures des récepteurs à l'insuline et à l'IGF I sont assez proches (fig. 4). Le récepteur à l'IGF-II se démarque par un large domaine extra cellulaire. Des études expérimentales utilisant des anti-corps spécifiques anti R-IGF-I ont montré que l'insuline, IGF-I et IGF-II ont un rôle pro-mitotique principalement via leur fixation sur R-IGF-I (Avena et al 1999). L'action mitotique de l'insuline et des IGF se porte principalement sur les cellules endothéliales et les VSMC.

- Epidermal Growth Factor (EGF) et Transforming Growth Factor- α (TGF- α)

TGF- α est un analogue de EGF dont il partage la moitié de la structure en commun. De plus, TGF- α a une haute affinité pour le récepteur à l'EGF qui est exprimé dans la plupart des types cellulaires (Marquardt et al 1983). Outre la stimulation des cellules épithéliales, ces facteurs stimulent la prolifération et la migration des cellules endothéliales ainsi que leur organisation en tube, étape essentielle à la néo-angiogénèse (Sato Y 1993).

- Transforming Growth Factor- β (TGF- β)

Initialement dénommé « sarcoma growth factor », ce facteur fut appelé Transforming Growth Factor- β (TGF- β) à cause des modifications morphologiques observées chez les cellules animales à son contact (Roberts et al 1980). Il y a au moins 5 membres composés de 112 à 114 amino acides, dont l'action est médiée par 4 récepteurs spécifiques dont leurs poids moléculaire est variable (Massague et al 1990). Le TGF- β 1 a des effets différents en fonction du type cellulaire et de son degré de différenciation. Ces effets sont une stimulation de la prolifération cellulaire ainsi que sur la différenciation mais il interfère aussi avec l'effet proliférant d'autres facteurs de croissance, tel que l'insuline pour laquelle TGF- β 1 joue un rôle inhibiteur (Sporn et al 1987). Ce facteur joue surtout

un rôle important pour la sécrétion de nombreuses protéines extra cellulaires et leur accumulation dont le collagène et l'élastine (Centrella et al 1987).

- Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Ce peptide stimule la prolifération des cellules endothéliales ainsi que la prolifération de néo-vaisseaux au sein du myocarde et de la circulation périphérique. Il augmente aussi la perméabilité inter cellulaire au niveau de la peau; ce dernier effet crée un milieu riche en fibrines qui peut servir de substrat pour la prolifération des cellules endothéliales (Senger et al 1987). Son action est médiée par au moins deux types de récepteurs (Dvorak et al 1987). VEGF a été employé comme support de thérapie génique pour créer une néo angiogénèse dans des modèles murins d'ischémie aiguë par ligature de l'artère iliaque primitive (Mack et al 1998) mais aussi chez des patients atteints d'ischémie critique (Isner et al 1996) et d'ischémie myocardique (Lee et al 2002, Isner 2002). Le gène codant était incorporé dans une séquence d'adénovirus. Les résultats furent encourageants avec une amélioration du taux de sauvetage de membre et une amélioration de la fonction cardiaque comparées au groupe contrôle.

II.4 : Les facteurs de risque cardio-vasculaires

Le traumatisme de la cellule endothéliale joue un rôle pivot dans le développement de la maladie athéromateuse. L'ensemble des facteurs de risques cardio-vasculaires sont intriqués dans la pathogénie de ces traumatismes.

Le tabac

Même si le tabac est un facteur de risque indépendant indiscutable de l'athérosclérose, son mode d'action reste obscur. La fumée de cigarette ainsi que la nicotine provoquent un

gonflement des cellules endothéliales (CE) associé à la formation de bulles, un œdème sous endothélial, un élargissement des jonctions entre les cellules endothéliales et un épaissement de la membrane basale de l'endothélium (Asmusen et al 1975, Boutet et al 1980, Booyse et al 1981). La nicotine stimule l'apoptose des cellules endothéliales avec une diminution de la réplication. Outre son action directe sur l'endothélium, la nicotine élève le taux plasmatique des lipoprotéines de façon réversible à l'arrêt de l'intoxication, stimule la production de prostaglandine qui crée un déséquilibre entre les prostacyclines et le thromboxane A2 (Pittilo et al 1992). Ce déséquilibre stimule l'agrégation et l'adhérence plaquettaire à la surface de l'endothélium. Le tabagisme inhibe aussi la production de NO modifiant la vasomotricité, la prolifération des VCML et l'adhésion des plaquettes et des macrophages (Powell et Higman 1994).

Facteurs hémodynamiques : hypertension et force de cisaillement

L'analyse de l'endothélium des patients hypertendus montre un œdème des CE, une prolifération des CML, un épaissement de la membrane basale, une accumulation de fibrine dans l'espace sous-endothélial et une accumulation de fibronectine au niveau de la MEC (Takasaki et al 1991). Il existe aussi une augmentation des taux de PDGF et de TGF- β favorisant ainsi la prolifération des CML (Dzau et al 1993) et une altération du métabolisme du NO probablement liée à une insensibilité des CE des patients hypertendus à l'acétylcholine. De plus la sévérité de la dysfonction des CE semble liée au degré de la pression artérielle et cette dysfonction est le résultat de l'hypertension et non la cause (Luscher 1994). L'athérosclérose s'observe spécifiquement dans les vaisseaux directement soumis à la pression artérielle, et ainsi ne s'observe dans les veines que lorsque celles-ci sont « artérialisées » au cours de la réalisation des pontages artériels. De

plus, l'athérome s'observe plus spécifiquement au niveau des bifurcations artérielles ainsi que sur les plicatures suggérant que les forces hémodynamiques ont un effet direct sur l'athérogénèse. Les zones à faible force de cisaillement telles que la bifurcation carotidienne sont des zones de prédilection pour le développement des plaques d'athérome (Boyle et al 1997). Le mécanisme exact de l'action de ces forces sur l'athérosclérose reste mal connu.

Hyperlipidémie

L'action délétère des lipoprotéines se fait par l'oxydation du LDL cholestérol après sa capture par les CE. La forme oxydée du LDL cholestérol inhibe la sécrétion de NO et stimule la production de cytokines et de facteurs de croissance (Boyle et al 1997). De plus, cette forme est chémo-attractante pour les monocytes et stimule leur adhésion à la surface des CE.

Diabète

Une étude a montré la mauvaise relaxation des artères de patients diabétiques (Avena et Curry 1998). Il existe une augmentation de l'endothéline et de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, vasoconstricteurs reconnus, chez ces patients (Takahashi et al 1990, Schernthaner et al 1984). Les mécanismes en jeu sont variés. L'insuline et le glucose sont deux facteurs indépendants de croissance des CML, or leurs taux sont élevés chez les diabétiques de type II (Avena et Mitchell 1998). Il a été montré aussi qu'un taux élevé de glucose stimule la production de collagène de type IV et de fibronectine et des enzymes impliquées dans l'anabolisme du collagène par les CE (Hseuh et Anderson 1992). Ce mécanisme contribue à l'épaississement de la membrane basale et à l'excès de MEC

observés au cours de l'athérosclérose. De forte dose de glucose provoque une accélération de l'apoptose cellulaire et une baisse de la réplication sur les CE in vitro.

II.5 Physiopathologie de la paroi artérielle au cours de la maladie athéromateuse

La paroi artérielle est soumise à des micro traumatismes et à des variations de débit perpétuels; ainsi elle doit s'adapter continuellement. Il est donc logique de bien comprendre la réponse adaptative physiologique avant d'entrevoir la physiopathologie de cette réponse qui est inadaptée en cas d'athérosclérose. La réponse adaptative repose sur l'épaisseur de la paroi et le diamètre luminal de l'artère.

II.5.1 La réponse adaptative

- Epaisseur de la paroi artérielle

La composition et l'épaisseur sont directement corrélées à la tension tangentielle exercée sur l'artère. Une augmentation de cette tension entraîne une augmentation des unités lamellaires de la média (unité fonctionnelle composé de CML dans un réseau organisé d'élastine et de collagène) et une augmentation de l'épaisseur de la paroi par accumulation de fibres dans la MEC (Wolinsky et Glagov 1967). L'adaptation se fait par une synthèse accrue des fibres de la MEC sans modification du nombre de CML au sein de la média (Leung et al 1977). Dans un contexte d'hypertension, la paroi artérielle va s'épaissir pour résister à l'élévation de pression pour maintenir une tension tangentielle normale ; dans ce cas, on constate principalement une augmentation de la composition de la paroi artérielle en collagène (Wolinsky 1972).

- Le diamètre luminal

Le diamètre luminal dépend directement du flux auquel sont soumis les vaisseaux. Par exemple, au cours de l'embryogénèse, les vaisseaux soumis à des flux importants vont s'élargir et se développer alors que ceux soumis à de faibles flux vont s'atrophier. Dans la période post natale, les vaisseaux vont poursuivre cette adaptation en s'élargissant dans le cas de fistule artério-veineuse ou en s'atrophiant si le membre vascularisé est amputé (Holman 1949). Le *shear stress* semble jouer un rôle important dans cette adaptation. Une étude expérimentale utilisant un modèle de fistule artério-veineuse a montré que le segment artériel se dilate suffisamment pour maintenir un *shear stress* constant malgré l'augmentation du flux (Masuda et al 1989). Cette réponse adaptative dépend de la présence d'un endothélium intact et est médiée par le NO (Miller et Burnett 1992). L'inhibition de la synthèse de NO par une administration chronique de NO synthase inhibitor N-omega-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME) inhibe l'élargissement des artères induit par le flux (Guzman et al 1997). Au cours de l'athérosclérose, les artères sont capables de s'élargir sous l'augmentation du flux et du *shear stress* mais ces mécanismes sont limités (Glagov et al 1987).

II.5.2 caractéristiques histologiques de l'athérosclérose

La caractéristique principale de l'athérome est la présence de lipides au sein de l'intima.

- Epaissement de l'intima

Cet épaissement peut apparaître comme un processus adaptatif secondaire à une augmentation de la force tangentielle. Il n'existe pas de preuve directe que cet épaissement déclenche le dépôt de lipide au sein de la paroi et le début de l'athérosclérose, toutefois ces 2 mécanismes co-existent sur les mêmes lieux et cet

épaississement est important au niveau des artères les plus sensibles à l'athérome (Movat et al 1958).

- Les stries lipidiques (*fatty streaks*)

Ce sont des stries jaunâtres sous forme de lignes ou de pastilles visibles sur la face endoluminale des artères. Elles correspondent à l'accumulation de cellules spumeuses dans l'intima. Elles sont visibles dès l'âge de 3 ans puis augmentent en nombre entre 8 et 18 ans. Après cette période, elles disparaissent. Ces stries lipidiques en tant que telles ne provoquent pas de rétrécissement de la lumière ou des ulcères athéromateux (McGill et al 2002). Des études expérimentales, utilisant des modèles sensibles aux régimes riches en cholestérol, ont montré que ces stries lipidiques étaient composées de cellules spumeuses recouvertes d'un endothélium intact. Toutefois, ces CE sont altérées avec une tendance à la déconnexion et à la stimulation de l'agrégation plaquettaire. Toutefois, aucune étude n'a montré de lien direct entre les stries lipidiques et la formation de la plaque fibreuse (Taylor et al 1989).

- La plaque fibreuse (*fibrous plaques*)

Elle correspond à la constitution de l'athérome. Elle peut apparaître dès la deuxième décennie de la vie mais ces manifestations cliniques n'apparaissent qu'à partir de la 4^e décennie. Il existe une grande variation de composition et de configuration de la plaque, toutefois elles comportent quelques points communs. La région sous endothéliale est constituée de couches de CML avec du tissu conjonctif appelé *fibrous cap* (fig. 6). Cette partie a une épaisseur variable et peut servir à isoler les débris thrombogéniques contenus dans le noyau lipidique (*necrotic core*). Ce noyau occupe la partie la plus profonde de la plaque et est riche en cristal de cholestérol. On retrouve aussi des macrophages et des

CML dans ce noyau (Stary 1995). Ces plaques ont des poussées évolutives avec constitution de thrombus due à une ulcération intimale puis à l'incorporation du thrombus et à la cicatrisation de l'ulcère. On retrouve aussi un développement de vasa vasorum à partir de l'adventice. La média entourant la plaque est amincie et riche en fibres de la MEC. Certaines lésions très avancées sont peu cellularisées mais riches en tissu fibreux et sont surtout calcifiées. Ces calcifications touchent toute la profondeur de la paroi artérielle (Miller-Zabel et al 2003).



Fig. 6. Coupe d'une plaque fibreuse humaine

Fibrous cap (F) est composé de CML organisées au sein d'une MEC dense et sépare le noyau lipidique (necrotic core) (N) de la lumière (L). La média entourant cette plaque est atrophique (→)

- Morphologie de la plaque

La perception classique d'une plaque d'athérome montre des lésions faisant protrusion à l'intérieur de la lumière artérielle et créant ainsi un rétrécissement. Toutefois, cet examen se fait dans des conditions avec absence de flux et de pression interne. L'examen en

condition « physiologique » en soumettant la lumière interne à une pression montre une protrusion de la plaque plutôt vers l'extérieur de celle-ci avec un aspect interne assez lisse et sans incidence sur le calibre de la lumière interne (Glagov et al 1963). Ainsi la protrusion de la plaque en face interne révèle une complication de cette plaque à type d'ulcération, d'hémorragie, de dissection ou de thrombose.

- Elargissement de la plaque athéromateuse

Pour éviter un rétrécissement de la lumière, l'élargissement de la plaque est associé à un élargissement du diamètre externe de l'artère avec un aspect ovalaire en section (fig.7). Ce mécanisme adaptatif a été montré sur des modèles expérimentaux d'athérosclérose (Holvoet et al 1998), mais aussi sur les plaques humaines localisées au niveau des coronaires (Losordo et al 1994), des carotides (Crouse et al 1996), de l'artère fémorale superficielle (Pasterkamp et al 1996) et de l'aorte abdominale (Zarins et al 1993). Ce mécanisme d'adaptation permet de maintenir stable le *shear stress*. La protrusion vers l'extérieur pourrait expliquer ainsi l'amincissement observé dans le média au cours de l'athérosclérose.

Au cours de la maladie coronarienne, ce mécanisme permet de compenser la progression de la plaque jusqu'à ce que la plaque occupe 40% de l'aire contenue par la Limitante Elastique Interne (LEI). A partir de ce point, le remodelage est dépassé et une sténose de la lumière s'observe (Glagov et al 1987)(fig.8).

Les artères répondent différemment à la formation de plaque et certaines artères peuvent s'élargir plus vite que l'élargissement de la plaque entraînant une augmentation relative du diamètre de l'artère (Zarins et al 1988). Il existe aussi des variations inter individus (Wong 1997).

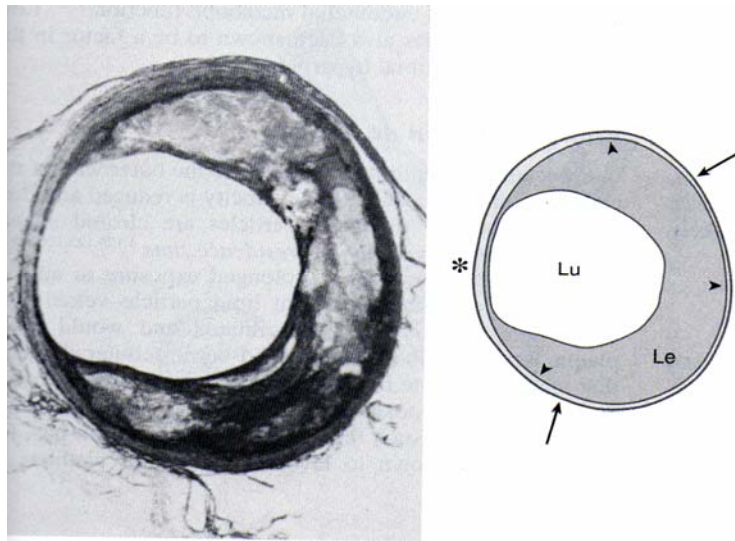


Fig.7. coupe d'une plaque athéromateuse humaine illustrant le remodelage adaptatif
 Malgré une plaque importante (Le), la lumière demeure constante (Lu). On observe une forme ovale à la coupe (→) (Glagov S, Weisenberg E, et al. *New Eng J Med* 1987 ;316 :1371)

Ainsi, une sténose de la lumière, une lumière normale ou un élargissement de la lumière résulte du rapport entre la croissance de plaque et l'élargissement de l'artère.

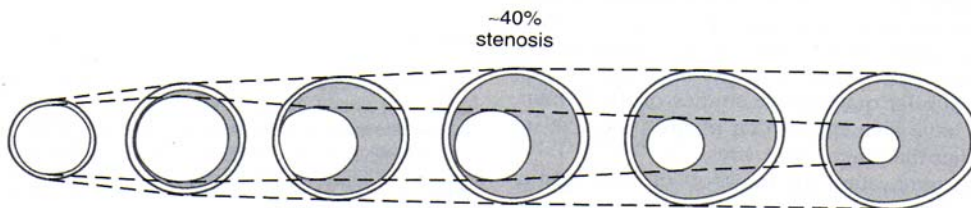


Fig.8. Evolution du remodelage adaptatif
 Lorsque la plaque occupe 40% de l'aire totale de la paroi artérielle, une sténose luminale apparaît. (Glagov S, Weisenberg E, et al. *New Eng J Med* 1987 ;316 :1371)

II.5.3 Localisation de l'athérosclérose

Les études épidémiologiques ont montré que certaines régions de l'arbre artériel sont plus sensibles que d'autres à la formation de plaque athéromateuse. Les plaques ont une

localisation préférentielle aux bifurcations suggérant l'importance de la perturbation du flux pour la formation de la plaque.

a) Considérations hémodynamiques

Shear stress de la paroi

Il est directement proportionnel au flux sanguin et à la viscosité sanguine et inversement proportionnel au rayon de l'artère; une faible variation du rayon entraîne une modification importante du *shear stress* (Stone et al 2003). Une élévation du *shear stress* est associée à la formation de plaque que si il existe une lésion intimale et une prolifération des CML. Une élévation transitoire du *shear stress* peut provoquer une lésion intimale mais pas si elle chronique (Bassiouny et al 1988). Il semble évident à l'heure actuelle que les zones à faible *shear stress* soient préférentiellement exposées à la formation de plaque athéromateuse à travers d'études hémodynamiques comparant le profil hémodynamique de région artérielle telles que la bifurcation carotidienne et aortique, et la localisation des athéromes (Ku et al 1985, Friedman 1998). On peut retenir comme mécanisme qu'un faible *shear stress* peut stimuler l'accumulation de lipide en diminuant leur lavage à la surface de l'endothélium (Caro et al 1971). Il peut altérer la fonction de l'endothélium (Paravicini et al 2002) et stimuler l'hyperplasie intimale (Zhuang YG 1998).

Séparation des flux et stase

Au niveau des bifurcations, le flux est ralenti et donc l'exposition entre les particules athérogènes telles que le cholestérol et la paroi artérielle est plus longue. L'agrégation et l'adhésion des cellules inflammatoires sont aussi favorisées (Gerrity et al 1985) ainsi que l'adhésion des plaquettes (Parmentier et al 1981).

Oscillation des flux

La vitesse du flux varie au cours du cycle cardiaque. Une étude a montré qu'au niveau de la face externe de la bifurcation carotidienne, on retrouvait une inversion de flux au cours du cycle cardiaque alors que ce flux restait unidirectionnel sur la face interne (Ku et al 1985). Cette variation de flux diminue l'adhérence inter-CE ainsi que l'orientation des CE (Fry et al 1992). De même, une oscillation de *shear stress* modifie l'expression de NO par les CE et l'expression des molécules d'adhérence inter-cellulaires (Chappell et al 1998).

Turbulence du flux

Même si les turbulences sont pressenties pour favoriser la plaque d'athérome, aucune preuve directe n'a été rapportée pour l'instant. Une étude hémodynamique sur la bifurcation carotidienne a échoué pour prouver la présence de turbulence à ce niveau (fig.9) (Bharadvaj et al 1982). Ces données ont été confirmées par une étude doppler sur l'homme (Ku et Giddens 1983). Ainsi les turbulences ne semblent pas initier la formation mais pourraient favoriser la rupture de plaque.



Fig 9. Modèle in vitro de flux au niveau de la bifurcation carotidienne

On observe des perturbations complexes de flux au niveau de ce modèle de bifurcation carotidienne mais une absence de vraie turbulence. (Bharadvaj BK, Mabon RF, et al. *J Biomech* 1982 ;15 :349-62)

Hypertension

L'hypertension (HTA) a été reconnue comme facteur de risque de complications de l'athérosclérose telles que les infarctus du myocarde et les Accidents Vasculaires Cérébraux (AVC) (Kannel et al 1969). Mais les études expérimentales utilisant un modèle de coarctation chez le lapin ont montré que c'est l'association de HTA avec la dyslipidémie qui provoque l'accumulation de cellules spumeuses dans l'intima. (Xu et al 2000). De plus, l'HTA inhibe la régression de la plaque en cas de correction de l'hypercholestérolémie (Xu et al 1991).

b) Notion de cinétique de la paroi artérielle

Une étude expérimentale limitant les mouvements de la paroi aortique en l'encerclant dans un tube rigide a montré la franche déposition des plaques au niveau du segment immobilisé (Tropea et al 2000). Cette observation est en accord avec une constatation clinique bien connue montrant que les segments artériels en aval d'une occlusion ou d'une sténose sont « protégés » de l'athérosclérose. La correction d'une lésion chronique aortique montre la présence d'une athérosclérose en aval comparable au contrôle après 3 mois. Ainsi la correction de l'obstacle a stimulé l'athérome à un niveau normal dans le segment d'aval mais ne l'a pas accéléré (Lyon et al 1987).

c) Effets de l'exercice physique

L'exercice physique accélère le débit cardiaque, la fréquence cardiaque et diminue les résistances périphériques. Ainsi ces modifications hémodynamiques peuvent influencer le *shear stress* et la vitesse du flux au niveau de l'arbre artériel. Des études utilisant une quantification du flux artériel par IRM a comparé les flux à différents niveaux de l'aorte et au repos et après exercice physique (Taylor et al 2002, Cheng et al 2003). Au repos,

l'aorte sous rénale a des vortex plus importants associés à des flux multi directionnels et un *shear stress* plus faible que l'aorte supra coeliaque. Ces zones sont principalement localisées au mur postérieur de l'aorte sous rénale qui est une zone réputée « sensible » à l'athérosclérose. L'exercice supprime cette zone. Ainsi un exercice physique quotidien aurait un effet protecteur vis à vis de l'athérosclérose.

d) Localisations préférentielles

Carotides

La bifurcation carotidienne est une zone très sensible à l'athérosclérose alors que la carotide interne distale et la carotide commune proximale sont épargnées. La géométrie de cette bifurcation est un élément essentiel pour expliquer la formation de plaque. La surface de la bifurcation est environ le double de la surface de l'artère carotide interne sus-jacente. Cet élément associé à l'angle de division crée une zone de faible *shear stress* oscillante surtout au niveau de la paroi externe. Au cours de l'élargissement et de la progression de la plaque, il existe une modification de flux favorisant le développement de cette plaque à la face interne de la bifurcation. Ainsi, au stade le plus avancé, la lésion touche toute la circonférence de la bifurcation (Bassiouny et al 1989).

Coronaires

Outre le fait que les coronaires ont un faible *shear stress*, des bifurcations et des oscillations de flux, certaines autres caractéristiques peuvent expliquer la localisation préférentielle de l'athérosclérose au niveau des coronaires. Elles ont une configuration complexe d'angulation et très variable au cours du cycle cardiaque. De plus, elles subissent deux flux systoliques différents au cours du cycle cardiaque (Granata et al 1965).

Aorte abdominale

L'athérosclérose au niveau de l'aorte thoracique est rarement symptomatique alors que l'athérome au niveau de l'aorte sous-rénale est souvent symptomatique. Cette différence peut s'expliquer par une différence de : 1) micro-architecture ; 2) vasa vasorum ; 3) flux. L'aorte thoracique a un diamètre plus important que l'aorte abdominale sous rénale et comporte plus d'unités lamellaires. Elle est composée de plus de fibre élastique que l'aorte abdominale. La composition plus élevée en collagène de l'aorte abdominale lui confère une plus grande rigidité. L'aorte abdominale est dépourvue de vasa vasorum dans la média contrairement à l'aorte thoracique. Ainsi la formation de la plaque pourrait créer une barrière nutritive rendant l'aorte plus sensible à l'ischémie pariétale et à l'atrophie. Enfin, le flux est moins important au niveau de l'aorte abdominale sous rénale qu'au niveau de l'aorte thoracique. Les artères rénales prennent 25% du débit cardiaque, ainsi le flux de l'aorte sous rénale est dépendant de l'activité musculaire des membres inférieurs (Moore et al 1994). De plus, ce faible flux relatif est aggravé par l'élargissement en diamètre de l'aorte sous rénale avec l'âge. L'ensemble de ces facteurs contribuent à augmenter le temps d'exposition des particules athérogènes au niveau de l'aorte sous rénale.

Artère fémorale superficielle (AFS)

Pour un calibre équivalent, AFS est plus sensible à l'athérosclérose que des artères du membre supérieur. Elle est soumise à une pression hydrostatique plus importante mais est surtout soumise à des variations de flux très importantes en fonction de l'activité physique.

Le tabac et le diabète sont les deux principaux facteurs de risque associés à l'athérosclérose de AFS (Gordon et Kannel 1972). La nicotine pourrait stimuler le tonus des CML au niveau de AFS (Winniford et al 1986).

II.5.4 Evolution de l'athérosclérose

L'évolution inexorable de la plaque vers les complications cliniques n'est pas la règle.

a) Initiation de la plaque

Plusieurs mécanismes ont été évoqués. Les mécanismes les plus étudiés sont une altération de la fonction endothéliale conduisant à une augmentation de la perméabilité, une altération de l'oxydation et une augmentation de la colonisation par les macrophages (Ross 1986). D'autres mécanismes sont en jeu tels que des stimuli de la prolifération des CML (Benditt et al 1983), la présence de fractions spécifiques du cholestérol (Ross 1976). Toutefois, aucun de ces mécanismes n'a prouvé son rôle primordial dans l'initiation de la plaque. D'un autre côté, il est établi que l'examen anatomopathologique de personnes âgées indemnes de manifestations cliniques de l'athérosclérose révèle la présence de plaques évoluées sur l'arbre artériel. Ainsi, la longévité de ces personnes ne s'explique pas par une prévention de l'initiation ou de la formation de la plaque mais par la stabilité de la plaque, le contrôle de sa progression, une adaptation adéquate des artères et la prévention des complications de ces plaques.

b) Progression de la plaque

Elle correspond à une augmentation de volume de la plaque pour aboutir au rétrécissement de la lumière et/ou à son occlusion. Elle implique :

1. La migration, la prolifération et la différenciation cellulaires

2. L'accumulation intra et extra-cellulaire de lipides
3. L'accumulation de MEC
4. La nécrose et la dégénérescence cellulaire.

A côté de ces modifications, la paroi artérielle va connaître un remodelage par création d'une coque fibreuse pour séquestrer les débris nécrotiques et dégénératifs associé à l'élargissement de la paroi artérielle pour maintenir le diamètre luminal. Ces mécanismes sont donc des processus de cicatrisation. C'est la balance entre les processus de cicatrisation et les phénomènes constituant la plaque qui détermine si une plaque progressera vers les complications ou si elle restera asymptomatique (fig.10).

Les modifications hémodynamiques jouent aussi un rôle puisque l'augmentation du *shear stress* peut inhiber la progression de la plaque mais aussi favoriser l'érosion de la coque fibreuse et l'ulcération de la plaque (Cozzi et al 1988).

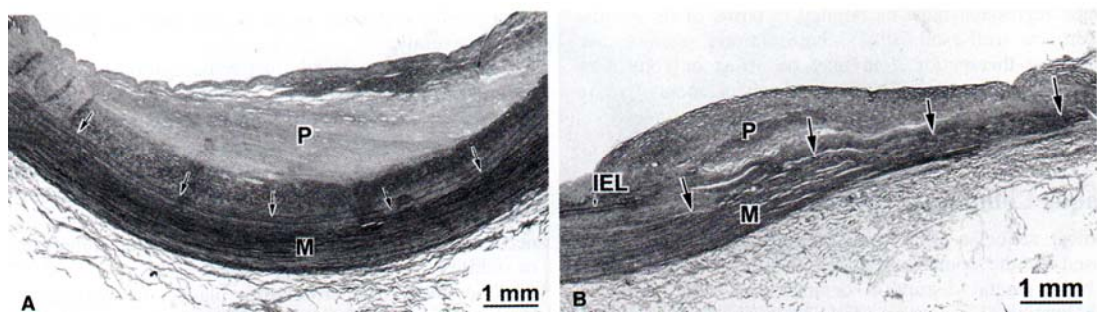


Fig. 10. Différentes évolutions de la plaque athéromateuse

A. lésion aortique avec une plaque bien organisée (P) et une média (M) quasi normale. L'élastine est en noir et la LEI est indiquée par des flèches. B. lésion aortique avec large plaque (P) et un amincissement de la média (M). La LEI (IEL) est partiellement détruite et on constate une érosion de la média (→). Xu C, Zarins CK, Glagov S. *J Vasc Surg* 2001 ;31 :91-6

c) Régression de la plaque

Elle peut être due à : résorption des lipides ou de la MEC

Mort cellulaire

Une migration cellulaire en dehors de la plaque

Cette régression a pu être observée sur de nombreux modèles animaux d'athérosclérose par modification du régime en lipide ou l'administration de drogue réduisant le cholestérol (Malinow 1983, Stary 1979). Toutefois, la sensibilité de la plaque pourrait dépendre de nombreux facteurs dont sa localisation. Par exemple, la plaque carotidienne ne régresse pas alors que les lésions aortiques et coronariennes régressent dans un modèle d'athérosclérose chez le singe (Clarkson et al 1984). Mais la transition à la pathologie humaine est difficile. De plus, les perturbations hémodynamiques d'une sténose altèrent la régression de la plaque en aval de la lésion.

d) Plaque stable et compliquée

La complication des plaques s'effectue sous forme de rupture de plaque ou d'ulcération. Cela aboutit à une thrombose *in situ* ou à une embolie. La composition et la structure des plaques semblent être des facteurs prédisposants importants pour la survenue de complications. Ainsi, des coques fibreuses fines exposent le contact du « cœur » lipidique avec les constituants du sang (Felton et al 1997). Les conditions hémodynamiques jouent aussi un rôle dans la survenue de telles complications.

III. Formation et de l'évolution de l'anévrisme d'aorte abdominale (AAA) chez l'homme

La définition courante d'un anévrisme est la dilatation du diamètre de plus de 50% par rapport au diamètre normal, avec une perte du parallélisme des bords (Ernst 1993). Plusieurs cadres nosologiques sont associés à la formation d'anévrismes artériels. Nous ne retiendrons ici que l'athérosclérose, de loin l'affection la plus représentée dans les pays industrialisés. La maladie anévrismale associée à l'athérosclérose affecte l'ensemble du système artériel. L'atteinte la plus fréquente se produit au niveau de l'aorte abdominale sous-rénale. 95 % des anévrismes de l'aorte se situent dans la partie sous rénale (Ernst 1993), et notre exposé sera restreint à cette localisation.

III.1. Incidence

La mortalité imputable aux AAA représente 1 à 2 % des décès en Europe. Les AAA représentent le 10^{ème} rang des causes de décès des hommes de plus de 65 ans dans les pays industrialisés, et la troisième cause de décès d'origine cardiovasculaire.

L'incidence des AAA de plus de 40 mm de diamètre dans la population générale se situerait autour de 1,4% dans les pays industrialisés. L'incidence varie beaucoup en fonction de la définition que l'on donne, et en fonction de la population considérée. Dans les études autopsiques, l'incidence des AAA varie de 1.8 à 6.6 % (Carlsson et al 1964, Turk 1965), mais il s'agit dans toutes ces séries d'une population sélectionnée. Les études de populations par échographie donnent une « image » intéressante de la prévalence, car elles représentent les populations accessibles à un dépistage. Ces études retrouvent une incidence de 1.5 à 3 % chez des hommes et des femmes de la sixième à la huitième décennie de la vie (Castleden et al 1985, Allen et al 1987).

Plusieurs facteurs influent la prévalence de la maladie. Une caractéristique remarquable des AAA est la prédominance masculine. Le sexe ratio est de trois hommes pour une femme aux Etats-Unis, et de 8 à 9 hommes pour une femme dans les pays européens (Turk 1965, Bickerstaff et al 1984). Le différentiel entre hommes et femmes diminue avec l'âge. Le tabagisme est le second facteur le plus influent, avec un risque relatif de 5,5. Cette influence du tabac est d'autant plus importante qu'un tabagisme est relevé chez 90% des patients recrutés dans le Small Aneurysm UK trial. Le facteur familial est important, le risque relatif étant de 2 à 4 dans la fratrie, mais seuls 5% des patients avec un AAA ont des membres de leurs fratrie porteurs de la maladie. L'âge influence aussi de façon significative l'incidence des AAA, avec un risque relatif de 2. L'âge moyen des patients porteurs d'un AAA inclus dans le Small Aneurysm UK trial est de 69,2 ans. Melton et coll. ont montré que chez les hommes âgés de 50 à 59 ans, l'incidence était de 83,2/100.000 (Melton et al 1984). Ce taux augmente rapidement avec l'âge pour atteindre 499/100.000 chez les hommes au dessus de 80 ans. D'autres facteurs ont une influence sur la prévalence variablement observée selon les études. En revanche l'existence d'un diabète semble protecteur contre la maladie, la prévalence du diabète étant de 3% dans le Small Aneurysm UK trial, ce que confirme toutes les séries cliniques.

Une étude de la Mayo clinic a montré que l'incidence des AAA a triplé durant les trois dernières décennies (Bickerstaff et al 1984). La mortalité par rupture d'AAA est en augmentation dans des régions à forte prévalence de l'athérosclérose comme l'Ecosse, alors que la population générale est en diminution. Cette augmentation semble ne pas être due seulement au vieillissement de la population.

III.2. Histoire naturelle des AAA

Une fois formés, les AAA continuent à se dilater jusqu'à la rupture dont la mortalité avoisine 90 % (Ernst 1993). Le risque de rupture dépend en premier lieu du diamètre externe de l'AAA. Lederle (Lederle et al 2002) a observé un taux de rupture annuel de 9.4% pour les AAA de diamètre entre 5.5 et 5.9 cm, à 10.2% pour un diamètre entre 6.0 et 6.9 cm, et à 32.5% pour un diamètre de plus de 7 cm. A diamètre égal, le risque de rupture est accru en cas d'AAA douloureux, chez les femmes (taille plus petite de l'aorte normale), les fumeurs et en présence d'une hypertension artérielle.

La vitesse moyenne d'accroissement du diamètre est de 5 mm / an pour les AAA de 35 à 50 mm, de 8 mm / an pour les AAA de 50 à 60 mm. En dehors du diamètre initial, les facteurs de risque d'accroissement du diamètre sont l'âge, le tabagisme, l'insuffisance cardiaque, la prise de corticostéroïdes.

Après un traitement chirurgical de l'AAA, les patients opérés ont une mortalité supérieure à la mortalité de la population témoin. Les causes de surmortalité sont essentiellement coronariennes et cérébrovasculaires. 65% des patients porteurs d'un AAA exploré avant la chirurgie ont des lésions coronariennes significatives à la coronarographie, et 15 à 20% ont des sténoses carotidiennes de plus de 65%.

III.3. Physiopathologie de la maladie anévrysmale

La paroi d'un anévrysme artériel est fragile et la composition de la média est considérablement remaniée: on note une réduction du nombre et une fragmentation des fibres élastiques et une fragmentation des fibres de collagène. Les modifications de ces protéines fibreuses altèrent les propriétés mécaniques de l'artère qui perd progressivement sa capacité à lutter contre la distension. La paroi artérielle exerce

normalement une force de rétraction égale et opposée à la force de distension: la tension pariétale. Selon le loi de Laplace, la force de distension (F) est égale au produit de la pression artérielle (P) par le rayon du vaisseau (r): $F=P \times r$. Au fur et à mesure que l'artère se laisse distendre, la force de distension augmente puisque le rayon du vaisseau augmente. Cette augmentation de la contrainte exercée sur la paroi artérielle accélère la dégradation des protéines fibreuses et diminue la résistance de cette paroi à la distension. Ainsi, la présence d'un anévrisme induit un cercle vicieux qui aboutit inéluctablement à son augmentation de diamètre. Lorsque la force de distension devient supérieure à la force de cohésion des fibres de la paroi, l'anévrisme se rompt.

Les anévrysmes associent six anomalies de la paroi artérielle (Ernst 1993, Anidjar 1992, Holmes et al 1996) :

- 1) forte diminution des CML de la média. L'apoptose et le remodelage de la paroi aortique sont présents avec une pénurie des CML dans la média;
- 2) néoangiogénèse dans la paroi;
- 3) formation de thrombus luminal sans cellules endothéliales;
- 4) infiltration de la paroi artérielle par des macrophages, des lymphocytes T et B et des dépôts d'immunoglobuline. L'activité des molécules d'adhésion jouant le rôle de recrutement, l'inflammation est augmentée dans la paroi anévrysmale (Davis et al 1993);
- 5) augmentation d'activité des enzymes protéolytiques, en particulier de métalloprotéinases matricielles (MMP) et du tPA (tissular activator of plasminogène) et uPA (urokinase);
- 6) lyse de l'élastine de la média lors de la dilatation et lyse du collagène lors de la

rupture (MacSweeney et al 1994).

La conséquence de la dégradation de la matrice extracellulaire dans la maladie anévrysmale est une réponse inadaptée à la contrainte radiale, qui s'exprime par la dilatation et la rupture de la paroi artérielle.

Les expérimentations chez les animaux ont montré l'importance de la balance protéases/anti-protéases dans l'évolution des AAA. L'augmentation locale de l'activité des enzymes protéolytiques peut dégrader les artère in vitro (Dobrin et al 1984) ou former des AAA in vivo (Anidjar et al 1990). Les cellules inflammatoires semblent être la source principale de ces protéases (Anidjar et al 1992). L'expression d'ARNm et de protéine MMP-9 est élevée dans AAA et celle de son inhibiteur, TIMP-1, est trouvée diminuée ou inchangée (Thompson 1996, Tamarina et al 1997). L'administration d'un inhibiteur des MMP, doxycycline, a permis de diminuer l'expression de MMP-9 dans la paroi anévrysmale humaine (Curci et al 2000). L'inactivation du gène codant pour MMP-9 a inhibé la dégénérescence d'AAA chez l'animal (Pyo et al 2000). L'expression de MMP-1 et de MMP-3 est également augmentée dans la maladie anévrysmale par rapport à la maladie occlusive d'athérosclérose (Vine 1991). Dans les AAA non rompus, un accroissement des activateurs du plasminogène, tPA et uPA, et de la plasmine a été observé (Jean Claude et al 1994, Quax et al 1990).

L'AAA est souvent associé à des lésions d'athérosclérose, coronaires et carotidiennes. A quelques nuances près, les facteurs de risque des AAA sont ceux des lésions sténosantes d'athérosclérose. Classiquement les anévrysmes sont considérés comme les résultats de la dégénérescence athérosclérotique de la paroi artérielle. Il pourrait exister une pathogénie commune des deux lésions, dont l'expression serait

modulée par des facteurs locaux. Cependant la plupart des malades atteints d'athérosclérose développent des lésions sténosantes et non pas anévrysmales. Dans les années 80, plusieurs auteurs ont contesté ce concept en montrant la présence de multiples particularités biochimiques, génétiques et épidémiologiques chez les malades ayant un AAA (Martin 1978, Tilson 1980). Une différence remarquable entre ces deux pathologies est la nette décroissance des CML dans la média de la paroi anévrysmale tandis que les CML sont abondantes au niveau intimal de la paroi d'athérosclérose, indiquant le rôle important de celles-ci dans le remodelage artériel. La raréfaction des CML dans la média pourrait rendre l'AAA plus vulnérable à l'inflammation et à la protéolyse (Losy et al 2003).

La surface luminale des AAA est souvent recouverte d'un thrombus, d'épaisseur variable, parfois absent. Ce thrombus est dépourvu de cellules endothéliales, de CML ou de fibroblastes, mais envahi par des polynucléaires neutrophiles (PMN). Une étude de Fontaine (Fontaine et al 2004) a montré un rapport MMP-9/MMP-2 plus élevé dans le thrombus anévrysmal par rapport à celui des lésions occlusives et que les PMN sont une source importante de MMP-9. Les auteurs ont aussi montré que la lame liquidienne présente à l'interface entre le thrombus et la paroi anévrysmale pourrait être le lieu d'activation du plasminogène en plasmine. La surface luminale du thrombus est un endroit hostile au développement des CML et des cellules endothéliales, un lieu de recrutement des PMN qui délivrent des protéases activées en diffusant vers la paroi artérielle, provoquant la dégradation de la MEC de celle-ci. De cette manière, des agents thérapeutiques pourraient également être délivrés d'abord dans le thrombus pour empêcher la destruction de la paroi.

III.4 Contrôle de la formation d'AAA expérimentaux

Dans le modèle de perfusion d'élastase, l'administration de Rapamycine, un immunosuppresseur, diminue la dégénérescence anévrysmale, diminue la formation de NF-kappaB et de MMP-9 (Diaz et al 2004). La Rapamycine a pour récepteur FK506/BP12 associée aux domaines intracytoplasmiques des récepteurs de haute affinité du TGFβ.

IV : MMP-14 (MT1-MMP) dans la paroi artérielle et les lésions d'athérome et d'anévrysme

Les métalloprotéases (MMPs) ont depuis longtemps été attractives pour leurs implications dans des processus physiologiques et pathologiques nécessitant un remodelage tissulaire. Elles sont intéressantes car elles ont une spécificité assez large pour les molécules de la MEC. La première métalloprotéase décrite fut une enzyme collagénolytique dépendante de la thyroïde (MMP-1) dont le substrat était le collagène de type I (Gross 1962). Le nombre des enzymes appartenant à ce groupe a très vite grandi et il est apparu que le collagène n'était pas leur unique substrat.

IV.1 Généralités sur les MMPs

Les MMPs appartiennent à la superfamille des endopeptidases metzincines liées au zinc (Gomis-Ruth 2003). Elle présente un motif strictement conservé histidine (H/D) HEXXHXXGXX. Ce motif crée 3 résidus histidines qui chélatent le site actif au zinc. On retrouve aussi un résidu méthionine à la fin de ce domaine histidine qui compose le bout C-terminal. Ce résidu méthionine crée une conformation 1,4-b-turn qui se glisse sous le

domaine catalytique lié au zinc. Cette conformation crée ainsi un sol hydrophobique. La famille metzincine est composée de 4 sous-familles :

- Séralysines
- Astacines
- Adamlysines (ADAMs : enzyme avec un domaine MMP et disintégrine) et ADAM-TS (comporte un motif thrombospondine)
- Métalloprotéinases

La famille des MMPs est composée de 24 membres ayant en commun plusieurs domaines de fonction (fig. 11). Leurs dénominations font souvent appel aux substrats préférentiels. On trouve ainsi les gélatinases (MMP-2 et MMP-9) et les collagénases (MMP-1, -8, -13, -14, -18). Ces dernières sont les seules enzymes issues des mammifères capables de lyser la triple hélice de collagène fibrillaire en fragment $\frac{3}{4}$ et $\frac{1}{4}$ (Nagase 1999).

Ces MMPs sont capables de cliver de nombreux composants de la MEC (collagène, laminine, fibronectine, vitronectine, aggrecan, énectine, versican, perlecan, ténascine, élastine entre autres) ainsi que des facteurs de croissance, des cytokines et des récepteurs d'adhésion inter-cellulaires. Du fait de leur grande activité et de l'effet important sur le micro environnement cellulaire, elles sont secrétées en petite quantité et leur localisation et sécrétion sont finement contrôlées au niveau transcriptionnel et post transcriptionnel. Cette régulation est faite par des cytokines (IL-1, IL-4 et IL-6), des facteurs de croissance (EGF, Hepatocyte Growth Factor HGF, TGF- β) et le TNF- α . Par rétro contrôle, des MMPs sont activées ou désactivées par d'autres (McQuibban et al 2000).

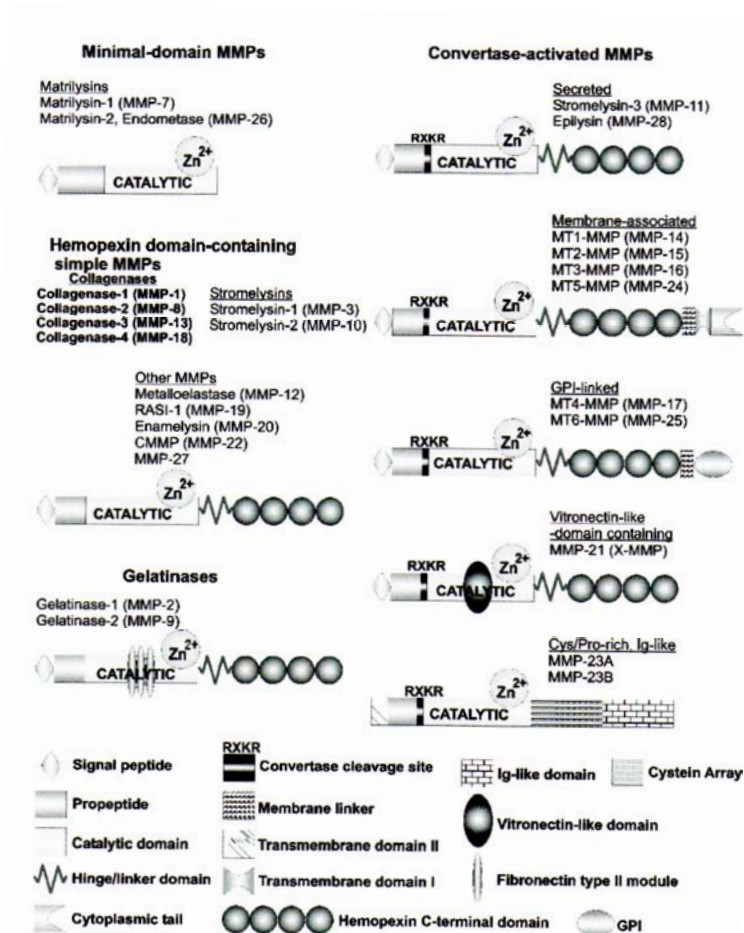


Fig. 11. Structures des MMPs

On retrouve : 1) peptide signal en rapport avec la sécrétion, 2) un pro-domaine dans la forme latente, 3) un site catalytique avec son site actif lié au zinc, 4) un domaine hémapexine en relation avec le site catalytique pour reconnaître ses substrats, 5) un domaine de liaison (hinge domain) reliant le domaine hémapexine et catalytique ; il confère une flexibilité à l'ensemble. Les MMPs transmembranaire ont, en plus, un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique ou un lien glycosylphosphatidy (GPI) (MMP-17 et -25). MMP-2, -9 contiennent un domaine fibronectine. (*Strongin A. Biochem Biophys Acta 2010 ;1803 :133-41*)

Les MMPs sont secrétées sous forme inactive. Elles nécessitent une activation protéolytique pour libérer le domaine N-term et exposer ainsi le site catalytique. Cette activation peut être intra ou extra cellulaire (Van Wart 1990, Pei 1995). Certaines MMPs (MMP-11, -28 et MT-MMPs), ayant le motif spécifique des furines RXK/RR sont activées dans les corps de Golgi par les sérines protéases telles que les furines et des

enzymes de la famille des Pro Convertases. Les MMPs secrétées en extra-cellulaire sont souvent activées par les sérines protéases dont les plasmines, les MMPs transmembranaires (MT-MMPs) ou d'autres MMPs solubles.

A l'exception de MMP-7 et -26 qui n'ont que le domaine catalytique, les autres MMPs ont un domaine hémapexine C-terminal. Il régule l'activité et la spécificité du site catalytique. Les deux domaines sont séparés par un domaine de liaison (*hinge domain*). Les MT-MMPs (MMP-14/MT1-MMP, MMP-15/MT2-MMP, MMP-16/MT3-MMP et MMP-24/MT5-MMP) ont en plus un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique. Pour MMP-17/MT4-MMP et MMP-25/MT6-MMP, cette queue cytoplasmique est remplacée par une ancre inositol glycosylphosphatidyl (GPI).

IV.2. Structure de MMP-14/MT1-MMP (fig. 12)

Elle appartient à la famille des MMPs transmembranaires et se distingue des MMPs solubles par la présence d'un domaine transmembranaire (Eglebad 2002). Sur le génome humain, son gène se situe sur le chromosome 14. On compte donc 7 domaines comprenant un pro peptide (M¹-R¹¹¹), un domaine catalytique nécessitant une liaison spécifique au zinc (Y¹¹²-G²⁸⁵), un domaine de liaison (E²⁸⁶-I³¹⁸), un domaine hémapexine (C³¹⁹-C⁵⁰⁸), une région fine (P⁵⁰⁹-S³⁵⁸), un domaine transmembranaire (A⁵³⁹-F⁵⁶²), et une queue cytoplasmique (R⁵⁶³-V⁵⁸²). L'enzyme est exprimée sous forme de zymogène inactif (pro-MMP-14) contenant un site de reconnaissance spécifique aux furines (R¹⁰⁸-R¹¹¹) entre le pro-peptide et le site catalytique. L'activation nécessite donc la libération de ce pro-peptide par des convertases telles que les furines pour obtenir une forme active de 55-60 kDa (Sato et al 1996, Yana 2000). Cette forme active est une étape essentielle pour

le mouvement membranaire des protéases (Remacle et al 2005). L'activation génère aussi une forme liée à la membrane sans site catalytique de 44-45 kDa. Cette forme pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'activité de l'enzyme mature (sorte d'auto-contrôle) (Lafleur et al 1986, Tam et al 2004).

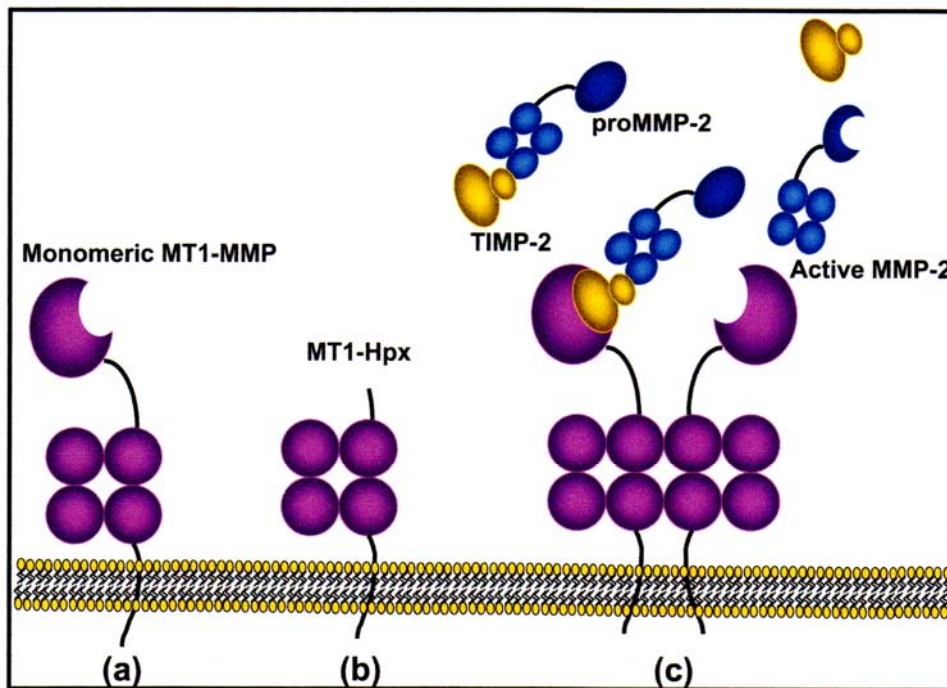


Fig.12. Structure de MMP-14

(a) forme mature active comprenant le site catalytique. (b) après autolyse, génération d'une forme liée à la membrane dépourvue de site catalytique mais comprenant le domaine hémopexine. Cette forme régule l'activité de l'enzyme mature. (c) La forme active mature se dimérise pour former un tri-complexe MMP-14/pro-MMP-2/TIMP-2. Ce tri complexe permet l'activation de MMP-2. (Bardolina M, Stack M. *Semin Cell Dev Biol* 2008 ;19 :24-33)

IV.3. Fonction de MMP-14/MT1-MMP

Cette enzyme est exprimée dans de nombreux types cellulaires. Son expression et son activité sont très élevées dans les cellules tumorales et elles sont corrélées directement

avec une augmentation des capacités migratoires des cellules. C'est pourquoi, cette enzyme est considérée comme pro-invasive et pro-tumérogène. De façon plus générale, elle joue une fonction importante dans la protéolyse péricellulaire.

a) collagénase interstitielle

Rapidement après sa découverte, des études *in vitro* ont montré la capacité de la forme active de MMP-14 à hydrolyser le collagène interstitiel de type I, II et III en 2 fragments $\frac{3}{4}$ et $\frac{1}{4}$, caractéristique des collagénases interstitielles des mammifères (d'Ortho et al 1997). Plus récemment, la transfection de cellules tumorales par des MMPs suivie de stimulation par des facteurs de croissance a montré la nécessité de MMP-14 pour bien positionner l'activité collagénase à la surface cellulaire (Hotary et al 2000). Des tests d'invasion ont confirmé la nécessité de MMP-14 pour stimuler l'invasion d'un gel de collagène 3D par des cellules carcinomateuses (Tam et al 2002). De plus, le collagène type I semble stimuler l'expression et l'activité de surface de MMP-14 via une voie dépendante des intégrines (Barbolina et al 2007, Haas et al 1999). Ces données confirment le rôle de MMP-14 dans l'homéostasie du collagène.

b) Clivage des glycoprotéines et du protéoglycans de la MEC

MMP-14 est impliquée dans le clivage de nombreux autres composants de la MEC dont la laminine, qui a été la plus étudiée. Il a été montré que MMP-14 est impliquée dans le clivage de la sous-unité $5\gamma 2$, $5\beta 3$ de la laminine et améliore la migration cellulaire (Udayakumar et al 2003). Ces données confirment donc que MMP-14 joue un rôle important dans les invasions tissulaires par les cellules cancéreuses.

A l'aide d'un modèle de souris plasminogène et/ou activateur du plasminogène-KO, il a été montré que l'invasion de la fibrine et la néo angiogénèse nécessite la présence de

MMP-14 (Hiraoka et al 1998). Des études biochimiques ont confirmé que MMP-14 pouvait lyser le réseau de fibrines (Bini et al 1999), cliver le fibrinogène et inactiver le facteur XII (Hiller et al 2000). L'ensemble de ces données montre que MMP-14 pourrait participer à une voie alternative de la fibrinolyse.

MMP-14 est aussi capable de cliver les protéoglycanes tels que l'héparin sulfate syndecan-1 (Endo et al 2003), l'aggrécane, perlécane et le lumicane (Li et al 2004) et confirme ainsi son rôle prépondérant dans l'invasion cellulaire.

c) Clivage de protéines solubles

Des études récentes ont montré que MMP-14 pouvait s'accumuler en intra-cellulaire dans le centrosome, catalyser la péri centrine et stimuler ainsi des aberrations mitotiques (Golubkov et al 2005, 2006). Par ce mécanisme, MMP-14 pourrait donc participer à la transformation maligne des cellules.

Des études *in vitro* ont montré que MMP-14 est un activateur de pro-MMP-2 en utilisant des clonages de c-DNA du domaine transmembranaire et une sur-expression du site catalytique (fig.12). La purification d'extraits de membrane plasmatique a montré que cette activation se faisait via un complexe tri-mérique MMP-14/TIMP-2/pro-MMP-2 (Strongin et al 1995). Depuis il a été montré que MMP-14 était capable d'activer pro-MMP-13 (Knauper et al 2002) et pro-MMP-8 (Holopainen et al 2003). Ces 2 dernières sont des collagénases interstitielles. Ainsi, MMP-14 participe au turn-over du collagène de façon directe mais aussi de façon indirecte en régulant l'activité d'autres collagénases. MMP-14 peut aussi activer TGF β (Karsdal et al 2002) et participer ainsi à la régulation des facteurs de croissance influençant la sécrétion des composants de la MEC.

MMP-14 est capable de cliver Stromal Cell-Derived factor (SDF-1) aboutissant à la perte du récepteur à CXCR-4; il en résulte une perte de l'activité chémo-attractante pour les cellules hématopoïétiques CD34(+) (McQuibban et al 2001). Elle est aussi capable de cliver Monocyte Chemoattractant Protein-3 (MCP-3) aboutissant à l'incapacité de répondre à son activation après liaison avec son récepteur (McQuibban et al 2002). Ces 2 actions illustrent la participation de MMP-14 à la modulation des réponses inflammatoires et immunitaires.

d) Clivage de molécules de surface cellulaire (fig. 13)

MMP-14 est capable de s'autolyser pour générer une forme inactive sans site catalytique mais liée à la membrane (fig.12). Cette forme est capable d'inhiber l'activité collagénolytique, l'invasion cellulaire et la formation tumorale (Nonaka et al 2005).

Les intégrines sont une famille de récepteur transmembranaire pour des ligands de la MEC. Elles sont impliqués dans l'adhésion cellulaire et dans de nombreux processus incluant l'embryogénèse, l'hémostase, la réparation tissulaire, la réponse immunitaire, la motilité cellulaire et l'invasion métastatique des cellules tumorales. MMP-14 est capable de cliver la sous-unité pro- α_v pour générer un fragment riche en ponts disulfures et un fragment de chaîne légère (Ratnikov et al 2002). Ce clivage semble faciliter la migration cellulaire par activation de la voie dépendante de $\alpha_v\beta_3$ (Deryugina et al 2002). La sous-unité pro- α_5 est sensible à MMP-14 alors que pro- α_2 est résistante. De plus, l'addition de MMP-14 stimule l'adhésion au collagène via l'activation de $\alpha_2\beta_1$. L'ensemble de ces données suggère que MMP-14 régule la communication entre les intégrines (Baciu et al 2003).

Les cadhérines font partie de la famille des caténines. Elles sont impliquées dans l'interaction inter-cellulaire, la polarité cellulaire et l'organisation du cytosquelette. A l'aide d'un modèle d'ischémie rénale, il a été montré que l'augmentation d'expression de MMP-14 est corrélée avec l'activation de E- et N-cadhérine. Cette activation est annulée par l'utilisation d'anti-corps anti-MMP-14 et l'emploi de shRNA contre MMP-14 (Covington et al 2006). Ces données suggèrent l'implication de MMP-14 dans l'insuffisance rénale aiguë post ischémie-reperfusion.

MMP-14 est aussi capable de cliver l'ectodomaine de CD44 (un récepteur à l'hyaluronane) et d'améliorer la mobilité de lignée cellulaire cancéreuse (Kajita et al 2001). MMP-14 pourrait aussi jouer un rôle dans la régulation de la clairance des protéinases via le clivage de la protéine associée au récepteur au LDL-cholestérol (LRP). Ce récepteur est impliqué dans les phénomènes d'endocytose et sa concentration est régulée par l'activité MMP-14 (Rozañov et al 2004).

MMP-14 semble avoir de nombreux autres substrats responsables de nombreux phénomènes physiopathologiques. On peut citer son rôle dans l'ostéoclastogénèse . Ce mécanisme semble être lié à l'inhibition par MMP-14 de RANKL (Récepteur au ligand NF- κ B) par clivage (Hikita et al 2006).

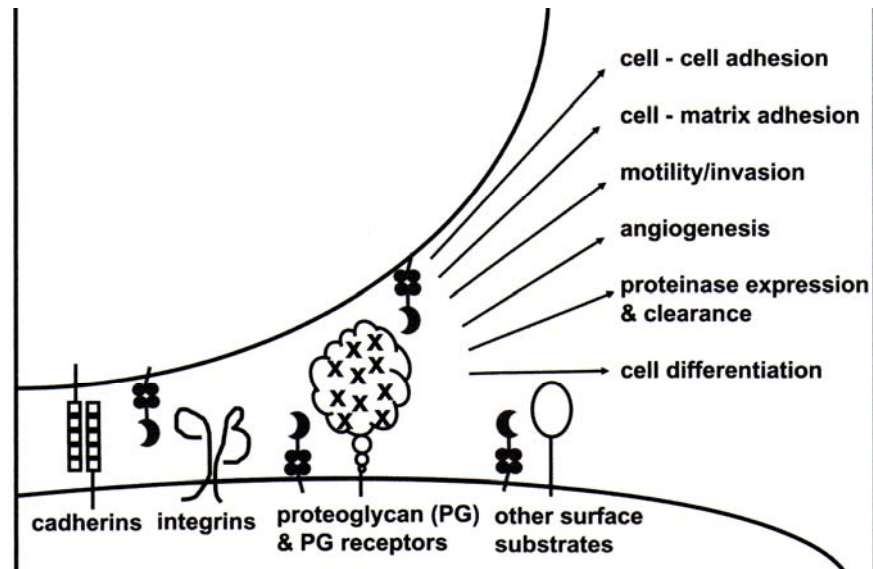


Fig.13. Clivage par MMP-14 des substrats à la surface cellulaire
MMP-14 est capable de cliver de nombreuses molécules de surface cellulaire et participer à de nombreux mécanismes dépendant du micro-environnement de la cellule. (Barbolina M, Stack M. *Semin Cell Dev Biol* 2008)

IV.4. Régulation de l'activité de MMP-14/MT1-MMP

L'étape essentielle de l'activation de MMP-14 est l'activation par les furines. Toutefois la régulation est beaucoup plus complexe pour permettre une régulation spatiale et temporelle permettant une fonction normale de l'ensemble de la cellule. Cette régulation comprend l'activation par les furines, l'inhibition par les TIMPs et l'auto-protéolyse, le transfert du compartiment intra-cellulaire vers la membrane cellulaire, l'internalisation et le retour vers le compartiment intra-cellulaire.

L'internalisation s'effectue via des invaginations recouvertes de clathrine et interférant avec la queue cytoplasmique de MMP-14 (Jiang et al 2001).

L'activité de MMP-14 peut être inhibé par TIMP-2/TIMP-3 et TIMP-4 ou par autolyse (Osenkowski et al 2004). En contre partie, l'activation de MMP-14 se fait en 2 étapes. Il existe une première étape de libération du pro-domaine par les furines puis un mécanisme d'autolyse permettant l'exposition complète du site actif (Golubkov et al 2007). Il faut noter que TIMP-2 joue un rôle d'inhibiteur mais aussi un rôle d'activateur en formant un complexe avec MMP-14. Ce complexe MMP-14/TIMP-2 active la voie intra-cellulaire Ras-Raf-ERK (D'Alessio et al 2008) et nécessite la queue cytoplasmique C-terminal de MMP-14.

IV.5. MMP-14, athérome et anévrisme artériel

Vu le rôle important de collagénase joué par MMP-14 et son rôle pivot pour la protéolyse péri-cellulaire, il est logique de penser que MMP-14 pourrait être impliqué dans les mécanismes pathologiques liés à un remodelage tissulaire comme on peut l'observer au cours de la maladie athéromateuse et anévrysmale. Une étude a déjà mise en évidence la présence de MMP-14 au sein de plaques athéromateuses humaines par immunohistochimie (Rajavashisth et al 1999). Une étude immunohistochimique réalisée au sein de notre institution a confirmé ces données (fig. 14). Une étude in vitro a déjà montré la nécessité de MMP-14 pour permettre l'invasion d'un gel 3D par des CML humaines. L'inhibition de MMP-2, de MMP-9, de la plasmine et des cathepsines L, S ou K ne modifiait pas l'invasion cellulaire (Filippov et al 2005). Ces résultats suggèrent le rôle important de MMP-14 pour la formation de lésion néo-intimale par prolifération de CML

et migration de ceux-ci au niveau de la néo intima. Une étude expérimentale (utilisant un modèle d'infarctus chez le mouton) a montré que le taux de MMP-14 augmentait dans la zone de transition et dans la zone infarctée après un infarctus du myocarde alors que les expressions de MMP-1 et MMP-9 étaient inchangées (Wilson et al 2003). De plus l'augmentation d'expression de MMP-14 était corrélée avec l'extension de la surface infarctée. Ces résultats confirment le rôle de MMP-14 au cours des processus pathologique liés à un remodelage ou au cours de la cicatrisation qui nécessite aussi un remodelage tissulaire. De plus, une étude histologique clinique a montré que MMP-14 était co-localisé avec les CML et les macrophages au sein de la plaque d'athérome (Rajavashisth et al 1999). Cette étude a aussi montré que l'expression de MMP-14 était augmentée à l'état basal ou après stimulation aussi bien au niveau ARN que protéique au sein des CML et des macrophages isolées à partir de plaques athéromateuse humaines et comparées à des tissus contrôles. Une étude in vitro a aussi montré que les CE humaines exprimaient MMP-14 au niveau RNA et protéique. Cette expression était augmentée après stimulation par addition LDL-oxydé, TNF- α , IL-1 α et IL-1 β . L'addition de LDL natif ne modifiait pas l'expression de MMP-14 (Rajavashisth et al 1999). Cette étude suggère donc que les cytokines et le LDL-oxydé pourraient influencer le remodelage artériel via MMP-14. Il est à noter que l'ensemble des cellules constituant la paroi artérielle et impliquées dans l'athérogénèse sont capables d'exprimer MMP-14.

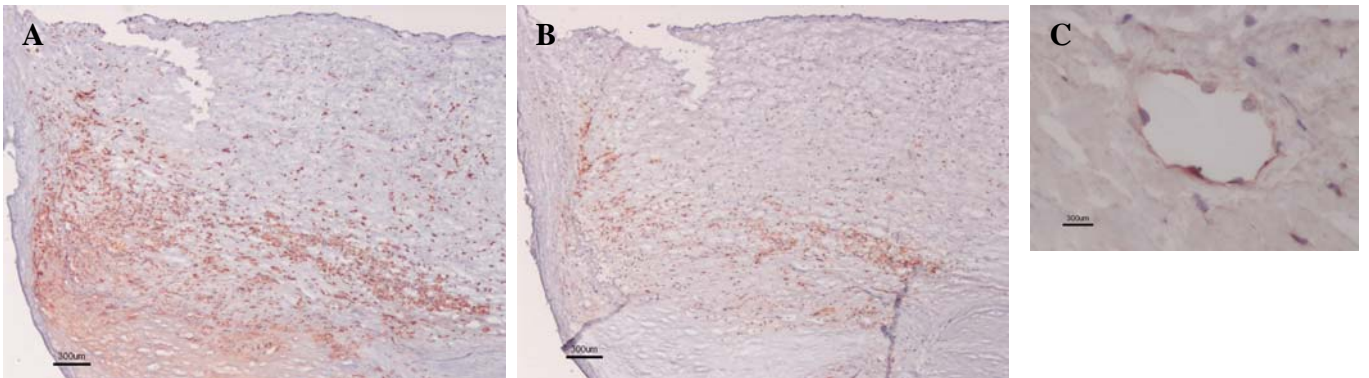


Fig.14. Expression de MMP-14 au sein d'une plaque d'athérome de carotide chez l'Homme
 A : Marquage immuno histochimique de macrophage. B : Marquage immuno histochimique de MMP-14 co-localisée avec les macrophages. C : marquage immuno histochimique de MMP-14 au sein de vasa vasorum montrant l'expression de MMP-14 au niveau de l'endothélium. (Don de Sukhova G.)

Aucune donnée ne prouve l'implication de MMP-14 au cours de la maladie anévrysmale humaine au niveau de l'aorte abdominale pour l'instant même si il est licite de penser un rôle au cours des processus de remodelage de la paroi aortique observés au cours de l'évolution de la maladie anévrysmale.

V: Les Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSMs)

Friedenstein fut le premier à mettre en évidence des cellules non-hématopoïétiques capables de se différencier en ostéoblastes et tissu fibreux (Friedenstein et al 1976) au sein de la Moëlle Osseuse (MO). Il observa une population cellulaire, qui une fois mise en culture à faible densité, était capable de former des colonies de cellules adhérentes au plastique et dont la forme allongée ressemblait aux fibroblastes. Le terme de Colony-Forming Unit-Fibroblasts (CFU-F) fut initialement employé pour décrire le caractère monoclonal de ces colonies cellulaires. La greffe sous-cutanée de CFU-F était capable de

reconstituer l'environnement hématopoïétique en donnant naissance à du tissu fibreux, de l'os contenant ou non de la moëlle. Plusieurs autres travaux confirmèrent ces données et démontrèrent le caractère multipotent de ces cellules par leur capacité à se différencier en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes (Pitinger et al 1999, Bianco et al 2008). Caplan fut le premier auteur à utiliser le terme de *Mesenchymal Stem Cells* ou Cellules Souches Mésoenchymateuses (MSCs) pour dénommer ces cellules (Caplan 1991). Devant les critiques de certains auteurs remettant en cause le caractère de cellule souche, la Société Internationale pour la Thérapie Cellulaire proposa le terme de Cellules Stromales Multipotentes (*Multipotents Stromal Cells*) (Horwitz et al 2005). Les propriétés obligatoires d'une cellule pour être qualifiée de cellule souche sont la multipotence et l'auto-renouvellement. Or les démonstrations de multipotence ont principalement été faites dans des conditions *in vitro* qui ne restituent pas forcément les interactions *in vivo* et exposent les cellules à des stimuli artificiels (Bianco et al 2010). Mais un travail récent isola une population sous endothéliale de MSCs exprimant CD146 (MCAM melanoma-associated cell adhesion). L'explantation de ces cellules et leur réimplantation hétérotopique après culture *ex vivo* générèrent de l'os, des adipocytes et du stroma médullaire, mais surtout des cellules identiques aux cellules initiales (Schetti et al 2007). Ce fut le premier travail prouvant l'auto-renouvellement des MSCs. Cette observation fut confirmée par un autre travail utilisant des MSCs isolées en périphérie de l'adventice chez la souris. Ces cellules étaient positives pour récepteur du PDGF (PDGFR- α) et *stem-cell* Antigène 1 (sca-1) mais négatives pour CD45 et TER119. L'injection de ces cellules dans une souris receveuse irradiée sans phase de culture *ex vivo* généra les mêmes cellules initiales mais aussi des ostéoblastes et adipocytes (Morikawa et al 2009).

Ces données semblent rendre légitime le terme de cellules souches attribué aux MSCs.

V.1. Caractéristiques *in vitro* et *in vivo* des CSM-MO (Cellules Souches Mésoenchymateuses issues de la Moëlle Osseuse)

Leurs caractéristiques principales sont leur isolement basé sur leur capacité à adhérer au plastique, leur immunophénotype et leur capacité à se différencier en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes *in vitro* (Chamberlain et al 2007). Mais il est admis maintenant que les CSMs sont capables de se différencier en CML (Galmiche et al 1993, Delorme et al 2009).

L'immunophénotype de ces cellules est résumé dans le Tableau I. En culture, elles expriment des marqueurs non-spécifiques tels que CD44, CD73, CD90, CD146 mais n'expriment pas des marqueurs hématopoïétiques tels que CD11b, CD14, CD45 et CD34 (Pontikoglou et al 2011). Elles expriment des marqueurs plus spécifiques tels que Stro-1, GD2, SSEA4, CD49a, CD105, CD146, CD200 et CD271. Même si ces cellules en culture ont l'air homogène par leur morphotype, elles sont en fait très hétérogènes par leur expression d'anti-gènes membranaires tels que CD146 et CD200 (Delorme et al 2008) et leur multipotence. Un tiers seulement des cellules en culture sont multipotentes (Pittinger et al 1999). Après un temps de latence, elles sont capables de se dupliquer très rapidement et il a été décrit des cultures *ex vivo* viables jusqu'à 50 passages (Pittinger et al 1999). Il a été montré que des CSMs pouvaient exister au sein de niche vasculaire et être isolées en dehors de MO. C'est le cas des péricytes qui se trouvent à l'opposé de la lumière artérielle en contact avec les cellules endothéliales. Il a déjà été montré que ces péricytes avaient le phénotype CSMs et la capacité à se différencier en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes (Crisan et al 2008), et ce quelque soit leur tissu d'origine.

Toutefois, la preuve que ces péricytes soient identiques aux CSMs isolées à partir de la moëlle osseuse reste à établir.

Marker	Property	Cultured MSCs	Native MSCs
Stro-1	Unknown antigen	+	+
GD2	Ganglioside	+	+
SSEA4	Stage-specific embryonic antigen	+	+
CD11b	ITGAM (integrin α M)	-	-
CD14	LPS receptor	-	
CD29	Integrin β ₁ chain	+	
CD34	Sialoprotein	-	+
CD44	Hyaluronan receptor	+	
CD45	Pan-leukocyte antigen	-	dim/-
CD49a	Integrin α ₁ chain	+	+
CD49b	Integrin α ₂ chain	+	
CD49c	Integrin α ₃ chain	+	
CD49d	Integrin α ₄ chain	-	
CD49e	Integrin α ₅ chain	+	
CD51	Integrin α V chain	+	
CD73	Ecto 5 endonuclease	+	+
CD90	Thy-1	+	+
CD105	TGF- β RIII (transforming growth factor- β receptor III)	+	+
CD106	VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1)	+	+
CD133	AG133 (prominin)	-	+
CD140b	PDGF-R β (platelet-derived growth factor receptor- β)	+	+
CD146	Mel-CAM (melanoma-cell adhesion molecule)	+	+
CD166	ALCAM (activated lymphocyte cell adhesion molecule)	+	+
CD200	OX-2	+	+
CD271	NGFR (neural growth factor receptor)	-	+

Tableau I. Immunophénotypes des CSMs in vitro et in vivo
(Pontikolou C, Deschaseaux F, Sensebé L, Papadaki H. *Stem Cell Rev end Rep* 2011 ;7 :569-89)

V.2 L'immunomodulation des CSMs

Une des caractéristiques principales de ces cellules est leur capacité à éviter leur reconnaissance immunitaire et à inhiber différentes fonctions de l'immunité. Ce manque d'immunogénicité pourrait s'expliquer par une faible expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) et un manque d'expression du CMH II associés à une absence de molécules stimulantes telles que CD40 et CD80 (Nauta 2007, Uccelli et al 2007, Siegel et al 2009). Toutefois de récents travaux ont tempéré cette action peu immunogène en montrant un rejet partiel après perfusion de CSMs dans des souris allogéniques en mismatch pour CMH (Nauta et al 2006).

L'immunomodulation des CSMs s'effectue principalement par une influence sur l'ensemble des cellules impliquées dans la réponse immunitaire.

Cet effet est médié par l'inhibition des sous populations CD3⁺, CD4⁺ et CD8⁺ des lymphocytes T par les CSMs (Krampera et al 2003). Ce caractère semble être important puisqu'il est conservé même après croisement inter espèces par xéno greffe (Djouad et al 2003). Les CSMs agissent en stoppant la division cellulaire en phase G0-G1 par inhibition de l'expression de cycline D2 (Glennie et al 2005). Ainsi, CSMs ne stimulent pas l'apoptose lymphocytaire mais favorisent la survie des lymphocytes quiescents. Cette action de maintenir la survie des lymphocytes T est accentuée par l'inhibition de facteur apoptique telle que récepteur Fas et le ligand Fas (Benvenuto et al 2007). Certains travaux suggèrent que CSMs stimulent le passage d'une réponse pro-inflammatoire vers une réponse anti-inflammatoire en inhibant la sécrétion de IFN γ par les Th-1 (T-helper 1) conjointement à une augmentation de sécrétion d'IL-4 par Th-2 (Aggarwal 2005). La dernière action sur la population des lymphocytes T semble être une suppression de leur

cytotoxicité. Les mécanismes moléculaires de cette modulation sur les lymphocytes T restent peu clairs. Ils semblent comporter une interaction directe inter-cellulaire mais aussi une action paracrine via TGF- β 1, HGF, indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), NO, PGE2, la forme soluble HLA-G et les Toll-Like Recepteurs (TLRs) (Siegel et al 2009, Opitz et al 2009).

De même, les CSMs semblent stopper la prolifération des lymphocytes B *in vitro* (Augello et al 2005). Mais les CSMs pourraient agir aussi en inhibant la maturation des lymphocytes B et la sécrétion d'anticorps et en modulant leur chémotatisme via une inhibition de l'expression de récepteurs aux chémokines CXCR4, CXCR5, CXCR7 (Corcione et al 2006).

Les MSCs ont aussi une action sur les Cellules Dendritiques (CD) tendant vers un phénotype tolérant. Les mécanismes impliqués sont multiples et comprennent une inhibition de l'activation des cellules-T par les CD (Jiang et al 2006), l'orientation vers une réponse Th-2 par sécrétion de IL-10 au dépend de TNF- α (Aggarwal et al 2005). Ces mécanismes pourraient se faire via la sécrétion de PGE2 pour inhiber la production de cytokines par les CD, mais aussi via IL-6, MCS-F et une interaction directe inter cellulaire (Aggarwal et al 2005, Zhao et al 2010).

CSMs influencent aussi la fonction des macrophages et des neutrophiles en inhibant la production de TNF α , IL-12, en stimulant IL-6 et IL-10 et en augmentant l'activité phagocytaire des macrophages (Kim et Hematti 2009). Les CSMs semblent avoir aussi une activité anti-apoptique sur les neutrophiles médiée par IL-6 (Raffaghello et al 2008). Enfin les CSMs semblent exercer une modulation de la réponse immunitaire en

inhibant la prolifération, la cytotoxicité et la production de cytokines par les cellules Natural Killer (NK) (Spaggiari et al 2008).

A côté de ces effets immunosuppresseurs, les MSCs sont capables d'induire une réponse par les lymphocytes T CD8 en présentant des anti-gènes par le CMH I (Francois et al 2009).

V.3. Rôle des CSMs dans l'hématopoïèse

L'observation de Friedenstein (Friedenstein et al 1976) fut la première à montrer l'importance des CSMs comme cellules de soutien et de régulation des Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH). Les CSMs semblent jouer un rôle très important pour maintenir une hématopoïèse d'après des expérimentations de déplétion et culture in vitro sur de longues périodes (Charbord et al 1996). L'étude de Mugumura montra que les CSM-MO jouaient un rôle important pour la repopulation des CSH et la prise de greffe (Mugumura et al 2006). Il pratiqua une transplantation de CSM-MO humaines expandues ex vivo dans la MO de souris immunodéficientes et retrouva des cellules issues du donneur dans la MO du receveur et ces cellules ont acquis des phénotypes variés reconstituant l'intégralité du micro environnement médullaire. Ces phénotypes comprenaient des péricytes, myofibroblastes, des cellules réticulaires, des ostéocytes et ostéoblastes et des cellules endothéliales. Il est intéressant de noter que la même expérience effectuée par un mode d'administration par perfusion dans le sang périphérique aboutit à un échec confirmant l'élimination des CSMs circulantes par les poumons (Barbash et al 2003). Le mécanisme incriminé est une interaction avec les CSH par l'expression de N-cadhérine et la production de SDF-1. Les CSMs interagissent avec les CSH par des mécanismes paracrines impliquant des cytokines (telles que TGF β 1, IL-

6,-7, -8, -11, -12, -14 et -15, le M-et GM-CSF), des molécules d'adhésion inter-cellulaire (V-CAM1) (Majumdar et al 2000, Prockop 1997). Cette régulation illustre ainsi l'importance de la niche et du micro environnement dans la fonction des CSMs.

V.4.Les MSCs au sein des systèmes de réparation tissulaire

Le fait de montrer que des MSCs chez l'adulte étaient capables de multipotence à profondément modifier le concept des cellules souches. Il a été alors possible de provoquer des différenciations cellulaires par stimuli. Ce mécanisme, appelé trans différenciation, a permis le développement de projet de thérapie cellulaire. La trans différenciation est difficile à mettre en évidence car l'acquisition de marqueurs cellulaires n'est pas synonyme de l'acquisition de la fonction cellulaire. De plus il a été montré que les CSMs amélioraient leur plasticité après altération de leur caryotype suggérant une acquisition de la multipotence par altération génétique (Jiang et al 2002). Ainsi, l'exposition prolongée de CSMs au 5-bromo-2'-deoxyuridine, un agent chimique hautement mutagène, améliore leur plasticité (Qu et al 2004). L'ensemble de ces données suggère la plus grande prudence lors de l'utilisation de ce type de cellules en pratique clinique et suggère l'exclusion des cultures cellulaires prolongées pour les applications cliniques. De nombreuses publications ont voulu démontrer le rôle bénéfique des CSMs dans la réparation tissulaire en réponse à un traumatisme ou une maladie. La première fonction réparatrice étudiée fut au niveau de la réparation du squelette après mutation expérimentale ou chez des patients atteints de défaut d'ostéogénèse ou de mutation du collagène I (Horwitz et al 2002). Mais, l'implication des CSMs dans des réparations tissulaires variées a été testée. La perfusion de CSMs a permis d'améliorer la réparation

tissulaire pulmonaire dans un modèle de traumatisme pulmonaire par administration de bléomycine. Ces cellules se trans différiaient en pneumocytes de type II (Ortiz et al 2003). Les CSMs ont été utilisées avec succès comme thérapie dans des modèles animaux de glomérulonéphrites (Kunter et al 2006), de diabète (Lee et al 2006), maladie du greffon contre l'hôte (Ringden et al 2006), d'infarctus du myocarde (Minguell et Erices 2006). Les mécanismes sont en cours d'exploration.

Toutefois, il a été observé dans une étude clinique que les patients traités bénéficiaient d'une amélioration de la croissance osseuse, de la densité osseuse malgré un taux très faible (<1%) de cellules du donneur au sein des tissus du receveur (Horwitz et al 2002). La même observation fut constatée après perfusion de CSMs humaines dans un modèle d'infarctus du myocarde chez la souris immunodéficiente ; aucune cellule du donneur ne fut détectée chez le receveur après 3 semaines malgré l'amélioration de la fonction cardiaque et du remodelage ventriculaire (Iso et al 2007). Ces données suggèrent que les CSMs pourraient agir principalement par un mode paracrine et l'on sait que les CSMs sont capables de sécréter un large spectre de cytokines. Il pourrait influencer la réparation tissulaire par de nombreux mécanismes comprenant la stimulation de la prolifération et de la survie des populations cellulaires endogènes, la stimulation de l'angiogénèse, l'inhibition de l'inflammation et de la réponse immunitaire, la réduction de l'apoptose (Phinney et Prockop 2007).

VI : Les traitements actuels de la maladie artérielle chez l'homme

VI.1. Concept actuel de la plaque athéromateuse: rôle de l'inflammation et ses conséquences thérapeutiques

a) l'inflammation dans l'athérogénèse

Alors que les premiers travaux se focalisaient sur le rétrécissement artériel, il est apparu que les complications de l'athérome étaient principalement dues à l'inflammation et à son interaction avec l'accumulation de cholestérol au sein de la plaque.

- Inflammation et l'initiation de l'athérogénèse.

L'expérimentation animale utilisant des régimes riches en cholestérol a montré qu'une adhésion de leucocytes à la surface de l'endothélium apparaissait précocement au cours de l'athérogénèse (Poole et Florey 1958). Une molécule d'adhésion leucocytaire a émergé comme un acteur essentiel de cette étape, il s'agit de Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1). En effet, outre sa sélectivité pour les leucocytes, elle est exprimée par les cellules endothéliales en réponse au régime hypercholestérolémique dans les zones d'athérome (Cybulsky et Gimbrone 1991). De plus, sa réduction d'expression dans un modèle de souris induit une réduction de l'athérome (Li et al 1993). Associé à VCAM-1, E- et P-selectine interviennent aussi (Dong et al 1998). Le mécanisme d'induction de l'expression de VCAM-1 semblerait faire intervenir une activation transcriptionnelle par la voie NF- κ B due à des lipoprotéines oxydées et à des cytokines telles que IL-1 β et TNF- α (Collins 2001). De plus, les zones à *shear stress* laminaire ont peu d'athérome. Il a été montré qu'un *shear stress* laminaire stimulait

l'expression de la NO synthase au sein des CE qui est un inhibiteur de VCAM-1 (De Caterina et al 1995). Cela suggère que l'inhibition de VCAM-1 pourrait être un mécanisme d'athéroprotection.

Après leur fixation sur l'endothélium, les leucocytes franchissent l'endothélium par diapédèse entre les jonctions inter-cellulaires. Ce mécanisme est stimulé par divers facteurs dont MCP-1. Des études, inhibant l'expression de MCP-1 et de son récepteur CCR2 dans un modèle murin d'athérome, ont montré une diminution de la formation des plaques chez les souris mutées (Boring et al 1998). Il en est de même pour IL-8 qui est chémo-attractant pour les leucocytes (Boisvert et al 1998).

Une fois intégrés à la paroi artérielle, les leucocytes vont subir une activation pour se transformer en macrophages. Au cours de cette transformation, les cellules vont exprimer des récepteurs aux lipoprotéines tels que Scavenger Receptor A (SRA) et CD36. Cette transformation implique la contribution de facteurs solubles tels que M-CSF. Ce facteur active l'expression de SRA et CD36 et est exprimé en grande quantité au sein des athéromes humains et expérimentaux (Clinton et al 1992). L'inhibition d'expression de M-CSF dans un modèle d'athérome chez la souris montre un retard de développement de la plaque et une baisse du nombre de macrophages (Smith et al 1995). De même, GM-CSF a montré son rôle en améliorant la survie des macrophages et la production de myéloperoxydase qui est une enzyme favorisant l'inflammation via une activation du stress oxydatif (Sugiyama et al 2001).

- Inflammation dans la progression et les complications de l'athérome (fig.15)

La vue classique de l'athérome décrivait un rétrécissement progressif de la lumière artérielle aboutissant aux ischémies tissulaires. Cette évolution était inéluctable et

linéaire. La prolifération de CML dans la néo intima favorisée par les macrophages était la principale explication. Mais des études cliniques utilisant des séries angiographiques ont montré la rareté de ces sténoses et leur caractère fulgurant (Yokoya et al 1999).

Des études histologiques ont alors montré des ruptures de plaque provoquant la thrombose in situ et pouvant expliquer ces évolutions par à coups (Davies 1996). Trois mécanismes ont été évoqués :

- La desquamation de l'endothélium provoque l'agrégation plaquettaire et la thrombose. Au cours de ce mécanisme, une production de médiateurs de l'inflammation par des lymphocytes-T pourrait induire l'apoptose des cellules endothéliales et stimuler la production de MMPs qui lyseraient la membrane basale, élément essentiel à l'organisation de l'endothélium (Rajavashisth et al 1999).

- La formation de micro vaisseaux peut être responsable d'hémorragie intra-plaque. Il a été montré que les cellules inflammatoires secrètent un certain nombre de facteurs pro-angiogéniques dont le VEGF (Ramos et al 1998). De plus, l'administration d'anti-angiogéniques dans un modèle expérimental inhibe la formation de micro vaisseaux et l'évolution des plaques (Moulton et al 1999). Ce point soulève la possibilité d'effet pervers par stimulation de rupture de plaque lors de l'utilisation des thérapies pro-angiogéniques.

- Le troisième a été le plus étudié, c'est la fracture de la coque fibreuse. L'élément essentiel conférant la stabilité de cette coque est le collagène interstitiel. Il a été montré que IFN- γ inhibait la synthèse de collagène par les CML au sein de la média. De plus, les 3 collagénases interstitielles MMP-1, -8, -13 sont fortement exprimées au cours de l'athérome (Gallis et al 1994, Herman et al 2001). Une fois le clivage initial effectué du

collagène interstitiel, le catabolisme du collagène est poursuivi par les gélatinases MMP-2 et -9 dont la production en grande quantité a été objectivée dans les plaques athéromateuses (Gallis et al 1994). Des études in vitro ont montré que des cytokines (IL-1 β , TNF- α , CD40L) stimulent la production des MMPs par les macrophages, CE et CML (Kovanen et al 1995). Ainsi l'augmentation de la collagénolyse au sein de la coque fibreuse amincirait celle-ci et la rendrait plus fragile au stress hémodynamique. Ceci est en accord avec le concept de 2 types de plaque, celle qui est stable composée d'une coque fibreuse épaisse et celle qui est instable composée d'une fine coque.

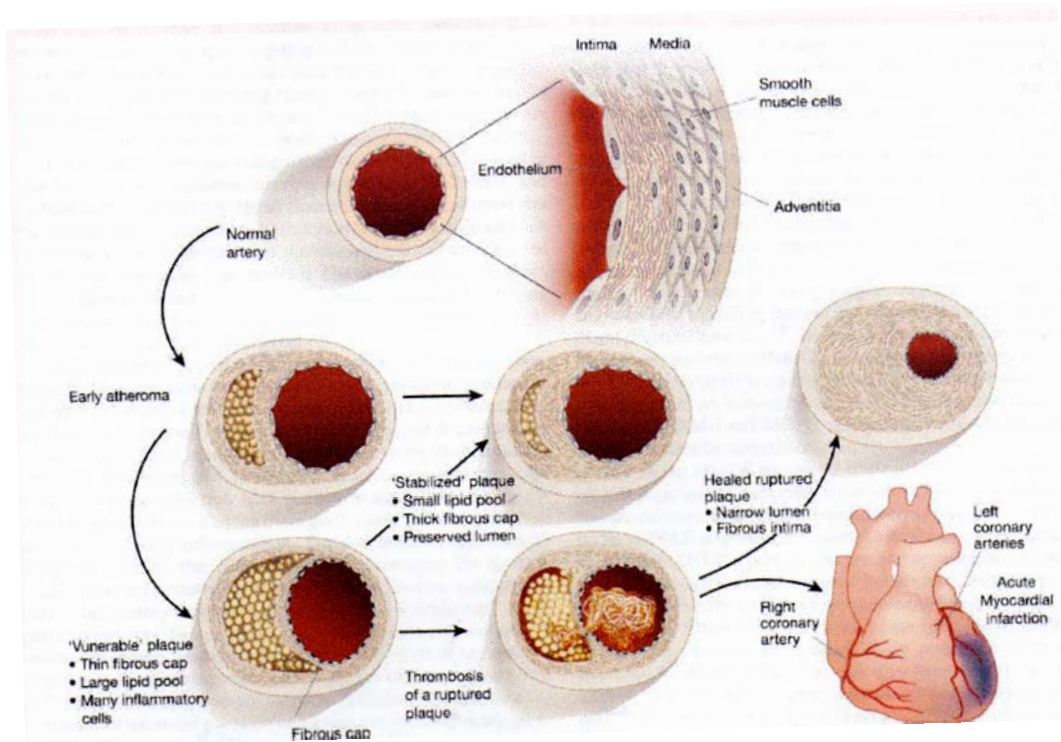


Fig.15. Schéma de l'histoire naturelle de la plaque athéromateuse coronarienne

A partir de la paroi normale de l'artère, l'athérogénèse évolue par la constitution d'un cœur lipidique associé à la constitution d'une coque fibreuse. Celle-ci peut être stable et caractérisée par une coque fibreuse avec une lumière intacte ou vulnérable et composée d'une fine coque et nombreuses cellules inflammatoires. Cette plaque vulnérable peut se rompre et provoquer une thrombose se manifestant par une ischémie tissulaire puis cicatriser avec un rétrécissement luminal séquentiel. Elle peut évoluer vers un stade stable avec ré épaissement de la coque. (Libby P. *Nature* 2002 ;420 :868-74)

b) Conséquences de l'inflammation sur la thérapeutique

- *Contrôle des facteurs de risque*

Le traitement visant à diminuer le cholestérol a été l'évolution la plus marquante au cours de ces 50 dernières années. Mais le contrôle strict de l'hypercholestérolémie n'est pas suffisant. D'autres facteurs de risque atypique pourraient être importants.

On peut citer l'homocystéine, des germes intra-cellulaires tels que *Chlamydia Pneumoniae* et le stress oxydatif lié à l'angiotensine II.

Le syndrome métabolique qui associe obésité, diabète et hypercholestérolémie est un des principaux facteurs de risque de l'athérome. Le tissu adipeux induit l'inflammation et l'augmentation des triglycérides est accompagnée d'une baisse du HDL-cholestérol. Or ce dernier stimule la sécrétion d'anti-oxydants tels que la paraoxonase et platelet-activating factor acetyl hydrolase (Navab et al 1998).

- *L'inflammation comme cible thérapeutique*

Il est admis de tous que les inhibiteurs de l'hydroxymethylglutaryl Coenzyme A (statines) ont un rôle hypolipémiant et non hypolipémiant et donc un effet pleiotrope sur l'athérome. Ce dernier pourrait être principalement anti-inflammatoire par inhibition de l'adhésion leucocytaire, par inhibition des macrophages, par inhibition des MMPs et du Facteur Tissulaire (FT) (Aikawa et al 2001). Les statines stimulent aussi l'activité NO synthase des CE (Laufs et al 1998). Toutefois, l'effet anti-inflammatoire prépondérant est controversé. Par exemple, la pravastatine a démontré son effet protecteur vis-à-vis de l'athérome malgré un effet *in vitro* nul sur l'inflammation due à sa relative hydrophobie. D'un autre côté, les statines diminuent les marqueurs de l'inflammation telle que la CRP de façon disproportionnée par rapport à la baisse du cholestérol suggérant un effet anti-

inflammatoire majeur (Ridker et al 1998). De plus, les statines semblent avoir un effet pro fibrinolytique direct *in vitro* sur les CE en inhibant la synthèse d'inhibiteur type 1 de l'activateur du plasminogène et une stimulation de la synthèse de l'activateur du plasminogène. L'ensemble aboutit à une lyse du thrombus éventuel (Bourcier et Libby 2000). En contre partie, un régime hypolipémiant seul aboutit aux mêmes résultats dans un modèle d'athérome chez le lapin (Aikawa et al 2002).

De même, l'effet bénéfique des inhibiteurs de l'angiotensine II semble être principalement dû à leurs activité anti-inflammatoire et non à la baisse de pression artérielle. Ils inhibent la production de VCAM-1 et MCP-1 par les CE et inhibent la production de IL-6 par les CML (Yusuf et al 2000).

Les agonistes de PPAR- α , utilisés initialement pour diminuer les triglycérides, ont aussi un rôle anti-inflammatoire en réduisant l'expression de VCAM-1 et du FT mais aussi en favorisant l'expression apoA1, principal apoprotéine du HDL (Libby 2001). Cette action pourrait liée à leur interférence avec NF- κ B.

Ces exemples illustrent l'activité anti-inflammatoire prépondérante que jouent certains traitements athéroprotecteurs.

VI.2. traitements chirurgicaux ou endoprothèses : avantages de l'approche endovasculaire

Les traitements actuels des AAA ont pour principe de soustraire la paroi fragilisée de la contrainte hémodynamique, soit par un remplacement aortique lors d'une intervention chirurgicale, soit en déployant une prothèse par voie endovasculaire (endoprothèse).

L'AAA se trouve souvent chez les sujets âgés porteurs de maladies cardiovasculaires (hypertension artérielle, maladie coronarienne etc). La chirurgie conventionnelle des AAA nécessite un clampage total de l'aorte pesant lourdement sur l'équilibre hémodynamique chez ces patients fragiles. La mortalité de ce type d'intervention est de 5 à 10% et est coûteuse (Lancet 1998, Allaire et Becquemin 1998).

Les techniques endoprothétiques ont permis de réduire la morbi-mortalité secondaire au traitement (Lancet 2004), particulièrement chez les patients à risque chirurgical élevé, et de diminuer le coût en réduisant la durée d'hospitalisation (Becquemin et al 1999). Ce traitement consiste à interposer par voie endovasculaire une greffe prothétique fixée sur la face luminale de la paroi anévrysmale pour exclure la zone malade des contraintes hémodynamiques artérielles sans besoin de remplacement de l'aorte ni de l'abdominal, afin de prévenir la rupture (Blum et al 1997). Les limites de ce traitement sont les indications restreintes par la morphologie de la lésion et l'incidence des fuites entre l'endoprothèse et la paroi anévrysmale qui atteint 20 à 30% (étude Eurostar) (Harris 1998). Ces fuites caractérisées par un passage de sang entre la prothèse et la paroi fragilisée exposent le patient à la rupture, obligent à une surveillance et à une prise en charge longue et coûteuse. L'étude multicentrique française pilotée par le Pr. Becquemin rapportait un taux de réopération endovasculaire chez 23% des patients en deux ans (Becquemin et al 1999). D'après le registre européen EUROSTAR, le taux de rupture d'AAA chez des patients porteurs d'endoprothèse est de 1% avec une mortalité de 65% (41 % de mortalité pour les patients ayant pu être opérés pour la rupture) (Harris et al 2000). Une intervention chirurgicale de «conversion» est parfois nécessaire mais celle-ci présente une mortalité de 24% (Harris et al 2000). En effet, les

mesurations de l'endoprothèse sont choisies avant l'implantation en fonction de la géométrie de l'anévrisme, l'adéquation entre le dispositif endovasculaire et la lésion aortique est vite perdue lorsque l'anévrisme évolue, constituant probablement une cause majeure d'échecs des endoprothèses par les endofuites. Le conflit entre le vivant et l'inerte nécessite une nouvelle approche thérapeutique. Si l'anévrisme « vivant » est laissé en place, il faut le stabiliser en transférant à sa paroi du matériel « vivant ». Les moyens les plus immédiats que nous explorons pour parvenir à cet objectif sont la thérapie cellulaire et la thérapie génique, par voie endovasculaire.

VII: Modélisation animale de la pathologie humaine

VII.1. Modélisations animales utilisées pour l'étude sur l'athérome

VII.1.1. modèle de la plaque athéromateuse chez la souris : souris LDLr KO

Les souris sont résistantes à l'athérosclérose naturellement. Spontanément, l'athérome peut apparaître dans la souche C57BL/6 soumise à un régime riche en cholestérol composé de 1,25% de cholestérol et 0.5% d'acide cholique. Toutefois cet athérome ne modélise pas parfaitement la maladie humaine car sa composition et le rôle toxique du cholestérol est trop prépondérant. De plus la taille et l'incidence des plaques sont trop aléatoires (Paigen et al 1985). Toutefois le modèle de souris a des avantages. Leurs temps de reproduction et de gestation sont courts, ce qui permet des études sur un nombre important d'animaux et elles nécessitent peu de place. L'intérêt principal réside dans la possibilité de manipulation génétique permettant de neutraliser sélectivement certains gènes pour obtenir une souris KO. Le modèle athéromateux le plus étudié et donc le plus

utilisé est le modèle de ApoE-KO mice dans la souche C57BL/6 (Piedrahita et al 1992). Ce modèle de souris est viable et comporte un taux total de cholestérol cinq fois supérieur à la normale et principalement représenté par les chylomicrons et les VLDL. Ce modèle développe des lésions athéromateuses dont l'évolution mime l'histoire naturelle de l'athérome humain. Il existe précocement (<6 semaines de vie) des stries lipidiques composées principalement de cellules spumeuses et de CML issues de la média. Au delà de 6 semaines de vie, la plupart des souris ont des lésions avancées avec cœur nécrotique composé de cholestérol entouré d'une coque fibreuse et la présence de nombreuses cellules inflammatoires (Reddick et al 1994). Il n'est pas rare ensuite d'observer des calcifications au sein de ces athéromes. L'autre similitude avec la maladie humaine est la présence d'épitopes oxydés sur les macrophages au stade initial puis dans le plasma. Toutefois, aucun cas de rupture de plaque n'a été observé dans ce modèle. Le désavantage principal de ce modèle est l'absence de contrôle de l'initiation de l'athérome puisque celui-ci apparaît même sous régime normal.

Ishibashi fut le premier à décrire le modèle par neutralisation du gène codant pour le récepteur au LDL (LDLR-KO) mimant ainsi les formes familiales d'hypercholestérolémie (Ishibashi et al 1993). Pour un régime normal, ces souris ont une augmentation modérée du VLDL et LDL cholestérol plasmatique ne permettant pas l'apparition d'athérosclérose ; soumises à un régime riche en cholestérol comme sus-cité, le taux de cholestérol plasmatique est multiplié par 6 par rapport au taux basal (≈1500 mg/dl vs. 250 mg/dl respectivement). On constate alors le développement d'un athérome similaire aux souris apoE-KO et dont l'évolution mime aussi la maladie humaine. Cet athérome est principalement localisé à la racine de l'aorte ascendante et sur l'aorte

thoracique. L'avantage principal de ce modèle est la possibilité d'induire le développement de l'athérome par modification du régime. C'est pour cette raison que ce modèle fut choisi dans ce travail.

VII.1.2. modèle de souris Mmp14 KO (Holmbeck et al 1999)

Il est très vite apparu que les MMPs étaient impliqués dans l'ensemble des mécanismes physiologiques ou pathologiques où la destruction cellulaire était fortement impliquée. L'étude des MMPs fut transformée par 3 évènements majeurs :

- e) l'avènement de la suppression élective au niveau génique de l'expression de MMPs et donc la création de souris n'exprimant pas les MMPs
- f) la découverte des MMPs trans membranaires et leur rôle clé dans la protéolyse péri cellulaire
- g) la découverte de nombreuses formes de MMPs

L'ensemble des déficiences en MMPs procure des phénotypes de souris sub normaux et peu létaux. La déficience en MMP-14 a des conséquences très sévères sur le phénotype et le développement de l'animal principalement caractérisés par des anomalies du squelette et du tissu conjonctif.

Les fibroblastes cutanés des MMP-14 sont incapables de cliver le collagène fibrillaire et sont caractérisés par des inclusions cytoplasmiques de fibre de collagène témoignant d'un phénomène de phagocytose pour digérer le collagène. Ceci explique le développement rapide pour ce phénotype de fibrose dans tous les tissus. Ce processus peut s'expliquer par une perte de l'activité collagénolytique des cellules de souris MMP-14. Ainsi, la baisse de cette activité collagénolytique provoque un

phénomène de compensation par induction de la phagocytose du collagène. Il a été montré aussi la présence d'une activité MMP-2 dans les cultures de cellules issues de souris MMP-14 KO. Ce fait montre que l'activation de MMP-2 ne dépend pas uniquement de MMP-14 mais aussi d'autres MMPs trans membranaires comme le suggèrent d'autres études (Pei 1999, Kang et al 2000). Ceci suggère aussi que la perte de l'activité collagénolytique des cellules issues de MMP-14-KO ne s'explique pas par une perte de l'activité MMP-2 mais que MMP-14 pourrait avoir un rôle direct de collagénase. Enfin, il est intéressant de constater que la perte d'une activité catabolique (activité collagénolytique) altère profondément des fonctions anaboliques (formation osseuse, croissance) et des fonctions cataboliques (perte de l'activité ostéoclastique pour la résorption osseuse).

A la naissance, les nouveaux-nés ont un morphotype normal mais rapidement des anomalies majeures cranio faciales vont apparaître dès le 5^e jour de naissance (fig.16). Chez l'homozygote, un retard de croissance et prise de poids vont apparaître et ces souris seront rachitiques au sevrage. A 3 semaines, plus de 30% décèderont. Contrairement aux hétérozygotes, les homozygotes n'auront aucune maturité sexuelle et aucune reproduction. Elles seront caractérisées par une fibrose générale, une perte de poils et mobilité très réduite.

L'une des principales caractéristiques de ces souris est une réduction de la croissance osseuse. Les noyaux d'ossification ne sont pas altérés et la fonction des plaques de croissance ainsi que leurs formations au cours de la vie embryonnaire ne sont pas modifiées. Par contre, on constate un retard de formation des centres d'ossification

secondaires (épiphyses). Ce retard est expliqué par la défaillance de développement et d'invasion des vaisseaux au sein du cartilage épiphysaire non minéralisé.

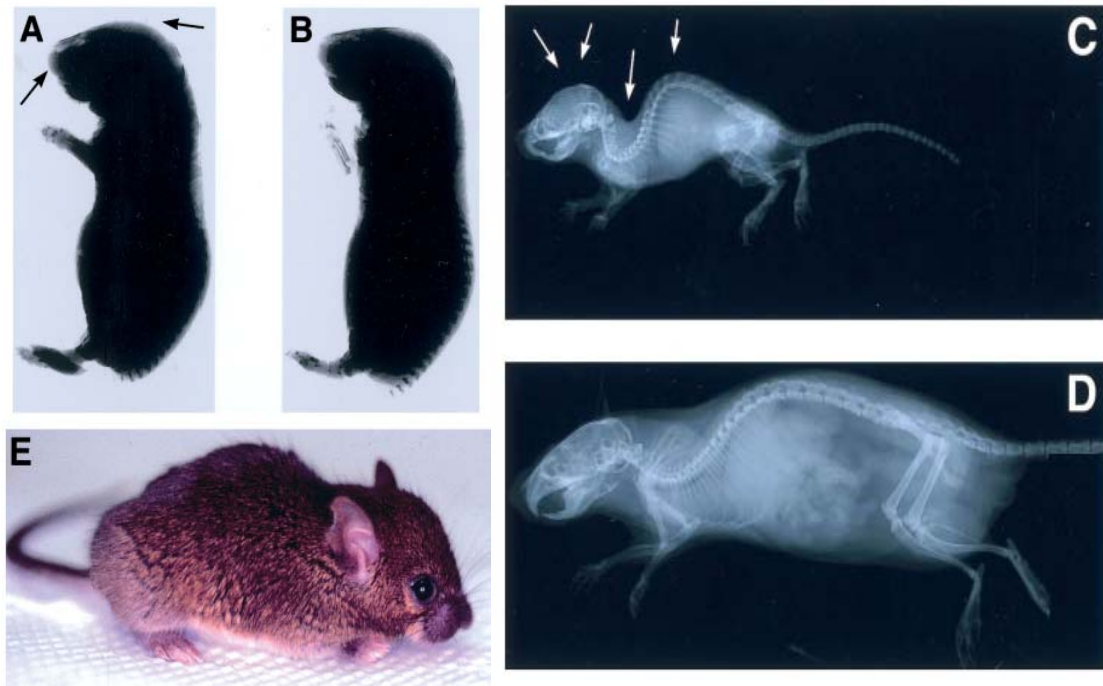


Fig.16. Morphotype de souris homozygotes MMP-14 KO

A, B : radios standards de nouveau-né MMP14-KO (A) et contrôle (B). On constate un raccourcissement du museau et un crâne plus bombé chez MMP-14KO (→). C,D : radios standard à 2 mois de MMP14-KO (C) et contrôle (D). On constate un plus petite taille avec une dysmorphie craniale et une hypercyphose et lordose du rachis (→). E : photo d'une souris MMP-14-KO à 2 mois. (Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, et al. *Cell* 1999 ;99(1) :81-92)

D'une façon générale, on constate une ostéopénie de l'ensemble du squelette. Initialement, Cette ostéopénie est surtout visible aux sites de jonction avec des tissus conjonctifs tels que les insertions tendineuses, ligamentaires et cartilage articulaire. On constate une activité ostéoclastique intense à ces sites pour permettre un remodelage tissulaire. Avec le temps, l'ostéopénie est générale. Les ostéoblastes sont observés au sein d'une MEC épaisse du périoste et ne peuvent migrer en périphérie osseuse pour établir

une ligne d'ossification suggérant un déficit de la protéolyse péri cellulaire pour permettre cette migration. Avec l'âge, lorsque la lyse osseuse dépasse la formation osseuse, on observe même une perte de la masse osseuse.

On constate aussi une atteinte des articulations caractérisée par une activité ostéoclastique très intense avec accumulation de cellules TRAP (Tartrate Resistant Acid Phosphatase) positives au niveau des insertions ligamentaires pour permettre un remodelage tissulaire, il existe une hyper prolifération et une fibrose des ligaments et de la synovi. Ces constatations histologiques miment une maladie rhumatoïde avec présence de cellules géantes ressemblant aux ostéoclastes.

De même, elles développent une fibrose avec une résorption extensive de l'os alvéolaire en adaptation avec la défaillance de remodelage des ligaments et de l'interface os-ligament au niveau du tissu péri odontal. Il en résulte une non éruption des molaires qui restent dans les mâchoires (Beertsen et al 2002). Par contre, le développement des incisives est normal suggérant une maturation des incisives indépendante de MMP-14.

La dysmorphie cranio faciale de ces souris est caractéristique. On constate la présence du cartilage embryonnaire sur l'ensemble des os du crâne chez ces souris. A l'état normal, ce cartilage disparaît dans les 10 premiers jours après la naissance permettant une calcification et une résorption osseuse. Il en résulte que les adultes ont une structure de crâne embryonnaire. Le mécanisme est principalement une absence de clivage du collagène de ce cartilage car la résorption des protéoglycans du cartilage est normale chez ces souris. Il en résulte une atteinte du remodelage des sutures crâniennes expliquant le morphotype typique avec un museau plus court, un crâne en

dôme et des yeux exorbités. A l'âge adulte, les souris MMP-14 KO ont un crâne fibrosé sans ossification.

Il en résulte que ce phénotype particulier est la conséquence de la perte de l'activité collagénolytique. Le remodelage du collagène au cours de la vie embryonnaire est indépendant de MMP-14. L'activité collagénolytique atteinte est localisée au tissu non minéralisé ce qui suggère que l'activité ostéoclastique est indépendante de MMP-14.

Notre étude aurait nécessiter la génération de souris double mutante Ldlr-KO/MMP-14-KO, ce qui est impossible vu l'absence de reproduction des souris homozygotes MMP-14-KO. Nous avons donc contourné le problème en effectuant une reconstitution de MO de souris Ldlr-KO après irradiation létale par des cellules de MO issues de souris MMP-14-KO. Ainsi dans ces souris, les cellules issues de MO, dont les monocytes-macrophages n'exprimaient pas MMP14-KO. On induisait alors l'athérome par un régime riche en cholestérol. Il est évident que ce travail supposait que les monocytes/macrophages étaient la principale source de MMP-14 au cours de l'athérome.

VII.2 : Modélisation d'AAA

VII.2.1 Modèle anévrysmal chez le rat

Les recherches expérimentales et les modèles animaux ont permis de faire progresser la compréhension de la physiopathologie des AAA, de la croissance du diamètre et de la rupture, en vue de développement de nouveaux traitements. Il existe plusieurs modèles anévrysmaux chez le rat, dont le plus connu est celui par la perfusion

d'élastase sur l'aorte (Anidjar et al 1990). Après la perfusion d'élastase, l'anévrisme se développe entre J2 et J3, et continue de croître jusqu'à J4-J5, puis tend à se stabiliser. Cette modélisation de la dégénérescence anévrysmale d'origine d'une paroi aortique native a permis l'essor de l'étude du rôle des protéases dans les AAA. Pourtant il y a quelques limites dans ce modèle. La détermination de la dose d'élastase est parfois difficile avec le taux de reproductivité autour de 50-60%. La perfusion d'élastase in vivo induit l'afflux de nombreux polynucléaires neutrophiles (PMN) dans la paroi aortique (Halpern et al 1994), alors que les lésions anévrysmales contiennent peu de PMN en dehors du thrombus. L'expression des MMP dans ces tissus riches en PMN est probablement peu représentative de ce qui se passe dans l'AAA chez l'humain. D'autre part, l'augmentation du diamètre est très rapide et variable, ce qui limite l'utilisation de ce modèle pour de réels essais thérapeutiques. Enfin, il s'agissait d'un modèle de transformation d'artères normales en anévrysmes, permettant de tester des traitements préventifs, et non pas curatifs. La structure que doit acquérir une paroi initialement anévrysmale pour être à nouveau capable de soutenir la contrainte hémodynamique, est inconnue. La principale difficulté tient au fait qu'aucun modèle animal ne reproduisait la croissance du diamètre d'un anévrisme déjà constitué, comme c'est le cas chez les patients cliniques, alors que de nombreux modèles reproduisaient la transformation d'une artère « saine » en un anévrisme. Faute de modèle d'aggravation d'anévrysmes déjà constitués chez l'animal, aucune donnée expérimentale ne répondait à cette question centrale.

Nous avons solutionné ce problème par la création d'un premier modèle qui permet de tester une thérapie génique ou thérapie cellulaire sur un critère cliniquement pertinent

qu'est l'augmentation du diamètre de l'anévrysme déjà constitué. Ce modèle d'AAA (Figure 17) est fait par la xéno greffe aortique en greffant chez le rat une aorte d'origine de cobaye décellularisée par un détergent, dodécyl sulfate de sodium (SDS) (Allaire et al 1994). Deux semaines après la xéno greffe, quasi 100% des greffons sont devenus anévrysmaux avec un diamètre augmenté de plus de 50%. En effet, les cellules de la paroi aortique dans cette combinaison discordante de xéno greffe doivent être rejetées de manière sur-aiguë, en quelques heures (Allaire et al 1996).

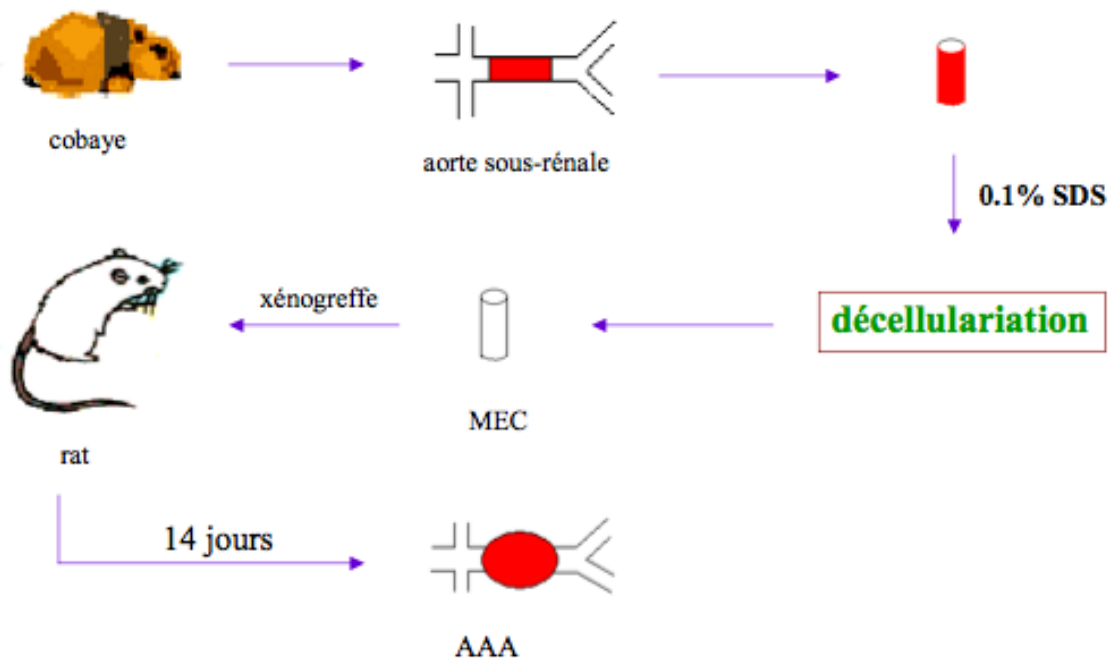


Figure 17 : Modèle d'AAA par xéno greffe aortique chez le rat

La décellularisation simplifie l'interprétation des données expérimentales et rend aisé l'ensemencement des cellules sur la face luminale pour la prochaine thérapie cellulaire. A cause du rejet chronique du rat contre la MEC d'aorte de cobaye, le réseau d'élastine de la média subit des altérations profondes et est ensuite détruit. On trouve la média envahie par un infiltrat composé de 80% de monocytes-macrophages et de 10% de lymphocytes T avec de l'élastine détruite, comme dans l'AAA humain. Les activités gélatinolytiques et élastasiques (MMP-9 et MMP-12), et de MMP-3 (stomélysine dont les substrats sont le collagène de type IV et la fibronectine) sont augmentées dans la paroi de la greffe, ainsi que l'activité t-PA et u-PA.

Ce modèle xénogreffique d'AAA présente plusieurs critères communs avec la maladie humaine (tableau 2).

Basés sur l'effet « reconnaissance » du système immunitaire des receveurs, les greffons se rompent quelques jours après la xénogreffe si l'on pré-immunise les rats receveurs par de la MEC des cobayes (donneurs). Sans cette pré-immunisation, les AAA persistent sans rupture jusqu'à un an.

Ce modèle anévrysmal nous offre une potentialité de croissance suffisante pour permettre de tester l'impact de facteurs biologiques sur le critère du diamètre (Allaire et al 2004). Ces lésions anévrysmales présentent des altérations sévères des MEC, une infiltration inflammatoire pariétale, des activités protéolytiques importantes et une néoangiogénèse considérable. Elles évoluent constamment vers l'aggravation, marquée sur le plan structural par un accroissement significatif du diamètre aortique jusqu'à 2 mois après la greffe.

	AAA humain	Xéno greffe	Elastase
Rupture	+	+	-
Potentiel de croissance ¹	+	+	-
Déplétion CML	+	+	+
Angiogénèse adventitielle	+	+	?
Thrombus luminal	+	+	+
Macrophages, Lymphocytes T et B	+	+	+
Polynucléaires	- ²	- ³	+
Immunoglobulines	+	+	+
MMP ⁴	+	+	+
Voie de la plasmine ⁵	+	+	?

¹ Croissance suffisamment lente pour permettre d'étudier l'impact d'un traitement sur l'évolution de la maladie

² Absents dans la paroi des AAA non rompus, non étudiés dans les AAA rompus

³ Sauf dans la rupture après pré-immunisation

⁴ MMP-1, 2, 3, 9, 12

⁵ uPA, tPA, Plasmine

?: Non documenté

Tableau 2 : Caractéristiques comparées de la maladie anévrysmale humaine et de deux modèles

Cette relative lenteur de la croissance du diamètre par rapport à d'autres modèles animaux permet d'effectuer des interventions biologiques visant à stabiliser la lésion au cours d'une ré-intervention 2 semaines après la greffe, le moment où les AAA se sont développés et vont continuer à croître. D'autre part, l'anévrisme se développant seulement au niveau de la xéno greffe, la topographie de la zone à traiter est parfaitement accessible chirurgicalement et prédictible à 100%. Les rats transplantés peuvent être réopérés, l'anévrisme exclu de la circulation, ce qui permet plusieurs manipulations biologiques (ensemencement des cellules, perfusion de suspensions virales etc.).

Nous avons mis au point des techniques de réabord chirurgical et/ou endovasculaire de ces lésions pour réaliser des thérapies cellulaires et géniques (figure 18). La zone anévrysmale est isolée par le clampage aortique. La délivrance des agents biologiques solubles est effectuée par un cathéter sous contrôle de la pression grâce à un manomètre connecté. Après le traitement, les agents résiduels sont doucement rincés et l'artérotomie permettant l'introduction du cathéter est fermée par des points microchirurgicaux. Le déclampage permet le rétablissement immédiat du flux sanguin et le diamètre externe de l'AAA est mesuré sous le microscope. Ce modèle xéno greffique d'AAA chez le rat permet donc de tester de véritables hypothèses thérapeutiques sur des critères utilisés en clinique humaine.

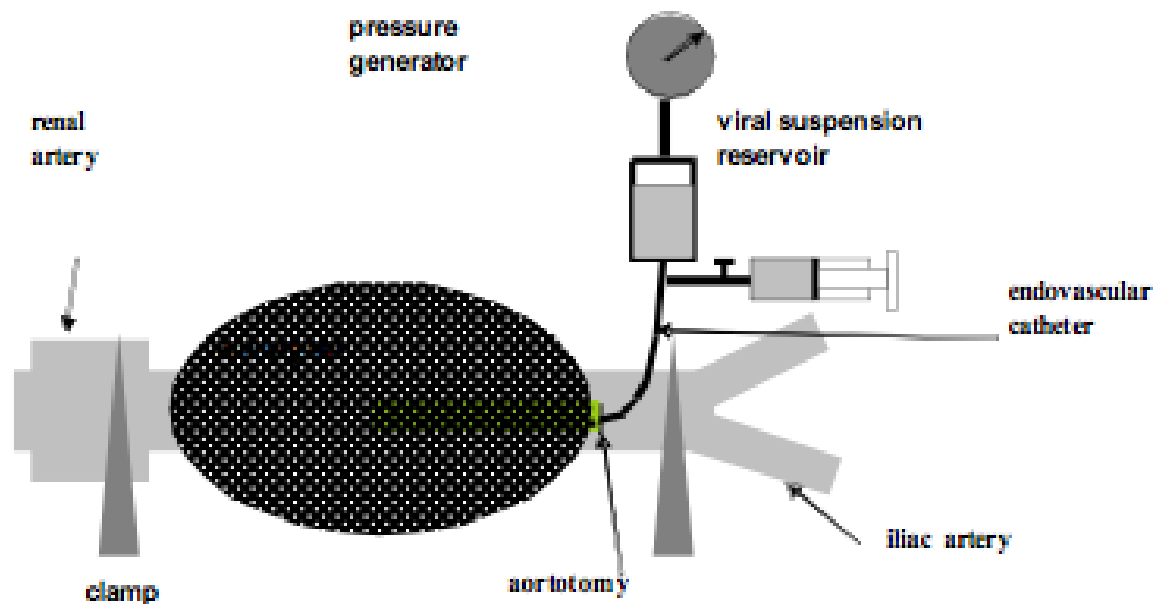


Figure 18 : Système de transmission endovasculaire pour les thérapies biologiques des AAA chez le rat

VII.2.2 Modèle de culture in vitro d'organes humains

Il n'existait aucun modèle animal qui reproduit tous les aspects de la maladie anévrysmale humaine. Chaque modèle explore un nombre discret d'aspects clinico-biologiques. Le modèle murin nous permet de tester la validité de concepts thérapeutiques, telle que l'induction d'une cicatrisation des artérites inflammatoires, par thérapie cellulaire ou génique. La durée d'observation de la lésion après le traitement est

suffisamment importante pour étudier l'efficacité du traitement selon des critères cliniquement pertinents comme l'accroissement de diamètre, ou le contenu en élastine ou en collagène.

Cependant, la biologie des xéno greffes artérielles, si elle reproduit de nombreux traits de la maladie humaine, en est bien distincte. L'étiologie de l'augmentation d'infiltration des cellules inflammatoires et des activités des MMP dans la paroi anévrysmale est mal connue. Ce n'est évidemment pas dû à l'immunogénicité des MEC d'origine des xéno greffes chez l'homme. Pour pallier cette limitation, nous avons développé un modèle de culture organotypique *in vitro*, avec des fragments d'anévrysmes humains prélevés lors d'interventions chirurgicales électives.

L'approche de culture d'organe *in vitro* permet de contourner des inconvénients posés par les recherches *in vivo* chez l'animal. Elle peut simplifier les interactions en supprimant de nombreux acteurs telles que les cellules inflammatoires circulantes, la contrainte hémodynamique. Elle permet aussi de déterminer à volonté la concentration d'une drogue. La culture *in vitro* peut donner des idées pour de futures approches *in vivo*, de même qu'elle permet de tester les résultats obtenus par les études expérimentales chez l'animal. Enfin, la culture organotypique permet de pallier en partie la carence physiopathologique de la modélisation animale.

On a, ainsi, mesuré l'expression de MMP-9 dans le surnageant après mise en culture de fragments de AAA humains seuls, avec des CML ou des CSMs. Cette manipulation nous a permis de tester si la présence d'un type cellulaire modifiait ou non le profil d'expression d'une MMP indicatrice de l'activité protéolytique, ici MMP-9, par l'AAA.

VIII. Thérapie cellulaire pour les AAA expérimentaux

VIII.1.1 Interêts des CML pour la thérapie cellulaire des AAA

Bien que la formation des AAA soit principalement due à la dégradation excessive des MEC par les protéases, ces protéases sont principalement d'origine cellulaire. Les monocytes-macrophages dans la paroi, les polynucléaires neutrophiles dans le thrombus sont les sources capitales des MMP (Newman et al 1994, Fontaine et al 2002). Par rapport à la maladie athérosclérotique, l'AAA se caractérise par une pénurie des cellules musculaires lisses (CML) dans la média de la paroi artérielle (Thompson et al 1996). Le rôle et la conséquence de cette diminution des CML ne sont pas complètement connus.

On connaît trois grandes contributions des CML à la biologie de la paroi vasculaire : la synthèse de matrice extracellulaire (MEC), la vasoconstriction et la réponse pariétale aux traumatismes (Schwartz et al 1995). L'activité de synthèse des CML est observée au cours de l'angiogenèse, de l'adaptation de la paroi vasculaire au flux artériel, dans la constitution des lésions d'athérosclérose et en réponse aux lésions physiques. La vasoconstriction participe à la régulation du débit sanguin par le réseau artériel résistif et module les propriétés mécaniques de la paroi des artères de gros diamètre. Les CML au niveau de la paroi anévrysmale présentent un phénotype apoptotique et ces mêmes CML mises en culture rentrent aussi en apoptose (Lopez-Candales et al 1997). Il a été montré que la média des AAA associée à l'athérosclérose avait une densité en CML moins importante que la média des aortes normales, ou que la

média des aortes porteuses de lésions sténosantes (Freestone et al 1995). L'examen des pièces d'athérectomies des plaques coronariennes humaines montre que les lésions associées à un angor instable contiennent moins de CML que les lésions associées à un angor stable (Bauriedel et al 1997). Ces observations indiquent une relation entre la disparition des cellules musculaires lisses et la dégradation de la matrice extracellulaire artérielle.

Le mécanisme entre la diminution focale des CML et la dégradation de la MEC est inconnu. Il semble que la disparition des CML empêche la consolidation locale de la paroi artérielle par la synthèse et le dépôt de la matrice extracellulaire (Holmes et al 1996). Nous pensons que la disparition des CML conduit à une vulnérabilité accrue de la MEC à l'inflammation et à la protéolyse. Les CML sont également le principal fabricant des MEC, notamment les collagènes (Barnes 1985), qui participent à la réparation de la paroi aortique dégradée. En plus, les CML induisent du TIMP-1 par intermédiaire de TGF- β 1 (Douillet et al 2000). La diminution des CML médiales provoque donc une diminution de la quantité d'antiprotéases et de cicatrisation par néosynthèse de MEC lors d'un AAA.

Une étude par les xénogreffes artérielles dans la combinaison hamster sur rat suggérait que la protéolyse, l'inflammation et les CML dans la média ne coexistaient pas (Allaire et al 1996). L'infiltrat inflammatoire ne progresse dans la média de ces xénogreffes que dans les zones où les CML ont été détruites par le rejet. L'ensemencement des CML dans l'AAA (Allaire, Hasenstab et al 1998) s'est accompagné d'une diminution de la dégradation d'élastine dans la média. La conséquence a été l'absence du développement anévrysmal des xénogreffes implantées

aux rats non préimmunisés, et la diminution du taux de rupture de 100 à 50% des xéno greffes implantées aux rats préimmunisés. Ces résultats suggèrent que la présence des CML dans la paroi artérielle protège la MEC. L'absence des CML dans les zones fragilisées par la protéolyse serait un événement clé qui détermine l'extension de l'inflammation dans la paroi, et la destruction accrue de la MEC. La première étape de la formation et la rupture des AAA pourrait être la mort des CML dans la média.

Ces observations suggèrent également que la cicatrisation des lésions artérielles inflammatoires sévères peut être induite. L'identification des molécules sécrétées par les CML dans ces modèles devrait permettre d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à stabiliser la dégradation de la MEC des AAA.

VIII.1.2. La stabilisation d'AAA chez le rat par l'ensemencement des CML syngéniques par voie endovasculaire

L'anévrisme est une maladie secondaire à l'infiltration accrue des cellules inflammatoires et à la dégradation excessive de la matrice extracellulaire (MEC) par les protéases (dont les MMP) dans la paroi artérielle. L'empêchement de cette procédure de destruction des MEC et/ou l'association de la réparation des MEC dégradées permettraient un traitement alternatif des AAA autre que la chirurgie et l'endoprothèse. La voie endovasculaire, du fait de sa sécurité et de son efficacité, peut être la voie de choix pour cette stratégie thérapeutique. De nombreuses études expérimentales ont réussi à inhiber l'évolution d'une aorte normale vers un AAA (MacSweeney 1994 et al, Allaire et al 1994), mais il n'y avait pas de recherche visant à stabiliser l'évolution d'un AAA

expérimental déjà constitué, comme c'est le cas chez les patients que l'on rencontre dans la clinique.

Dans la mesure où les cellules musculaires lisses sont la source principale de la synthèse de la matrice extracellulaire de la paroi artérielle et que la pénurie des CML médiales est une caractéristique spéciale de la maladie anévrysmale, nous avons pensé que l'ensemencement des CML par voie endovasculaire pourrait avoir un effet bénéfique pour la réparation de la dégénérescence artérielle et permettrait la stabilisation du diamètre d'AAA.

Dans notre laboratoire, nous avons essayé une thérapie cellulaire sur le modèle xéno greffique d'AAA déjà constitué chez le rat, dont le diamètre continue à croître (Allaire et al 2004). Par voie endovasculaire, nous avons ensemencé les cellules musculaires lisses syngéniques dans la lumière des AAA constitués. Les rats du groupe témoin recevaient du milieu de culture sans cellule dans la même condition.

Deux mois après l'ensemencement des CML syngéniques, le diamètre des AAA chez le rat est significativement stabilisé par rapport au groupe contrôle. Une diminution d'infiltration des monocytes-macrophages, une décroissance des ARNm des MMP (MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-12) et une diminution de l'activité de gélatinase de MMP-9 ont été trouvées 7 jours après l'ensemencement des CML. Une augmentation de ARNm codant pour TIMP-1 et TIMP-3 est observée au niveau intimal chez les rats ensemencés, accompagnée d'une augmentation de ARNm codant pour collagènes type I et III. L'aspect histologique des vaisseaux 2 mois après le traitement montre qu'il existe une reconstruction pariétale endoluminale de la paroi anévrysmale, avec les CML qui forment une néomédia riche en collagène, recouverte de cellules

endothéliales dont la provenance est inconnue (cellules souches circulantes, cellules endothéliales de la paroi aortique adjacente ?).

Ces résultats montrent que la thérapie cellulaire par ensemencement des CML syngéniques peut participer à la cicatrisation de la paroi anévrysmale en stabilisant la croissance du diamètre par l'inhibition de l'activité des MMP et de l'infiltration des macrophages, l'induction des inhibiteurs des protéases et l'augmentation de la synthèse des collagènes. Notre étude montre qu'une thérapie cellulaire courte peut obtenir son effet thérapeutique pendant une période relativement longue (2 mois). Dans cette étude, du fait de leur localisation endoluminale, les CML infusées subissaient une force radiale et répondaient à cette force par une prolifération, une hypertrophie et une synthèse de matrice extracellulaire et d'anti-protéases (O'Clallaghan 2000). Ces constatations nous ont conduit à interpréter l'effet de la thérapie cellulaire comme étant un effet cicatriciel sur la paroi, dans le sens structural du terme (néoparoi), et dans le sens fonctionnel, la paroi ainsi traitée sans matériel prothétique est capable de supporter la contrainte hémodynamique sans se dilater davantage. Cette cicatrisation est le résultat de deux phénomènes, la reconstruction pariétale induite par les CML, et la modification de la biologie de la paroi anévrysmale en périphérie des CML selon un mécanisme paracrine (Figure 19, cf. infra).

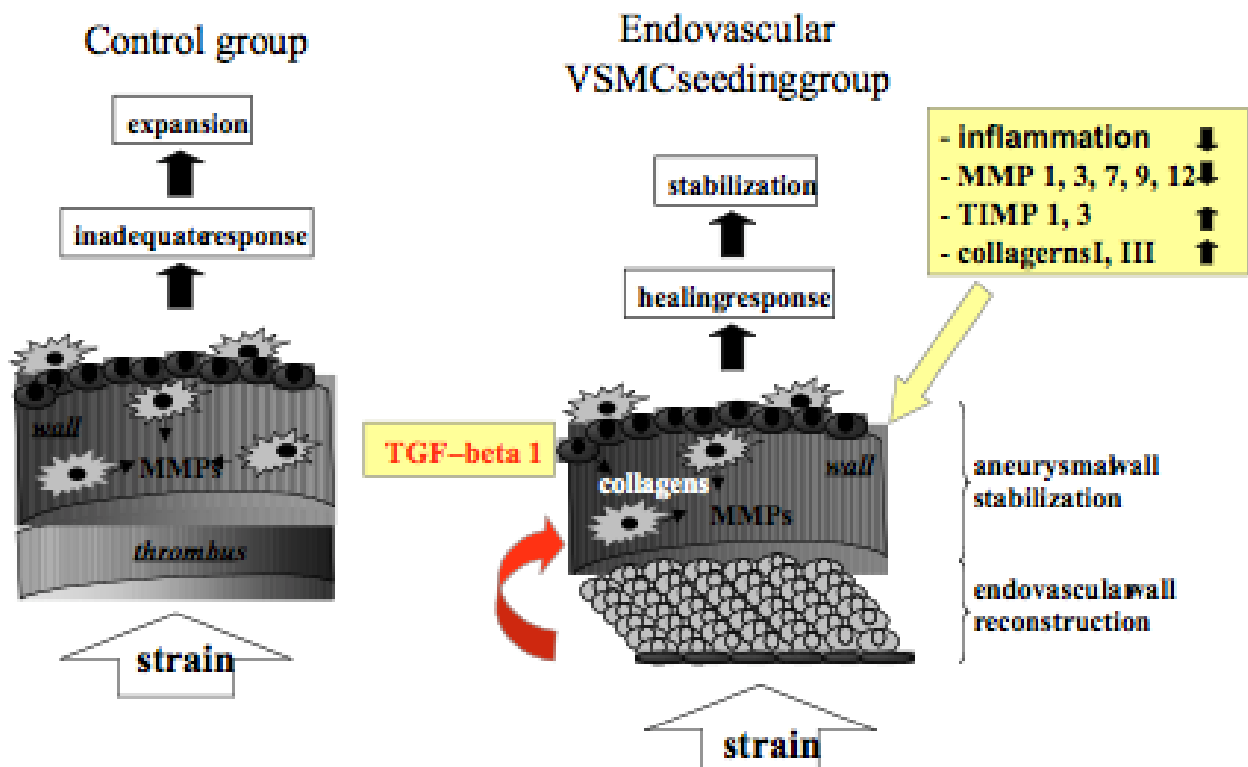


Figure 19: la stabilisation des AAA par thérapie cellulaire endovasculaire résulte de deux mécanismes principaux : la construction d'une néo paroi endovasculaire, et une modification de l'expression génique dans la paroi anévrysmale, par des sécrétions paracrines des cellulesensemencées.

Toutefois dans la perspective d'une application clinique, l'utilisation de CML autologues est impossible chez l'Homme du fait de la difficulté de prélèvement et de la faible quantité de cellules obtenues. C'est pourquoi, l'utilisation d'autres types cellulaires est indispensable. C'est dans cet optique que nous avons choisi de tester les CSMs dans notre modèle.

IX : présentation du projet de thèse

IX.1. Intérêt de la compréhension physiopathologique de la rupture de plaque athéromateuse localisée au coronaire

L'imagerie médicale et les études autopsiques semblent avoir clairement établi que la plupart des décès par Syndrome Coronarien Aigu (SCA) était secondaire à une thrombose sur rupture de plaque (Davies et al 1996) (fig.20). Les autres causes de thrombose telles que l'hémorragie sous plaque et l'érosion de l'endothélium sont minoritaires.

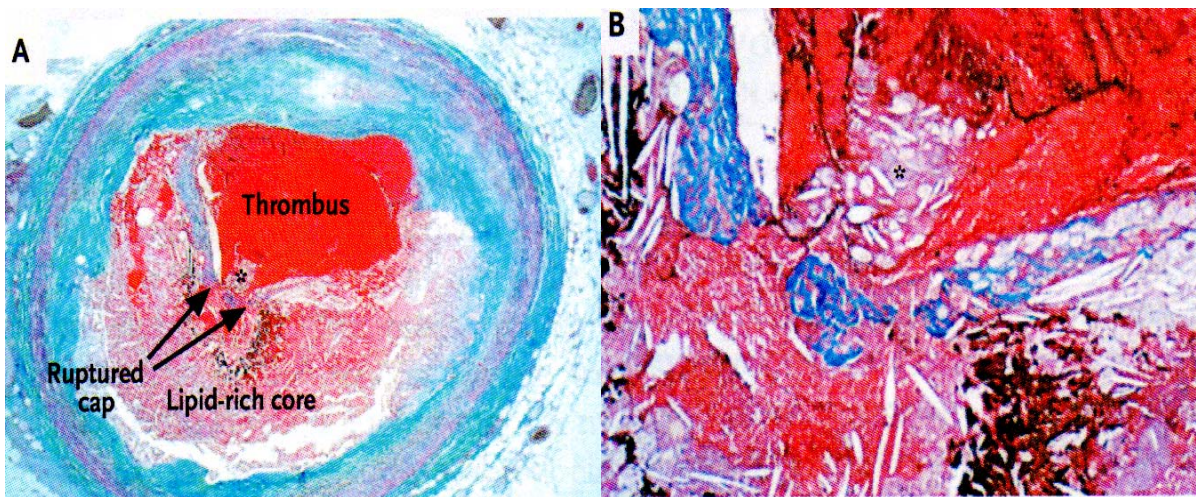


Fig. 20. Preuve histologique d'une thrombose d'artère coronaire sur rupture de plaque

A. Coloration au trichrome de Masson montrant une thrombose luminale avec une coque fibreuse fine entourant un cœur lipidique. B : grossissement de la zone * en A. (Hansson GK. *N Engl J Med* 2000 ;352 :1685-95)

Le mécanisme de cette thrombose peut s'expliquer par une agrégation plaquettaire provoquée par les fibres de collagène et par l'activation de la coagulation par le Facteur Tissulaire (FT) produit par les macrophages et les CML. La rupture de plaque apparaît donc comme une phase solide de ce stimulus de la coagulation et de la thrombose.

On retrouve aussi une phase liquide. L'inhibiteur de l'activateur du Plasminogène (PAI-1) est l'agent fibrinolytique physiologique empêchant la formation de thrombus à la surface de l'endothélium. Ce PAI-1 est augmenté chez les obèses, les diabétiques et est stimulé par certains médiateurs de HTA telle que l'angiotensine II (Vaughan 2003). Ce mécanisme suggère donc une activité thrombotique accrue avec augmentation de PAI-1 comme effet compensateur. Il est à noter que la rupture de plaque pourrait provoquer aussi des micro thromboses d'aval par micro embols et pourrait expliquer le phénomène « no-reflow » fréquemment observé dans ce contexte (Topol 2000).

Finalement, la notion de plaque instable semble être une réalité et challenge les thérapeutiques conventionnelles telles que les revascularisations chirurgicales et endovasculaires des coronaires qui n'effectuent qu'une correction locale de la vascularisation myocardique. En effet, même si l'ischémie est localisée, les études angiographiques et par échographie endovasculaire, ont montré que la plupart des patients ayant eu un SCA présentent plus d'une plaque ulcérée (Rioufol et al 2002, Asakura et al 2001). De plus, certaines lésions instables ne présentent pas de rétrécissement et ne sont pas détectables en angiographie (Libby 2005). L'ensemble de ces données montrent que le SCA est le révélateur d'une atteinte diffuse de l'arbre artériel qui dépasse le simple événement local révélateur de la maladie athéromateuse. Ainsi, les objectifs des thérapies à instaurer ont pour mission de limiter la phase aiguë du SCA puis de stabiliser la lésion coupable.

Le but initial est donc de limiter la perte des cardiomyocytes en limitant la thrombose. A l'heure actuelle, les thérapeutiques utilisent une association d'aspirine, de clopidogrel et l'administration intra-veineuse d'antagonistes de glycoprotéines IIb/IIIa. Les futurs anti-

agrégants pourraient bloquer de façon plus complète les récepteurs ADP P2Y₁ et P2Y₁₂ et aussi inhiber le complexe glycoprotéine Ib/IX-facteur van Willebrand qui est un médiateur de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaire pour des *shear stress* élevés. Outre l'inhibition de la formation du thrombus, l'effet inhibiteur sur les plaquettes pourrait permettre de faire baisser la sécrétion de pro-inflammatoires et briser ainsi le lien entre thrombose et inflammation. De plus, les anti-thrombotiques en développement ont aussi une activité inhibitrice sur la thrombine, le facteur Xa et sur le complexe FT-facteur VIIa qui est un précurseur du thrombus.

L'utilisation de traitements anti-inflammatoires est aussi une voie de développement. Les statines ont déjà montré leur rôle bénéfique sur l'athérosclérose en limitant le cholestérol mais aussi par un effet indépendant du cholestérol qui semble être en grande partie représenté par une activité anti-inflammatoire (Cannon et al 2004). D'autres sont à l'étude dont des inhibiteurs de la cyclo-oxygénase-2 ou du récepteur au thromboxane qui ont montré des résultats encourageants (Cayatte AJ 2000). D'un autre côté, des essais cliniques de phase II utilisant des anti-inflammatoires ont échoué à montrer un bénéfice au cours d'un SCA (Azar et al 2000, Baran et al 2001). Le Pexelizumad est anti-corps monoclonal contre C5. L'utilisation de cette drogue en complément d'une angioplastie, au cours de l'essai COMMA, n'a pas réduit la taille de l'infarctus mais a amélioré la mortalité et la survenue de choc cardiogénique (Granger et al 2003). Cette dissociation suggère que le complément via l'inflammation intervient dans la morbi-mortalité au cours d'un SCA. C5a est une puissante anaphylotoxine impliqué dans le recrutement leucocytaire et l'expression de cytokines, NO synthase et de C5b, stimulateur d'apoptose cellulaire. Ces résultats sont compatibles avec l'étude SHOCK (Hochman 2003) qui

montre que la mortalité des patients en choc cardiogénique est indépendante de l'hémodynamique et conforte l'importance de l'inflammation dans les SCA.

Les autres traitements à l'étude sont les inhibiteurs de MMPs pour permettre une stabilisation de la plaque et éviter la rupture de la plaque. Toutefois, les substrats étendus des MMPs en rendent leur inhibition difficile et se pose le problème de la tolérance systémique des inhibiteurs des MMPs. Ainsi, l'identification de MMPs clés dans les étapes initiales du catabolisme du collagène est fondamentale. De plus, l'identification de MMPs spécifiques de l'activité collagénolytique au sein des plaques athéromateuses permettrait une visualisation des plaques à risque par une imagerie fonctionnelle utilisant des substrats spécifiques de ces MMPs.

IX.2. Intérêt de thérapeutiques biologiques utilisant une délivrance endovasculaire

Les traitements biologiques offrent de potentiels intérêts pour le traitement des maladies cardio-vasculaires parmi lesquels deux méthodes, la thérapie cellulaire et la thérapie génique, ont été étudiées avec pour chacune des études cliniques (Symes 2001, Alexander et al 1999, Tomita et al 1999). La diminution de la morbi-mortalité du traitement des AAA par l'endoprothèse en vue de délivrance du matériel thérapeutique fait de la voie endovasculaire une voie logique pour les traitements biologiques. La voie endovasculaire est simple, efficace et sûre (Arko et al 2002). Un petit abord au niveau de l'artère fémorale suffit pour introduire l'endoprothèse sans besoin de grande incision abdominale, avec éventuellement une simple anesthésie locale.

Les observations cliniques ont montré que les AAA peuvent rester stables pendant une longue période. Les patients porteurs de petits AAA sont surveillés jusqu'à ce que le diamètre d'AAA atteigne plus de 5 cm et qu'une opération soit proposée. Le mécanisme de l'évolution d'un AAA constitué vers la rupture n'est pas tout à fait élucidé. L'infiltration inflammatoire et la dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire de la paroi aortique jouent sans doute le rôle capital (Ernst 1993, Dollery et al 1995, Allaire et Becquemin 1998). Si l'on pouvait diminuer cette infiltration inflammatoire et l'activité des protéases par thérapeutique biologique, et/ou favoriser la restructuration de la paroi anévrysmale, on pourrait stabiliser, ou même faire regresser l'AAA sans traitement instrumental. Nous explorons donc la faisabilité d'un principe de traitement autre que la chirurgie ou l'endoprothèse, basé sur la modification de la biologie de la paroi anévrysmale par le transfert endovasculaire de gènes ou par l'ensemencement de cellules. A notre connaissance, il n'existait aucune étude de thérapie cellulaire ou génique pour le traitement des AAA visant à stabiliser le diamètre de lésions expérimentales constituées.

Quelle doit être la voie d'administration des thérapeutiques biologiques des AAA, générale ou locale ? En vue de futures applications cliniques, cette thérapeutique doit moduler de manière efficace le remodelage de la paroi artérielle sans perturber l'homéostasie des autres organes. L'infiltration inflammatoire des tissus est une partie indispensable du système de défense contre les infections (Levy 1996), tandis que les cytokines jouent aussi un rôle important dans la prolifération, la différenciation et la migration des cellules et sont indispensables au renouvellement tissulaire (Saito 2001). L'application générale des matériaux biologiques qui inhibent l'activité des protéases

pourrait avoir des effets indésirables. La délivrance d'un agent pharmacologique par voie générale pour inhiber les activités protéolytiques avec diminution de MMP-3 a résulté en une progression plus rapide de la sténose coronarienne qui est présente chez 40-50% des patients (Ye et al 1996), ce qui montre qu'une inhibition forte systémique de la protéolyse qui serait nécessaire pour stabiliser les AAA, est inutilisable en pratique clinique. En revanche, l'application locale d'agents thérapeutiques permet d'obtenir une concentration plus élevée sur la zone ciblée sans atteindre les autres organes. La voie endovasculaire, par sa moindre morbidité, serait une solution utile pour le traitement biologique. La zone aortique anévrysmale peut être isolée du flux sanguin par un système de double-ballons monté sur catheter (les deux ballons sont gonflés sur les zones « saines » pariétales aux deux extrémités de l'AAA pour isoler celui-ci du flux sanguin). Le matériel thérapeutique peut ainsi être injecté au contact de la paroi anévrysmale sous le contrôle de la pression afin de ne pas fragiliser la paroi par une force mécanique excessive. Après le traitement, les agents thérapeutiques résiduels peuvent être rincés par catheter et le flux sanguin réétabli immédiatement après le dégonflement des ballons.

La dégradation de la matrice extracellulaire de la paroi va favoriser la diffusion des agents biologiques et/ou les cytokines de la lumière aortique vers l'adventice de façon centrifuge (Losy et al 2003, Allaire et al 1998). Les vaisseaux sanguins sont des sites favorables pour la thérapie génique grâce à leur accessibilité et au fait que pour la plupart des désordres cardio-vasculaires, une expression temporaire du gène transféré pourrait suffire pour avoir des effets biologiques durables (Alexander et al 1999).

Notre travail est fondé sur plusieurs postulats :

- 1). un traitement par transfert de matériel biologique permet de s'affranchir des conflits entre l'anévrisme vivant et les endoprothèses inertes,
- 2). un seul traitement induisant d'importantes modifications de la biologie des AAA peut stabiliser des aortes dilatées soumises aux contraintes hémodynamiques artérielles,
- 3). l'agent thérapeutique doit être délivré localement pour limiter les effets indésirables et permettre un développement clinique,
- 4). la délivrance doit être par voie endovasculaire pour que la morbi-mortalité soit inférieure à celle de la chirurgie.

IX.3. Les objectifs du travail

Les objectifs de ce travail ont été :

- 1) de montrer le rôle collagénolytique *in vivo* de MMP-14 dans un modèle murin d'athérome et illustrer un exemple de destruction matricielle au cours du remodelage artériel
- 2) d'étudier l'effet de la perfusion endoluminale de CSMs dans un modèle d'anévrisme par xéno greffe et illustrer un exemple de reconstruction tissulaire au cours du remodelage artériel.

PRESENTATION DES TRAVAUX-ARTICLES

I. mise en évidence du rôle collagénolytique de Mmp14 dans un modèle d'athérome chez la souris

a. Article

Matrix Metalloproteinase-14 Deficiency in Bone Marrow Derived Cells Promotes Collagen Accumulation in Mouse Atherosclerotic Plaques

Schneider F, Sukhova G, Aikawa M, Canner J, Gerdes N, Tang T, Shi GP, Apte S, Libby P.

Circulation 2008 ;117 :931-39

Introduction : Le rôle structural du collagène interstitiel est primordial au sein des artères.

Même si des travaux *in vitro* ont suggéré un rôle collagénolytique de la métalloprotéase trans membranaire MMP-14(MT1-MMP), les preuves *in vivo* d'une telle activité manquent.

Méthodes et résultats: A cause du décès précoce des souris Mmp14^{-/-} à 3 semaines de vie, nous avons reconstitué la moëlle osseuse de souris Ldlr^{-/-} irradiées léthalement par des cellules de moëlle osseuse issues de souris Mmp14^{-/-} ou Mmp14^{+/+}. Dans les deux groupes, les analyses histologiques de la racine aortique ont révélé une similitude de la taille des plaques athéromateuses, et du contenu cellulaire (macrophages et Cellules Musculaires Lisses) après 8 semaines et 16 semaines de régime riche en cholestérol. Cependant, à 16 semaines, les plaques des souris Ldlr^{-/-} reconstituées avec des cellules de moëlle osseuse issues de Mmp14^{-/-} (n=12) contenaient significativement plus de collagène interstitiel que celles reconstituées avec Mmp14^{+/+} (n=14 ; p<0,05). *In vitro*, les macrophages différenciés à partir de la moëlle osseuse de souris Mmp14^{-/-} avaient significativement moins d'activité collagénolytique que ceux isolés à partir des souris Mmp14^{+/+} à l'état basal et après stimulation par TNF α (p<0,05). L'analyse par Western et

blot et enzymographie sur gélatine d'extraits aortiques a montré que le déficit en MMP14 était associé avec une diminution de l'activation de pro-MMP13 mais n'avait pas d'effet ni sur l'activation de pro-MMP-2, ni sur l'activation de pro-MMP8.

Conclusion : MMP14 exprimé par les cellules issues de la moëlle osseuse peut influencer le contenu en collagène fibrillaire de la plaque athéromateuse chez la souris, élément critique de la stabilité de la plaque athéromateuse.

b. Discussion

Cette étude démontre que MMP-14 influence le contenu en collagène de la plaque athéromateuse chez la souris. De plus, l'activité collagénolytique de MMP-14 au sein de la plaque est principalement liée aux cellules issues de la moëlle osseuse. L'absence de différence en terme de taille de plaque entre les deux groupes montre que l'expression de MMP-14 n'est pas indispensable à la mobilisation et au recrutement des cellules issues de la moëlle osseuse au cours du remodelage pariétal de la plaque contrairement à MMP-9. En effet, une étude a montré que MMP-9 était indispensable pour la mobilisation et la repopulation des cellules souches de la moëlle osseuse ; cette action s'effectuait via la stimulation de la sécrétion de la forme soluble Kit-ligand (sKitl) (Heissig et al 2002).

Cette étude est la première démonstration in vivo de l'activité collagénolytique de MMP-14 au cours de l'athérosclérose et nous avons dû utiliser une reconstitution de moëlle osseuse après irradiation. Ce résultat est donc à nuancer car une étude a montré que l'irradiation avait une influence propre sur l'athérosclérose (Schiller et al 2001). Cette étude a comparé des souris *Ldlr*^{-/-} avec des souris *Ldlr*^{-/-} subissant une reconstitution de moëlle osseuse après irradiation létale. Elle a montré que les plaques du groupe avec reconstitution étaient plus petites et contenaient moins de CML et de collagène que le

groupe contrôle. Cette étude suggère donc que l'irradiation et la reconstitution modifient le comportement des CML au sein de la plaque athéromateuse. De telles modifications sur l'activité des macrophages au cours de l'athérome ne peuvent être exclues. L'interprétation de nos résultats nécessite d'éliminer un certain nombre de biais dont les phénomènes de compensation éventuels du déficit en MMP-14 au niveau des cellules inflammatoires issues de la moëlle osseuse. En effet, une étude, utilisant un modèle d'infarctus du myocarde chez des souris *Mmp9^{-/-}*, a montré que l'effet inattendu du déficit en MMP-9 était principalement dû à la stimulation compensatoire de l'expression de MMP-13 (Ducharme et al 2000). C'est pourquoi, nous avons mesuré l'expression ARN par real-time PCR d'autres collagénases potentielles (MMP-8, MMP-13, cathepsine K) et du pro-collagène. Le déficit en MMP-14 n'avait aucune influence sur l'expression d'autres collagénases ainsi que sur l'expression du pro-collagène I. Ainsi l'accumulation de collagène dans le groupe *Mmp14^{-/-}* ne peut s'expliquer par un phénomène de compensation au niveau la synthèse du collagène par stimulation de son expression ou au niveau de sa dégradation par inhibition de l'expression d'autres collagénases.

D'après la littérature, MMP-14 est capable d'activer les formes latentes de proMMP-2 et proMMP-13 (D'Ortho et al 1998, Fosang et al 1998, Pei et Weiss 1996). C'est pourquoi, nous avons étudié l'activation de MMP-13 et MMP-2 par western blot et enzymographie sur gélatine au niveau des extraits aortiques pour savoir si MMP-14 agissait directement comme collagénase ou via l'activation de MMP-13 et/ou MMP-2. Le déficit en MMP-14 diminuait l'accumulation de forme activée de MMP-13 et n'avait aucune influence sur l'expression mARN de MMP-13. Ce résultat associé à un travail précédent, démontrant le rôle collagénolytique de MMP-13 au sein de la plaque (Deguchi et al 2005), suggère que

l'activation de MMP-13 pourrait médier, au moins partiellement l'action de MMP-14 sur le catabolisme du collagène au cours de l'athérogénèse. La délétion de MMP-14 n'a pas influencé l'activation de MMP-8, alors qu'une étude *in vitro* a montré que l'activation de MMP-8 par MMP-14 était crucial au cours de la cicatrisation post traumatisme au niveau oculaire (Holopainen et al 2003). Ces résultats contradictoires montrent que le mode d'activation de MMP-8 est différent en fonction des tissus. L'enzymographie sur gélatine n'a montré aucune modification de l'activité de MMP-2 au cours de la déplétion de MMP-14. Ce résultat suggère qu'une autre voie d'activation de proMMP-2 indépendante de MMP-14 existe au cours de l'athérome. Ce résultat est en accord avec une étude montrant que l'effet néfaste observé sur le développement mandibulaire et pulmonaire chez les souris *Mmp14^{-/-}* est indépendant du niveau d'activation de proMMP-2 (Oblander et al 2005). L'ensemble de ces résultats montrent que l'effet de MMP-14 issues des cellules de moëlle osseuse est un effet indépendant de l'activation de proMMP-2.

Ainsi ce travail supporte l'implication des MMPs dans le turn-over du collagène et illustre un nouvel aspect du métabolisme du collagène au cours de l'athérome. Ce travail met en lumière un nouveau mécanisme au niveau moléculaire et cellulaire favorisant la dégradation du collagène et influençant les propriétés biomécaniques de la plaque.

Le rôle des cellules issues de la moëlle osseuse, principalement les macrophages, dans la régulation de l'accumulation de collagène confirme le rôle prépondérant de l'inflammation au cours de l'évolution critique de la plaque athéromateuse vers l'instabilité.

II. Thérapie cellulaire endovasculaire des anévrysmes expérimentaux utilisant des cellules souches mésenchymateuses

c) Article

Mesenchymal Stem Cells are decreased in patients with atherosclerotic aortic aneurysms and stabilize formed experimental aneurysms.

Schneider F, Saucy F, Poulet C, Mohand F, Dai J, Desgranges P, Becquemin JP, Rouard H, Gervais M, Allaire E.

Soumis à PNAS

Présentation de l'étude

La faisabilité d'une approche de thérapie cellulaire est conditionnée par la possibilité de procurer aux patients des cellules « thérapeutiques » dans un délai et un coût raisonnables. Si les CML étaient un choix logique pour valider le principe de la stabilisation des anévrysmes par thérapie cellulaire, ces cellules sont difficiles à prélever (biopsie de l'artère temporale) et croissent mal en culture chez les sujets âgés (Dartsch et al 1990, Low et al 1999) qui sont l'essentiel des patients porteurs d'anévrysmes.

Nous avons donc deux choix, l'un est de tester d'autres types cellulaires choisis en fonction de la facilité du prélèvement et de la croissance en culture, l'autre est de tester les CML allogéniques qui ouvriraient la possibilité de créer des banques de cellules interindividuelles. Ce dernier a bénéficié d'une étude précédente et a nécessité l'utilisation de traitement immunosuppresseur par cyclosporine.

On a pensé tout d'abord aux fibroblastes cutanés en raison de leur facilité de prélèvement, de leur puissante capacité de prolifération et de leur rôle primordial dans la cicatrisation cutanée (Van Den Bogaerdt et al 2002). Mais l'essai d'ensemencement de fibroblastes cutanés et adventitiels sur la croissance des anévrysmes dans le modèle

d'AAA (DEA de Dr Y. Jousset, 2001-2002) a été un échec. L'ensemencement de fibroblastes aggravait de façon significative les AAA expérimentaux en favorisant les thromboses et les ruptures. Une augmentation de l'activité de MMP-9, de MMP-3 et de MMP-7 a été observée chez les rats ensemencés par les fibroblastes. L'effet délétère des fibroblastes sur l'évolution anévrysmale s'accompagnait d'une formation de thrombus luminal, probablement par l'activation du facteur tissulaire (FT) ; ce thrombus est un lieu privilégié de délivrance des MMPs (Fontaine et al 2002). La candidature des fibroblastes pour la thérapie cellulaire a donc été abandonnée. L'autre type cellulaire possible est l'emploi de cellules souches issues de moëlle osseuse (MO) qui ont l'avantage d'être capable de se différencier en différents types cellulaires et d'être déjà impliqué dans des systèmes de réparation tissulaire. C'est ce type de cellules que nous avons testé dans cette étude.

D'un autre côté, nous savons que la face luminale des artères est recouverte de fibrines et de plaquettes, sources de TGF- β 1 et de PDGF-BB. Ces 2 facteurs sont capables d'induire la différenciation des Cellules Souches Mésenchymateuses (CSMs) en Cellules Musculaires Lisses vasculaire (CMLv) (Bobik et al 1999, Agrotis et al 1994, Simper et al 2002). Ces éléments participent au processus de cicatrisation inadaptée observé au cours de l'hyperplasie néo-intimale. Notre hypothèse de travail a été que ces processus de cicatrisation étaient présents aussi au cours de la maladie anévrysmale mais de façon inefficace. Nous avons voulu montrer la présence de CSMs à la surface luminale de thrombi de AAA ainsi que la présence de facteurs favorisant leur différenciation en CMLv. Puis nous avons voulu quantifier les CSMs circulants de patients porteurs de AAA et sans AAA pour montrer la diminution de ces cellules pour les patients porteurs

de AAA. Ceci serait en accord avec la possibilité de stabiliser la croissance d'anévrismes expérimentaux par addition de CSMs.

Matériels et méthode

Les CSMs furent sélectionnées par leur capacité d'adhésion au plastique à partir de sang périphérique humain, de thrombus de AAA humain et de MO de rat et cultivées dans le même milieu de culture α -MEM + 20% de Sérum de Veau Fœtal (SVF) (Invitrogen Corporation Paisley, UK). Quinze millilitres de sang périphérique furent collectés chez des patients porteurs de AAA (n=27) et des patients ayant une sténose carotidienne sans AAA (n=15). La fraction mononucléaire fut isolée par centrifugation sur gradient de densité (Lymphoprep[®] 1.077, Axis-shield, Oslo, Norvège) puis mise en culture.

Les thrombi de AAA (n=5) furent prélevés au bloc opératoire puis la face endoluminale séparée mécaniquement au bistouri sur de la glace puis mise en suspension sur HBSS et centrifugée pour isoler un culot cellulaire.

L'immunohistochimie des CSMs issues du sang périphérique fut réalisée après fixation par albumine bovine à 1% et incubation pendant la nuit avec les anti-corps anti-CD34 (Abcys SA, Paris, France), anti-CD45 (Abcam, Cambridge, RU), anti-chaîne lourde myosine MYH11 (Abcam), anti- α actine (Clone 1A4, Sigma, Saint Louis, USA). La révélation utilisa le system ABC[®] (Vector laboratory ,Burlingham, USA) et DAB[®].

Des coupes de 5 mm de thrombi humain furent fixées dans de l'éthanol à 70% pour une immunohistochimie anti-CD61 (Dako). Après extraction protéique des thrombi de AAA, une mesure ELISA pour PDGF-BB (Quantikine kit, R&D Systems) et TGF β 1 (Duoset, R&D Systems) fut réalisée. Une immunohistochimie anti-PDGF phosphorylé ou anti-

Smad2 (Cell Signaling Technology Inc, Beverly, USA) fut réalisée sur les cellules isolées du thrombi après stimulation par 50ng/ml de PDGF-BB et/ou 10ng/ml TGF- β 1.

Les CSMs de rat Fisher 344 furent isolées à partir de fémur puis mise en culture sur un milieu à 20% de SVF et maintenues en confluence < 80%.

Un phénotypage des cellules ainsi sélectionnées par immunohistochimie conventionnelle et par FACS montra que ces cellules étaient CD44+, CD73+, CD90+ et CD105+ et CD45-, CD11b-.

Le modèle de AAA fut généré dans des rats Fisher 344 dont le segment aortique sous rénale était remplacé par une xéno greffe d'aorte de Cobaye décellularisée dans SDS à 0,1%. A 15 jours, la xéno greffe était clampée en amont et en aval et une courte aortotomie fut réalisée pour une perfusion de CSMs ou CMLv à passage 5-8, ou de milieu de culture à 5% SVF comme contrôle. Des CSMs furent marquées par le marqueur fluorescent PKH26 (Sigma) avant ensemencement puis la xéno greffe fut prélevée à J2 ou J7 pour analyse au microscope fluorescent.

Le plus grand diamètre de l'anévrisme fut mesuré à la perfusion puis avant sacrifice à 1 semaine et à 4 semaines. Les AAA furent inclus dans la paraffine et un marquage du collagène par sirius red et des fibres d'élastine par orcéine fut réalisé. Une immunohistochimie utilisa des anticorps anti-ED1 clone macrophage, anti-RECA (Serotec, Oxford, UK) et anti- α actine (Clone 1A4, Sigma).

L'analyse ARN nécessita l'extraction de l'ARN par TrIzol™ (Life Technologies, USA) à partir des xéno greffes. Une RT PCR utilisant une DNA Taq ploymerase (Eurobio) quantifia le contenu en ARNm de MMP-9 et TIMP-1 (primers: MMP-9: *forward*: 5'-CTGCGTATTTCCATTCATCTT-3'; *reverse*: 5'-ATGCCTTTTATGTCGTCTTCA-3';

TIMP-1: *forward*: 5'-CCCCAGAAATCAACGAGAGACCA-3'; *reverse*: 5'-ACACCCCACAGCCAGCACTAT-3'). Les résultats furent exprimés par ratio entre le gène domestique 18S et le gène d'intérêt.

Des fragments frais de AAA humains furent divisés en 15 fragments de 3 mm puis mis en culture dans des plateaux à 6 puits (4 fragments/puit) comprenant des CSMs, des CMLv ou pas de cellule comme contrôle. Après 24 heures, le milieu était prélevé pour analyse de MMP-9 par ELISA (ELISA kit, R&D Systems).

Les résultats furent exprimés en moyenne \pm déviation standard. Un test t-student fut utilisé pour comparer les groupes non appareillés. Les valeurs qualitatives indépendantes furent comparées par un test du Chi-2 (biostat TGV). Les tests non paramétriques U-test Mann-Whitney et Kruskal Wallis furent utilisés pour l'expérimentation animale. Un $p < 0,05$ fut considéré comme significatif.

Résultats

L'analyse histologique par immunohistochimie révéla un marquage CD61+ à la surface des thrombi humains confirmant la présence de plaquettes à la surface des thrombi humains. L'analyse par ELISA détecta du PDGF-BB et du TGF β 1 au niveau du thrombus. La mise en culture montra la présence de cluster cellulaire (nb Colony Forming Unit (CFU)/ thrombus= $4,8 \pm 3,8$). Ces cellules avaient un morphotype de cellules étoilées ressemblant à des fibroblastes et elles étaient positives pour α -actine et négatives pour CD45. Après 30 mn de stimulation par PDGF-BB et TGF β 1, les cellules isolées étaient positives pour Récepteur phosphorylé au PDGF-BB et phospho-Smad 2. Après 7 jours de stimulation, elles étaient positives pour la chaîne lourde de la myosine.

A 7 jours, l'analyse quantitative des clusters cellulaires à partir des cellules sélectionnées sur plastique montra que les patients porteurs de AAA avaient significativement moins de clusters que les patients sans AAA ($34,4 \pm 24,7$ vs. $71,4 \pm 47,9$ CFUs/ml respectivement ; $p=0,018$).

Après marquage des cellules au PKH26, l'analyse histologique montra une colocalisation du marqueur fluorescent avec le noyau cellulaire coloré au DAPI dans la zone intermédiaire de l'intima à 48 heures et à 1 semaine. Cela indique que des cellules perfusées ont adhéré à la surface endoluminale des xénogreffes. Aucun marquage ne fut observé à 4 semaines. La perfusion de 1 million de CSMs diminua significativement la croissance anévrysmale à 1 semaine ($n=6$) comparée au groupe contrôle (milieu de culture) ($n=5$) ($6,6 \pm 9,7\%$ vs. $48,2 \pm 17,9\%$ respectivement ; $p=0,006$). On observa la même différence significative à 4 semaines ($n=5$ dans chaque groupe ; $9,2 \pm 3,1\%$ vs. $88,3 \pm 61,6\%$ respectivement, $p=0,028$).

La perfusion de CSMs diminua significativement l'infiltration de monocytes/macrophages comparée au groupe contrôle (cellules ED1 positives: $4,7 \pm 2,3$ vs. $14,6 \pm 6,4$ /mm², respectivement, $P=0,015$). L'analyse semi-quantitative par RT-PCR montra une diminution d'expression de MMP-9 et une augmentation d'expression de TIMP-1 dans le groupe perfusé par CSMs comparé au groupe contrôle. Ce résultat était compatible avec l'immunohistochimie à 4 semaines montrant une diminution de marquage MMP-9 dans le groupe CSMs. A 4 semaines, il y a avait significativement plus de collagène dans la paroi dans le groupe CSMs comparé au groupe contrôle ($22,5 \pm 9,1$ vs. $7,35 \pm 1,9$ Surface-%, $P=0,007$) et d'élastine ($28,52 \pm 16,5$ vs. $4,25 \pm 4,30$ Surface-%, $P=0,008$). L'analyse histologique à 4 semaines révéla la présence d'une néo paroi à la

place du thrombus dans le groupe CSMs comparé au groupe contrôle avec plus de CML ($115,6 \pm 30,4$ cellules/unité de surface vs. $22,2 \pm 2,7$ cellules/unité de surface, $p=0,007$) et la présence de cellules endothéliales en couche mono cellulaire à sa surface.

Finalement, pour 1 million de cellules, les CSMs furent plus efficaces que les CML pour stabiliser la croissance anévrysmale ($6,6 \pm 9,7\%$ vs. $25,5 \pm 17,2\%$, $p=0.007$).

L'analyse ELISA après organoculture avec des fragments de AAA montra une diminution de la sécrétion de MMP-9 en présence de CML ou de CSMs comparé au contrôle (pas de cellule).

d) Discussion

Cette étude a montré que le thrombus de AAA contenait les éléments de la cicatrisation artérielle et que la présence d'un AAA diminuait de 50% le taux de CSMs circulantes. D'autre part, l'ensemencement endovasculaire de CSMs diminue l'inflammation et la protéolyse et induit une régénération tissulaire aboutissant à la stabilisation d'un modèle de AAA chez le rat. Ces données suggèrent que la croissance anévrysmale s'effectue dans un contexte d'échec des systèmes de réparation tissulaire et d'épuisement des CSMs circulantes. Cette raréfaction peut être corrigée par addition de CSMs issues de la moëlle osseuse à la surface du thrombus.

La cicatrisation des traumatismes artériels s'effectue par convergence de CSMs issues de la média et adventice (Jawien et al 1992, Sartore et al 2001) ou par absorption de CSMs circulantes (Zernecke et al 2005, Zhang et al 2009) aboutissant à une hyperplasie réactionnelle des CML au niveau de l'intima. Dans le cas de maladie anévrysmale, la contribution des éléments de la paroi aortique pour la cicatrisation est limitée du fait de la

faible croissance des CML, de la désorganisation de la MEC. C'est pourquoi nous sommes intéressés à la surface endoluminale du thrombus en contact direct avec le sang pour capter des facteurs de croissance capables d'induire le recrutement et l'adhésion des CSMs circulantes. La mise en évidence de CSMs sur la face endoluminale du thrombus du AAA confirme cette hypothèse. La capacité d'adhésion des CSMs permettant leur adhésion est un héritage des cellules permettant la formation des îlots vasculaires au niveau du sac vitellin au cours de l'embryogénèse. La capacité de ces cellules est conservée au cours de la période post embryonnaire pour permettre la réparation artérielle due à des traumatismes (Yokote et al 2003), au cours du remodelage de pontage veineux (Xu et al 2003), au cours du remodelage après rejet chronique et lors des calcifications aortiques (Cheng et al 2010). La détection de plaquettes, de TGF β 1, PDGF-BB dans le thrombus et la démonstration que les CSMs des thrombi peuvent être activées au niveau récepteur par ces différents facteurs tendent à confirmer cette hypothèse. De plus, la mise en évidence de cellules capables d'exprimer la chaîne lourde de la myosine au niveau thrombus indique que les facteurs locaux, permettant la différenciation des CSMs en CML, sont présents à la surface du thrombus. Comme mécanisme de la faillite du système de réparation, une étude a montré que l'activité élastase inhibe la colonisation cellulaire du thrombus et la survie des CSMs et CML en provoquant une anoïkis (Fontaine et al 2004). Une autre possibilité est l'inactivation du récepteur au SFD-1 CXCR4 due à l'activité protéolytique locale. Cette inactivation altère la fonction des CSMs (Valenzuela et al 2002). La faible croissance en culture des CSMs isolées du thrombus tend à confirmer l'atteinte de ces CSMs en terme de fonction au cours des AAA.

Des études précédentes ont déjà démontré la corrélation entre le taux de CSMs circulants et les dysfonctions artérielles au cours de certaines pathologies (Cheng et al 2010, Simper et al 2010). Notre étude semble confirmer cette corrélation en montrant un lien entre la présence de AAA et la baisse du nombre de CSMs circulantes. Par contre il n'existe pas de lien entre le nombre de CSMs et le diamètre du AAA, suggérant que le défaut de CSMs n'est pas corrélé avec l'évolution de l'atteinte aortique. L'ensemble de ces résultats nous suggère que les facteurs cellulaires et moléculaires permettant une réparation artérielle sont présents sur les thrombi de AAA mais qu'un défaut quantitatif de CSMs circulantes limite les capacités de réparation de l'aorte. L'importance respective de la protéolyse, de l'inflammation, de la désorganisation structurale de l'aorte dans la limitation du recrutement et la prolifération des CML restent à élucider.

Pour mieux comprendre les conséquences d'un défaut de CSMs, nous avons perfusé ces cellules dans un modèle de AAA par xénogreffe chez le rat. Dans un premier temps, nous avons vérifié la présence de cellules perfusées fixées à la surface de la xénogreffe en effectuant un tracking cellulaire par marqueur fluorescent PKH26. Puis, nous avons montré que l'addition de CSMs diminuait la réponse inflammatoire en inhibant l'activité protéolytique et le nombre de monocytes/macrophages. Ce résultat sur l'inflammation a été confirmé par notre système d'organoculture entre les fragments de AAA et des cultures cellulaires. Ces résultats sont en accord avec d'autres observations montrant le contrôle de l'inflammation par les CSMs (Bartosh et al 2010).

L'addition de CSMs provoque au sein des xénogreffes un remplacement du thrombus par une structure très organisée prenant l'aspect d'une « néo-paroi » recouvert d'un

endothélium. Ce résultat est en accord avec des études montrant la stimulation de la synthèse d'élastine et de collagène par les CSMs (Simper et al 2010).

Nous avons montré aussi que les CSMs étaient plus efficaces que les CML pour stabiliser ce modèle d'anévrisme. Ce résultat suggère que les CSMs exercent une fonction spécialisée au cours du remodelage artériel et que l'addition de ces CSMs reproduit un système de réparation physiologique comme l'atteste la présence de ces cellules au niveau du thrombus au cours de la maladie humaine. L'action des CSMs sur le contrôle de la destruction de MEC pourrait être un effet paracrine car nous avons montré une augmentation de sécrétion des TIMP-1 et l'absence de pénétration au sein de la média des CSMs perfusées et marquées par PKH26. Des essais de régénération tissulaire, dans des modèles d'infarctus du myocarde, par injection périphérique de CSMs ou intra tissulaire ont été décevants en partie par la faible survie des CSMs (Strauer et al 2002, Assmus et al 2002, Bel et al 2003). D'autres ont proposé une utilisation de CSMs en couches pour limiter cette apoptose cellulaire (Van Laake LW 2005). La réussite de notre système pourrait être liée au contact direct de nos cellules avec le sang circulant.

Ces données suggèrent que la croissance de AAA pourrait être due à une disparition des CSMs sans altération de la fonction de ces cellules. La possibilité de stabiliser la croissance des AAA par perfusion endoluminale de CSMs ouvre une nouvelle approche thérapeutique des AAA. Le mécanisme d'action des CSMs ensemencé reste à élucider. Toutefois, le faible taux d'adhésion des CSMs associé à un effet durable malgré la disparition des CSMs perfusées nous incitent à penser que cette action doit être majoritairement indirecte par effet paracrine et/ou par contact inter cellulaire.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Quels sont les enseignements du rôle collagénolytique de MMP-14 au cours de l'athérome ?

La première étape de notre travail a été d'étudier un aspect de destruction de la MEC à travers le rôle collagénolytique de MMP-14 (MT1-MMP). Outre la preuve *in vivo* du rôle collagénolytique de MMP-14 au cours de l'évolution de l'athérosclérose, cette étude montre un aspect du rôle joué par les cellules issues de la moëlle osseuse (MO) au cours de l'athérogénèse. Il est admis que les monocytes circulants issus de la moëlle osseuse sont captés sur la plaque pour y être incorporés et transformés en cellules spumeuses (Swirski et al 2007). Mais la participation de cette population cellulaire n'est pas exclusive car des cellules au phénotype musculaire issues de la moëlle osseuse (Sata et al 2002) participent aussi à la physiopathologie de l'athérome ainsi que des cellules endothéliales progénitrices (Asahara et al 1997). Le système de recrutement des cellules issues de la moëlle osseuse nécessite l'activation de certains systèmes agoniste/récepteur incluant GM-CSF, SDF-1 et l'érythropoïétine (Sato et al 2006, Nakano et al 2007, Walter et al 2007). Cette étude a montré que la déficience en MMP-14 influait la composition en collagène sans en altérer sa taille, ni sa composition cellulaire et cette modification est principalement due à une altération fonctionnelle des macrophages. Comme nous avons utilisé un modèle de greffe de moëlle osseuse où seules les cellules issues de la moëlle osseuse sont déficitaires en MMP-14, cette étude confirme que les macrophages influençant la stabilité de la plaque sont principalement issus de la moëlle osseuse. Il a été montré aussi que MMP-14 est sécrétée par les CMLs et que les CML issues de la moëlle osseuse peuvent être présentes à la surface de la plaque (Sata et al

2002). Elles stabilisent la plaque par augmentation de synthèse du collagène et par augmentation du contenu en CML de la plaque (Zoll et al 2007). Or notre étude a montré que la composition cellulaire et la taille n'étaient pas affectées suggérant un rôle stabilisant des CML issues de la MO peu dépendant de MMP-14. Une autre explication pourrait être que la teneur en CML de la plaque est dépendante de la prolifération uniquement locale de CML. Cette hypothèse a été confirmée par une étude montrant que les CML favorisant la cicatrisation artérielle proviennent uniquement de l'artère elle-même dans un modèle de souris ApoE^{-/-} (Hansson et Libby 2006). Ainsi l'interaction entre les cellules locales et les cellules issues de MO pourrait être un élément clé de la stabilité de la plaque.

L'action importante de MMP-14 au sein du processus inflammatoire pour réduire le collagène au sein de la plaque et ainsi promouvoir l'instabilité de la plaque a été confirmée dans une autre étude in vivo chez le lapin (Johnson et al 2008). Les auteurs ont montré que les cellules spumeuses ayant un fort potentiel d'envahissement au sein des plaques d'athérome avaient une expression accrue de MMP-14 combinée avec une inhibition de la sécrétion de TIMP-3. Il est à noter que des études sur certaines MMPs ont montré des résultats discordants en fonction des études portant sur des délétions (souris KO) ou sur des sur-expressions géniques via une transfection virale. Ces résultats suggèrent que l'effet des MMPs peut être délétère ou bénéfique sur la stabilisation de la plaque en fonction de leur concentration. Des taux normaux de MMP-2 et MMP-9 stabilisent la plaque en favorisant la migration et la sécrétion des CMLs alors que l'expression de MMP-12, -13 et -14 favorise l'instabilité en favorisant la destruction de la MEC (Newby et al 2009). De plus, la population des macrophages et cellules spumeuses

semble être très hétérogène avec des états d'activation différents. Ces états d'activation différents résultent en une réponse aux cytokines inflammatoires différentes principalement caractérisée par une sécrétion ou non de MMPs. Finalement, le rôle de l'inflammation au sein de l'évolution de la plaque athéromateuse semble être indéniable, mais le plus important pourrait être le devenir de cette réponse inflammatoire. En effet, la plupart du temps, l'agression initiale déclenche une transformation des macrophages en cellules spumeuses caractérisées par un état d'activation optimale aux stimuli pro-inflammatoires, puis l'agent initial est éliminé et l'intégrité tissulaire restaurée avec plus ou moins une fibrose cicatricielle. Dans d'autres cas, l'agression initiale perdure sous forme de formation granuleuse chronique. La plaque athéromateuse stable est assimilée à ces granulomes chroniques. Dans un nombre de cas plus rares, un stade d'ulcération est atteint. Ainsi le rôle des MMPs dont MMP-14 au sein de l'instabilité de la plaque pourrait dépendre du type cellulaire par lequel elles sont exprimées mais aussi de leurs concentrations.

On peut élargir le rôle de MMP-14 au cours de l'instabilité de la plaque à son rôle au cours de la maladie anévrysmale. Des marquages histologiques ont montré la présence de MMP-14 au sein de coupe histologique de AAA. Ces résultats ont été corroborés sur un modèle de AAA par angiotensine-II chez la souris où l'on retrouvait une augmentation d'expression de MMP-14 au niveau protéique et mRNA chez les souris porteuses de AAA (résultats personnels non publiés). Une étude expérimentale utilisant un modèle d'anévrysme de l'aorte thoracique chez la souris a montré une augmentation de la sécrétion par les macrophages de MMP-14 au cours de la progression de l'anévrysme (Jones et al 2010). Ces résultats ont été confirmés dans une étude utilisant un modèle de

AAA par CaCl_2 chez la souris (Xiong et al 2009). Les auteurs ont montré que la délétion d'expression de MMP-14 chez les macrophages inhibait la formation des AAA sans influencer l'infiltration des macrophages. Des études *in vitro* utilisant ces macrophages ont prouvé que l'activité MMP-14 seule pouvait réguler l'activité élastolytique des macrophages. Ces résultats ont suggéré que la destruction de l'élastine au cours de la formation anévrysmale était dépendante de l'activité MMP-14 des macrophages.

Outre la perspective d'un traitement thérapeutique inhibant l'activité de MMP-14 au sein de la plaque, la perspective clinique d'une cible pour une imagerie clinique semble plus réalisable. En effet, le développement de nouveaux moyens d'imagerie combiné avec le progrès de la compréhension des mécanismes moléculaires de l'athérome a ouvert un large champ d'investigation. Le dépistage des plaques instables et donc sensibles à la rupture requiert une imagerie moléculaire, ou fonctionnelle, dirigée contre les acteurs de l'inflammation au cours de l'athérosclérose plutôt qu'une imagerie conventionnelle, ou anatomique dépistant uniquement les sténoses. Les cibles moléculaires potentielles comprennent entre autres les MMPs. Des sondes spécifiques utilisant des substrats spécifiques des MMPs ont été testées dans des modèles expérimentaux avec des résultats encourageants. Ces sondes activées après clivage peuvent être détectées par des caméras infra-rouges pour obtenir une imagerie localisant l'activité MMPs au sein de l'arbre artériel et ainsi localiser les plaques à haute activité susceptible de se rompre (Deguchi et al 2006, Ohshima et al 2009).

La théorie de la plaque instable a dépassé le contexte de la maladie coronaire et peut s'appliquer à d'autres territoires artériels telles que les carotides. Une étude sur des pièces anatomiques d'endartériectomie carotidienne a permis de mettre en évidence plus de

rupture de plaque et d'ulcération dans le groupe des patients symptomatiques que chez les patients asymptomatiques. Les auteurs ont montré que ces plaques ulcérées/rompues contenaient significativement plus de MMP-2, MMP-9 et avaient une coque fibreuse plus fine (Heoh et al 2011). Ainsi, les caractéristiques moléculaires et cellulaires de la rupture de la plaque coronaire pourraient s'appliquer aussi à la plaque carotidienne.

Toutefois, une question fondamentale peut se poser: pouvons-nous transposer les résultats des études *in vitro* et expérimentales sur l'athérosclérose à la pathologie humaine et en tirer un réel bénéfice clinique ?

En effet, il est reconnu qu'un sous-type de monocytes stimulés par l'hyperlipidémie pourrait préférentiellement fournir les futures cellules spumeuses, mais la caractérisation de ce sous-type et son isolement chez l'Homme restent à élucider (Swirski et al 2007). Même si le rôle central du taux plasmatique de LDL dans l'athérome semble indéniable, ses mécanismes restent obscurs. En effet, les thérapies diminuant le taux de LDL, les statines, n'abolissent pas entièrement l'évolution de l'athérosclérose puisque 20% des patients recevant des statines à haute dose vont récidiver un syndrome coronarien aigu à 30 mois (Cannon et al 2004) et ¼ des patients recevant des statines à haute dose ont un taux de LDL au dessus de la norme. L'ensemble de ces résultats montre la nécessité de nouvelles cibles thérapeutiques pour baisser le taux de LDL plasmatique. A côté de l'effet bénéfique de l'abaissement du LDL cholestérol, une augmentation du HDL cholestérol semble être bénéfique sur le développement de l'athérosclérose. Le HDL semble assurer le transport retour pour épurer les cellules spumeuses de leur cholestérol via un transporteur lié à l'ATP (ABCG1) (Rye et al 2009). Une action supplémentaire anti inflammatoire de HDL pourrait exister aussi via Cholesteryl Ester Transfer Protein

(CETP), protéine favorisant le transfert de cholestérol des apolipoprotéines vers HDL. Plusieurs inhibiteurs de CETP ont été testés en clinique, mais un seul, anacétrapide, a montré un bénéfice dans un essai de phase III (Cannon et al 2010). Ainsi, ces résultats décevants vis à vis de CETP soulignent la difficulté de transition entre les essais *in vitro* et la clinique. Une autre molécule liée au HDL a été une cible thérapeutique, il s'agit de l'apolipoprotéine A1 et de son inducteur PPAR α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α). Un agoniste de PPAR α , gemfibrozil, a montré un intérêt clinique (Frick et al 1987) même si son association avec des statines pose un problème d'interaction délétère entre les 2 traitements amenant la survenue de grave rhabdomyolyse (Jones et Davidson 2005). Ce cas particulier illustre, à nouveau, la difficulté de la transition entre les résultats expérimentaux et leurs applications cliniques directes.

Les démonstrations expérimentales de l'induction de l'athérosclérose par le LDL oxydé abondent (Steinberg et Witztum 2010) mais les essais cliniques de thérapie anti-oxydante par Vitamine E ou C furent des échecs (Lonn et al 2006). Ces constatations illustrent le fossé entre les démonstrations expérimentales et la réalité clinique.

Le rôle immunitaire décrit au cours de l'athérosclérose ne peut être appliqué à l'Homme. En effet, l'athérogénèse accélérée chez la souris nécessite un taux de cholestérol plasmatique nettement supérieur à celui observé chez l'Homme et ne peut donc refléter la chronicité et la complexité de la maladie humaine. La solution serait le développement de modèle murin ayant un métabolisme lipidique plus proche de l'humain, ou de limiter l'hypercholestérolémie sur une période plus longue. De plus, le système immunitaire de la souris diverge en plusieurs points sur le système immunitaire de l'humain. La polarisation claire entre les réponses Th1 et Th2 observées chez la souris, où la réponse

Th1 caractérisée par la sécrétion de $\text{INF}\gamma$ et $\text{TNF}\alpha$ est pro-athérogénique et la réponse Th2 caractérisée par IL-10 et $\text{TGF}\beta$ est athéro-protecteur, n'est pas aussi claire chez l'Homme (Nussenblatt et al 2010). De même, les marqueurs des sous-populations de macrophages M1 et M2 diffèrent entre la souris et l'Homme. Ainsi, les résultats obtenus chez la souris doivent être interprétés avec beaucoup de précautions pour leurs applications à l'Homme. D'un autre côté, le modèle animal a suggéré le rôle athéro-protecteur de l'immunité humorale en montrant l'aggravation de l'athérosclérose par suppression des lymphocytes B après splénectomie (Caligiuri et al 2002). Des essais cliniques utilisant des anticorps anti-LDL et des vaccinations utilisant des immunogènes dérivant du LDL ont montré des résultats prometteurs en favorisant donc l'immunité humorale comme suggéré par les données expérimentales (Hansson et Nilsson 2009).

Le rôle important de l'inflammation au cours de l'athérosclérose a amené à utiliser des marqueurs de l'inflammation, surtout la CRP (C-Réactive Protein) comme marqueur de l'athérome. Mais la relation de causalité entre le taux de CRP et le taux de complication de l'athérome reste controversée (Libby et al 2009). L'effet bénéfique clinique d'anti-inflammatoire reconnu reste à prouver. Des études au sujet, des glucocorticoïdes, anti-inflammatoires non stéroïdiens, certains $\text{PPAR}\alpha$ et des inhibiteurs TNF, ont échoué pour montrer un rôle athéroprotecteur. De même, l'aspirine semble bénéfique plus par un effet anti-agrégant plaquettaire que par un rôle anti-inflammatoire. D'un autre côté, l'effet des statines semble être médié par une action anti-inflammatoire indépendante de l'effet hypocholestérolémiant (Ridker et al 2009). Toutefois la preuve de cette action reste à démontrer. La mise au point d'étude d'essai d'anti-inflammatoire sans action sur le taux

de LDL est nécessaire et semble être en cours, tel qu'un essai utilisant un inhibiteur de IL-1 β , le canakinumab (Libby et al 2011).

La translation du modèle d'athérome chez la souris et donc de ses résultats à la pathologie humaine pose le problème du modèle en lui-même. L'athérosclérose expérimentale comporte rarement des ruptures de plaque avec thrombose, mode le plus fréquent de complications de l'athérome humain. De plus, les analyses chez la souris portent principalement sur l'aorte ascendante et l'aorte thoracique alors que leurs interprétations en pathologie humaine se situent au niveau des carotides, coronaires. Or, l'origine embryonnaire des CMLs et les contraintes hémodynamiques sont très différentes. Ainsi, la coronaire gauche, siège fréquent d'athérome chez l'Homme, comporte de façon constitutionnelle des CMLs au sein de leur intima, ce qui n'est pas le cas chez la souris au niveau de l'aorte. De plus, les CMLs des coronaires ont une origine embryonnaire issue de l'organe pro épикаrdique alors que les CMLs de l'aorte sont issues du mésoderme splanchnique (Majesky 2007). Au niveau hémodynamique, le flux est principalement au moment de la systole dans l'aorte alors qu'il est au moment de la diastole pour les coronaires. L'ensemble de ces données est toutefois moins fondé si l'on veut extrapoler la maladie athéromateuse murine au niveau aortique à la maladie athéromateuse humaine au niveau aortique. L'ensemble de ces éléments nous incite à une interprétation prudente et une reconnaissance des limites exploitables des résultats expérimentaux avant de les extrapoler à la pathologie humaine. En résumé, les modèles expérimentaux nous servent à tester des hypothèses mécanistiques mais sans mimer totalement la maladie humaine.

II. Quelles sont les controverses issues de l'utilisation des CSMs pour une thérapie cellulaire des AAA au cours de notre étude ?

La deuxième partie de notre étude a porté sur une thérapie cellulaire utilisant les CSMs issues de la MO. Nous avons pu stabiliser la croissance d'un modèle d'AAA déjà formé chez le rat. Ce résultat était corroboré par la mise en évidence d'une délétion des CSMs circulantes chez les patients porteurs de AAA. De plus, cette étude a permis d'isoler des CSMs à partir de thrombus de AAA et l'on a pu mettre en évidence des facteurs capables d'induire la différenciation de ces cellules en CML. L'ensemble de ces données suggère que les CSMs circulantes participent au remodelage physiologique de la paroi aortique et que la croissance des AAA pourrait être expliquée par un défaut des systèmes de cicatrisation physiologique au sein desquels les CSMs pourraient jouer un rôle. L'apport de CSMs par perfusion endoluminale permet de restaurer ce système de cicatrisation et donc d'induire une stabilisation de la croissance anévrysmale.

Il est intéressant de noter que nous avons utilisé un modèle de AAA déjà formé pour tester l'impact d'une thérapie sur l'évolution de cet AAA. Le but de cette étude n'a pas été d'inhiber la formation des AAA. Un travail ultérieur utilisant des CML (Allaire et al 2004) a déjà montré la pertinence de ce modèle dans le cadre d'objectif de thérapie cellulaire et/ou génique. Les points les plus importants sont probablement au niveau de l'utilisation de ces CSMs.

La première controverse se situe probablement au niveau de l'appellation de ces cellules. En effet, plusieurs noms semblent correspondre à ces cellules. On retrouve la dénomination initiale, CFU-F, se référant à leurs aspects macroscopiques spiculés, les faisant ressembler à des fibroblastes. On retrouve la dénomination particulièrement

employée par les hématologistes, Cellules Stromales de la MO et se référant au rôle de tissus de soutien pour les Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH). On retrouve bien sûr le terme de CSMs qui met en avant la multipotence de ces cellules mais aussi le terme de Cellules Stromales Mésoenchymateuses multipotentes. L'ensemble de ces termes équivalents aboutit à une analyse de la littérature assez difficile car certains travaux peuvent être omis du fait d'une dénomination différente. Nous avons choisi de garder le terme de CSMs car c'est le terme le plus fréquemment employé dans la littérature.

La première question que l'on peut se poser est de savoir si l'on peut appeler ces cellules des cellules souches. Initialement, le terme de cellules souches désignait des cellules capables de se diviser de façon asymétrique et de se différencier en tout phénotype. Cette définition a évolué car même les cellules souches embryonnaires se différencient rarement en cellules du trophoblaste (He et al 2008). Finalement, le débat revient à répondre à la question de savoir si ces CSMs sont capables de se différencier en cellules non-mésenchymateuses. Or, avec le progrès du marquage cellulaire et de la purification de ces cellules, des travaux continuent à montrer que ces cellules sont capables de se différencier en cellules épithéliales, endothéliales et neurales (Greco et Rameshwar 2007, Sueblington et al 2008, Yue et al 2008). Toutefois, la capacité à se différencier semble dépendre autant de la nature « souche » de la cellule que du micro environnement créant une niche autour de la cellule. Ainsi, la même cellule peut se différencier ou non en fonction de la niche dans laquelle, elle se trouve. Cette notion a été démontrée dans un travail montrant la reprogrammation en cellules souches multipotentes d'une cellule par exposition à un facteur de transcription adéquate (Stadtfield et al 2008). Ainsi, la barrière entre cellules souches et cellules différenciées n'est plus aussi claire. Finalement, la

définition d'une cellule souche pourrait bien être sa capacité à évoluer son phénotype dans le temps et non pas son statut à un temps donné. Cette définition introduit donc une définition dynamique et non plus statique au concept de cellule souche.

Une des difficultés d'interprétation des résultats utilisant les CSMs est l'hétérogénéité des cultures cellulaires des CSMs. En effet, nous avons observé des cellules spiculées au stade initial de la culture à faible densité ressemblant à des fibroblastes. Ces cellules avaient un taux de croissance très élevé. Elles donnaient rapidement des cellules plus larges au taux de croissance plus faible. Cette observation conforte les données de la littérature où le premier type cellulaire est dénommé type 1 (ou RS-MSCs Rapidly Self Renewing MSCs) et le deuxième type est nommé type 2 (ou SR-MSCs Slowly Replicating MSCs) (Mets et Verdonk 1981). Ces cellules sont différentes du point de vue de l'expression des marqueurs cellulaires et de leur capacité de différenciation. Cela rejoint l'observation que les CSMs humaines perdent leur plasticité initiale avec le temps, correspondant à une sénescence (Pittinger et al 1999) et/ou à une évolution d'une population majoritairement type 1 vers une population majoritairement type 2. Ainsi, les CSMs isolées et cultivées de façon différente ont des propriétés très différentes et un potentiel thérapeutique différent. De plus, l'adhésion sur plastique sélectionne des cellules issues de MO qui ne sont pas uniquement des CSMs telles que les cellules MIAMI (Marrow Isolated Adult Multilineage Inducible) isolées à partir des corps vertébraux chez l'homme (Tatard et al 2007), les cellules VSEL (Very Small Embryonic-like) isolées à partir de la MO de souris par sélection de cellules positives aux récepteurs CXCR4 (Ratajczak et al 2008), cellules MAPCs (Multipotent Adult Progenitor cells) isolées à partir de MO à faible oxygène et faible sérum (Aranguren et al 2008). Ces

cellules sont capables de se différencier en de multiples phénotypes (MAPCs), en neurones (MIAMI) ou d'exprimer des marqueurs de cellules embryonnaires (VSEL). L'ensemble de ces cellules pourraient correspondre à une hiérarchie de différenciation au niveau des CSMs. Ces observations soulignent la difficulté à analyser les résultats de ces cellules devant des effets différents en fonction des modes de sélection et de culture qui influencent fortement le type cellulaire. On peut en rapprocher des différences potentielles entre les CSMs isolées à partir de la MO et à partir des tissus périphériques et du sang périphérique. Des différences d'effet thérapeutique ont déjà été observées entre les CSMs issues de la MO et du tissu synovial (Koga et al 2008). Ainsi, une des principales critiques de notre travail est la translation d'interprétation entre les CSMs issues de MO du rat et les CSMs issus du sang périphérique chez l'Homme. On peut remettre en cause leur similitude de plasticité et d'effets thérapeutiques. D'un autre côté, le système de sélection a utilisé spécifiquement les mêmes paramètres et les mêmes modes de culture. De plus, la différenciation clé dans notre système de réparation est l'acquisition du phénotype CMLs. Des travaux récents ont montré que les CML d'aorte ainsi que leurs préogéniteurs pourraient avoir une origine commune au niveau des îlots sanguins primitifs au stade précoce de l'embryon (Drake et al 1998). Les 2 types cellulaires utilisées dans notre étude sont capables de se différencier en CML d'aorte, ainsi une origine commune est possible pour ces 2 types cellulaires et finalement l'effet thérapeutique pourrait être similaire.

Une des questions est de savoir si l'étape de culture précédant l'utilisation des CSMs au cours de notre étude n'altère pas le phénotype de ces cellules et leurs rôles biologiques? Le fait d'obtenir une population hétérogène de cellules en culture à faible densité

associée à des changements importants de type cellulaire au cours de ces cultures nous suggèrent que les CSMs en culture sont capables de générer leur propre niche, ou micro environnement. Il est intéressant de noter que la duplication initiale des cellules RSMSCs est nettement supérieure aux situations *in vivo*, suggérant un mécanisme d'inhibition par leur micro environnement *in vivo*. Au cours de cette phase, les cellules expriment Dkk-1, un inhibiteur de la voie de signalisation Wnt (Gregory et al 2003) ainsi que des marqueurs anti-adhésion intercellulaires et spécifiques de la mobilité telles que $\alpha 6$ -intégrine et PODXL (Podocalyxin-like protein) (Lee et al 2009). Pendant cette phase, les cellules ne forment pas de clusters. Avec l'expansion, la sécrétion de Dkk-1 diminue ainsi que l'expression de PODXL et les cellules forment des îlots où les cellules au centre ont un taux de duplication faible et une expression de marqueurs de différenciation cellulaire (Sekiya et al 2002) suggérant ainsi une perte de la multipotence par engagement dans une voie de différenciation. Ainsi l'utilisation de CSMs cultivées expose au risque d'utiliser des cellules dont les capacités de différenciation sont altérées. Toutefois, des études précédentes ont montré que ces cellules en îlots cultivées à faible densité étaient capables de se transdifférencier pour donner naissance à de nouveaux clusters après repiquage indiquant que l'on obtenait une réversion vers une cellule dont la multipotence était intacte malgré un passage dans un phénotype différencié au cours de la culture (Ylostalo et al 2008). Toutefois, une expansion à confluence importante (>90%) faisait perdre cette capacité à ces cellules. Cette observation conforte le rôle clé du micro environnement dans la régulation de ces cellules. Au cours de notre étude, nous avons strictement préservé une confluence <80% au cours de l'expansion *in vitro*, suggérant ainsi que nos CSMs cultivées avaient gardé leurs propriétés initiales de multipotence.

Une des limites de l'expansion de CSMs est la création de mutation génomique au cours de l'expansion car la duplication AND n'est pas un processus infaillible (Burgers 2009). Ainsi, le risque est la création de mutation cancérigène au sein de ces cellules. La démonstration de transformation cancéreuse des CSMs humaines est difficile car le caryotype ne détecte que les grosses lésions chromosomiques, et est insensible aux mutations minimales et la méthode de tumérogénèse dans des souris immunodéficientes est insensible car de nombreux cancers humains ne développent des tumeurs chez la souris qu'après de nombreuses manipulations (Berman et al 2008). Ainsi, la seule solution est de montrer la sénescence des cultures des CSMs ce qui est le cas chez l'Homme. Par contre, il a été montré que la culture des CSMs de souris générerait rapidement des cellules cancéreuses par instabilité génomique après une phase de croissance très lente. Ce phénomène dénommé « multistage carcinogenesis in cell culture » est présent aussi pour les fibroblastes de souris (Rubin 2001). Les études pour les CSMs de rat sont plus rares et montrent que leur culture est plus sensible à la densité cellulaire et au milieu de culture que les CSMs humains (Javazon et al 2001) en terme de prolifération et de multipotence. Toutefois, on ne peut éliminer la participation de cellules cancéreuses aux effets biologiques observés au cours de notre travail. Il est difficile de juger si la transformation cancéreuse interfère avec les capacités de réparation tissulaire des CSMs. Cette tumérogénèse éventuelle reste un problème pour une application clinique des CSMs devant l'absence à l'heure actuelle de test sensible à la transformation cancéreuse des CSMs. Une des solutions possibles est l'utilisation de CSMs issues du tissu adipeux car l'isolement permet d'obtenir un grand nombre de cellules limitant ainsi la durée de

l'expansion (Bunnell et al 2008). Mais la preuve de la similitude des effets biologiques entre les CSMs issues du tissu adipeux et de le MO reste à montrer.

Une question cruciale est le mécanisme d'action des CSMs au cours de la réparation tissulaire. Vu les capacités *in vitro* de ces cellules à une différenciation sous l'action de facteurs de croissance, le mécanisme initial évoqué était un recrutement des CSMs sur le site des lésions et une différenciation *in situ* de ces cellules pour la réparation. Un certain nombre d'études ont corroboré cette hypothèse. Ainsi, Wu Y et al. ont montré l'amélioration de la régénération cutanée après plaie par application directe de CSMs issues de MO. Le tracking cellulaire utilisant une analyse du marquage GFP par FACS a montré une greffe cellulaire >25% à 1 semaine. De plus, les auteurs ont montré l'expression de kératine, marqueur spécifique des kératinocytes, par les CSMs suggérant une différenciation directe de ces cellules (Wu et al 2007). Ces données furent confirmées par d'autres études utilisant le même modèle de plaie pariétale (Sasaki et al 2008). Mais d'autres auteurs ont montré que l'incorporation des CSMs sur le site lésionnel était faible et que les CSMs agissaient principalement par action paracrine via la sécrétion de facteurs de croissance ou par contact inter cellulaire avec les cellules locales. Ortiz et al. , en utilisant un modèle de fibrose inflammatoire pulmonaire par bléomycine, ont montré une inhibition de cette inflammation par des CSMs et principalement via la sécrétion d'antagoniste IL1 β (Ortiz et al 2007). Dans un autre modèle, la perfusion de milieu conditionnée de CSMs, riche en IGF-1, HGF, VEGF, était aussi efficace que la perfusion même de CSMs pour limiter la dégradation rénale dans un modèle d'ischémie-reperfusion rénale. Les auteurs ne retrouvaient pas de CSMs une semaine après la perfusion locale de cellules (Togel et al 2007). De même, l'effet bénéfique des CSMs

dans le remodelage cardiaque après infarctus du myocarde était principalement médié par une action paracrine et les auteurs ne montraient plus de cellules perfusées après 3 semaines malgré la pérennisation de l'effet bénéfique (Iso et al 2007). Dans notre étude, nous avons pu observer un taux d'incorporation assez faible des cellules au sein de la paroi aortique à 2 jours et l'absence des cellules perfusées par marquage PKH26 à 4 semaines. Il est vrai que ce marquage n'est pas optimal car le PKH26 est un marqueur fluorescent inerte incorporé au sein de la membrane plasmique et que son signal fluorescent diminue avec les divisions cellulaires. Ainsi, si nos cellules ont une duplication élevée, la concentration sera trop faible pour être détectée et l'absence de signal détectable ne signifiera pas l'absence des CSMs. Un tracking cellulaire utilisant le marquage cellulaire par GFP semble souhaitable pour examiner le devenir des CSMs dans la paroi aortique après leur perfusion endoluminale dans notre modèle. Une étude récente utilisant un modèle de AAA chez le porc, a utilisé la perfusion de CSMs marquées par GFP et détectées par microscopie fluorescent. Les auteurs ont mis en évidence la présence de marquage GFP à 7 jours après la perfusion suggérant l'incorporation au sein du tissu aortique des CSMs perfusées. (Turnbull et al 2011). Toutefois le marquage était faible en proportion et les auteurs ont utilisé une méthode d'instillation peu conventionnelle par infiltration directe dans la paroi aortique. De plus, le modèle utilisé était un modèle de traumatisme directe par dilatation aortique associée à la perfusion endoluminale d'élastase et de collagénase. Il en résultait une dilatation aortique associée à une dégradation de la MEC répondant à un critère de AAA. Toutefois ce modèle n'a pas de thrombus intra mural ce qui rend difficilement interprétable les conclusions d'incorporation éventuelle des CSMs au cours de la maladie anévrysmale.

Notre étude a clairement montré une repopulation du thrombus par des CML après perfusion de CSMs. La restauration d'une organisation de paroi artérielle par CSMs a déjà été démontré dans un modèle de biothérapie de prothèse vasculaire. Les auteurs ont ensemencé des CSMs au sein de prothèse conventionnelle vasculaire et ont montré une différenciation de ces CSMs en CMLs et une organisation multi lamellaire. De plus, cette restauration d'une néo-média biologique stimulait l'adhésion de CE et leur organisation en endothélium provoquant ainsi l'endothélialisation de la prothèse (Mirza et al. 2008). Les auteurs ont montré aussi que ces CSMs différenciées en CML n'avaient pas de propriétés contractiles suggérant ainsi que le caractère non fonctionnel de ces cellules. La même a confirmé cette absence de fonction après différenciation *in vitro* de CSMs à l'aide de milieu préconditionné de CML motivant la recherche de condition optimale pour obtenir une différenciation complète des CSMs en CML avec acquisition d'une fonction contractile (Bonnet et al. 2008). Ainsi le mode d'action des CSMs au cours de la réparation tissulaire pour AAA reste à découvrir même si une action paracrine ou indirecte semble la plus plausible. Des travaux antérieurs de notre équipe ont déjà montré que l'effet stabilisant des CML dans notre modèle de AAA était principalement paracrine via la sécrétion de TGF β 1 et a été la base d'une stabilisation de notre modèle de AAA par thérapie génique utilisant TGF β 1(Dai et al 2005). Ainsi, TGF β 1 pourrait être un candidat pour expliquer l'effet stabilisant des CSMs.

Outre la richesse de sécrétion de facteurs solubles par les CSMs, la niche semble jouer un rôle très important dans le système de réparation tissulaire comme nous l'avons évoquée ultérieurement. Cette communication entre le micro environnement et les CSMs oriente les CSMs vers la sécrétion de facteurs solubles spécifiques à la réparation tissulaire

nécessaire. Cet échange entre les CSMs et le tissu environnant permet une immuno modulation et une activité anti-inflammatoire. Par exemple, les lymphocytes T sécrètent IFN γ qui stimulent le recrutement de CSMs et celles-ci sécrètent du NO pour inhiber la prolifération des lymphocytes T établissant ainsi un équivalent de rétro-contrôle négatif (Ren et al 2008). Un autre exemple d'échange est l'activation de CSMs par des fibroblastes rendue apoptotique par rayonnement ultra-violet ; il en résulte une sécrétion d'un anti-apoptotique cellulaire, la stanniocalcine-1 (Block et al 2008). Par analogie, on peut penser que les cellules inflammatoires au cours de la maladie anévrysmale activent les CSMs pour limiter cette inflammation et que les CMLs stimulent leur survie et leur croissance par activation des CSMs. Des preuves concrètes de ces échanges restent à montrer au cours du AAA. Ainsi, la perfusion locale de CSMs pour stimuler localement la réparation tissulaire pourrait être une des stratégies thérapeutiques les plus utiles. D'un autre côté, la communication entre les CSMs et son milieu peut aussi stimuler la prolifération cancéreuse. En effet, il a été montré que la culture de cellules de myélome était stimulée par les CSMs ; l'interaction aboutit à la sécrétion IL-6 par CSMs qui stimule la production de Dkk-1 par les cellules de myélome (Gunn et al 2006). Ce mécanisme pourrait expliquer la stimulation de certains cancers après ajout de CSMs (Kidd et al 2008). L'ensemble de ces données nous suggère que malgré le rôle thérapeutique prometteur des CSMs, leur emploi en pratique clinique reste à définir.

A côté du rôle cancérogène éventuel des CSMs, le mode d'administration optimal des cellules reste posé. L'injection périphérique veineuse semble être la voie privilégiée car elle est facile à mettre en œuvre et pratiquement dénuée d'effets indésirables. Cette voie a déjà été utilisée avec succès dans un certain nombre de modèles expérimentaux, mais il a

été montré que pratiquement toutes les cellules perfusées étaient retenues dans les poumons au premier passage (Schrepfer et al 2007). Plus de 95% des cellules sont retenues dans les poumons dans les 5 minutes. Le temps de demi-vie des CSMs au niveau des poumons est de 24 heures, mais seulement 5% des cellules se retrouvent finalement dans les tissus périphériques cibles après la barrière pulmonaire. Ainsi se pose la question du mode d'action de ces CSMs sur les tissus périphériques. Plusieurs hypothèses ont été avancées. Comme décrit précédemment, les CSMs peuvent agir par sécrétion de facteurs solubles dans la circulation systémique mais cette sécrétion doit être en grande quantité et à l'heure actuelle aucun candidat ne semble se dégager. Les CSMs piégées au sein des poumons pourraient stimuler des CSMs déjà présentes au niveau des tissus périphériques (Munoz et al 2005). Là encore, le mécanisme exact reste à démontrer. Un autre mécanisme possible est la sélection d'une sous population de CSMs ayant des capacités accrues d'adhésion et de stimulation. Notre mode d'administration s'affranchit partiellement de ce problème car nous avons effectué une perfusion intra artérielle directe et il n'y a pas donc pas de clairance par les poumons. Toutefois, le lavage par le flux artériel est un obstacle majeur à l'utilisation de ce mode d'administration chez l'Homme et la nécessité d'un clampage bipolaire de la zone artérielle cible est peu réalisable en pratique clinique. C'est pourquoi, la perspective clinique envisageable est la perfusion de ces CSMs entre la paroi aortique et la paroi d'une endoprothèse aortique. Le flux de lavage est beaucoup moins important et permettra éventuellement une adhésion des cellules perfusées dans la paroi aortique. Cette étape nécessite une étude expérimentale chez le gros animal. La suite logique de cette étude est donc la mise au point d'un modèle animal d'endofuite puis l'impact de la perfusion de CSMs sur la croissance anévrysmale.

L'ensemble de ce travail montre que le remodelage de la paroi artérielle nécessite une étape de destruction dans laquelle l'inflammation via l'action des métalloprotéases semble jouer un rôle important. La compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires est primordiale en vue d'une cible thérapeutique et d'imagerie fonctionnelle dans le traitement de l'athérosclérose, et plus précisément de la prise en charge de ses complications au cours des ruptures de plaque athéromateuse. Au cours de la destruction de la paroi artérielle, le système de réparation tissulaire semble inclure les CSMs. Notre travail a montré qu'un déficit de ce système de réparation centré sur les CSMs pourrait être un nouvel aspect physiopathologique de la maladie anévrysmale. L'apport de CSMs pourrait rétablir l'efficacité de ces systèmes de réparation et être un candidat éventuel dans l'optique d'une biothérapie cellulaire du traitement des AAAs.

CONCLUSION

Ce travail a permis d'illustrer des mécanismes de remodelage artériel au cours des pathologies athéromateuses et anévrysmales. L'aspect de destruction nous a permis de démontrer l'activité collagénolytique de MMP-14 au cours de l'athérome. Ce travail suggère d'ajouter cette métalloprotéase à la liste des collagénases interstitielles déjà existante (MMP-1, -8, -13). Cet exemple montre un nouvel aspect de la biologie moléculaire de la rupture de plaque et ouvre la perspective d'une nouvelle cible thérapeutique mais surtout d'une nouvelle cible de marqueur pour une imagerie fonctionnelle de la plaque instable aussi bien coronarienne que carotidienne.

L'aspect de reconstruction nous a permis de mettre en évidence l'existence des acteurs cellulaires et moléculaires de la réparation tissulaire à la surface du thrombus des AAA humains et a surtout montré une diminution quantitative des CSMs au cours des AAA. L'administration endoluminale de CSMs dans un modèle expérimental de AAA évolutif a stabilisé de façon durable la croissance anévrysmale par diminution de l'inflammation et induction d'une cicatrisation pariétale caractérisée par le repeuplement de CMLs et le renforcement de la MEC. Ce travail suggère une nouvelle approche physiopathologique du AAA par altération des mécanismes de réparation tissulaire et la perspective d'une biothérapie contre la croissance anévrysmale utilisant les CSMs.

REFERENCES

A

Aaronson SA. Growth factors and cancer. *Science* 1991 ;254 :1146-53

Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105(4):1815-22

Agrotis A, Saltis J, Bobik A. Effect of transforming growth factor-beta 1 on platelet-derived growth factor receptor binding and gene expression in vascular smooth muscle cells from SHR and WKY rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1994;21:145-8

Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S, Voglic SJ, Fukumoto Y, Furukawa Y, Shiomi M, Schoen FJ, Libby P. An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. *Circulation* 2001;103(2):276-83

Aikawa M, Sugiyama S, Hill CC, Voglic SJ, Rabkin E, Fukumoto Y, Schoen FJ, Witztum JL, Libby P. Lipid lowering reduces oxidative stress and endothelial cell activation in rabbit atheroma. *Circulation*. 2002;106(11):1390-6

D'Alessio S, Ferrari G, Cinnante K, Scheerer W, Galloway AC, Roses DF, Rozanov DV, Remacle AG, Oh ES, Shiryayev SA, Strongin AY, Pintucci G, Mignatti P. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 binding to membrane-type 1 matrix metalloproteinase induces MAPK activation and cell growth by a non-proteolytic mechanism. *J Biol Chem.* 2008;283(1):87-99

Alexander MY, Webster KA, McDonald PH, Prentice HM. Gene transfer and models of gene therapy for the myocardium. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999;26(9):661-8.

Allaire E, Guettier C, Bruneval P, Plissonnier D, Michel JB. Cell-free arterial grafts: morphologic characteristics of aortic isografts, allografts, and xenografts in rats. *J Vasc Surg* 1994;19(3):446-56.

Allaire E, Mandet C, Bruneval P, Bensenane S, Becquemin JP, Michel JB. Cell and extracellular matrix rejection in arterial concordant and discordant xenografts in the rat. *Transplantation* 1996;62(6):794-803.

Allaire E, Hasenstab D, Richard D, Kenagy, Barry Starcher, Monika M. Clowes, Alexander W. Clowes. Prevention of aneurysm development and rupture by local overexpression of plasminogen activator inhibitor-1. *Circulation* 1998;98:249-255.

Allaire E, Becquemin JP, Chemla E, Desgranges P, Méllière D: Résultats de la chirurgie des AAA en fonction des facteurs anatomiques et de la co-morbidité. *J Mal Vasc* 1998;23, SA:57

Allen P, Gourevitch D. Population screening for aortic aneurysm. *Lancet* 1987; 2: 736

Anidjar S, Salzmann JL, Gentric D, Lagneau P, Camilleri JP, Michel JB. Elastase-induced experimental aneurysm in rat. *Circulation* 1990;82:973-81

Anidjar S, Kieffer E: Pathogenesis of acquired aneurysms of the abdominal aorta. *Ann Vasc Surg* 1992;6:298-305

Aranguren XL, McCue JD, Hendrickx B, Zhu XH, Du F, Chen E, Pelacho B, Peñuelas I, Abizanda G, Uriz M, Frommer SA, Ross JJ, Schroeder BA, Seaborn MS, Adney JR, Hagenbrock J, Harris NH, Zhang Y, Zhang X, Nelson-Holte MH, Jiang Y, Billiau AD, Chen W, Prósper F, Verfaillie CM, Luttun A. Multipotent adult progenitor cells sustain function of ischemic limbs in mice. *J Clin Invest.* 2008;118(2):505-14

Arko FR, Lee WA, Hill BB, Olcott C, Dalman RL, Harris EJ, Cipriano P, Fogarty TJ, Zarins CK. Aneurysm-related death: primary endpoint analysis for comparison of open and endovascular repair. *J Vasc Surg* 2002; 36:297-304

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997; 275: 964–967

Asakura M, Ueda Y, Yamaguchi O, Adachi T, Hirayama A, Hori M, Kodama K. Extensive development of vulnerable plaques as a pan-coronary process in patients with myocardial infarction: an angioscopic study. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37(5):1284-8

Asmussen I, Kjeldsen K. Intimal ultrastructure of human umbilical arteries. Observations on arteries from newborn children of smoking and nonsmoking mothers. *Circ Res*. 1975;36:579-89

Assmus B, Schachinger V, Teupe C et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002;106(24):3009-17.

Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, Pennesi G. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol*. 2005;35(5):1482-90

Avena R, Curry KM, Sidawy AN, Simpkins JF, Neville RF, Mitchell ME, Bukowski M. The effect of occult diabetic status and oral glucose intake on brachial artery vasoactivity in patients with peripheral vascular disease. *Cardiovasc Surg*. 1998;6:584-9.

Avena R, Mitchell ME, Neville RF, Sidawy AN. The additive effects of glucose and insulin on the proliferation of infragenicular vascular smooth muscle cells. *J Vasc Surg.* 1998;28:1033-8

Avena R, Mitchell ME, Carmody B, Arora S, Neville RF, Sidaway AN. Insulin-like growth factor-1 receptors mediate infragenicular vascular smooth cell proliferation in response to glucose and insulin not by insulin receptors. *Am J Surg* 1999 ;178 :156-161

Azar RR, Rinfret S, Thérout P, Stone PH, Dakshinamurthy R, Feng YJ, Wu AH, Rangé G, Waters DD. A randomized placebo-controlled trial to assess the efficacy of antiinflammatory therapy with methylprednisolone in unstable angina (MUNA trial). *Eur Heart J.* 2000;21(24):2026-32

B

Baciu PC, Suleiman EA, Deryugina EI, Strongin AY. Membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) processing of pro-alpha_v integrin regulates cross-talk between alpha_vbeta₃ and alpha₂beta₁ integrins in breast carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 2003;291(1):167-75

Baird A, Bohlen P. Fibroblast growth factors. In Sporn MB, Roberts AB (eds) : Peptide Growth Factors and Their Receptors, vol 1. New York, Springer-Verlag 1990, pp 369-418

Baran KW, Nguyen M, McKendall GR, Lambrew CT, Dykstra G, Palmeri ST, Gibbons RJ, Borzak S, Sobel BE, Gourlay SG, Rundle AC, Gibson CM, Barron HV; Limitation of Myocardial Infarction Following Thrombolysis in Acute Myocardial Infarction (LIMIT AMI) Study Group. Double-blind, randomized trial of an anti-CD18 antibody in conjunction with recombinant tissue plasminogen activator for acute myocardial infarction: limitation of myocardial infarction following thrombolysis in acute myocardial infarction (LIMIT AMI) study. *Circulation*. 2001;104(23):2778-83

Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, Miller L, Guetta E, Zipori D, Kedes LH, Kloner RA, Leor J. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*. 2003;108(7):863-8

Barbolina MV, Adley BP, Ariztia EV, Liu Y, Stack MS. Microenvironmental regulation of membrane type 1 matrix metalloproteinase activity in ovarian carcinoma cells via collagen-induced EGR1 expression. *J Biol Chem*. 2007;282(7):4924-31

Barnes MJ. Collagens in atherosclerosis. *Coll Relat Res* 1985;5(1):65-97.

Barro, C., P. Zaoui, P. Gaudin, and F. Morel. Les métalloprotéases (MMP) et les TIMPs dans la protéolyse matricielle inflammatoire. *Regard sur la biochimie*. 1996 ;47:19-27.

Bartosh TJ, Ylostalo JH, Mohammadipoor A et al. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(31):13724-9.

Bassiouny HS, Lieber BB, Giddens DP. Quantitative inverse correlation of wall shear stress with experimental intimal thickening. *Surg Forum* 1988 ;39 :328

Bassiouny HS, Davis H, Massawa N, Gewertz BL, Glagov S, Zarins CK. Critical carotid stenoses: morphologic and chemical similarity between symptomatic and asymptomatic plaques. *J Vasc Surg*. 1989;9:202-12

Bauer EA, Cooper TW, Huang JS, Altman J, Deuel TF. Stimulation of in vitro human skin collagenase expression by platelet-derived growth factor. *PNAS* 1985 ;82 :4132-36

Bauriedel G, Schmucking I, Hutter R, Schmidt T. Increased apoptotic and necrotic cell death in human coronary plaques with instable versus stable angina. *Circulation* 1997;8:1-290.

Beagehold, M.A. Heterogeneity of endothelial function within the circulation. *Curr Opin Nephrol Hypert*. 1998;7:71-78.

Becquemin JP, Lapie V, Favre JP, Rousseau H. Mid-term results of a second generation bifurcated endovascular graft for abdominal aortic aneurysm repair: the French Vanguard trial. *J Vasc Surg* 1999; 30:209-218.

Beertsen W, Holmbeck K, Niehof A, Bianco P, Chrysovergis K, Birkedal-Hansen H, Everts V. On the role of MT1-MMP, a matrix metalloproteinase essential to collagen remodeling, in murine molar eruption and root growth. *Eur J Oral Sci.* 2002;110(6):445-51

Bel A, Messas E, Agbulut O et al. Transplantation of autologous fresh bone marrow into infarcted myocardium: a word of caution. *Circulation* 2003;108 Suppl 1:II247-II252.

Benditt EP, Barrett T, McDougall JK. Viruses in the etiology of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80:6386-9

Benvenuto F, Ferrari S, Gerdoni E, Gualandi F, Frassoni F, Pistoia V, Mancardi G, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. *Stem Cells.* 2007;25(7):1753-60

Berk BC, Alexander RW, Brock TA, Gimbrone MA Jr, Webb RC. Vasoconstriction: a new activity for platelet-derived growth factor. *Science* 1986 ;232 :87-90

Berliner JA, Territo MC, Sevanian A, Ramin S, Kim JA, Bamshad B, Esterson M, Fogelman AM. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest* 1990 ;85 :1260-6

Berman SD, Calo E, Landman AS, Danielian PS, Miller ES, West JC, Fonhoue BD, Caron A, Bronson R, Bouxsein ML, Mukherjee S, Lees JA. Metastatic osteosarcoma induced by inactivation of Rb and p53 in the osteoblast lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(33):11851-6

Bharadvaj BK, Mabon RF, Giddens DP. Steady flow in a model of the human carotid bifurcation. Part I--flow visualization. *J Biomech*. 1982;15:349-62

Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*. 2008;2(4):313-9

Bianco P, Robey PG, Saggio I, Riminucci M. "Mesenchymal" stem cells in human bone marrow (skeletal stem cells): a critical discussion of their nature, identity, and significance in incurable skeletal disease. *Hum Gene Ther*. 2010;21(9):1057-66

Bickerstaff LK, Hollier LK, Van Peenan HJ, et al. Abdominal aortic aneurysm: the changing natural history. *J Vasc Surg*. 1984; 1: 6–12

Bini A, Wu D, Schnuer J, Kudryk BJ. Characterization of stromelysin 1 (MMP-3), matrilysin (MMP-7), and membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) derived fibrin(ogen) fragments D-dimer and D-like monomer: NH₂-terminal sequences of late-stage digest fragments. *Biochemistry*. 1999;38(42):13928-36

Block GJ, Ohkouchi S, Fung F, Frenkel J, Gregory C, Pochampally R, Dimattia G, Sullivan DE, Prockop DJ. Multipotent Stromal Cells (MSCs) are Activated to Reduce Apoptosis in Part by Upregulation and Secretion of Stanniocalcin-1 (STC-1). *Stem Cells*. 2008 Dec 18

Blum U, Voshage G, Lammer J, Beyersdorf F, Thollner D, Kretschmer G, Spillner G, Polterauer P, Nagel G, Holzenbein T, Thurnher S, Langer M: Endoluminal stent-grafts for infrarenal abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med* 1997;336:13-20

Bobik A, Agrotis A, Kanellakis P et al. Distinct patterns of transforming growth factor-beta isoform and receptor expression in human atherosclerotic lesions : colocalization implicates TGF-beta in fibrofatty lesion development [In Process Citation]. *Circulation* 1999;99:2883-91.

Bobik A, Tkachuk V. Metalloproteinases and plasminogen activators in vessel remodeling. *Curr Hypertens Rep* 2003;5(6):466-72.

Boisvert WA, Santiago R, Curtiss LK, Terkeltaub RA. A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest.* 1998;101(2):353-63

Bonnet P, Awede B, Rochefort GY, Mirza A, Lermusiaux P, Domenech J, Eder V. Electrophysiological maturation of rat mesenchymal stem cells after induction of vascular smooth muscle cell differentiation in vitro. *Stem Cells Dev.* 2008;17(6):1131-40

Booyse FM, Osikowicz G, Quarfoot AJ. Effects of chronic oral consumption of nicotine on the rabbit aortic endothelium. *Am J Pathol.* 1981;102:229-38

Borden, P., and R.A. Heller. Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1997;7:159-178.

Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* 1998;394(6696):894-7

Bourcier T, Libby P. HMG CoA reductase inhibitors reduce plasminogen activator inhibitor-1 expression by human vascular smooth muscle and endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(2):556-62

Boutet M, Bazin M, Turcotte H, Lagacé R. Effects of cigarette smoke on rat thoracic aorta. *Artery*. 1980;7:56-72

Boyle EM Jr, Lille ST, Allaire E, Clowes AW, Verrier ED. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: atherosclerosis. *Ann Thorac Surg*. 1997;63:885-94

Braquet, P., P.E. Chabrier, and F. Clostre. Les fonctions de l'endothélium. *Presse Médicale*. 1994 ;23:225-227.

Brugge JS. New intracellular targets for therapeutic drug design. *Science* 1993 ;260

Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008;45(2):115-20

Burgers PM. Polymerase dynamics at the eukaryotic DNA replication fork. *J Biol Chem*. 2009;284(7):4041-5

C

Caligiuri G, Nicoletti A, Poirier B, Hansson GK. Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice. *J Clin Invest*. 2002;109(6):745-53

Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, Rader DJ, Rouleau JL, Belder R, Joyal SV, Hill KA, Pfeffer MA, Skene AM; Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 Investigators. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2004;350(15):1495-504

Cannon CP, Shah S, Dansky HM, Davidson M, Brinton EA, Gotto AM, Stepanavage M, Liu SX, Gibbons P, Ashraf TB, Zafarino J, Mitchel Y, Barter P; Determining the Efficacy and Tolerability Investigators. Safety of anacetrapib in patients with or at high risk for coronary heart disease. *N Engl J Med.* 2010;363(25):2406-15

Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9(5):641-50

Carlsson J, Sternby N. Aortic aneurysms. *Acta Chir Scand* 1964;127:466-473

Caro CG, Fitz-Gerald JM, Schroter RC. Atheroma and arterial wall shear. Observation, correlation and proposal of a shear dependent mass transfer mechanism for atherogenesis. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1971;177:109-59

Castleden M, Mercer J. Abdominal aortic aneurysms in Western Australia: descriptive epidemiology and patterns of tupture. *Br J Surg* 1985; 72: 109-121

Cayatte AJ, Du Y, Oliver-Krasinski J, Lavielle G, Verbeuren TJ, Cohen RA. The thromboxane receptor antagonist S18886 but not aspirin inhibits atherogenesis in apo E-deficient mice: evidence that eicosanoids other than thromboxane contribute to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(7):1724-8

Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Transforming growth factor beta is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J Biol Chem.* 1987;262:2869-74

Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 2007;25(11):2739-49

Chappell DC, Varner SE, Nerem RM, Medford RM, Alexander RW. Oscillatory shear stress stimulates adhesion molecule expression in cultured human endothelium. *Circ Res.* 1998;82:532-9

Charbord P, Tavian M, Humeau L, Péault B. Early ontogeny of the human marrow from long bones: an immunohistochemical study of hematopoiesis and its microenvironment. *Blood.* 1996;87(10):4109-19

Cheng CP, Herfkens RJ, Taylor CA. Abdominal aortic hemodynamic conditions in healthy subjects aged 50-70 at rest and during lower limb exercise: in vivo quantification using MRI. *Atherosclerosis*. 2003;168:323-31

Cheng S, Cohen KS, Shaw SY et al. Association of colony-forming units with coronary artery and abdominal aortic calcification. *Circulation* 2010;122(12):1176-82.

Clarkson TB, Bond MG, Bullock BC, McLaughlin KJ, Sawyer JK. A study of atherosclerosis regression in *Macaca mulatta*. V. Changes in abdominal aorta and carotid and coronary arteries from animals with atherosclerosis induced for 38 months and then regressed for 24 or 48 months at plasma cholesterol concentrations of 300 or 200 mg/dl. *Exp Mol Pathol*. 1984;41:96-118

Clinton SK, Underwood R, Hayes L, Sherman ML, Kufe DW, Libby P. Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am J Pathol*. 1992;140(2):301-16

Collins T, Cybulsky MI. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest*. 2001;107(3):255-64

Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006;107(1):367-72

Corson MA, Berk BC. Growth factors and the vessel wall. *Heart Dis Stroke* 1993 ;24 :166-70

Covington MD, Burghardt RC, Parrish AR. Ischemia-induced cleavage of cadherins in NRK cells requires MT1-MMP (MMP-14). *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;290(1):F43-51

Cozzi PJ, Lyon RT, Davis HR, Sylora J, Glagov S, Zarins CK. Aortic wall metabolism in relation to susceptibility and resistance to experimental atherosclerosis. *J Vasc Surg*. 1988;7:706-14

Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008;3(3):301-13

Crouse JR, Goldbourt U, Evans G, Pinsky J, Sharrett AR, Sorlie P, Riley W, Heiss G. Risk factors and segment-specific carotid arterial enlargement in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) cohort. *Stroke*. 1996;27:69-75

Curci JA, Mao D, Bohner DG, Allen BT, Rubin BG, Reilly JM, Sicard GA, Thompson RW. Preoperative treatment with doxycycline reduces aortic wall expression and

activation of matrix metalloproteinases in patients with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2000 ;31:325-42

Cuvelier, A., C. Kuntz, R. Sesboüé, J.F. Muir, and J.P. Martin. Les métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (MMP): structure et activité. *Rev Mal Resp.* 1997 ;14:1-10.

Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science.* 1991;251(4995):788-91

D

Dai J, Losy F, Guinault AM, Pages C, Anegon I, Desgranges P, Becquemin JP, Allaire E. Overexpression of transforming growth factor-beta1 stabilizes already-formed aortic aneurysms: a first approach to induction of functional healing by endovascular gene therapy. *Circulation.* 2005;112(7):1008-15

Dartsch PC, Voisard R, Bauriedel G, Hofling B, Betz E. Growth characteristics and cytoskeletal organization of cultured smooth muscle cells from human primary stenosing and restenosing lesions. *Arteriosclerosis* 1990;10(1):62-75

Davies MJ. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation.* 1996;94(8):2013-20

Davis CA, pearce WH, Haines GK, Shah M, Koch AE. Increased ICAM-1 expression in aortic disease. *J vasc Surg* 1993;18:875-880

De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr, Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest.* 1995;96(1):60-8

Degushi JO, Aikawa E, Libby P, Vachon JR, Inada M, Krane SM, Whittaker P, Aikawa M. Matrix metalloproteinase-13/collagenase-3 deletion promotes collagen accumulation and organization in mouse atherosclerotic plaques. *Circulation.* 2005 ;112(17):2708-15

Deguchi JO, Aikawa M, Tung CH, Aikawa E, Kim DE, Ntziachristos V, Weissleder R, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: visualizing matrix metalloproteinase action in macrophages in vivo. *Circulation.* 2006;114(1):55-62

Delorme B, Ringe J, Gallay N, Le Vern Y, Kerboeuf D, Jorgensen C, Rosset P, Sensebé L, Layrolle P, Häupl T, Charbord P. Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood.* 2008;111(5):2631-5

Delorme B, Ringe J, Pontikoglou C, Gaillard J, Langonné A, Sensebé L, Noël D, Jorgensen C, Häupl T, Charbord P. Specific lineage-priming of bone marrow mesenchymal stem cells provides the molecular framework for their plasticity. *Stem Cells*. 2009;27(5):1142-51

Deryugina EI, Ratnikov BI, Postnova TI, Rozanov DV, Strongin AY. Processing of integrin alpha(v) subunit by membrane type 1 matrix metalloproteinase stimulates migration of breast carcinoma cells on vitronectin and enhances tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase. *J Biol Chem*. 2002;277(12):9749-56

Diaz S, Uzieblo MR, Desai KM, Talcott MR, Bae KT, Geraghty PJ, Parodi JC, Sicard GA, Sanchez LA, Choi ET. Type II endoleak in porcine model of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 2004;40:339-44

Dicorleto PE, Bowen-Pope DF. Cultured endothelial cells produce a platelet-derived growth factor-like protein. *PNAS* 1983 ;80 :1919-23

Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noël D, Jorgensen C. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*. 2003;102(10):3837-44

Dobrin PB, Baker WH, Gley WC. Elastolytic and collagenolytic studies of arteries. Implications for the mechanical properties of aneurysms. *Arch Surg* 1984;119:405-409

Dollery, C.M., J.R. McEwan, and A.M. Henney. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res.* 1995;77:863-868.

Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1998;102(1):145-52

Douillet CD, Velarde V, Christopher JT, Mayfield RK, Trojanowska ME, Jaffa AA. Mechanisms by which bradykinin promotes fibrosis in vascular smooth muscle cells: role of TGF-beta and MAPK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279(6):H2829-37.

Drake CJ, Hungerford JE, Little CD. Morphogenesis of the first blood vessels. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;857:155-79

Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, Rabkin E, Lindsey M, Rohde LE, Schoen FJ, Kelly RA, Werb Z, Libby P, Lee RT. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest.* 2000;106(1):55-62.

Dvorak HF, Harvey VS, Estrella P, Brown LF, McDonagh J, Dvorak AM. Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest.* 1987 ;57:673-86

Dzau VJ, Gibbons GH, Cooke JP, Omoigui N. Vascular biology and medicine in the 1990s: scope, concepts, potentials, and perspectives. *Circulation*. 1993;87:705-19

E

Edwards, D.R., G. Murphy, J.J. Reynolds, S.E. Whitham, A.J. Docherty, P. Angel, and J.K. Heath. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *Embo J*. 1987;6:1899-1904.

Edwards, D.R., P.P. Beaudry, T.D. Laing, V. Kowal, K.J. Leco, P.A. Leco, and M.S. Lim. The roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in tissue remodelling and cell growth. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1996;20(Suppl 3):S9-15.

Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(3):161-74

Endo K, Takino T, Miyamori H, Kinsen H, Yoshizaki T, Furukawa M, Sato H. Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration. *J Biol Chem*. 2003;278(42):40764-70

Ernst CB: Abdominal aortic aneurysm. *N Engl J Med* 1993;328:1167-1172

F

Felton CV, Crook D, Davies MJ, Oliver MF. Relation of plaque lipid composition and morphology to the stability of human aortic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1337-45

Filippov S, Koenig GC, Chun TH, Hotary KB, Ota I, Bugge TH, Roberts JD, Fay WP, Birkedal-Hansen H, Holmbeck K, Sabeh F, Allen ED, Weiss SJ. MT1-matrix metalloproteinase directs arterial wall invasion and neointima formation by vascular smooth muscle cells. *J Exp Med.* 2005;202(5):663-71

Flavahan NA. Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction : potential mechanisms underlying reduction in ERDF/nitric oxide activity. *Circulation* 1992 :85 :1927-1938

Fontaine V, Jacob MP, Houard X, Rossignol P, Plissonnier D, Angles-Cano E, Michel JB. Involvement of the mural thrombus as a site of protease release and activation in human aortic aneurysms. *Am J Pathol* 2002;161:1701-10

Fontaine V, Touat Z, Mtairag eM et al. Role of leukocyte elastase in preventing cellular re-colonization of the mural thrombus. *Am J Pathol* 2004;164:2077-87.

Forsyth EA, Aly HM, Najjar SF, Neville RF, Sidawy AN. Transforming growth factor beta 1 inhibits the proliferative effect of insulin on human infragenicular vascular smooth muscle cells. *J Vasc Surg.* 1997;25:432-6

Fosang, A.J., and T.E. Hardingham. Matrix proteoglycans. *In: Extracellular matrix.* Ed Comper WD. Harwood academic publishers, Melbourne, Australia. 1996; 2:200-230.

Fosang AJ, Last K, Fujii Y, Seiki M, Okada Y. Membrane-type 1 MMP (MMP-14) cleaves at three sites in the aggrecan interglobular domain. *FEBS Lett.* 1998 ;430(3):186-90.

François M, Romieu-Mourez R, Stock-Martineau S, Boivin MN, Bramson JL, Galipeau J. Mesenchymal stromal cells cross-present soluble exogenous antigens as part of their antigen-presenting cell properties. *Blood.* 2009;114(13):2632-8

Freestone T, Turner RJ, Coady A , Higman DJ, Greenhalgh RM, Powell JT. Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1995;15:1145-1151.

Frick MH, Elo O, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, Helo P, Huttunen JK, Kaitaniemi P, Koskinen P, Manninen V, et al. Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med.* 1987;317(20):1237-45

Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 1976 ;4(5):267-74

Friedman MH, Ding Z. Relation between the structural asymmetry of coronary branch vessels and the angle at their origin. *J Biomech.* 1998;31:273-8

Fry DL, Haupt MW, Pap JM. Effect of endothelial integrity, transmural pressure, and time on the intimal-medial uptake of serum 125I-albumin and 125I-LDL in an in vitro porcine arterial organ-support system. *Arterioscler Thromb.* 1992;12:1313-28

Fuster V, Bgowie EJW, Lewis JC, Fass DN, Owen CA Jr, Brown AL. Resistance to atherosclerosis in pigs with von Willebrand's disease : spontaneous and high-cholesterol diet-induced atherosclerosis. *J Clin Invest* 1978 ;61 :722-30

G

Galis, Z.S., M. Muszynski, G.K. Sukhova, E. Simon-Morrissey, E.N. Unemori, M.W. Lark, E. Amento, and P. Libby. a Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res.* 1994;75:181-189.

Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994;94(6):2493-503

Galmiche MC, Koteliansky VE, Brière J, Hervé P, Charbord P. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood.* 1993;82(1):66-76

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

Glagov S, Eckner FA, Lev M. Controlled pressure fixation apparatus for hearts. *Arch Pathol* 1963 ;76 :640-6

Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med.* 1987;316:1371-5

Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood.* 2005;105(7):2821-7

Golubkov VS, Boyd S, Savinov AY, Chekanov AV, Osterman AL, Remacle A, Rozanov DV, Doxsey SJ, Strongin AY. Membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)

exhibits an important intracellular cleavage function and causes chromosome instability.

J Biol Chem. 2005;280(26):25079-86

Golubkov VS, Chekanov AV, Savinov AY, Rozanov DV, Golubkova NV, Strongin AY.

Membrane type-1 matrix metalloproteinase confers aneuploidy and tumorigenicity on mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 2006;66(21):10460-5

Golubkov VS, Chekanov AV, Shiryayev SA, Aleshin AE, Ratnikov BI, Gawlik K,

Radichev I, Motamedchaboki K, Smith JW, Strongin AY. Proteolysis of the membrane type-1 matrix metalloproteinase prodomain: implications for a two-step proteolytic processing and activation. *J Biol Chem.* 2007;282(50):36283-91

Gomez, D.E., D.F. Alonso, H. Yoshiji, and U.P. Thorgeirsson. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 1997; 74:111-122.

Gomis-Rüth FX. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Mol Biotechnol.* 2003;24(2):157-202`

Gordon T, Kannel WB. Predisposition to atherosclerosis in the head, heart, and legs. The Framingham study. *JAMA.* 1972;221:661-6

Granata L, Olsson RA, Huvos A, Gregg DE. Coronary inflow and oxygen usage following cardiac sympathetic nerve stimulation in unanesthetized dogs. *Circ Res.* 1965;16:114-20

Granger CB, Mahaffey KW, Weaver WD, Theroux P, Hochman JS, Filloon TG, Rollins S, Todaro TG, Nicolau JC, Ruzyllo W, Armstrong PW; COMMA Investigators. Pexelizumab, an anti-C5 complement antibody, as adjunctive therapy to primary percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction: the COMplement inhibition in Myocardial infarction treated with Angioplasty (COMMA) trial. *Circulation.* 2003;108(10):1184-90

Greco SJ, Rameshwar P. Enhancing effect of IL-1alpha on neurogenesis from adult human mesenchymal stem cells: implication for inflammatory mediators in regenerative medicine. *J Immunol.* 2007;179(5):3342-50

Gregory CA, Singh H, Perry AS, Prockop DJ. The Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 is required for reentry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrow. *J Biol Chem.* 2003;278(30):28067-78

Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1962;48:1014-22

Gunn WG, Conley A, Deininger L, Olson SD, Prockop DJ, Gregory CA. A crosstalk between myeloma cells and marrow stromal cells stimulates production of DKK1 and interleukin-6: a potential role in the development of lytic bone disease and tumor progression in multiple myeloma. *Stem Cells*. 2006;24(4):986-91

Guzman RJ, Abe K, Zarins CK. Flow-induced arterial enlargement is inhibited by suppression of nitric oxide synthase activity in vivo. *Surgery*. 1997;122:273-9

H

Haas TL, Stitelman D, Davis SJ, Apte SS, Madri JA. Egr-1 mediates extracellular matrix-driven transcription of membrane type 1 matrix metalloproteinase in endothelium. *J Biol Chem*. 1999;274(32):22679-85

Halpern VJ, Nackman GB, Gandhi RH, Irizarry E, Scholes JV, Ramey WG, Tilson MD. The elastase infusion model of experimental aortic aneurysms: synchrony of induction of endogenous proteinases with matrix destruction and inflammatory cell response. *J Vasc Surg* 1994;20(1):51-60.

Hansson GK, Holm J, Jonasson L. Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am J Pathol* 1989 ;135 :169-75

Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6: 508–519

Hansson GK, Nilsson J. Vaccination against atherosclerosis? Induction of atheroprotective immunity. *Semin Immunopathol.* 2009;31(1):95-101

Harris P: Bifurcated endoprosthesis: results according to anatomic presentation and co-morbid conditions. *J Mal Vasc* 1998;23SA:59-0

Harris P.L., Vallabhaneni S.R., Desgranges P., Becquemin J.P., van Marrewijk C, Laheij RJ: Incidence and risk factors of late rupture, conversion, and death after endovascular repair of infrarenal aortic aneurysms: the EUROSTAR experience. European Collaborators on Stent/graft techniques for aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg.* 2000;32(4):739-49.

Hayakawa, T., K. Yamashita, K. Tanzawa, E. Uchijima, and K. Iwata. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett.* 1992;298:29-32.

Hayakawa, T. Tissue inhibitors of metalloproteinases and their cell growth-promoting activity. *Cell Struct Funct.* 1994;19:109-114.

He S, Pant D, Schiffmacher A, Meece A, Keefer CL. Lymphoid enhancer factor 1-mediated Wnt signaling promotes the initiation of trophoblast lineage differentiation in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2008;26(4):842-9

Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 2002;109(5):625-37.

Heo SH, Cho CH, Kim HO, Jo YH, Yoon KS, Lee JH, Park JC, Park KC, Ahn TB, Chung KC, Yoon SS, Chang DI. Plaque Rupture is a Determinant of Vascular Events in Carotid Artery Atherosclerotic Disease: Involvement of Matrix Metalloproteinases 2 and 9. *J Clin Neurol*. 2011;7(2):69-76

Herman MP, Sukhova GK, Libby P, Gerdes N, Tang N, Horton DB, Kilbride M, Breitbart RE, Chun M, Schönbeck U. Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling. *Circulation*. 2001;104(16):1899-904

Hikita A, Yana I, Wakeyama H, Nakamura M, Kadono Y, Oshima Y, Nakamura K, Seiki M, Tanaka S. Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand. *J Biol Chem*. 2006;281(48):36846-55

Hiller O, Lichte A, Oberpichler A, Kocourek A, Tschesche H. Matrix metalloproteinases collagenase-2, macrophage elastase, collagenase-3, and membrane type 1-matrix metalloproteinase impair clotting by degradation of fibrinogen and factor XII. *J Biol Chem.* 2000;275(42):33008-13

Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR, Weiss SJ. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell.* 1998;95(3):365-77

Hochman JS. Cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction: expanding the paradigm. *Circulation.* 2003;107(24):2998-3002

Holman E. Problems in the dynamics of blood flow; conditions controlling collateral circulation in the presence of an arteriovenous fistula, following the ligation of an artery. *Surgery.* 1949;26:889-917

Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA, Mankani M, Robey PG, Poole AR, Pidoux I, Ward JM, Birkedal-Hansen H. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell.* 1999;99(1):81-92

Holmes DR, Lopez-Candales A, Liao S, Thompson RW: Smooth muscle cell apoptosis and p53 expression in human abdominal aortic aneurysms. *Ann N Y Acad Sci* 1996;800:286-287

Holopainen JM, Moilanen JA, Sorsa T, Kivelä-Rajamäki M, Tervahartiala T, Vesaluoma MH, Tervo TM. Activation of matrix metalloproteinase-8 by membrane type 1-MMP and their expression in human tears after photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(6):2550-6

Holvoet P, Theilmeier G, Shivalkar B, Flameng W, Collen D. LDL hypercholesterolemia is associated with accumulation of oxidized LDL, atherosclerotic plaque growth, and compensatory vessel enlargement in coronary arteries of miniature pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:415-22

Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(13):8932-7

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A; International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005;7(5):393-5

Hotary K, Allen E, Punturieri A, Yana I, Weiss SJ. Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3. *J Cell Biol.* 2000;149(6):1309-23

Hsueh WA, Anderson PW. Hypertension, the endothelial cell, and the vascular complications of diabetes mellitus. *Hypertension.* 1992;20:253-63.

I

Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest.* 1993;92(2):883-93

Iso Y, Spees JL, Serrano C, Bakondi B, Pochampally R, Song YH, Sobel BE, Delafontaine P, Prockop DJ. Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;354(3):700-6

Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, Rosenfield K, Razvi S, Walsh K, Symes JF. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet.* 1996;348(9024):370-4.

Isner JM. Myocardial gene therapy. *Nature*. 2002 Jan 10;415(6868):234-9

J

Jacob, M.P. L'élastine: préparation, caractérisation, structure, biosynthèse et catabolisme. *C R Soc Biol*. 1993;187:166-180.

Javazon EH, Colter DC, Schwarz EJ, Prockop DJ. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells*. 2001;19(3):219-25.

Jawien A, Bowen-Pope DF, Lindner V, Schwartz SM, Clowes AW. Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty. *J Clin Invest* 1992;89:507-11.

Jean Claude J, Newman KM, Li H, Gregory AK, Tilson MD. Possible key role for plasmin in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Surgery* 1994; 116:472-478

Jiang A, Lehti K, Wang X, Weiss SJ, Keski-Oja J, Pei D. Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 activity by dynamin-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(24):13693-8

Jiang W, Ma A, Wang T, Han K, Liu Y, Zhang Y, Zhao X, Dong A, Du Y, Huang X, Wang J, Lei X, Zheng X. Intravenous transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac performance after acute myocardial ischemia in female rats. *Transpl Int*. 2006;19(7):570-80

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418(6893):41-9

Johnson JL, Sala-Newby GB, Ismail Y, Aguilera CM, Newby AC. Low tissue inhibitor of metalloproteinases 3 and high matrix metalloproteinase 14 levels defines a subpopulation of highly invasive foam-cell macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(9):1647-53

Jones JA, Ruddy JM, Bouges S, Zavadzkas JA, Brinsa TA, Stroud RE, Mukherjee R, Spinale FG, Ikonomidis JS. Alterations in membrane type-1 matrix metalloproteinase abundance after the induction of thoracic aortic aneurysm in a murine model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299(1):H114-24

Jones PH, Davidson MH. Reporting rate of rhabdomyolysis with fenofibrate + statin versus gemfibrozil + any statin. *Am J Cardiol*. 2005;95(1):120-2

K

Kajita M, Itoh Y, Chiba T, Mori H, Okada A, Kinoh H, Seiki M. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol.* 2001;153(5):893-904

Kang T, Yi J, Yang W, Wang X, Jiang A, Pei D. Functional characterization of MT3-MMP in transfected MDCK cells: progelatinase A activation and tubulogenesis in 3-D collagen lattice. *FASEB J.* 2000 ;14(15):2559-68

Kannel WB, Schwartz MJ, McNamara PM. Blood pressure and risk of coronary heart disease: the Framingham study. *Dis Chest.* 1969;56:43-52

Karsdal MA, Larsen L, Engsig MT, Lou H, Ferreras M, Lochter A, Delaissé JM, Foged NT. Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor-beta controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. *J Biol Chem.* 2002;277(46):44061-7

Kidd S, Spaeth E, Klopp A, Andreeff M, Hall B, Marini FC. The (in) auspicious role of mesenchymal stromal cells in cancer: be it friend or foe. *Cytotherapy.* 2008;10(7):657-67

Kim J, Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol.* 2009;37(12):1445-53

Knäuper V, Bailey L, Worley JR, Soloway P, Patterson ML, Murphy G. Cellular activation of proMMP-13 by MT1-MMP depends on the C-terminal domain of MMP-13. *FEBS Lett.* 2002;532(1-2):127-30

Koga H, Muneta T, Nagase T, Nimura A, Ju YJ, Mochizuki T, Sekiya I. Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. *Cell Tissue Res.* 2008;333(2):207-15

Kovanen PT, Kaartinen M, Paavonen T. Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction. *Circulation.* 1995;92(5):1084-8

Krampera M, Vitale A, Vincenzi C, Perbellini O, Guarini A, Annino L, Todeschini G, Camera A, Fabbiano F, Fioritoni G, Nobile F, Szydlo R, Mandelli F, Foà R, Pizzolo G. Outcome prediction by immunophenotypic minimal residual disease detection in adult T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2003;120(1):74-9

Ku DN, Giddens DP. Pulsatile flow in a model carotid bifurcation. *Arteriosclerosis.* 1983;3:31-9

Ku DN, Giddens DP, Zarins CK, Glagov S. Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. *Arteriosclerosis*. 1985;5:293-302

Kunter U, Rong S, Djuric Z, Boor P, Müller-Newen G, Yu D, Floege J. Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(8):2202-12

L

Lafleur MA, Mercuri FA, Ruangpanit N, Seiki M, Sato H, Thompson EW. Type I collagen abrogates the clathrin-mediated internalization of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) via the MT1-MMP hemopexin domain. *J Biol Chem*. 2006;281(10):6826-40

Lancet. Mortality results for randomised controlled trial of early elective surgery or ultrasonographic surveillance for small abdominal aortic aneurysms. The UK Small Aneurysm Trial Participants. *Lancet* 1998;352(9141):1649-55

Lancet. Comparison of endovascular aneurysm repair with open repair in patients with abdominal aortic aneurysm (EVAR trial 1), 30-day operative mortality results: randomised controlled trial. *Lancet* 2004 Sep 4;364(9437):843-8.

Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998 ;97(12):1129-35

Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, Ballard DJ, Jordan WD, Blebea J, et al. Rupture rate of large abdominal aortic aneurysms in patients refusing or unfit for elective repair. *JAMA* 2002; 287:2968-72

Lee LY, Patel SR, Hackett NR, Mack CA, Polce DR, El-Sawy T, Hachamovitch R, Zanzonico P, Sanborn TA, Parikh M, Isom OW, Crystal RG, Rosengart TK. Focal angiogen therapy using intramyocardial delivery of an adenovirus vector coding for vascular endothelial growth factor 121. *Ann Thorac Surg.* 2000;69(1):14-23

Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, Prockop DJ. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(46):17438-43

Lee RH, Seo MJ, Pulin AA, Gregory CA, Ylostalo J, Prockop DJ. The CD34-like protein PODXL and alpha6-integrin (CD49f) identify early progenitor MSCs with increased clonogenicity and migration to infarcted heart in mice. *Blood.* 2009;113(4):816-26

Leung DY, Glagov S, Mathews MB. Elastin and collagen accumulation in rabbit ascending aorta and pulmonary trunk during postnatal growth. Correlation of cellular synthetic response with medial tension. *Circ Res.* 1977;41:316-23

Levy JH. The human inflammatory response. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;27 Suppl 1:S31-7.

Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr, Libby P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb.* 1993 ;13(2):197-204

Li Y, Aoki T, Mori Y, Ahmad M, Miyamori H, Takino T, Sato H. Cleavage of lumican by membrane-type matrix metalloproteinase-1 abrogates this proteoglycan-mediated suppression of tumor cell colony formation in soft agar. *Cancer Res.* 2004;64(19):7058-64

Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation.* 2001;104(3):365-72

Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation.* 2005;111(25):3481-8

Libby P, Ridker PM, Hansson GK; Leducq Transatlantic Network on Atherothrombosis. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol.* 2009 ;54(23):2129-38

Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature.* 2011;473(7347):317-25

Linder V, Majack RA, Reidy MA. Basic fibroblast growth factor stimulates endothelial regrowth and proliferation in denuded arteries. *J Clin Invest* 1990 ;85 :2004-8

Lohler J, Timpl R, Jaenisch R: Embryonic lethal mutation in mouse collagen I causes rupture of blood vessels and is associated with erythropoietic and mesenchymal cell death. *Cell* 1984;38:597-602.

Losordo DW, Rosenfield K, Kaufman J, Pieczek A, Isner JM. Focal compensatory enlargement of human arteries in response to progressive atherosclerosis. In vivo documentation using intravascular ultrasound. *Circulation.* 1994;89:2570-7

Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, Micks M, McQueen MJ, Probstfield J, Fodor G, Held C, Genest J Jr; Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Investigators. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med.* 2006;354(15):1567-77

Losy F, Dai J, Page C, Ginat M, Becquemin JP, Allaire E. Paracrine secretion of transforming growth factor-beta 1 in aneurysm healing and stabilisation with endovascular smooth muscle cell therapy. *J Vas Surg* 2003;37:1301-1309

Low RB, White SL, Low ES, Neuville P, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. Age dependence of smooth muscle myosin expression by cultured rat aortic smooth muscle cells. *Differentiation* 1999 Nov;65(3):151-9.

Lopez-Candales A, Holmes DR, Lao S, Scott ML, Wickline SA, Thompson RW. Decreased vascular smooth muscle cell density in medial degeneration of human abdominal aortic aneurysms. *Am J Pathol* 1997; 150:993-1007.

Lüscher TF. The endothelium and cardiovascular disease--a complex relation. *N Engl J Med*. 1994;330:1081-3

Lyon RT, Runyon-Hass A, Davis HR, Glagov S, Zarins CK. Protection from atherosclerotic lesion formation by reduction of artery wall motion. *J Vasc Surg*. 1987;5:59-67

M

McGill HC Jr, Herderick EE, McMahan CA, Zieske AW, Malcolm GT, Tracy RE, Strong JP. Atherosclerosis in youth. *Minerva Pediatr.* 2002;54:437-47

McQuibban GA, Gong JH, Tam EM, McCulloch CA, Clark-Lewis I, Overall CM. Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science.* 2000;289(5482):1202-6

McQuibban GA, Butler GS, Gong JH, Bendall L, Power C, Clark-Lewis I, Overall CM. Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem.* 2001;276(47):43503-8

McQuibban GA, Gong JH, Wong JP, Wallace JL, Clark-Lewis I, Overall CM. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood.* 2002;100(4):1160-7

MacSweeney ST, Powell JT, Greenhalgh RM. Pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg* 1994;81:935-941

Mack CA, Magovern CJ, Budenbender KT, Patel SR, Schwarz EA, Zanzonico P, Ferris B, Sanborn T, Isom P, Ferris B, Sanborn T, Isom OW, Crystal RG, Rosengart TK. Salvage angiogenesis induced by adenovirus-mediated gene transfer of vascular

endothelial growth factor protects against ischemic vascular occlusion. *J Vasc Surg.* 1998;27(4):699-709

Majesky MW. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(6):1248-58

Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE, Bruder SP, Gerson SL. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematother Stem Cell Res.* 2000;9(6):841-8

Malinow MR. Experimental models of atherosclerosis regression. *Atherosclerosis.* 1983;48:105-18

Marquardt H, Hunkapiller MW, Hoot LE, Twardzik DR, De Larco JE, Stephenson JR, Todaro GJ. Transforming growth factors produced by retrovirus-transformed rodent fibroblasts and human melanoma cells. :Amino acid sequence homology with epidermal growth factor. *PNAS* 1983 ;80 :4684-88

Martin P. On abdominal aortic aneurysms. *J Cardiovasc Surg* 1978; 19:597-598

Massagué J, Cheifetz S, Boyd FT, Andres JL. TGF-beta receptors and TGF-beta binding proteoglycans: recent progress in identifying their functional properties. *Ann N Y Acad Sci.* 1990;593:59-72

Masuda H, Bassiouny HS, Glagov S, Zarins CK. Artery wall restructuring in response to increased flow. *Surg Forum* 1989 ;40 :285

Melton L, Bickerstaff L, Hollier L et coll. Changing incidence of abdominal aortic aneurysms: a population based study. *Am J Epidemiol* 1984; 120: 379-386

Mets T, Verdonk G. In vitro aging of human bone marrow derived stromal cells. *Mech Ageing Dev.* 1981;16(1):81-9

Mignatti, P. Extracellular matrix remodeling by metalloproteinases and plasminogen activators. *Kidney Int Suppl.* 1995;49:S12-14.

Milker-Zabel S, Zabel A, Manegold C, Zuna I, Wannemacher M, Debus J. Calcification in coronary arteries as quantified by CT scans correlated with tobacco consumption in patients with inoperable non-small cell lung cancer treated with three-dimensional radiotherapy. *Br J Radiol.* 2003;76:891-6

Miller VM, Burnett JC Jr. Modulation of NO and endothelin by chronic increases in blood flow in canine femoral arteries. *Am J Physiol.* 1992;263:H103-8

Minguell JJ, Erices A. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2006;231(1):39-49

Mirza A, Hyvelin JM, Rochefort GY, Lermusiaux P, Antier D, Awede B, Bonnet P, Domenech J, Eder V. Undifferentiated mesenchymal stem cells seeded on a vascular prosthesis contribute to the restoration of a physiologic vascular wall. *J Vasc Surg*. 2008 ;47(6):1313-21

Moore S, Freidman RJ, Singal DP, Gauldie J, Blajchman MA, Roberts RS. Inhibition of injury induced thromboatherosclerotic lesions by anti-platelet serum in rabbits. *Thromb Haemost* 1976 ;35 :70-81

Moore JE Jr, Xu C, Glagov S, Zarins CK, Ku DN. Fluid wall shear stress measurements in a model of the human abdominal aorta: oscillatory behavior and relationship to atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1994;110:225-40

Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, Nagai Y, Niibe K, Hiratsu E, Suzuki S, Miyauchi-Hara C, Nagoshi N, Sunabori T, Shimmura S, Miyawaki A, Nakagawa T, Suda T, Okano H, Matsuzaki Y. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med*. 2009;206(11):2483-96

Moulton KS, Heller E, Konerding MA, Flynn E, Palinski W, Folkman J. Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 1999 ;99(13):1726-32

Movat HZ, More RH, Haust MD. The diffuse intimal thickening of the human aorta with aging. *Am J Pathol*. 1958;34:1023-31

Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sato T, Uno T, Itoh J, Kato S, Ito M, Hotta T, Ando K. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood*. 2006;107(5):1878-87

Munoz JR, Stoutenger BR, Robinson AP, Spees JL, Prockop DJ. Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(50):18171-6

Murphy, G., S. Atkinson, R. Ward, J. Gavrilovic, and J.J. Reynolds. The role of plasminogen activators in the regulation of connective tissue metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci*. 1992;667:1-12.

N

Nagase, H. Activation mechanisms of metalloproteinases. *Biol Chem.* 1997; 378:151-160.

Nagase, H., and J.F. Woessner. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274:21491-21494.

Nakano M, Satoh K, Fukumoto Y, Ito Y, Kagaya Y, Ishii N, Sugamura K, Shimokawa H. Important role of erythropoietin receptor to promote VEGF expression and angiogenesis in peripheral ischemia in mice. *Circ Res.* 2007; 100: 662–629

Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EG, Willemze R, Fibbe WE. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood.* 2006;108(6):2114-20

Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood.* 2007;110(10):3499-506

Navab M, Hama SY, Hough GP, Hedrick CC, Sorenson R, La Du BN, Kobashigawa JA, Fonarow GC, Berliner JA, Laks H, Fogelman AM. High density associated enzymes: their role in vascular biology. *Curr Opin Lipidol.* 1998;9(5):449-56.

Newby AC, George SJ, Ismail Y, Johnson JL, Sala-Newby GB, Thomas AC. Vulnerable atherosclerotic plaque metalloproteinases and foam cell phenotypes. *Thromb Haemost.* 2009 ;101(6):1006-11

Newman KM, Jean-Claude J, Li H, Scholes JV, Ogata Y, Nagase H, Tilson MD. Cellular localisation of matrix metalloproteinases in the abdominal aortic aneurysm wall. *J Vasc Surg* 1994; 20:814-820.

Nissen SE, Nicholls SJ, Sipahi I, Libby P, Raichlen JS, Ballantyne CM, Davignon J, Erbel R, Fruchart JC, Tardif JC, Schoenhagen P, Crowe T, Cain V, Wolski K, Goormastic M, Tuzcu EM; ASTEROID Investigators. Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial. *JAMA.* 2006;295(13):1556-65

Nonaka T, Nishibashi K, Itoh Y, Yana I, Seiki M. Competitive disruption of the tumor-promoting function of membrane type 1 matrix metalloproteinase/matrix metalloproteinase-14 in vivo. *Mol Cancer Ther.* 2005;4(8):1157-66

Nussenblatt RB, Bielekova B, Childs R, Krensky A, Strober W, Trinchieri G; Center for Human Immunology, Autoimmunity and Inflammation, National Institutes of Health. National Institutes of Health Center for Human Immunology Conference, September 2009. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1200 Suppl 1:E1-23

O

O'Callaghan CJ, Williams B. Mechanical strain-induced extracellular matrix production by human vascular smooth muscle cells: role of TGF-beta(1). *Hypertension* 2000;36(3):319-24.

Oblander SA, Zhou Z, Gálvez BG, Starcher B, Shannon JM, Durbeej M, Arroyo AG, Tryggvason K, Apte SS. Distinctive functions of membrane type 1 matrix-metalloprotease (MT1-MMP or MMP-14) in lung and submandibular gland development are independent of its role in pro-MMP-2 activation. *Dev Biol.* 2005;277(1):255-69

Ohshima S, Petrov A, Fujimoto S, Zhou J, Azure M, Edwards DS, Murohara T, Narula N, Tsimikas S, Narula J. Molecular imaging of matrix metalloproteinase expression in atherosclerotic plaques of mice deficient in apolipoprotein e or low-density-lipoprotein receptor. *J Nucl Med.* 2009;50(4):612-7

Opitz CA, Litzemberger UM, Lutz C, Lanz TV, Tritschler I, Köppel A, Tolosa E, Hoberg M, Anderl J, Aicher WK, Weller M, Wick W, Platten M. Toll-like receptor engagement enhances the immunosuppressive properties of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by inducing indoleamine-2,3-dioxygenase-1 via interferon-beta and protein kinase R. *Stem Cells.* 2009;27(4):909-19

d'Ortho MP, Will H, Atkinson S, Butler G, Messent A, Gavrilovic J, Smith B, Timpl R, Zardi L, Murphy G. Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem.* 1997;250(3):751-7

d'Ortho MP, Stanton H, Butler M, Atkinson SJ, Murphy G, Hembry RM. MT1-MMP on the cell surface causes focal degradation of gelatin films. *FEBS Lett.* 1998 ;421(2):159-64.

Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, Phinney DG. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(14):8407-11

Ortiz LA, Dutreil M, Fattman C, Pandey AC, Torres G, Go K, Phinney DG. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(26):11002-7

Osenkowski P, Toth M, Fridman R. Osenkowski P, Toth M, Fridman R. *J Cell Physiol.* 2004;200(1):2-10

Owen AJ, Geyer RP, Antoniades HN. Human platelet-derived growth factor stimulates amino acid transport and protein synthesis by human diploid fibroblasts in plasma-free media. *PNAS* 1982 ;79 :3203-07

P

Paigen B, Morrow A, Brandon C, Mitchell D, Holmes P. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis*. 1985;57(1):65-73

Paravicini TM, Gulluyan LM, Dusting GJ, Drummond GR. Increased NADPH oxidase activity, gp91phox expression, and endothelium-dependent vasorelaxation during neointima formation in rabbits. *Circ Res*. 2002;91:54-61

Parmentier EM, Morton WA, Petscheck HE. Platelet aggregate formation in a region of separated blood flow. *Phys Fluids* 1981 ;20 :2012-15

Pasterkamp G, Borst C, Post MJ, Mali WP, Wensing PJ, Gussenhoven EJ, Hillen B. Atherosclerotic arterial remodeling in the superficial femoral artery. Individual variation in local compensatory enlargement response. *Circulation*. 1996;93:1818-25

Pei D, Weiss SJ. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature*. 1995;375(6528):244-7

Pei D, Weiss SJ. Transmembrane-deletion mutants of the membrane-type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity. *J Biol Chem*. 1996;271(15):9135-40.

Pei D. Identification and characterization of the fifth membrane-type matrix metalloproteinase MT5-MMP. *J Biol Chem*. 1999;274(13):8925-32

Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*. 2007;25(11):2896-902

Piedrahita JA, Zhang SH, Hagan JR, Oliver PM, Maeda N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(10):4471-5

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7

Pittilo RM, Mackie IJ, Rowles PM, Machin SJ, Woolf N. Effects of cigarette smoking on the ultrastructure of rat thoracic aorta and its ability to produce prostacyclin. *Thromb Haemost*. 1982;48:173-6

Pontikoglou C, Deschaseaux F, Sensebé L, Papadaki HA. Bone marrow mesenchymal stem cells: biological properties and their role in hematopoiesis and hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cell Rev.* 2011;7(3):569-89

Poole JC, Florey HW. Changes in the endothelium of the aorta and the behaviour of macrophages in experimental atheroma of rabbits. *J Pathol Bacteriol.* 1958;75(2):245-51

Powell JT, Higman DJ. Smoking, nitric oxide and the endothelium. *Br J Surg.* 1994;81:785-7

Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997;276(5309):71-4

Pyo R, Lee JK, Shipley JM, Curci JA, Mao D, Ziporin SJ, Ennis TL, Shapiro SD, Senior RM, Thompson RW. Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest* 2000;105:1519-20.

Q

Qu Y, Dong XJ, Sugaya I. Bromodeoxyuridine increases multipotency of human bone marrow-derived stem cells. *Restor Neurol Neurosci* 2004 ;22 :459-68

Quax PH, Van Den Hoogen CM, Verheijen JH, et al. Endotoxin induction of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 mRNA in rat tissues in vivo. *J Biol Chem* 1990;265:15560-15563

R

Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, Ottonello L, Pistoia V. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells*. 2008;26(1):151-62

Rajavashisth TB, Xu XP, Jovinge S, Meisel S, Xu XO, Chai NN, Fishbein MC, Kaul S, Cercek B, Sharifi B, Shah PK. Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by proinflammatory mediators. *Circulation*. 1999;99(24):3103-9

Rajavashisth TB, Liao JK, Galis ZS, Tripathi S, Laufs U, Tripathi J, Chai NN, Xu XP, Jovinge S, Shah PK, Libby P. Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *J Biol Chem*. 1999;274(17):11924-9

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(7):1188-96

Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Machalinski B, Ratajczak J, Kucia M. Very small embryonic-like (VSEL) stem cells: purification from adult organs, characterization, and biological significance. *Stem Cell Rev.* 2008;4(2):89-99

Ratnikov BI, Rozanov DV, Postnova TI, Baciuc PG, Zhang H, DiScipio RG, Chestukhina GG, Smith JW, Deryugina EI, Strongin AY. An alternative processing of integrin alpha(v) subunit in tumor cells by membrane type-1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem.* 2002;277(9):7377-85

Reddick RL, Zhang SH, Maeda N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesion development and progression. *Arterioscler Thromb.* 1994 ;14(1):141-7

Remacle AG, Rozanov DV, Baciuc PC, Chekanov AV, Golubkov VS, Strongin AY. The transmembrane domain is essential for the microtubular trafficking of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 21):4975-84

Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, Zhao RC, Shi Y. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. 2008;2(2):141-50

Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks FM, Moye LA, Goldman S, Flaker GC, Braunwald E. Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation*. 1998;98(9):839-44

Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM Jr, Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, Macfadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ; JUPITER Trial Study Group. Reduction in C-reactive protein and LDL cholesterol and cardiovascular event rates after initiation of rosuvastatin: a prospective study of the JUPITER trial. *Lancet*. 2009;373(9670):1175-82

Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lönnies H, Marschall HU, Dlugosz A, Szakos A, Hassan Z, Omazic B, Aschan J, Barkholt L, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*. 2006;81(10):1390-7

Rioufol G, Finet G, Ginon I, André-Fouët X, Rossi R, Vialle E, Desjoyaux E, Convert G, Huret JF, Tabib A. Multiple atherosclerotic plaque rupture in acute coronary syndrome: a three-vessel intravascular ultrasound study. *Circulation*. 2002;106(7):804-8

Robert, L., and P. Birembaut. 1987. La matrice extracellulaire de la paroi artérielle. *In: Les maladies de la paroi artérielle*. Eds Camilleri JP, Berry CL, Fiessinger JN and Bariety J. Médecine-Sciences-Flammarion : 32-43.

Roberts AB, Lamb LC, Newton DL, Sporn MB, De Larco JE, Todaro GJ. Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980 ;77 :3494-8

Robins, S.P., and C. Farquharson. 1995. Connective tissue components of the blood vessel wall in health and disease. *In: Vascular Pathology*. Eds Stehbens WT, Lie JT. Chapman & Hall Medical , London : 89-127.

Ross R, Glomset JA, Kariya B, Harker L. A platelet-dependant serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *PNAS* 1974 ;71 :1207-10

Ross R, Harker L. Hyperlipidemia and atherosclerosis. *Science*. 1976;193:1094-100

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N Engl J Med*. 1986;314:488-500

Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* 1995 :57 :791-804

Rozanov DV, Hahn-Dantona E, Strickland DK, Strongin AY. The low density lipoprotein receptor-related protein LRP is regulated by membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) proteolysis in malignant cells. *J Biol Chem.* 2004;279(6):4260-8

Rubin H. Multistage carcinogenesis in cell culture. *Dev Biol (Basel).* 2001;106:61-6

Rus HG, Niculescu F, Constantinescu E, Cristea A, Vlaicu R. Immunoelectron-microscopic localization of the terminal C5b-9 complement complex in human aortic fibrous plaque. *Atherosclerosis* 1986 ;61 :35-42

Rye KA, Bursill CA, Lambert G, Tabet F, Barter PJ. The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *J Lipid Res.* 2009;50 Suppl:S195-200

S

Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, Tagliafico E, Ferrari S, Robey PG, Riminucci M, Bianco P. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell.* 2007;131(2):324-36

Saito S. Cytokine cross-talk between mother and the embryo/placenta. *J Reprod Immunol* 2001 Oct-Nov;52(1-2):15-33.

Saksela O, Moscatelli D, Sommer A, Rifkin DB. Endothelial derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J Cell Biol* 1988 ;107 :743-55

Sartore S, Chiavegato A, Faggini E et al. Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant. *Circ Res* 2001;89:1111-21.

Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol*. 2008;180(4):2581-7

Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med*. 2002; 8: 403

Sato H, Kinoshita T, Takino T, Nakayama K, Seiki M. Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. *FEBS Lett*. 1996;393(1):101-4

Sato Y, Okamura K, Morimoto A, Hamanaka R, Hamaguchi K, Shimada T, Ono M, Kohno K, Sakata T, Kuwano M. Indispensable role of tissue-type plasminogen activator in growth factor-dependant tube formation of human microvascular endothelial cells in vitro. *Exp Cell Res* 1993 ;204 :223-9

Satoh K, Kagaya Y, Nakano M, Ito Y, Ohta J, Tada H, Karibe A, Minegishi N, Suzuki N, Yamamoto M, Ono M, Watanabe J, Shirato K, Ishii N, Sugamura K, Shimokawa H. Important role of endogenous erythropoietin system in recruitment of endothelial progenitor cells in hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Circulation*. 2006; 113: 1442–1450

Schernthaner G, Schwarzer C, Kuzmits R, Müller MM, Klemen U, Freyler H. Increased angiotensin-converting enzyme activities in diabetes mellitus: analysis of diabetes type, state of metabolic control and occurrence of diabetic vascular disease. *J Clin Pathol*. 1984;37:307-12.

Schiller NK, Kubo N, Boisvert WA, Curtiss LK. Effect of gamma-irradiation and bone marrow transplantation on atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(10):1674-80.

Schindler C, Shuai K, Prezioso VR, Darnell JE. Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science* 1992 ;257 :809-13

Schrepfer S, Deuse T, Reichenspurner H, Fischbein MP, Robbins RC, Pelletier MP. Stem cell transplantation: the lung barrier. *Transplant Proc.* 2007;39(2):573-6

Schwartz SM, DeBlois D, O'Brien ERM. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Cir Res* 1995;77:445-465.

Seifert RA, Schwartz SM, Bowen-Pope DF. Developmentally regulated production of platelet-derived growth factor-like molecules. *Nature* 1984 ;311 :669-71

Seifert RA, Hart CE, Philips PE, Forstom JW, Ross R, Murray MJ, Bowen-Pope DF. Two different subunits associate to create isoform-specific platelet-derived growth factor receptors. *J Biol Chem* 1989 ;264 :8771-8

Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells.* 2002;20(6):530-41

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 1983;219:983-5

Siegel G, Schäfer R, Dazzi F. The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Transplantation.* 2009;87(9 Suppl):S45-9

Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, Wang S, Caplice NM. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation* 2002;106(10):1199-204.

Simper D, Mayr U, Urbich C et al. Comparative proteomics profiling reveals role of smooth muscle progenitors in extracellular matrix production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30(7):1325-32.

Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 ;92(18):8264-8

Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*. 2008;111(3):1327-33

Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, de Crombrughe B. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J Cell Biol*. 1987;105:1039-45

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

Stadtfield M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*. 2008;322(5903):945-9

Stary HC. Regression of atherosclerosis in primates. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*. 1979;383:117-34

Stary HC. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Atherosclerosis* 1989 ;9(Suppl 1) :19-32

Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Atherosclerosis. *Circulation* 1995 ;92 :1355-74

Steinberg D, Witztum JL. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(12):2311-6

Stone PH, Coskun AU, Kinlay S, Clark ME, Sonka M, Wahle A, Ilegbusi OJ, Yeghiazarians Y, Popma JJ, Orav J, Kuntz RE, Feldman CL. Effect of endothelial shear stress on the progression of coronary artery disease, vascular remodeling, and in-stent restenosis in humans: in vivo 6-month follow-up study. *Circulation*. 2003;108:438-44

Strauer BE, Brehm M, Zeus T et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002;106:1913-8.

Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem.* 1995;270(10):5331-8

Sueblinvong V, Loi R, Eisenhauer PL, Bernstein IM, Suratt BT, Spees JL, Weiss DJ. Derivation of lung epithelium from human cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177(7):701-11

Sugiyama S, Okada Y, Sukhova GK, Virmani R, Heinecke JW, Libby P. Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am J Pathol.* 2001;158(3):879-91

Swirski FK, Libby P, Aikawa E, Alcaide P, Luscinskas FW, Weissleder R, Pittet MJ. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest.* 2007; 117: 195

Symes JF. Gene therapy for ischemic heart disease: therapeutic potential. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2001;1(3):159-66.

T

Takahashi K, Ghatgei MA, Lam HC, O'Halloran DJ, Bloom SR. Elevated plasma endothelin in patients with diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1990;33:306-10.

Takasaki I, Chobanian AV, Brecher P. Biosynthesis of fibronectin by rabbit aorta. *J Biol Chem*. 1991;266:17686-94

Tam EM, Wu YI, Butler GS, Stack MS, Overall CM. Collagen binding properties of the membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) hemopexin C domain. The ectodomain of the 44-kDa autocatalytic product of MT1-MMP inhibits cell invasion by disrupting native type I collagen cleavage. *J Biol Chem*. 2002;277(41):39005-14

Tam EM, Moore TR, Butler GS, Overall CM. Characterization of the distinct collagen binding, helicase and cleavage mechanisms of matrix metalloproteinase 2 and 14 (gelatinase A and MT1-MMP): the differential roles of the MMP hemopexin c domains and the MMP-2 fibronectin type II modules in collagen triple helicase activities. *J Biol Chem*. 2004;279(41):43336-44

Tamarina NA, McMillan WD, Shively VP, Pearce WH. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in aneurysms and normal aorta. *Surgery* 1997;122:264-72

Tatard VM, D'Ippolito G, Diabira S, Valeyev A, Hackman J, McCarthy M, Bouckenooghe T, Menei P, Montero-Menei CN, Schiller PC. Neurotrophin-directed differentiation of human adult marrow stromal cells to dopaminergic-like neurons. *Bone*. 2007;40(2):360-73

Taylor KE, Glagov S, Zarins CK. Preservation and structural adaptation of endothelium over experimental foam cell lesions. Quantitative ultrastructural study. *Arteriosclerosis*. 1989;9:881-94

Taylor CA, Cheng CP, Espinosa LA, Tang BT, Parker D, Herfkens RJ. In vivo quantification of blood flow and wall shear stress in the human abdominal aorta during lower limb exercise. *Ann Biomed Eng*. 2002;30:402-8

Thompson RW, Parks WC. Role of matrix metalloproteinases in abdominal aortic aneurysms. *Ann N Y Acad Sci* 1996;800:157-74

Tilson M, Stansel H. Differences in results for aneurysm vs. occlusive disease after bifurcation grafts. *Arch Surg* 1980; 115:1173-1175

Tögel F, Weiss K, Yang Y, Hu Z, Zhang P, Westenfelder C. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292(5):F1626-35

Tomita S, Li R.K., Weisel R.D. *et al.*, Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 100 Suppl II (1999), pp. II247–II256.

Topol EJ. Inflammation and embolization in ischemic heart disease. *J Invasive Cardiol.* 2000;12 Suppl B:2B-7B

Torzewski J, Bowyer DE, Waltenberg J, Fitzsimmons C. Processes in atherogenesis : complement activation. *Atherosclerosis* 1997 ;132 :131-8

Tropea BI, Schwarzacher SP, Chang A, Asvar C, Huie P, Sibley RK, Zarins CK. Reduction of aortic wall motion inhibits hypertension-mediated experimental atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2127-33

Turk K: Post-mortem incidence of abdominal aortic aneurysms. *Proc R Soc Med* 1965; 58: 869-870.

Turk V, Bode W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett.* 1991;285(2):213-9.

Turnbull IC, Hadri L, Rapti K, Sadek M, Liang L, Shin HJ, Costa KD, Marin ML, Hajjar RJ, Faries PL. Aortic implantation of mesenchymal stem cells after aneurysm injury in a porcine model. *J Surg Res.* 2011;170(1):e179-88

U

Udayakumar TS, Chen ML, Bair EL, Von Bredow DC, Cress AE, Nagle RB, Bowden GT. Membrane type-1-matrix metalloproteinase expressed by prostate carcinoma cells cleaves human laminin-5 beta3 chain and induces cell migration. *Cancer Res.* 2003;63(9):2292-9

Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol.* 2007;28(5):219-26

V

Valenzuela-Fernandez A, Planchenault T, Baleux F et al. Leukocyte elastase negatively regulates Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCR4 binding and functions by amino-terminal processing of SDF-1 and CXCR4. *J Biol Chem* 2002;277:15677-89.

Van Den Bogaerdt AJ, Van Zuijlen PP, Van Galen M et al. The suitability of cells from different tissues for use in tissue-engineered skin substitutes. *Arch Dermatol Res* 2002;294:135-42.

Van Laake LW, Vainas T, Dammers R, Kitslaar PJ, Hoeks AP, Schurink GW. Systemic dilation diathesis in patients with abdominal aortic aneurysms: a role for matrix metalloproteinase-9? *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005;29:371-7

Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(14):5578-82

Vassalli, J.D., A.P. Sappino, and D. Belin. The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest*. 1991;88:1067-1072.

Vaughan DE. Plasminogen activator inhibitor-1 and the calculus of mortality after myocardial infarction. *Circulation*. 2003;108(4):376-7

Vine N, Powell JT. Metalloproteinases in degenerative aortic disease. *Clin Science* 1991;81:233-239

W

Walter DH, Rochwalsky U, Reinhold J, Seeger F, Aicher A, Urbich C, Spyridopoulos I, Chun J, Brinkmann V, Keul P, Levkau B, Zeiher AM, Dimmeler S, Haendeler J. Sphingosine-1-phosphate stimulates the functional capacity of progenitor cells by activation of the CXCR4-dependent signaling pathway via the S1P3 receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27: 275

Wilson EM, Moainie SL, Baskin JM, Lowry AS, Deschamps AM, Mukherjee R, Guy TS, St John-Sutton MG, Gorman JH 3rd, Edmunds LH Jr, Gorman RC, Spinale FG. Region- and type-specific induction of matrix metalloproteinases in post-myocardial infarction remodeling. *Circulation*. 2003;107(22):2857-63

Winniford MD, Wheelan KR, Kremers MS, Ugolini V, van den Berg E Jr, Niggemann EH, Jansen DE, Hillis LD. Smoking-induced coronary vasoconstriction in patients with atherosclerotic coronary artery disease: evidence for adrenergically mediated alterations in coronary artery tone. *Circulation*. 1986;73:662-7

Wolinsky H, Glagov S. A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals. *Circ Res*. 1967;20(1):99-111

Wolinsky H. Long-term effects of hypertension on the rat aortic wall and their relation to concurrent aging changes. Morphological and chemical studies. *Circ Res*. 1972;30:301-9

Wong CB. Atherosclerotic arterial remodeling in the superficial femoral artery: individual variation in local compensatory enlargement response. *Circulation*. 1997;95:279-80

Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*. 2007;25(10):2648-59

X

Xiong W, Knispel R, MacTaggart J, Greiner TC, Weiss SJ, Baxter BT. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase regulates macrophage-dependent elastolytic activity and aneurysm formation in vivo. *J Biol Chem.* 2009;284(3):1765-71

Xu C, Glagov S, Zatina MA, Zarins CK. Hypertension sustains plaque progression despite reduction of hypercholesterolemia. *Hypertension.* 1991;18:123-9

Xu C, Zarins CK, Pannaraj PS, Bassiouny HS, Glagov S. Hypercholesterolemia superimposed by experimental hypertension induces differential distribution of collagen and elastin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2566-72

Xu C, Zarins CK, Bassiouny HS, Briggs WH, Reardon C, Glagov S. Differential transmural distribution of gene expression for collagen types I and III proximal to aortic coarctation in the rabbit. *J Vasc Res.* 2000;37:170-82

Xu Q, Zhang Z, Davison F, Hu Y. Circulating progenitor cells regenerate endothelium of vein graft atherosclerosis, which is diminished in ApoE-deficient mice. *Circ Res* 2003;93(8):e76-e86.

Y

Yana I, Weiss SJ. Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases. *Mol Biol Cell*. 2000;11(7):2387-401

Yarden Y, Ullrich A. Growth factor receptor tyrosine kinase. *Annu Rev Biochem* 1988 ;57 :443-78

Ye S, Eriksson P, Hamsten A, Kurkinen M, Humphries SE, Henney AM. Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. *J Biol Chem* 1996; 271:13055-13060.

Ylöstalo J, Bazhanov N, Prockop DJ. Reversible commitment to differentiation by human multipotent stromal cells in single-cell-derived colonies. *Exp Hematol*. 2008;36(10):1390-402

Yokote K, Take A, Nakaseko C et al. Bone marrow-derived vascular cells in response to injury. *J Atheroscler Thromb* 2003;10(4):205-10.

Yokoya K, Takatsu H, Suzuki T, Hosokawa H, Ojio S, Matsubara T, Tanaka T, Watanabe S, Morita N, Nishigaki K, Takemura G, Noda T, Minatoguchi S, Fujiwara H. Process of progression of coronary artery lesions from mild or moderate stenosis to moderate or severe stenosis: A study based on four serial coronary arteriograms per year. *Circulation*. 1999;100(9):903-9

Yue WM, Liu W, Bi YW, He XP, Sun WY, Pang XY, Gu XH, Wang XP. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, reduce neointimal formation, and enhance endothelial function in a rat vein grafting model. *Stem Cells Dev.* 2008;17(4):785-93

Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* 2000;342(3):145-53

Z

Zarins CK, Weisenberg E, Kolettis G, Stankunavicius R, Glagov S. Differential enlargement of artery segments in response to enlarging atherosclerotic plaques. *J Vasc Surg.* 1988;7:386-94

Zarins CK, Xu CP, Glagov S. Aneurysm and occlusive atherosclerosis of the human abdominal aorta. *J Vasc Surg* 1993 ;18 :526

Zernecke A, Schober A, Bot I et al. SDF-1alpha/CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. *Circ Res* 2005;96:784-91.

Zerwes HG, Risau W. Polarized secretion of a platelet-derived growth factor-like chemotactic factor by endothelial cells in vitro. *J Cell Biol* 1987 ;105 :2037-41

Zhang F, Tsai S, Kato K et al. Transforming growth factor-beta promotes recruitment of bone marrow cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells through stimulation of MCP-1 production in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2009;284(26):17564-74.

Zhao S, Wehner R, Bornhäuser M, Wassmuth R, Bachmann M, Schmitz M. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells and their therapeutic consequences for immune-mediated disorders. *Stem Cells Dev.* 2010;19(5):607-14

Zhong Z, Wen Z, Darnell JE. Stat3 : A stat family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin. *Science* 1994 ;264 :95-98

Zhuang YG, Singh TM, Zarins CK, Masuda H. Sequential increases and decreases in blood flow stimulates progressive intimal thickening. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1998 ;16 :301

Zoll J, Fontaine V, Gourdy P, Barateau V, Vilar J, Leroyer A, Lopes-Kam I, Mallat Z, Arnal F, Henry P, Tobelem G, Teder P. Role of human smooth muscle cell progenitors in

atherosclerotic plaque development and composition. *Cardiovasc Res*. October 31, 2007.

DOI: 10.1093/cvr/cvm034. Available at: <http://www.cardiovascres.oxfordjournals.org>.

ANNEXE 1

Molecular Cardiology

Matrix Metalloproteinase-14 Deficiency in Bone Marrow-Derived Cells Promotes Collagen Accumulation in Mouse Atherosclerotic Plaques

Fabrice Schneider, MD; Galina K. Sukhova, PhD; Masanori Aikawa, MD, PhD; James Canner, MA; Norbert Gerdes, PhD; Sai-Man Timothy Tang, BSc; Guo-Ping Shi, DSc; Suneel S. Apte, MBBS, DPhil; Peter Libby, MD

Background—Interstitial collagen plays a crucial structural role in arteries. Although in vitro results suggest collagenase activity for membrane-bound matrix metalloproteinase type 1 (MMP-14), in vivo evidence for such a function in atherosclerosis remains scant.

Methods and Results—Because *Mmp14*^{-/-} mice die by 3 weeks of age, this study used lethally irradiated low-density lipoprotein receptor-deficient mice reconstituted with syngeneic bone marrow cells of *Mmp14*^{-/-} or *Mmp14*^{+/+} mice. In both groups, histological analyses of the aortic root revealed similar plaque size and macrophage and smooth muscle cell content after 8 or 16 weeks of atherogenic diet. By 16 weeks, however, the plaques of low-density lipoprotein receptor-deficient mice engrafted with *Mmp14*^{-/-} bone marrow (n=12) contained significantly more interstitial collagen than those receiving *Mmp14*^{+/+} bone marrow (n=14; *P*<0.05). In vitro, bone marrow-derived macrophages from *Mmp14*^{-/-} mice had significantly less interstitial collagenase activity than those from *Mmp14*^{+/+} mice both basally (*P*<0.01) and on tumor necrosis factor- α stimulation (*P*<0.05). Western blot analysis and gelatin zymography of aortic extracts revealed that MMP-14 deficiency yielded decreased activation of pro-MMP-13 but not of pro-MMP-2 or pro-MMP-8.

Conclusion—MMP-14 from bone marrow-derived cells can influence the collagen content of mouse atheroma, a critical component of plaque stability. (*Circulation*. 2008;117:931-939.)

Key Words: atherosclerosis ■ collagen ■ metalloproteinases ■ pathology ■ plaque

Rupture of atherosclerotic plaques in coronary arteries causes most fatal acute myocardial infarctions.^{1,2} Such plaques characteristically have a thin fibrous cap, a large lipid-rich core, and abundant macrophages. Because interstitial collagen confers tensile strength on the fibrous cap, collagenolysis in the fibrous cap likely participates critically in plaque disruption.^{3,4} Matrix metalloproteinases (MMPs) can degrade all components of arterial extracellular matrix, and considerable evidence supports their involvement in plaque remodeling. Three members of the MMP family denoted interstitial collagenases (MMP-1, MMP-8, and MMP-13) can cleave triple-helical fibrillar collagen at the neutral pH of the extracellular milieu.^{5,6} In addition to these secreted, soluble enzymes, the membrane-anchored or membrane type 1 MMP, MMP-14, also can exhibit collagenase activity.⁷⁻⁹ Human and animal studies have localized these collagenases in atherosclerotic plaques.¹⁰⁻¹⁴ Mice genetically

altered to express collagenase-resistant collagen (*Col^{RR}*) have increased collagen content in atheromata in vivo.¹⁵ Mice lacking MMP-13 accumulate more collagen with a more organized supramolecular structure in plaque than those wild type for this key interstitial collagenase.¹⁶ MMP-14 localizes in human plaque¹⁷ and on peripheral blood monocytes during myocardial infarction.¹⁸ Experimental studies showed enhanced expression of MMP-14 during arterial remodeling after balloon injury¹⁹ and in the myocardium after ischemia/reperfusion.²⁰ However, the contribution of MMP-14 to collagen metabolism during atherosclerosis in mice remains unexplored. Mice genetically deficient in MMP-14 (*Mmp14*^{-/-}) typically die 3 weeks after birth of unknown causes. Before death, these mice show significant growth impairment and wasting.^{21,22} These findings hamper the analysis of atherogenesis in compound mutant mice for *Mmp14*^{-/-} and low-density lipoprotein receptor-deficient

Received April 29, 2007; accepted November 27, 2007.

From the Donald W. Reynolds Cardiovascular Clinical Research Center and Fondation Leducq Transatlantic Network on Atherothrombosis (F.S., G.K.S., M.A., J.C., N.G., S.-M.T.T., G.-P.S., P.L.), Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Mass; Service de Chirurgie Vasculaire (F.S.), Hôpital Henri Mondor, Créteil, France; Department of Biomedical Engineering (S.S.A.), Lerner Research Institute Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio; and Center for Molecular Medicine (N.G.), Karolinska Institute, Stockholm, Sweden.

Guest Editor for this article was Donald D. Heistad, MD.

Correspondence to Peter Libby, MD, Brigham and Women's Hospital, 77 Ave Louis Pasteur, NRB 741, Boston, MA 02115. E-mail plibby@rics.bwh.harvard.edu

© 2008 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at <http://circ.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.707448

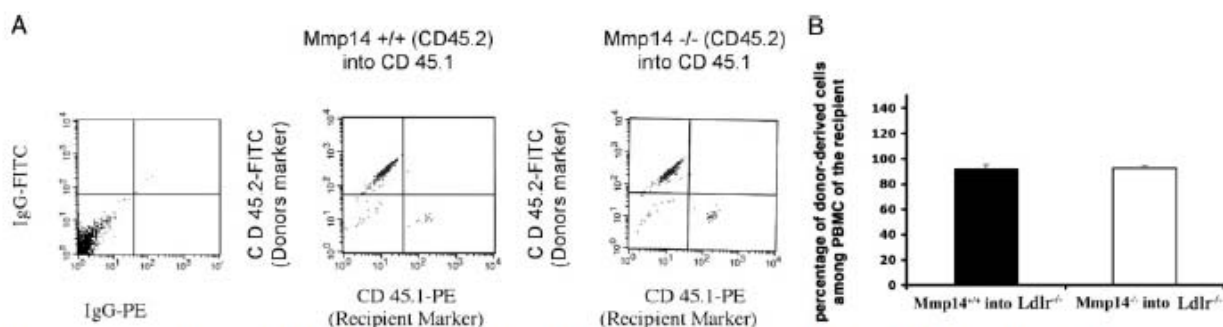


Figure 1. Successful reconstitution of bone marrow–derived cells after γ -irradiation in CD45.1-positive recipient mice. Bone marrow–derived cells from 2- to 3-week-old *Mmp14*^{+/+} or *Mmp14*^{-/-} (CD45.2-positive/CD45.1-negative) mice were transplanted into CD45.1-positive/CD45.2-negative mice. Blood was harvested after 5 weeks. **A**, Representative plots of peripheral blood cells stained with anti-CD45.1-PE and anti-CD45.2-FITC, analyzed by FACS. **B**, Quantitative analysis of percentage of donor-derived cells among recipient peripheral blood monocyte cells ($n=3$ for both groups).

mice (*Mmp14*^{-/-}/*Ldlr*^{-/-}). The present study circumvented this constraint by using bone marrow from *Mmp14*^{-/-} mice to examine the role of MMP-14 expressed by bone marrow–derived cells in atheroma formation. Macrophages, which arise from bone marrow, appear to express the bulk of MMP-14 in atheroma.²³ This approach permitted us to test the hypothesis that MMP-14 derived from bone marrow participates in collagen catabolism in plaques using lethally irradiated *Ldlr*^{-/-} mice reconstituted with bone marrow from *Mmp14*^{-/-} mice.

Editorial p 863
Clinical Perspective p 939

Methods

Animal Preparation

All experiments conformed to a protocol approved by the Standing Committee on Animals of Harvard Medical School. *Mmp14*^{+/+} mice²⁴ backcrossed 7 generations into congenic C57BL/6 mice were crossed to generate *Mmp14*^{-/-} mice and *Mmp14*^{+/+} littermates. *Ldlr*^{-/-} C57BL/6 mice 6 to 10 weeks of age (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Me) were lethally irradiated (2 times at 700 rad 3 hours apart) and received bone marrow (5×10^6 cells per mouse IV) derived from *Mmp14*^{-/-} ($n=29$) and *Mmp14*^{+/+} ($n=31$) donor mice 2 to 3 weeks of age. After bone marrow reconstitution (5 weeks), mice consumed a high-cholesterol diet (Research Diets, New Brunswick, NJ; 1.25% cholesterol, 0% cholate) for 16 weeks ($n=26$) or 8 weeks ($n=34$). Mouse plasma was collected for cholesterol measurements at day 0, after bone marrow reconstitution, and at the time of death.¹² For the in vitro study, we used *Mmp13*^{-/-} mice with congenic C57BL/6 background.¹⁶ In separate experiments, we verified the effect of MMP-14 deficiency on reconstitution of bone marrow–derived cells by transplanting bone marrow–derived cells from *Mmp14*^{+/+} or *Mmp14*^{-/-} mice (both CD45.2) into *Ldlr*^{-/-} mice (CD45.1; $n=3$ each group).²⁵ The reconstitution of peripheral blood monocytes was >92% in both groups (Figure 1).

Fluorescence-Activated Cell Sorter Analysis

We performed fluorescence-activated cell sorter analysis (FACS) as previously described.²⁵ Briefly, 20 μ L diluted mouse blood (1:1 in FACS buffer [2% BSA, 0.1% sodium azide in PBS]) and 1 μ L Fc block (eBioscience, San Diego, Calif) were incubated at room temperature (15 minutes) before fluorescently labeled antibodies were added (15 minutes). After incubation with FACS lysis buffer, the cells were washed twice with FACS buffer and analyzed by FACS. CD45.2-FITC and CD45.1-PE antibodies and corresponding isotype controls were purchased from eBioscience.

Tissue Preparation and Histological Assays

The aortic roots were prepared as described previously.^{26,27} Briefly, mice were perfused at physiological pressure with normal saline via the left ventricle, and the hearts and aortas were removed en bloc. The aortic root was embedded in optical cutting temperature compound (Sakura, Torrance, Calif). To evaluate intimal lesion size, frozen sections of aortic root were incubated with oil red O (0.5% in glycerol). Immunohistochemical studies used rat anti-mouse monoclonal antibody to Mac3, a macrophage marker (1:1000, BD PharMingen, San Diego, Calif), and smooth muscle cell (SMC) α -actin staining with primary antibody FITC-conjugated α -actin mouse monoclonal (1:500, Sigma, St Louis, Mo), followed by anti-FITC biotin–conjugated secondary antibody (1:400, Sigma) and a rabbit anti-MMP-14 polyclonal antibody (1:500, Chemicon, Temecula, Calif). We analyzed fibrillar collagen content using picrosirius red staining of sections, which were viewed under polarized light. Quantitative analyses used Image-Pro Plus Software (Media Cybernetics, Bethesda, Md). Two blinded observers recorded the percentage of the total area with positive color for each section.

Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction

Total RNA was extracted from whole mouse aortas (pooled, $n=3$ per group) and reverse transcribed. Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used SYBR Green PCR Master Mix and MyiQ Single Color Detection System (BioRad, Hercules, Calif). Oligonucleotide primers used to recognize mouse mRNAs included the following: MMP-2, 5'-GCA-CCC-TTG-AAG-AAG-TAG-CTA-TG-3' and 5'-GCA-GGA-GAC-AAG-TTC-TGG-AGATA-3'; MMP-8, 5'-CAA-CCT-ATT-TCT-CGT-GGC-TG-3' and 5'-TGC-AGG-TCA-TAG-CCA-CTT-AG-3'; MMP-9, 5'-AAC-ACA-CAG-GGT-TTG-CCT-TC-3' and 5'-CGT-CGT-GAT-CCC-CAC-TTA-CT-3'; MMP-12, 5'-TTT-CTT-CCA-TAT-GGC-CAA-GC-3' and 5'-GGT-CAA-AGA-CAG-CTG-CAT-CA-3'; MMP-13, 5'-TCC-CCT-GAT-GCC-ATT-ACC-AGT-C-3' and 5'-AAA-AAG-AGC-TCA-GCC-TCA-ACC-TG-3'; MMP-14, 5'-AGG-GTT-CCT-GGC-TCA-TGC-3' and 5'-ACA-GCG-GCC-GCA-CTC-ACA-3'; cathepsin K, 5'-CCA-GTG-GGA-GCT-ATG-GAA-GA-3' and 5'-AAG-TGG-TTC-ATG-GCC-AGT-TC-3'; α 1 procollagen I, 5'-TCT-TTC-TCC-TCT-CTG-ACC-G-3' and 5'-AAG-GTG-CTG-ATG-GTT-CTC-C-3'; and GAPDH, 5'-TGG-GTG-TGA-ACC-ATG-AGA-AG-3' and 5'-GCT-AAG-CAG-TTG-GTG-GTG-C-3'.

Western Blotting and Gelatin Zymography

Whole aortas from *Mmp14*^{-/-} \rightarrow *Ldlr*^{-/-} and *Mmp14*^{+/+} \rightarrow *Ldlr*^{-/-} ($n=3$ each group) were harvested and snap-frozen in liquid nitrogen. After pulverization, samples were homogenized into radioimmunoprecipitation assay buffer (Boston Bioproducts, Boston, Mass) with EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche, Indianapolis, Ind) for 30 minutes at 4°C and centrifuged at 3000g for 30 minutes. For Western blotting, total protein (20 μ g per well) was separated by

standard SDS-PAGE and blotted to polyvinylidene difluoride membranes (Bio-Rad, Hercules, Calif) using a semidry blotting apparatus. Blots were blocked in 5% (wt/vol) defatted dry milk in PBS/0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) overnight and incubated with the respective primary antibody (2 hours). The secondary peroxidase-conjugated antibody (1:10 000, Jackson Immunoresearch, West Grove, Pa) was added for another hour. Finally, immunoreactive proteins were visualized with the Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences, Boston, Mass). We used rabbit polyclonal antibody against MMP-14 (1:1000, Chemicon), goat polyclonal antibodies against MMP-13 (1:2000, Chemicon) and MMP-8 (1:100, R&D Systems, Minneapolis, Minn), and a rabbit polyclonal antibody against α -tubulin (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif) as a loading control. For gelatin zymography, we used a previously described protocol.²⁸ Briefly, equal amounts of total protein were separated under nonreducing conditions by SDS-PAGE containing gelatin (1 mg/mL, BioRad). After washing with renaturation buffer (BioRad; 30 minutes), we incubated the gel in development buffer (24 hours) and then stained it with Coomassie brilliant blue 0.5% and destained in 25% methanol/10% acetic acid.

Macrophage Culture and In Vitro Collagenase Assay

Bone marrow–derived macrophages were harvested from the femurs and tibias of *Mmp13^{-/-}*, *Mmp14^{-/-}*, and wild-type mice. After incubation in red cell lysis buffer (ammonium chloride 0.155 mol/L in PBS), we centrifuged (20 minutes) the samples on Ficoll medium (LSM, ICN Biomedicals, Aurora, Ohio) and collected the monocytic cells. Macrophages were selected using medium with macrophage-colony stimulating factor (25 ng/mL, Cell Sciences, Canton, Mass) for 6 days. Determination of the collagenolytic capacity used cells maintained in serum-free medium overnight, unstimulated or stimulated with tumor necrosis factor- α (TNF- α ; 10 ng/mL) and then incubated with fluorescein-labeled nondenatured collagen type-I (0.3 mg/mL, Calbiochem, La Jolla, Calif) for 48 hours in the presence or absence of 1,10-phenanthroline (0.1 mmol/L, Sigma), a broad metalloenzyme inhibitor. Digested collagen fragments were measured at 485-nm excitation and 530-nm emission in a fluorescent plate reader.

Statistical Analysis

Data are presented as mean \pm SD. Differences between groups were determined with the Mann-Whitney *U* test. Values of *P* < 0.05 were considered significant.

The authors had full access to and take full responsibility for the integrity of the data. All authors have read and agree to the manuscript as written.

Results

Characteristics of Mice

Body weight and plasma cholesterol did not differ between groups (*Mmp14^{+/+}→Ldlr^{-/-}* and *Mmp14^{-/-}→Ldlr^{-/-}*) consuming an atherogenic diet for 8 or 16 weeks. Total serum cholesterol level increased with the duration of the atherogenic diet and did not differ between groups (Table).

Compound Mutant *Ldlr^{-/-}* Mice With *Mmp14^{-/-}* Bone Marrow–Derived Cells Expressed Less MMP-14 Than Those Receiving *Mmp14^{+/+}* Bone Marrow–Derived Cells

Our experimental approach supposes that bone marrow–derived macrophages furnish most of the MMP-14 in the plaque. In the mice constructed for this study, only the bone marrow–derived cells from *Mmp14^{-/-}* mice lack MMP-14. Many arterial SMCs and endothelial cells do not originate

Table. Characteristics of Mice Used in the Present Analysis

	<i>Mmp14^{+/+}→Ldlr^{-/-}</i>	<i>Mmp14^{-/-}→Ldlr^{-/-}</i>	<i>P</i>
n	31	29	
Body weight, g			
Day 0	22.77 \pm 2.29	23.19 \pm 1.63	NS
+4 wk	22.42 \pm 1.71	23.36 \pm 2.95	NS
+12 wk	25.08 \pm 1.81	25.85 \pm 1.53	NS
+20 wk	24.8 \pm 2.4	25.6 \pm 2.6	NS
Total cholesterol, mg/dL			
Day 0	177.12 \pm 53.85	191.18 \pm 87.07	NS
+4 wk	218.84 \pm 61.37	204.07 \pm 103.53	NS
+12 wk	535.16 \pm 148.19	611.62 \pm 194.57	NS
+20 wk	1176 \pm 526.39	1127 \pm 661.97	NS

Mice consumed a high-fat diet for 8 weeks (n=17 for each group) or 16 weeks (n=14 for *Mmp14^{+/+}→Ldlr^{-/-}*; n=12 for *Mmp14^{-/-}→Ldlr^{-/-}*). Data are presented as mean \pm SD. NS indicates not significant.

from bone marrow²⁹ but could produce MMP-14, especially in inflammatory environments such as atheromata.^{30,31} Macrophages localized in the atherosclerotic intima of *Ldlr^{-/-}* mice reconstituted from *Mmp14^{-/-}* donors did not contain MMP-14, whereas in intimal lesions of *Ldlr^{-/-}* mice receiving *Mmp14^{+/+}* bone marrow, macrophages showed strong immunostaining for MMP-14 (Figure 2A). Quantitative analysis of aortic extracts demonstrated that the aortic wall of *Ldlr^{-/-}* mice receiving *Mmp14^{-/-}* bone marrow contained significantly less MMP-14 mRNA (Figure 2B) and protein (Figure 2C) compared with mice reconstituted with *Mmp14^{+/+}* bone marrow.

MMP-14 Deficiency in Bone Marrow–Derived Cells Does Not Influence Atherosclerotic Lesion Size or Cellular Composition

Aortic root lesion size was similar in *Ldlr^{-/-}* mice receiving *Mmp14^{+/+}* bone marrow and *Ldlr^{-/-}* mice receiving *Mmp14^{-/-}* bone marrow (Figure 3A). Quantitative image analysis revealed similar intimal areas in *Ldlr^{-/-}* mice reconstituted with *Mmp14^{+/+}* or *Mmp14^{-/-}* after 8 weeks (0.13 \pm 0.08 and 0.12 \pm 0.11 mm², respectively) or 16 weeks (0.33 \pm 0.10 and 0.25 \pm 0.12 mm², respectively) on atherogenic diet (Figure 3B). These lesions contained similar macrophage and SMC content at 16 weeks (Figure 3C). Quantitative image analysis confirmed a similar percentage of positive area for SMCs (α -actin⁺) and macrophages (Mac-3⁺) in plaques of mice receiving *Mmp14^{+/+}* and *Mmp14^{-/-}* bone marrow cells at 8 and 16 weeks (2.16 \pm 2.21% versus 2.46 \pm 2.03% and 5.38 \pm 1.89% versus 4.89 \pm 2.14% at 8 and 16 weeks, respectively, for SMCs; 5.26 \pm 2.2% versus 4.08 \pm 2.13% and 7.12 \pm 3.39% versus 6.08 \pm 2.13% at 8 and 16 weeks, respectively, for macrophages) (Figure 3D). Our results agree with our previous study that found similar plaque burden and cell content in *Mmp13^{+/-}/ApoE^{-/-}* and *Mmp13^{+/+}/ApoE^{-/-}* mice.¹⁶

MMP-14 Deficiency in Bone Marrow–Derived Cells Increases Collagen Content in the Atherosclerotic Intima

Aortic atheromata of *Ldlr^{-/-}* mice receiving *Mmp14^{-/-}* bone marrow cells displayed greater accumulation of fibrillar

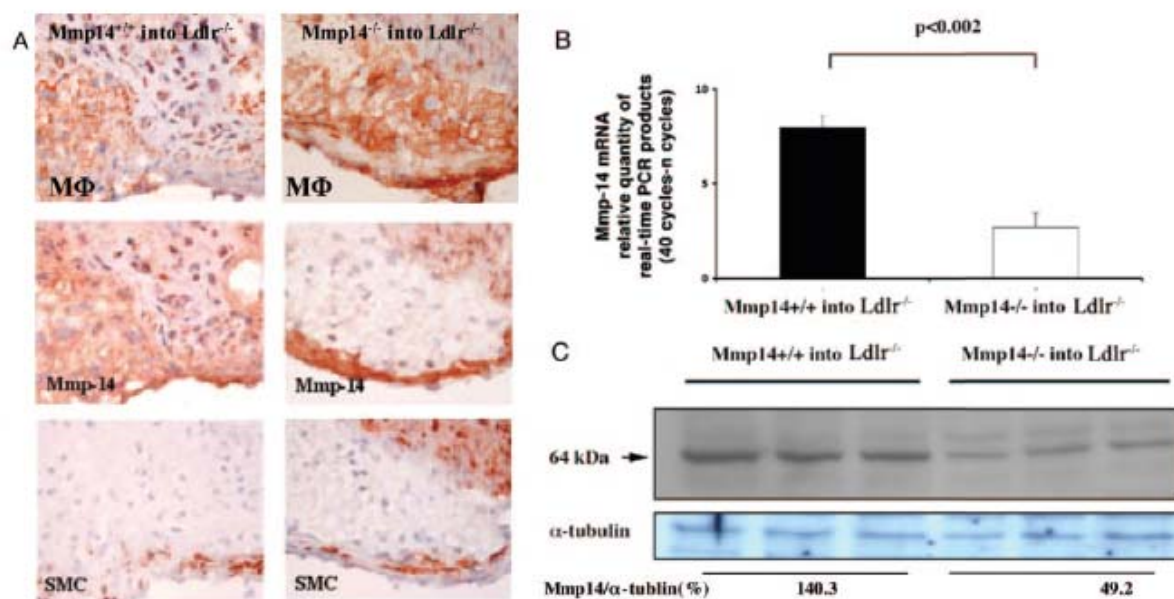


Figure 2. MMP-14 expression in the aortas of *Ldlr*^{-/-} mice receiving *Mmp14*^{+/+} or *Mmp14*^{-/-} bone marrow cells. **A**, Immunoreactive MMP-14 colocalizes mainly with macrophages (MΦ) in the intima of *Ldlr*^{-/-} mice transplanted with *Mmp14*^{+/+} bone marrow and fed an atherogenic diet for 16 weeks (left). Most macrophages in the aortic intima of *Ldlr*^{-/-} mice receiving *Mmp14*^{-/-} bone marrow lack detectable MMP-14 for the duration of atherogenic diet consumption (right). SMCs stained positively for MMP-14 in both groups. These micrographs are representative of 3 mice analyzed from each group. High power = ×40. **B**, Aortas (n=3, pooled) from *Ldlr*^{-/-} mice receiving *Mmp14*^{-/-} bone marrow contained significantly less MMP-14 mRNA, measured by real-time RT-PCR, compared with *Ldlr*^{-/-} mice receiving *Mmp14*^{+/+} bone marrow. Bars represent mean ± SD. **C**, Transplantation of *Mmp14*^{-/-} bone marrow cells into *Ldlr*^{-/-} mice reduced the level of MMP-14 protein (64 kDa) detected by Western blot analysis. The same amount of total protein was loaded as shown by immunoreactive band to α-tubulin. Data represent results obtained from 3 mice from each group. Quantitative analysis revealed that transfer of *Mmp14*^{-/-} bone marrow reduced the ratio of plaque MMP-14 and α-tubulin (mean percent) in plaques.

collagen, as shown by picrosirius red staining under polarized light (Figure 4A). Quantitative analysis showed that MMP-14 deficiency in bone marrow–derived cells increases collagen content expressed as the percentage of intimal area (Figure 4B). As observed in infarcted hearts of MMP-9–deficient mice,³² targeted deletion of a single MMP may cause “compensatory” changes in expression of other MMPs or other enzymes involved in collagen turnover. After 16 weeks of atherogenic diet, RT-PCR analysis of mRNA expression in aortic extracts detected similar levels of all tested MMPs (MMP-2, -8, -9, -12, and -13) and a cysteine proteinase, cathepsin K, also implicated in arterial wall remodeling.³³ Nor did MMP-14 deficiency affect interstitial collagen gene expression because aortas of both experimental groups had similar procollagen Iα-mRNA levels (Figure 5).

MMP-14 Deficiency Decreases Collagenase Activity of Bone Marrow–Derived Macrophages

Because macrophages furnish most MMPs in atheromata, further experiments compared the collagenase activity of bone marrow–derived macrophages from *Mmp13*^{-/-}, *Mmp14*^{-/-}, and wild-type mice using a fluorescein-labeled collagen type I as substrate to monitor collagen degradation (Figure 6). Bone marrow–derived macrophages from *Mmp14*^{-/-} mice had significantly lower collagenolytic activity than those from wild-type or *Mmp13*^{-/-} mice. Although treatment with the proinflammatory cytokine TNF-α in-

creased collagenolysis by macrophages, collagen-degrading activity remained higher in macrophages from wild-type mice compared with *Mmp14*^{-/-} and *Mmp13*^{-/-} mice. After addition of 1,10-phenanthroline, a nonselective metalloenzyme inhibitor, degradation of collagen in the 3 different conditions decreased almost to the level obtained without stimulation, suggesting that MMPs account for most of the TNF-α–induced collagenolytic activity.

MMP-14 Deficiency Alters Activation of MMP-13 but Not of MMP-2 or MMP-8

We previously demonstrated a key role of MMP-13 in the regulation of plaque collagen content.¹⁶ Western blot analysis revealed that the level of latent MMP-13 (~57 kDa) increased in aortic extracts of mice receiving *Mmp14*^{-/-} bone marrow cells, whereas levels of active MMP-13 (~45 kDa) decreased considerably. The level of a truncated form of MMP-13 (~20 kDa) was similar in both groups (Figure 7A). Gelatin zymography demonstrated similar levels of latent and active MMP-2 in both groups (pro-Mmp2, ~72 kDa; active Mmp2, ~60 kDa) (Figure 7B), indicating that MMP-14 influences MMP-13 activation either directly or indirectly during atherogenesis. In the atherosclerotic aorta, however, MMP-14 does not appear critical to MMP-2 activation under these conditions. Western blot analysis revealed similar levels of active MMP-8 between the groups (Figure 7C).

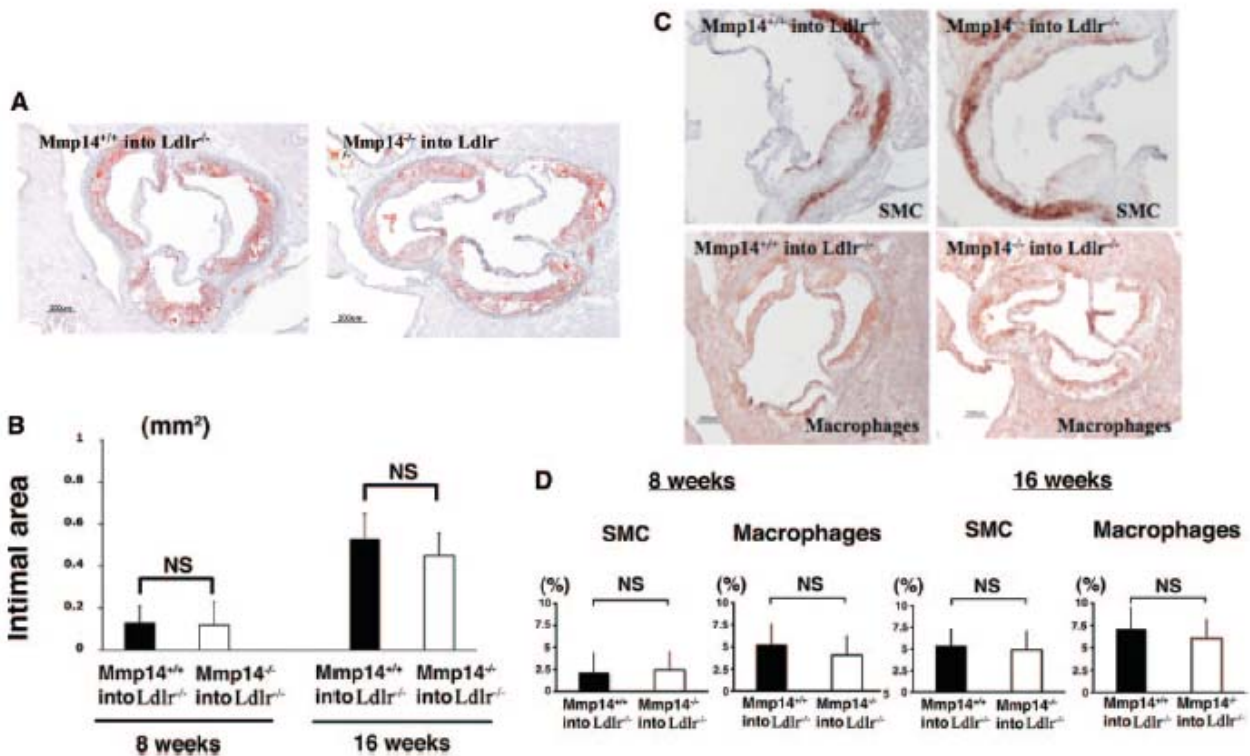


Figure 3. The size and macrophage and SMC accumulation in the intima of the aortic root in *Ldlr*^{-/-} mice receiving *Mmp14*^{+/+} or *Mmp14*^{-/-} bone marrow. A, Oil Red O staining shows similar plaque size in the intima in both groups after 16 weeks of atherogenic diet. Scale bar=200 μmol/L. B, Quantitative analysis of the intimal area showed no difference between *Ldlr*^{-/-} mice receiving *Mmp14*^{+/+} or *Mmp14*^{-/-} bone marrow and fed an atherogenic diet for 8 weeks or 16 weeks. Bars represent mean±SD. C, Immunohistochemical analysis of macrophages (Mac-3) or SMCs (α-actin) shows similar accumulation of positive cells in the intima of control and experimental group mice after 8 and 16 weeks of atherogenic diet. D, Quantitative analysis of the Mac-3 and α-actin immunopositive areas in the intima of *Ldlr*^{-/-} mice receiving *Mmp14*^{+/+} or *Mmp14*^{-/-} bone marrow. Results express the percentage of positive area for macrophage and SMC staining according to the total area of intima. Bars represent mean±SD. Scale bar=200 μmol/L.

Discussion

This study demonstrates that MMP-14 influences the collagen level in mouse atherosclerotic plaque. Moreover, MMP-14-mediated interstitial collagenase activity in plaque depends substantially on bone marrow-derived cells. Indeed, bone marrow-derived inflammatory cells provide most of the MMP-14 within the arterial wall under atherogenic conditions.^{30,34} Vascular SMCs also express considerable MMP-14 during mouse development.^{35,36} However, the role of *Mmp14* in these cells will have to await the development of conditionally inactivated *Mmp14* mice, which are presently unavailable. In the meantime, successful transplantation of bone marrow—a critical step in this study—enabled analysis of the role of bone marrow-derived cells in experimental atherogenesis. An earlier study showed that MMP-9 participates importantly in the recruitment and maturation of bone marrow stem cells.³⁷ The bone marrow reconstitution experiments reported here indicate that trafficking of bone marrow cells to the atherosclerotic plaque does not require MMP-14 expression.

Deficiency of MMP-14 in macrophages does not affect the size or cellular content of plaques. Earlier work in *Mmp14*^{-/-} mice indicated that MMP-14 acts as a collagenase during osteogenesis, soft tissue remodeling,^{21,38} and degradation of the basement membrane to initiate neoangiogenesis.²² Fur-

thermore, MMP-14 has collagenolytic activity in vitro.^{30,40} The present study establishes in vivo that MMP-14 influences collagen content of atherosclerotic plaques. A previous study compared the atherosclerotic lesion in the aorta between *Ldlr*^{-/-} mice and littermate *Ldlr*^{-/-} mice receiving total irradiation and bone marrow reconstitution.⁴¹ The collagen layer was significantly thicker in untreated *Ldlr*^{-/-} mice than in *Ldlr*^{-/-} mice receiving total irradiation and bone marrow reconstitution, suggesting that bone marrow reconstitution may have influenced SMC involvement in plaque fibrosis.

Interpretation of the present data requires careful consideration of several potential confounders. Indeed, unexpected decreases in myocardial collagen after myocardial infarction in *Mmp9*^{-/-} mice likely resulted from a compensatory increase in MMP-13 in infarcted tissue.³² Therefore, we measured the RNA level of the other interstitial collagenases MMP-8 and MMP-13 and the potentially collagenolytic cysteine proteinase cathepsin K. MMP-14 deficiency affected neither the level of the other enzymes tested nor the level of procollagen-I mRNA. Thus, collagen accumulation in the atherosclerotic plaques of mice receiving *Mmp14*^{-/-} bone marrow-derived cells did not appear to result from compensatory changes in other collagenases or in interstitial collagen gene expression. In vitro study of bone marrow-derived macrophages documented decreased collagen breakdown by

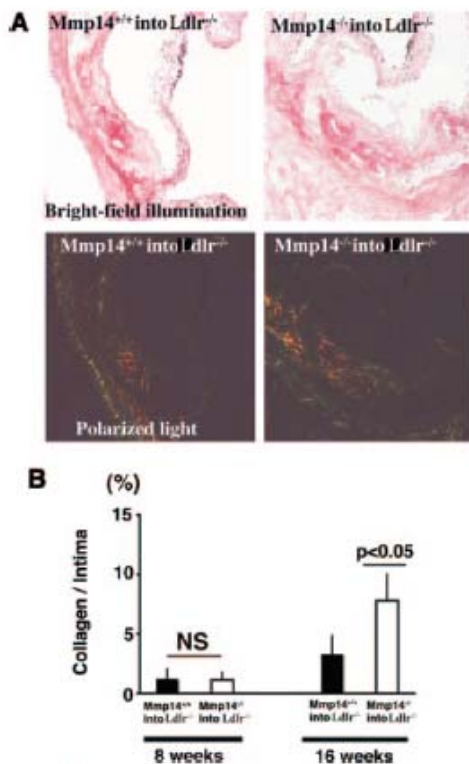


Figure 4. Collagen accumulation in the aortic intima of *Ldlr*^{-/-} mice receiving *Mmp14*^{+/+} or *Mmp14*^{-/-} bone marrow cells. A, Picrosirius red staining viewed under bright light (top). Picrosirius red staining viewed under polarized light in the same sections shows fibrillar collagen (bottom). After 16 weeks of atherogenic diet, the intima of *Ldlr*^{-/-} mice receiving *Mmp14*^{-/-} bone marrow cells (right) contained more interstitial collagen than mice receiving *Mmp14*^{+/+} bone marrow cells (left). B, Quantitative analysis of picrosirius red birefringence in the intima shows similar amounts of collagen in *Ldlr*^{-/-} mice receiving *Mmp14*^{+/+} or *Mmp14*^{-/-} bone marrow at 8 weeks of atherogenic diet. At 16 weeks, the aortic intima of *Ldlr*^{-/-} mice receiving *Mmp14*^{-/-} bone marrow cells contained more collagen than mice receiving *Mmp14*^{+/+} bone marrow cells. Bars represent mean±SD.

Mmp14^{-/-} cells compared with wild-type and *Mmp13*^{-/-} cells under unstimulated conditions or after TNF-α stimulation (Figure 6).

As previously shown, membrane type 1 MMP (MMP-14) participates in the activation of the latent forms of MMP-2 (progelatinase A) and MMP-13.⁴²⁻⁴⁴ To test whether MMP-14 acts in the plaque directly as a collagenase or also acts by processing pro-MMP-13 and/or MMP-2, we examined the activation of MMP-13 and MMP-2 in the atherosclerotic aortas of mice reconstituted with MMP-14-deficient or wild-type bone marrow. Interestingly, deficiency of MMP-14 decreased the levels of activated MMP-13 but did not affect MMP-2 activation in atherosclerotic lesions, suggesting a dual role of MMP-14 in collagenolysis and plaque stabilization. Notably, MMP-14 deficiency did not affect MMP mRNA levels, including MMP-13, as demonstrated by real-time RT-PCR. Although MMP-14 deletion decreased accumulation of a cleaved form of MMP-13 in mouse atheromata, lack of MMP-14 did not affect MMP-8 activation. This result indicates that the situation in atheromata in vivo may differ

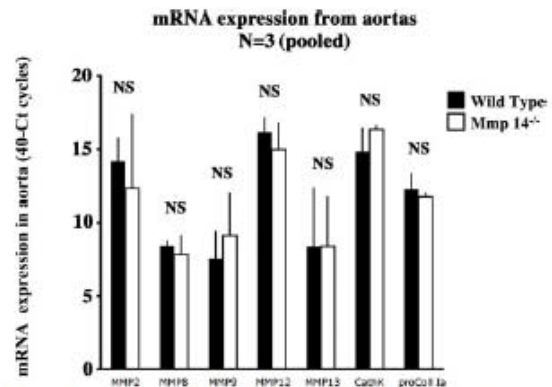


Figure 5. Real-time RT-PCR for mRNAs that encode molecules related to matrix remodeling and/or MMP-14 function. Aortas from *Ldlr*^{-/-} mice receiving *Mmp14*^{+/+} and *Mmp14*^{-/-} bone marrow cells (n=3, pooled) and fed an atherogenic diet for 16 weeks contained similar mRNA levels of MMP-2/gelatinase-A, MMP-8/collagenase-2, MMP-9/gelatinase-B, MMP-12, MMP-13/collagenase-3, cathepsin K (CathK), and α1 chain of type I procollagen (pro Coll). Bars indicate mean±SD; NS, not significant.

from results of an in vitro study on human tear fluid MMP-8 during wound healing after acute eye injury⁴⁵ that suggested MMP-14-dependent activation of MMP-8. Because our previous analysis indicated a role for *Mmp13* activity in the atherosclerotic plaque, the present findings suggest that MMP-13 activation may mediate, at least in part, the effect of MMP-14 on collagen metabolism during atherogenesis. Unlike humans, mice lack MMP-1; hence, MMP-13 appears to

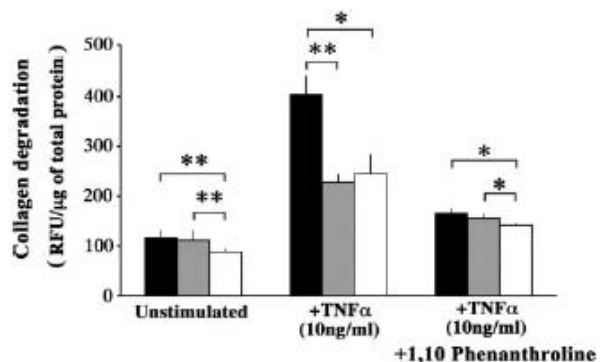


Figure 6. Collagen degradation by bone marrow-derived macrophages in vitro. Interstitial collagenolytic activity was determined after 48 hours of incubation of bone marrow-derived macrophages from wild-type (black bar), *Mmp13*^{-/-} (gray bar), and *Mmp14*^{-/-} mice (white bar) by release of soluble fluorescent material from FITC-labeled native collagen type I. Under unstimulated conditions, bone marrow-derived macrophages from *Mmp14*^{-/-} mice showed less collagen breakdown compared with bone marrow-derived macrophages from *Mmp13*^{-/-} and wild-type mice. After stimulation with TNF-α, collagenolysis by bone marrow-derived macrophages from wild-type mice exceeded that of cells from *Mmp13*^{-/-} or *Mmp14*^{-/-} mice. Addition of a metalloenzyme inhibitor (1,10-phenanthroline) decreased the collagenase activity of both groups. However, the collagenase activity of bone marrow-derived macrophages from *Mmp14*^{-/-} mice remained lower than enzymatic activity of cells from wild-type and *Mmp13*^{-/-} mice. Data are presented as mean±SD (n=3). Comparison of the respective study groups used the Mann-Whitney test; *P<0.05, **P<0.01. RFU indicates relative fluorescent units.

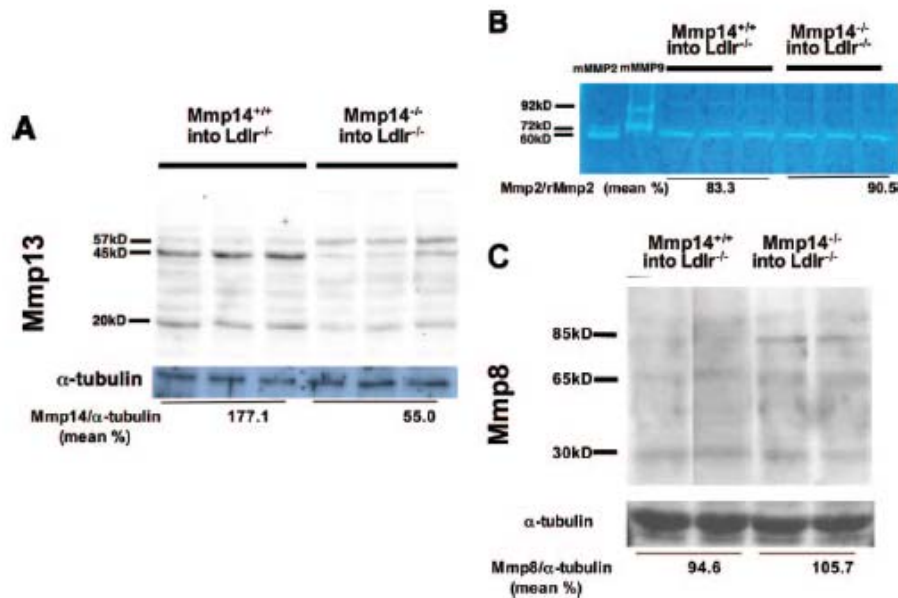


Figure 7. MMP-2, MMP-13, and MMP-8 activation in aortic protein extracts from *Ldlr*^{-/-} mice receiving *Mmp14*^{+/+} and *Mmp14*^{-/-} bone marrow cells. **A**, Western blot analysis detected less of the presumed active form (45 kDa) and higher levels of the proform (57 kDa) of MMP-13 in mice receiving *Mmp14*^{-/-} bone marrow cells compared with mice receiving *Mmp14*^{+/+} bone marrow cells. The level of a truncated form of 20 kDa was similar between both groups. Equal protein loading was affirmed by assessing α -tubulin. Quantitative analysis revealed that transfer of *Mmp14*^{-/-} bone marrow reduced the ratio of active MMP-13 and α -tubulin (mean percent) in plaques. **B**, Gelatin zymography detected similar levels of the active form of MMP-2 in mice receiving *Mmp14*^{+/+} or *Mmp14*^{-/-} bone marrow cells. The bands were identified by comparison with bands from digested recombinant mouse MMP-2 and MMP-9. Quantitative analysis indicated that the ratios of active MMP-2 and recombinant MMP-2 were similar in the 2 groups (mean percent). **C**, Western blot analysis detected no difference in level of the presumed active form (65 kDa) and higher levels of the proform (85 kDa) of MMP-8 in mice receiving *Mmp14*^{-/-} bone marrow cells compared with mice receiving *Mmp14*^{+/+} bone marrow cells. The level of a truncated form of 30 kDa was similar between groups. Equal protein loading was affirmed by assessing α -tubulin. Quantitative analysis showed that the ratios of active MMP-8 and α -tubulin were similar in the 2 groups (mean percent).

subserve in mice the functions of MMP-1 in humans. These considerations illustrate that the pathophysiological principles demonstrated here may not apply directly to humans. Although several tissue and cell types require MMP-14 for activation of pro-MMP-2, our present data suggest that alternate mechanisms operate in atheromata.^{21,24} In addition, a recent study described how MMP-14 had developmental effects that did not depend on its role in pro-MMP-2 activation during lung and submandibular gland maturation.⁴⁶ Taken together, these data suggest that effects of macrophage-derived MMP-14 other than pro-MMP-2 activation dominate in atherosclerosis. Because furin activates MMP-14 intracellularly in the trans-Golgi, MMP-14 can exert its proteolytic activity in the pericellular space as soon as it anchors in the cell membrane.⁴⁷ A recent study showed that the furin-like proconvertase PC5 also can activate MMP-14 in vascular SMCs.⁴⁸

Human coronary artery plaques that have caused fatal thrombosis typically have a thin fibrous cap, reduced levels of intact interstitial collagen, and abundant levels of MMP-13¹² and MMP-14¹⁷ and display biochemical signatures of collagenolysis in situ. The present study found that MMP-14 deficiency in bone marrow-derived cells (primarily macrophages) does not influence atherosclerotic lesion size or cellular composition but does, with time, substantially increase lesional content of fibrillar collagen. These results agree with our previous findings that collagenase resistance or MMP-13 deficiency promoted colla-

gen accumulation, a key molecular determinant of plaque stability, but not atheroma burden.^{15,16}

The present study used cholesterol-fed *Ldlr*^{-/-} mice, an established mouse model of hypercholesterolemia, to induce accumulation of plaque macrophages, a major source of MMPs. Macrophage infiltration in hypercholesterolemia promotes MMP production in arteries.¹⁻⁴ Indeed, we reported early on that oxidatively modified low-density lipoprotein could promote MMP-14 expression in vascular cells in culture.³⁰ Our own work and studies of others have demonstrated that lipid lowering reduces MMP expression and yields collagen accumulation in atheromata.³

Taken together with studies using *Mmp13*^{-/-} and *Col*^{RR} mice,^{15,16} the present work further supports the involvement of collagenases from the MMP family in arterial collagen remodeling and illustrates a novel aspect of collagen metabolism in atherosclerosis. These results shed new mechanistic light on the molecular and cellular mechanisms that promote collagen degradation and thus may influence the biomechanical properties of plaques. The role of bone marrow-derived cells, principally macrophages, in regulating collagen accumulation demonstrated here underscores the role of inflammation in clinically critical aspects of plaque biology.

Acknowledgments

We thank Eugenia Shvartz for technical assistance and Joan Perry for editorial assistance. Dr Andreas Zirlik assisted with the *Ldlr*^{-/-} (CD45.1-positive) mouse strain husbandry.

Sources of Funding

This work was supported by a grant from the National Heart, Lung, and Blood Institute (HL-080472), a Transatlantic Network of Excellence in Atherothrombosis grant from the Fondation Leducq (Dr Libby), and a Harold M. English grant from Harvard Medical International (Dr Schneider). Dr Gerdes received a PhD scholarship from the Schering Foundation.

Disclosures

None.

References

- Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation*. 1995;92:657–671.
- Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*. 2005;111:3481–3488.
- Aikawa M, Libby P. The vulnerable atherosclerotic plaque: pathogenesis and therapeutic approach. *Cardiovasc Pathol*. 2004;13:125–138.
- Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 1995;91:2844–2850.
- Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003;92:827–839.
- Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999;274:21491–21494.
- Knäuper V, Will H, Lopez-Otin C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H, Hembry RM, Murphy G. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP13) activation. *J Biol Chem*. 1996;271:17124–17131.
- Sato H, Takino T, Okada Y, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature*. 1994;370:61–65.
- Strongin AY, Marmor BL, Grant GA, Goldberg GL. Plasma membrane-dependent activation of the 72-kDa type IV collagenase is prevented by complex formation with TIMP2. *J Biol Chem*. 1993;268:14033–14039.
- Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 1994;94:2493–2503.
- Nikkari ST, O'Brien KD, Ferguson M, Matsukami T, Welgus HG, Alpers CE, Clowes AW. Interstitial collagenase (MMP-1) expression in human carotid atherosclerosis. *Circulation*. 1995;92:1393–1398.
- Aikawa M, Rabkin E, Voglic SJ, Shing H, Nagai R, Schoen FJ, Libby P. Lipid lowering promotes accumulation of mature smooth muscle cells expressing smooth muscle myosin heavy chain isoforms in rabbit atheroma. *Circ Res*. 1998;83:1015–1026.
- Sukhova GK, Schonbeck U, Rabkin E, Schoen FJ, Poole AR, Billinghurst RC, Libby P. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 1999;99:2503–2509.
- Herman MP, Sukhova GK, Libby P, Gerdes N, Tang N, Horton DB, Kilbride M, Breitbart RE, Chun M, Schonbeck U. Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling. *Circulation*. 2001;104:1899–1904.
- Fukumoto Y, Deguchi J, Libby P, Rabkin-Aikawa E, Sakata Y, Chin MT, Hill CC, Lawler PR, Varo N, Schoen FJ, Krane SM, Aikawa M. Genetically determined resistance to collagenase action augments interstitial collagen accumulation in atherosclerotic plaques. *Circulation*. 2004;110:1953–1959.
- Deguchi J, Aikawa E, Libby P, Vachon JR, Inada M, Krane SM, Whittaker P, Aikawa M. Matrix metalloproteinase-13/collagenase-3 deletion promotes collagen accumulation and organization in mouse atherosclerotic plaques. *Circulation*. 2005;112:2708–2715.
- Rajavashisth TB, Xu XP, Jovinge S, Meisel S, Xu XO, Chai NN, Fishbein MC, Kaul S, Cercek B, Sharifi B, Shah PK. Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by proinflammatory mediators. *Circulation*. 1999;99:3103–3109.
- Schmidt R, Bultmann A, Ungerer M, Joghetaei N, Bulbul O, Thieme S, Chavakis T, Toole BP, Gawaz M, Schomig A, May AE. Extracellular matrix metalloproteinase inducer regulates matrix metalloproteinase activity in cardiovascular cells: implications in acute myocardial infarction. *Circulation*. 2006;113:834–841.
- Jenkins GM, Crow MT, Bilato C, Gluzband Y, Ryu WS, Li Z, Stetler-Stevenson W, Nater C, Froehlich JP, Lakatta EG, Cheng L. Increased expression of membrane-type matrix metalloproteinase and preferential localization of matrix metalloproteinase-2 to the neointima of balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation*. 1998;97:82–90.
- Deschamps AM, Yarbrough WM, Squires CE, Allen RA, McClister DM, Dowdy KB, McLean JE, Mingoa JT, Sample JA, Mukherjee R, Spinale FG. Trafficking of the membrane type-1 matrix metalloproteinase in ischemia and reperfusion: relation to interstitial membrane type-1 matrix metalloproteinase activity. *Circulation*. 2005;111:1166–1174.
- Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA, Mankani M, Robey PG, Poole AR, Pidoux I, Ward JM, Birkedal-Hansen H. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell*. 1999;99:81–92.
- Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR, Weiss SJ. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell*. 1998;95:365–377.
- Ray BK, Shukla A, Turk JR, Apte SS, Ray A. Induction of the MMP-14 gene in macrophages of the atherosclerotic plaque: role of SAF-1 in the induction process. *Circ Res*. 2004;95:1082–1090.
- Zhou Z, Apte SS, Soyninen R, Cao R, Baaklini GY, Rauser RW, Wang J, Cao Y, Tryggvason K. Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:4052–4057.
- Bavendieck U, Zirikli A, LaClair S, MacFarlane L, Libby P, Schonbeck U. Atherogenesis in mice does not require CD40 ligand from bone marrow-derived cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1244–1249.
- Sukhova GK, Zhang Y, Pan JH, Wada Y, Yamamoto T, Naito M, Kodama T, Tsimikas S, Witztum JL, Lu ML, Sakara Y, Chin MT, Libby P, Shi GP. Deficiency of cathepsin S reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest*. 2003;111:897–906.
- Sukhova GK, Wang B, Libby P, Pan JH, Zhang Y, Grubb A, Fang K, Chapman HA, Shi GP. Cystatin C deficiency increases elastic lamina degradation and aortic dilatation in apolipoprotein E-null mice. *Circ Res*. 2005;96:368–375.
- Shimizu K, Shichiri M, Libby P, Lee RT, Mitchell RN. Th2-predominant inflammation and blockade of IFN-gamma signaling induce aneurysms in allografted aortas. *J Clin Invest*. 2004;114:300–308.
- Hoognagle MH, Thomas JA, Wamhoff BR, Owens GK. Origin of neo intimal smooth muscle: we've come full circle. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:2579–2581.
- Rajavashisth TB, Liao JK, Galis ZS, Tripathi S, Laufs U, Tripathi J, Chai NN, Xu XP, Jovinge S, Shah PK, Libby P. Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *J Biol Chem*. 1999;274:11924–11929.
- Shofuda K, Yasumitsu H, Nishihashi A, Miki K, Miyazaki K. Expression of three membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in rat vascular smooth muscle cells and characterization of MT3-MMPs with and without transmembrane domain. *J Biol Chem*. 1997;272:9749–9754.
- Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, Rabkin E, Lindsey M, Rohde LE, Schoen FJ, Kelly RA, Werb Z, Libby P, Lee RT. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest*. 2000;106:55–62.
- Cheng XW, Kuzuya M, Sasaki T, Arakawa K, Kanda S, Sumi D, Koike T, Maeda K, Tamaya-Mori N, Shi GP, Saito N, Iguchi A. Increased expression of elastolytic cysteine proteases, cathepsins S and K, in the neointima of balloon-injured rat carotid arteries. *Am J Pathol*. 2004;164:243–251.
- Uzui H, Harpf A, Liu M, Doherty TM, Shukla A, Chai NN, Tripathi PV, Jovinge S, Wilkin DJ, Asotra K, Shah PK, Rajavashisth TB. Increased expression of membrane type 3-matrix metalloproteinase in human atherosclerotic plaque: role of activated macrophages and inflammatory cytokines. *Circulation*. 2002;106:3024–3030.
- Apte SS, Fukui N, Beier DR, Olsen BR. The matrix metalloproteinase-14 (MMP14) gene is structurally distinct from other MMP genes and is co-expressed with the TIMP-2 gene during mouse embryogenesis. *J Biol Chem*. 1997;272:25511–25517.
- Lehti K, Allen E, Birkedal-Hansen H, Holmbeck K, Miyake Y, Chun TH, Weiss SJ. An MT1-MMP-PDGF receptor-beta axis regulate mural cell investment of the microvasculature. *Genes Dev*. 2005;19:979–991.
- Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S. Recruitment of

- stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 2002;109:625–637.
38. Atkinson SJ, Patterson ML, Butler MJ, Murphy G. Membrane type 1 matrix metalloproteinase and gelatinase A synergistically degrade type 1 collagen in a cell model. *FEBS Lett*. 2001;491:222–226.
 39. Jiang A, Pei D. Distinct roles of catalytic and peixin-like domains in membrane-type matrix metalloproteinase (MMP)-mediated pro-MMP-2 activation and collagenolysis. *J Biol Chem*. 2003;278:38765–38771.
 40. Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem*. 1997;272:2446–2451.
 41. Schiller NK, Kubo N, Boisvert WA, Curtiss LK. Effect of gamma-irradiation and bone marrow transplantation on atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1674–1680.
 42. D'Ortho M, Stanton H, Butler M, Atkinson SJ, Murphy G, Hembry RM. MT1-MMP on the cell surface causes focal degradation of gelatin films. *FEBS Lett*. 1998;421:159–164.
 43. Fosang AJ, Last K, Fuji Y, Seiki M, Okada Y. Membrane-type 1 MMP (MMP-14) cleaves at three sites in the aggrecan interglobular domain. *FEBS Lett*. 1998;430:186–190.
 44. Pei D, Weiss SJ. Transmembrane-deletion mutants of the membrane-type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity. *J Biol Chem*. 1996;271:9135–9140.
 45. Holopainen JM, Moilanen JA, Sorsa T, Kivela-Rajamaki M, Tervahartala T, Vesaluoma MH, Tervo TMT. Activation of matrix metalloproteinase-8 by membrane type 1-MMP and their expression in human tears after photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:2550–2556.
 46. Oblander SA, Zhou Z, Galvez BG, Starcher B, Shannon JM, Durbeej M, Arroyo AG, Tryggvason K, Apte SS. Distinctive functions of membrane type 1 matrix-metalloprotease (MT1-MMP or MMP-14) in lung and submandibular gland development are independent of its role in pro-MMP-2 activation. *Dev Biol*. 2005;277:255–269.
 47. Yana I, Weiss SJ. Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases. *Mol Biol Cell*. 2000;11:2387–2401.
 48. Stawowy P, Meyborg H, Stibenz D, Borges Pereira Stawowy N, Roser M, Thanabalasingam U, Veinot JP, Chretien M, Seidah NG, Fleck E, Graf K. Furin-like proprotein convertases are central regulators of the membrane type matrix metalloproteinase-pro-matrix metalloproteinase-2 proteolytic cascade in atherosclerosis. *Circulation*. 2005;111:2820–2827.

CLINICAL PERSPECTIVE

Many data support the concept that the collagen content of the fibrous cap of an atherosclerotic plaque governs its propensity to rupture and causes thrombotic complications. The mechanisms that regulate the plaque collagen content thus have considerable clinical interest. Members of the matrix metalloproteinase (MMP) family possess interstitial collagenase activity capable of breaking down this critical component of the plaque structure. Previous work has highlighted a role for MMP-13, a secreted interstitial collagenase, in collagen breakdown in mouse atherosclerotic plaques. The present study tested the role of a membrane-bound MMP (MMP-14) present in plaques in regulating the interstitial collagen content of atheromatous lesions. Animals that lack MMP-14 do not survive to adulthood, so these experiments used animals with bone marrow cells lacking MMP-14 to test the hypothesis that this enzyme contributes to collagen catabolism in mouse atheromata. After 16 weeks of an atherogenic diet, low-density lipoprotein receptor-deficient mice engrafted with MMP-14-deficient bone marrow contain significantly more interstitial collagen compared with those receiving wild-type bone marrow. The effect of MMP-14 on collagen metabolism may be indirect through activation of the latent zymogen form of MMP-13 as shown by biochemical experiments. Thus, MMP-14 from bone marrow-derived cells can influence the collagen content of atheromata, a critical component of plaque stability.

ANNEXE 2

Mesenchymal Stem Cells are decreased in patients with atherosclerotic aortic aneurysms and stabilize formed experimental aneurysms.

Fabrice Schneider* MD, François Saucy, MD, PhD, Claire Poulet, Faiza Mohand, Jianping Dai MD, PhD, Pascal Desgranges, MD, PhD, Jean-Pierre Becquemin, MD, Hélène Rouard, MD, PhD, Marianne Gervais, PhD, Eric Allaire, MD, PhD.

Short running title: mesenchymal stem cells in aneurysms

From CNRS EAC 7054, Centre de Recherches Chirurgicales Dominique Chopin, Faculty of Medicine, Université Paris-Est Créteil (F.Sc., C.P., F.M., J.D., M.G.T., E.A.), Department of Vascular Surgery, Henri Mondor Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (P.D., JP.B., E.A.), Créteil, France, Department of Vascular and Thoracic Surgery, Lausanne, Switzerland (F. Sa), EA 3952 U-PEC, Etablissement Français du Sang (H.R.).

Corresponding author: Eric Allaire, Department of Vascular Surgery, Henri Mondor Hospital, 51 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil Cedex, France. allaire@club-internet.fr

Soumis à PNAS

Abstract

Introduction. Abdominal Aortic Aneurysms (AAAs) form because of aortic wall destruction with no compensatory reconstruction. Vascular Smooth Muscle Cell (VSMC) addition stabilizes expanding AAAs in rats. Mesenchymal Stem Cells (MSCs) can differentiate into VSMCs.

Objective. Assess MSC defect in patients with AAAs and evaluate their healing properties in a rat model of expanding AAA.

Methods. MSCs were isolated by plastic adhesion from patient blood with or without AAA (carotid stenosis). Rat bone marrow-derived MSCs were perfused endovascularly in experimental AAAs.

Results. Blood MSCs were less in patients with AAAs than in matched controls (34.4+/-24.7 vs. 71.4+/-47.9 CFUs/ml respectively; $p < 0.0018$). MSCs from human thrombi could be stimulated by TGF-beta1 and PDGF-BB, and induced to express VSMC markers. Cells expressing VSMC markers were isolated from AAA thrombus surface, suggesting MSC differentiation into VSMC-like cells in this area. Bone marrow rat MSCs were CD90⁺, CD44⁺, CD45⁻ and CD11b⁻. MSCs decreased AAA diameter expansion more powerfully than VSMCs and culture medium infusion (6.5%+/-9.7, 25.5%+/-17.2 and 53.4%+/-14.4; $p < 0.05$, respectively). This result was sustained at 4 weeks. MSCs decreased expression of MMP-9 and infiltration by macrophages (4.7+/-2.3 vs. 14.6+/-6.4mm² respectively; $p < 0.05$), increased TIMP-1 and reduced medial elastin destruction compared to control. MSCs induced formation of a neo-aortic tissue rich in SM-alpha active positive cells (22.2±2.7 versus 115.6±30.4 cells/surface units, $P = 0.007$) surrounded by a dense collagen and elastin network with luminal endothelial cells.

Conclusion. Circulating MSCs are quantitatively deficient in patients with AAAs. Adding CFUs/MSCs on the lumen induces aortic regeneration and aneurysm stability.

Introduction

Abdominal aortic aneurysms (AAAs) expand because of wall atrophy, a consequence of proteolytic injury of extracellular matrix (ECM), disappearance of vascular smooth muscle cells (VSMCs), and absence of compensatory reconstruction^{1, 2}.

Addition of VSMCs by local cell therapy³, or induction of VSMC growth by TGF-beta1 endovascular gene transfer⁴, triggers wall reconstruction and stabilizes expanding AAAs experimentally. These data support the concept that lack of VSMC perpetuates wall atrophy and diameter enlargement, and that restoring a VSMC population represents a therapeutic goal in AAAs.

A subset of bone marrow cells adhere to coated or uncoated plastic wells in culture where they form colonies of heterogeneous cells, and are referred to as colony forming units (CFUs)⁵. In addition to bone marrow, CFUs have been isolated. CFUs have been shown to be multipotent and have been identified under different names, e.g. Mesenchymal Stem Cells (MSCs)⁶, Endothelial Progenitor Cells⁷. Because they can home at sites of injury and respond to lineage-specific stimuli, they are thought to contribute to post-natal tissue repair.

However, adhesion on a solid surface *in vitro* may be related to cell capability to concentrate at the surface of injured vascular surfaces *in vivo*, an initial step to luminal healing.

The luminal aspect of arterial lesions is covered with fibrin and platelets, and provisioned with platelet-derived growth factors TGF-beta1 and PDGF-BB^{8, 9, 10}, able to induce MSCs differentiation into VSMC-like cells¹¹. These elements are thought to

contribute to post-injury healing of arteries, which results in a VSMC-rich hyperplasia, a hypertrophic tissue outgrowth contrasting with AAA luminal thrombus and wall atrophy deprived of VSMCs. Herein, we hypothesized that this archetypal healing response of injured arteries occurs at the surface of AAA thrombi, albeit inefficiently. We demonstrate that AAA thrombi at the interface with blood contain MSCs, as well as factors for MSC differentiation into VSMC-like cells. We show that MSCs are decreased two folds in the blood of patients with AAA, a potential limitation to luminal aortic healing. In a rat model of expanding AAAs with a luminal thrombus, the endovascular seeding of bone marrow-derived MSCs is shown to trigger the formation of an organized aortic tissue replacing the luminal thrombus, and to stabilize the aortic diameter more powerfully than canonic VSMCs. These data are concordant with the idea that MSCs are quantitatively deficient in patients with large AAAs, and that adding MSCs on the lumen induces aortic regeneration and aneurysm stability.

Material and methods

MSCs were selected from patient circulating blood, human AAA thrombus and rat bone marrow, using plastic adhesion with the same culture medium (α MEM, 20% fetal calf serum, 1% penicillin and streptomycin, 0.08% fungizone with 1% glutamine (Invitrogen Corporation, Paisley, UK)¹². Fifteen milliliters of fresh blood was collected by venipuncture in citrate phosphate dextrose solution (Baxter, Maurepas, France) from male patients operated on for an asymptomatic AAA (N=27) or for an asymptomatic carotid stenosis with no AAA detected by duplex-scanner (controls,

N=15) in the Department of Vascular Surgery in Henri Mondor Hospital. The study had been approved by the Mondor Ethic Comity. All patients had signed an informed consent. Duplex scanner examination showed no significant carotid stenosis in AAA patients and no AAA in patients operated on for carotid stenosis. Mononuclear cells were isolated by density gradient centrifugation (Lymphoprep® 1.077, Axis-shield, Oslo, Norway) and seeded onto uncoated 6-wells plates (Nunc, Naperville, USA) (3.10^6 cells/well). Culture medium was changed at day 4.

Thrombi (N=5) collected during elective surgery were immediately transported to the laboratory at room temperature in DMEM with 2% penicillin, streptomycin and 0.3% fungizone (Invitrogen). The fresh fibrin layer of the thrombus luminal surface was scrapped with a surgical blade and suspended in HBSS, centrifuged at 1200 rpm for 5 minutes. Pellets were seeded and cultured in the same conditions as blood mononuclear cells in uncoated 6-wells plates or Lab-Tek® wells (Nunc).

At day 7, clusters in P6 wells were counted, and Lab-Tek® wells were rinsed in 1X PBS (Invitrogen), fixed with 4% PFA 4% for 10 minutes at 4°C and permeabilized with 0.2% triton PBS (Sigma chemicals, Saint-Louis, USA) during 20 minutes. For immunocytochemistry, wells were incubated for 1 hour with 1% BSA PBS (Sigma, Saint-Louis, USA) and 10% goat serum (Dako, Glostrup, Denmark). Wells were incubated overnight at 4°C with antibodies in 1% BSA PBS: CD34 (Abcys SA, Paris, France), CD45 (Abcam, Cambridge, UK), Smooth Muscle Myosin Heavy Chain MYH11 (SM MyHC) (Abcam), Alpha Smooth Muscle Actin (clone 1A', Sigma). Controls were generated by incubation with a non relevant antibody. Wells were incubated for one hour at room temperature with appropriated secondary biotinylated antibodies

revealed by the ABC® system (Vector laboratory, Burlingham, USA) and DAB® (Vector laboratory Substrates). Cells were counter-stained with Hematoxylin (Réactifs RAL, Martillac, France) and Lab-Tek® were mounted with Immu-Mount (Thermo Shandon, Pittsburg, USA).

Immunohischemistry with anti-beta3 integrin antibody (CD61, Dako) was performed on 5 µm sections of human AAA thrombi after fixation in 70% ethanol. PDGF-BB (Quantikine kit, R&D systems) and active TGF-β1 proteins (Duoset, R&D systems) were measured by ELISA after thrombus protein extraction with 0.5M Tris pH 7.6, 0.2M NaCl, 10mM CaCl₂, 1X Triton buffer and anti-protease. Cells isolated on Lab-Tek® from the luminal aspect of human AAA thrombus were stimulated with 50ng/ml PDGF-BB and/or 10 ng/ml TGF-β1 (Sigma) for 30 min after three hours in serum-free medium. Cells were then immunostained with anti-phosphorylated PDGF-receptor or anti phosphor-Smad2 antibodies (Cell signaling Tehnology Inc, Beverly, USA). Double stimulation with TGF-beta1 and PDGF-BB for seven days was followed by anti- SM MyHC immunocytochemistry.

Rat bone marrow CFUs/MSCs isolation

Cells were isolated from ten week old male Fischer rats (Charles River, St Quentin Fallavier, France). Aortic VSMCs³ were grown in RPMI 1640 and Medium 199, with L-glutamine and 10% fetal calf serum (Invitrogen). MSCs were isolated from femurs and tibias by centrifugation and selected by plastic adhesion after overnight incubation into culture medium with 20% FCS. Non adherent cells were removed after 72 hrs. Adherent cells were passaged when reaching 80% confluence.

MSCs phenotypes were characterized by FACS analysis and were shown to express MSCs markers such as CD44, CD73, CD90, and CD105 and these cells were CD45- and CD11b- by immunohistochemistry.

Surgery

Animals housed and taken care for according to the European Union Standards received analgesia and were anesthetized with 0.1 ml/100g b.w. of pentobarbital I.P. AAAs were generated in 250g male Fischer 344 rats (Charles River) by implanting a segment of Hartley guinea pig aorta (xenograft) as previously described¹³. Guinea pig infrarenal aortas were decellularized using 0.1% sodium dodecyl sulfate (Sigma) to obtain intact tubes of aortic ECM which were orthotopically implanted into rats with 10-0 sutures. Fourteen days after xenograft implantation, a chimeric AAA (>50% diameter increase) had developed from the degraded guinea pig ECM and the cells and thrombus from rat³. At this delay, AAAs were isolated from blood flow by clamps. The lumen was rinsed with culture medium through a PE10 catheter introduced by an aortectomy performed downstream in the native aorta. Passage 5 to 8 MSCs or VSMCs suspended in culture medium with 5% fetal calf serum were injected into the AAA as previously described³. In some experiments MSCs were stained before seeding with the fluorescent dye PKH26 (Sigma). As controls, AAAs were infused with culture medium with 5% FCS no cell.

AAA assessment

AAA diameter was measured at endovascular infusion and before euthanasia 1 or 4 weeks later. After inclusion into paraffin, 5 µm cross sections were generated from

the center of AAAs. Elastin and collagen were stained by orcein and sirius red, respectively. For immunohistochemistry, primary antibodies were mouse anti rat monoclonals : ED1 clone for monocytes/macrophages, RECA for endothelial cells (Serotec, Oxford, England) and smooth muscle alpha-actin (clone 1A4, Sigma). An alkaline phosphatase-antialkaline phosphatase technique was used (Dakopatts). Control sections were generated by omission of the primary antibody and with a non relevant primary antibody.

mRNA semi-quantification

MMP-9 and TIMP-1 mRNA contents were analyzed using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), comparative to the domestic gene 18S (QuantumRNA™18s Internal Standards kit, Ambion, Montrouge, France) (primers: MMP-9: *forward*: 5'-CTGCGTATTTCCATTCATCTT-3'; *reverse*: 5'-ATGCCTTTTATGTCGTCTTCA-3'; TIMP-1: *forward*: 5'-CCCCAGAAATCAACGAGAGACCA-3'; *reverse*: 5'-ACACCCCACAGCCAGCACTAT-3'). Intima, on the one hand, and media plus adventitia, on the other hand, were separated by micro dissection and pooled by layers and groups. Total RNA was extracted with TRIzol™(Life Technologies, USA) and treated with grade I DNase (Roche Molecular Biomedicals). Reverse transcription was done with randoms primers, and Reverse transcriptase M-MLV, dNTP, dithiothreitol, and ribonuclease inhibitor (Eurobio, Les Ulis, France). PCR was performed in a PCR Express thermo cycler (Hybaid, UK) with DNA Taq polymerase (Eurobio). Bands of amplified sequences corresponding to the gene of interest and to 18s were quantified with Gel

Analysis (Iconix, France). Results were expressed as ratios between signals corresponding to the gene of interest and 18s.

ELISA quantification of MMP-9 in a human explants model

Human VSMCs and bone marrow-derived MSCs (Etablissement Français du sang, Créteil, France) were grown to 80% confluency in alpha-MEM, 20% FCS in 6-wells plates. Fragments from the maximum dilation zone of five asymptomatic human atherosclerotic AAAs (>55 mm) collected during elective surgery in the Department of Vascular Surgery of the Henri Mondor Hospital in agreement with the local ethics committee, were cultured in serum-free medium with 5% CO₂ at 37°C, as described previously (7). Briefly, each AAA was divided in 15 fragments generated with 3 mm biopsy punches (Stiefel SARL, Nanterre, France). Fragments were randomly added on cell layers (4 punches per well), or in wells with no cell as controls, in triplicate. After a 24 hour incubation, the conditioned medium was harvested for MMP-9 quantification (ELISA kit, RandD System).

Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm SD. Comparisons between patient groups used unpaired student t test. For independent qualitative parameters a Chi-square test was used (biostat TGV). In animal experiments, the non parametric Mann-Whitney *U* and Kruskal Wallis tests (Statview, version 4.5) were used for statistical comparisons between two and three groups, respectively. $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Characterization of human AAA thrombus interface with blood

Anti-CD61 immunohistochemistry confirmed presence of platelets on the luminal aspect of thrombi (Figure 1a), as reported previously¹⁴. ELISA quantification in human AAA thrombus and wall extracts demonstrated presence of PDGF-BB and TGF- β 1 (Table 1).

AAA thrombus interface with blood contains MSCs responding to smooth muscle differentiating factors

Cultures on plastic wells from the luminal aspect of six out of eight fresh AAA thrombi yielded MSCs (mean CFUs/thrombus: 4.8 ± 3.8 , range 0-11) (Figure 1a). Adherent cell outgrowth could be seen from the fourth day, resembling CFUs isolated from circulating blood using the same technique (Figure 1b). Thrombus-derived cells isolated on LabTek developed as isolated fibroblast-like, spindle shaped, CD45 negative cells; some of these cells expressed alpha actin and SM MyHC. Cells from AAA thrombus isolated on LabTek were incubated with PDGF-BB and/or TGF- β 1 (Figure 1c). After a 30 min stimulation, thrombus-derived cells became positive for anti-phosphorylated PDGF receptor and phospho-Smad 2 immunostaining. After a seven day stimulation by TGF- β 1 and PDGF-BB, all cells were positive for SM MyHC immunostaining.

MSCs from patient circulating blood

We quantified MSCs in the circulating blood of atherosclerotic patients, with or without AAA. Control patients with no AAA were scheduled for carotid surgery. Both groups were comparable for age, cardiovascular risk factors and non aortic, non carotid localization of atherosclerosis (Table 2). After four day in culture, the seeding on plastic of Ficol-isolated mononuclear cells always resulted in the development of clusters. At day 7, the number of clusters was less in AAA than carotid patients (34.4+/- 24.7 and 71.4+/-47.9 CFUs/ml of blood, respectively; non appared *t*-test: $p=0.0018$) (Figure 2). There was no correlation between cluster number and AAA diameter (Z correlation test: $p=0.85$).

Endovascular seeding of MSCs stabilized the diameter of expanding AAAs

MSCs isolated from rat bone marrow by plastic adhesion were seeded onto the lumen of formed and expanding AAAs with luminal thrombus. On cross sections made from AAAs harvested 48 hours and one week after seeding, fusion images showed co-localization of nuclei stained with DAPI and red fluorescence in the intermediate area of the intima, indicating presence of seeded MSCs or daughter cells (Figure 3). No PKH26 labeling could be seen four weeks after MSC seeding. One million MSCs were seeded onto the lumen of already formed AAAs. In the control group infused with culture medium with no cell, the diameter of AAAs continued to increase one week ($n=5$, 48.2 ± 17.9 %) and four weeks later ($n=5$, 88.3 ± 61.6 %) (differences in diameters between endovascular infusion and one and four weeks later: $P<0.05$). In contrast, endovascular injection of one million MSCs stopped AAA diameter expansion, one ($n=6$, 6.6 ± 9.7 %) and four weeks ($n=5$,

9.2±30.1 %) later (one and four week growth rate differences between control and CFUs/MSCs groups: P=0.006 and P=0.028 respectively) (Figure 4a).

MSCs decrease inflammation and further MMP-driven wall destruction, and trigger tissue regeneration in formed AAAs

Addition of MSCs decreased infiltration of AAAs by monocyte/macrophages (ED1 positive cells: 14.6±6.4 vs. 4.7±2.3/mm², in control and MSC groups, respectively, P=0.015) (Figure 4b). Semi-quantitative analysis by RT-PCR expression in AAAs over the domestic gene 18s showed a decrease in MMP-9, and an increase in TIMP-1, mRNAs, one week after endovascular injection of MSCs (Figure 4c). Anti-MMP-9 immunostaining antibody confirmed a sharp decrease in MMP-9 protein accumulation upon MSC endovascular seeding.

Four weeks after MSC seeding, collagen and elastin contents in the media and adventitia were higher than in controls (collagen: 7.35±1.9 vs. 22.5±9.1 Surface-%, P=0.007; elastin: 4.25±4.30 vs. 28.52±16.5 Surface-%, P=0.008) (Figure 5, a, b, d, e). After MSC seeding, a tissue developed on the luminal aspect of AAAs and replaced the thrombus which persisted in the control group (Figure 5, a to f). Cell and extracellular matrix accumulating in the convexity formed by the aneurysmal wall recapitulated the organization of an aortic wall. The neo vessel wall contained abundant SM- α -active positive cells (22.2±2.7 versus 115.6±30.4 cells/surface units, in control and MSC groups, respectively, P=0.007) (Figure 5 c-f). RECA immunostaining showed endothelial cells covering VSMC-like cells at the interface with circulating blood. In contrast the luminal surface of the AAAs infused with

culture medium was covered with thrombus devoid of endothelium (Figure 5, g-h). The neo aortic wall contained a dense extracellular network with elastin (1.42 ± 0.9 vs. 6.6 ± 1.9 Surface-%, $P=0.007$, in control and MSC groups, respectively, $P=0.007$) and collagen (Figure 5, a-e).

Rat MSCs stabilize expanding AAAs more efficiently than canonic VSMCs

Because we had shown previously that aortic VSMCs stabilize expanding rat AAAs³, we designed a dose-response experiment to compare the impact of MSC and VSMC seeding on this clinically relevant parameter. Whereas five million VSMCs were needed to curb diameter expansion, only one million MSCs were sufficient to stabilize AAA diameter (Figure 6a). The mean diameter expansion rate was $48.2 \pm 17.0\%$ after culture medium infusion (controls), $25.5 \pm 17.2\%$ after VSMC seeding ($P=0.11$ in comparison with controls) and $6.6 \pm 9.7\%$ after MSC infusion ($P=0.006$ in comparison with controls) (Kruskall-Wallis test between the three groups: $P=0.007$).

Human bone marrow-derived MSCs decrease MMP-9 release from human AAA wall *in vitro*

Punches from human AAAs were incubated with human MSCs isolated from bone marrow or VSMCs from human aortas. Controls were punches with no cell. Addition of both cell types decreased MMP-9 protein release in the culture medium (Figure 6b).

Discussion

We show that the surface of AAA thrombi retains elements of arterial healing and that presence of an AAA in atherosclerotic patients is associated with a two folds decrease in circulating MSCs. Bone marrow-derived MSCs seeded endovascularly down-regulate inflammation and proteolysis, trigger aortic regeneration and finally stop expansion of formed AAA in rats, more efficiently than VSMCs. Although bone marrow derived-MSCs and peripheral MSCs are not functionally equivalent Although bone marrow derived-MSCs and peripheral MSCs are not functionally equivalent both subsets of MSCs can be isolated using the same method of plastic adhesion, retain the capability to form colonies and have similar differentiation potentials¹⁵. Altogether, these common properties suggest that MSCs from both origins (suggesting their common origin from cells into the yolk sac) can contribute to tissue repair. Our data support the concept that VSMC-depleted AAAs expand in a context of repair failure and circulating progenitor cell exhaustion, that can be corrected by MSC addition on the luminal aspect of the thrombus to reconstruct the diseased aorta and gain diameter stability.

AAAs are chronic arterial wounds which expand inexorably once they have reached 40 mm in diameter¹⁶, a suggestion that no efficient repair occurs in these aortic lesions. Healing of injured arteries occurs on the luminal aspect covered with fibrin and platelets, by convergence of mesenchymal cells and presumably by convergence of progenitors from adjacent media and adventitia^{17, 18}, and by entrapment of circulating bone marrow-derived MSCs^{19, 20}. As a consequence, VSM-like cells form a

post-lesional overgrowth of arterial tissue in the intima. In sharp contrast to other arterial lesions in which the media layer is intact, in AAAs the trafficking of repair cells through the wall towards the intima faces limiting factors, among which poor growth capability of VSMCs, uncontrolled proteolysis causing anoikis, inflammation driven apoptosis²¹ and ECM disorganization²². Since the contribution of aortic wall cells to luminal repair is likely limited in AAAs, we asked whether the luminal surface of the thrombus in contact with blood, encloses blood-derived factors instrumental for circulating MSC recruitment and participation to intimal artery wall healing.

Our finding that fresh fibrin covering AAA thrombi contains plastic-adherent MSCs credits our hypothesis. The method we have used for isolation and culture of cells entrapped in AAA thrombus has been described by Friedenstein⁵ and has been used by other groups to isolate MSCs from numerous tissues¹² and circulating blood¹¹. Adherent cells on LakTek did not express the pan leukocytic marker CD45, in contrast to MSCs from circulating blood and bone marrow, a suggestion that they may represent genuine VSMC progenitors rather than monocytes. MSC adhesion on solid phase *in vitro* is a reminiscence of vascular formation by progenitors in the yolk sac at early stages of embryonic development²³. Attachment of progenitors is conserved post-natally in repair of injured vessels²⁴, vein graft adaptation to radial strain²⁵, chronic vascular rejection (and in aortic calcification process²⁶. The detection of platelets, TGF-beta1 and PDGF-BB proteins in the thrombus of AAAs and the demonstration that thrombus-derived CFUs can be activated at the receptor level by these differentiating factors and induced to express SM-MyHC, provides

further support to our hypothesis. Finally, the isolation of vascular SM MyHC-positive cells suggests that the cascade of events allowing for MSC differentiation into VSMCs is effective at the surface of AAA thrombus. Noticeably, the absence of organized vascular tissue in AAA thrombus indicates that significant VSMC development aborts in this area. As a possible mechanism for reconstruction failure, it has been shown previously that polymorphonuclear-derived elastase impairs VSMC and MSC survival and prevents cell colonization of the luminal aspect of thrombus in culture, by causing anoikis²⁹. Local proteolysis alters MSC function by proteolytic inactivation of the SDF-1 receptor CXCR4³⁰. Herein, our observation that MSCs isolated from thrombi grow poorly suggests exhaustion of repair mechanisms, a reminiscence of alterations of mature VSMCs in AAA media layer³¹.

Previous studies have shown correlations between blood MSCs and vascular dysfunction and lesions^{7, 26}. Herein, we provide evidence that circulating progenitor cells able to contribute to arterial repair^{11, 32} are decreased in patients with atherosclerotic AAA, in comparison to other patients with atherosclerosis but no AAA. We have performed our study in patients with AAAs over 40 mm in diameter with thrombus. It remains possible that the repair mechanisms we have evidenced are effective in smaller AAAs with no luminal thrombus, which are less prone to diameter expansion³³. There was no correlation between the number of circulating MSCs and AAA diameter, an indication that MSC defect is unrelated to the advance of the aortic disease. Taken together, our data support the view that cellular and molecular factors for arterial healing are present on the luminal aspect of AAA thrombi, and that a quantitative defects in circulating MSCs limits repair. Whether

local proteolysis, inflammation and alteration of AAA wall structure prevents recruitment of VSMC progenitors from the aortic wall will warrant further investigations.

MSCs stabilize expanding AAA by inducing wall regeneration

In an attempt to better understand the consequences of MSC quantitative defect in patients with AAA, we have assessed the impact of endovascular addition of autologous bone marrow-derived MSCs in experimental, expanding AAAs. We have used a model of AAA elicited by implanting a tube of xenogeneic aortic ECM in rats, targeted by inflammation and MMP-driven proteolysis^{34, 35}. Resulting AAAs are depleted in VSMCs, expand constantly once they have formed and acquire a luminal thrombus, thereby mimicking important evolutive and structural features of expanding human atherosclerotic AAAs. Using PKH 26 labelling, we have first documented MSC attachment and survival up to one week after endovascular seeding. We then have shown that addition of MSCs down-regulates monocyte/macrophage accumulation, and decreases MMP proteolytic burden in the wall of formed AAAs. Concordant results were obtained in a co-culture system with punches of human AAA wall, in which human bone marrow-derived MSCs decreased MMP-9 release as powerfully as VSMCs. These results, in line with previous observations that MSCs controls inflammation in host tissues³⁶, demonstrate the capability of MSCs to controlling aortic tissue destruction in the context of experimental and human AAAs.

Another important finding is that the endovascular seeding of MSCs results in the formation of a structured arterial tissue in the intima in replacement of the luminal thrombus. Vascular muscle alpha actin-positive cells accumulating after MSC seeding were surrounded by an ECM with collagen and elastin. These data are concordant with previous data demonstrating production of ECM by MSCs³². An endothelium separated VSMC-like cells from blood, contrasting with the surface of the luminal thrombus in control AAAs as well as in human atherosclerotic AAAs. Our findings add credit to the hypothesis that MSCs are positive modulators of wall mass increase in injured arteries.

We have observed that MSCs are five folds more efficient than VSMCs in rebuilding the aneurysmal aorta. On a structural standpoint, MSCs triggered regeneration of the injured aorta with maturation of an elastin network, which had not been observed after VSMC seeding³. These data support the view that MSCs exert a specialized function in arterial repair and functional recovery that transcends that of mature mesenchymal cells. Herein, addition of MSCs on the luminal aspect reproduces a physiologic process, already in place as shown by isolation of MSCs on the luminal surface of AAA thrombus. Importantly, MSC endovascular addition did not result in the repair of the media layer of AAAs. ECM injury in the aneurysmal wall was stopped upon MSCs addition, presumably by paracrine secretion of protease inhibitors, as suggested by TIMP-1 mRNA accumulation. The absence of PKH-labelled cells in the AAA wall itself demonstrates that MSCs did not penetrate into the injured vessel wall. The mechanism of tissue healing remains unclear. The direct differentiation of MSCs into SMC-like phenotype

has already been demonstrated in previous work about MSCs seeding on vascular prostheses³⁶. On the other hand, few cells were detected after perfusion in our experiment suggesting us a paracrine effect MSCs. Previous attempts to regenerating infarcted myocardium by progenitor injection into coronaries^{38,39} or into the myocardium itself⁴⁰ have been limited by the poor survival of MSCs in injured tissues, a limiting factor to regenerative approaches. Other groups have proposed the addition of layers of MSCs on the outskirts of the infarcted myocardium to obviate excessive death of therapeutic cells⁴¹. In our experiments, survival of seeded MSCs might have been made possible by the direct contact with circulating blood. Our data provide further understanding in MSC repair contribution and therapeutic potential in the cardiovascular system.

Conclusion

This is the first report addressing the role of MSCs in AAA expansion. Our data raise the possibility that human atherosclerotic AAA expansion results from an exhaustion of MSCs. Our observation that endovascular addition of MSCs stabilizes expanding AAAs opens a new field for therapeutic intervention for the third leading cause of cardiovascular death.

Acknowledgment

This work was funded by la Fondation de France (grant 2005 005341), la Fondation de l'Avenir pour la Recherche Médicale, and « Fighting aneurysmal Disease”, a grant from the European Union.

Table 1. ELISA quantification in extracts from human AAA wall and thrombus (pg/mg extract).

	PDGF-BB	TGF-beta1
wall	79.5 ± 34.9	127.0 ± 56.3
ab-luminal thrombus	60.3 ± 34.0	37.5 ± 28.4
luminal thrombus	122.5 ± 83.5	47.0 ± 30.2
Kruskall-Wallis (P)	0.286	0.025

Table 2. Patient characteristics (%)

	AAA n=28	Carotide stenosis, n=17	P*
Age	73.1+/- 8.3	72.1+/-10.2	0.73
AAA (%)	100	0	-
AAA diameter (mm)	52.9	-	-
Operated carotid stenosis	2 (7)	15 (100)	-
Tobacco use	15 (54)	7 (41.2)	NS
Hypercholesterolemia	15 (54)	8 (47)	NS
Diabetes	5 (17.9)	6 (35.3)	NS
Hypertension	19 (67.9)	12 (70.6)	NS
CAD	14 (50)	8 (47)	NS
PAD	9 (32.1)	7 (41.2)	NS
AAP	27 (100)	14 (82.3)	NS
Statin	18 (64.3)	9 (52.9)	NS

***: non aparited t test; other: chi-square**

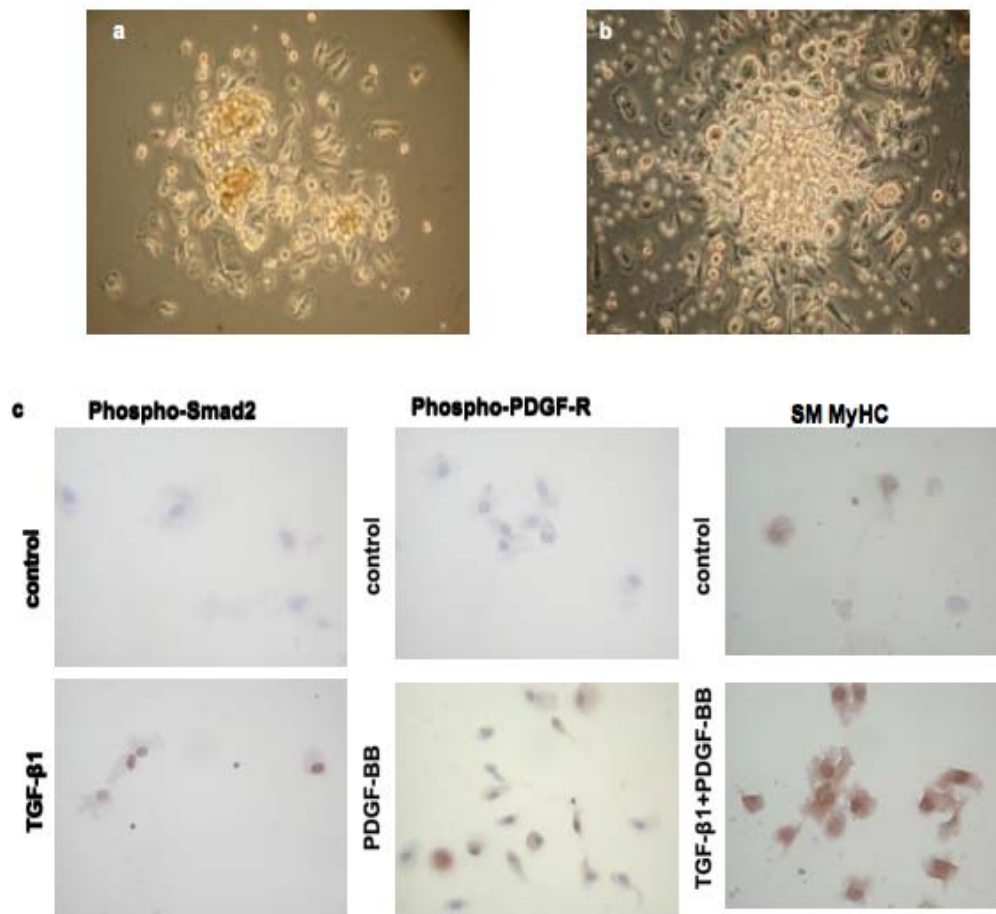


Figure 1. Upper panel. a. Clusters at seven day on plastic, from the luminal aspect of AAA thrombus and from circulating blood (b). Original magnification x20. **Lower panel (c):** platelet-derived growth factor stimulation of plastic adherent cells from the luminal aspect of AAA thrombus.

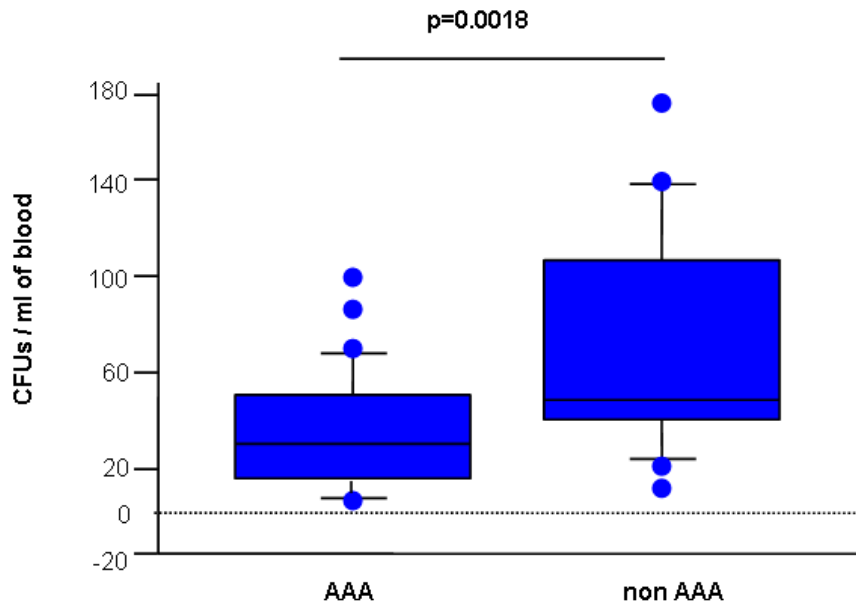


Figure 2. Quantification of CFUs in the blood of atherosclerotic patients. *: non apparited t test.

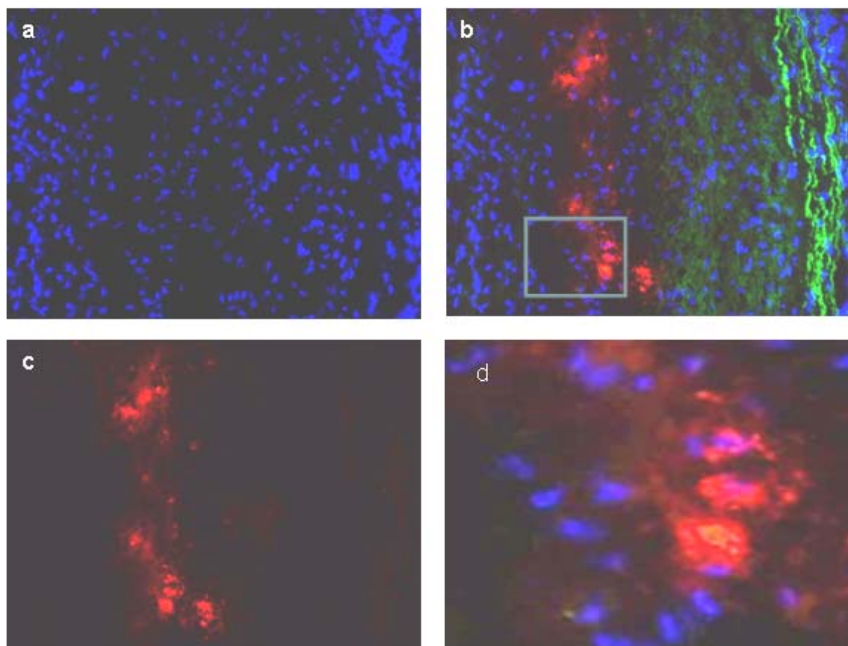


Figure 3. Cross-sectional views of rat AAAs one week after endovascular seeding of PKH26 labeled MSCs. a: nuclear staining with DAPI; c: PKH26- labeling; b: fusion of a and c; d: high power field view of b. Original magnification: a, b, c: x 20; d: x 100.

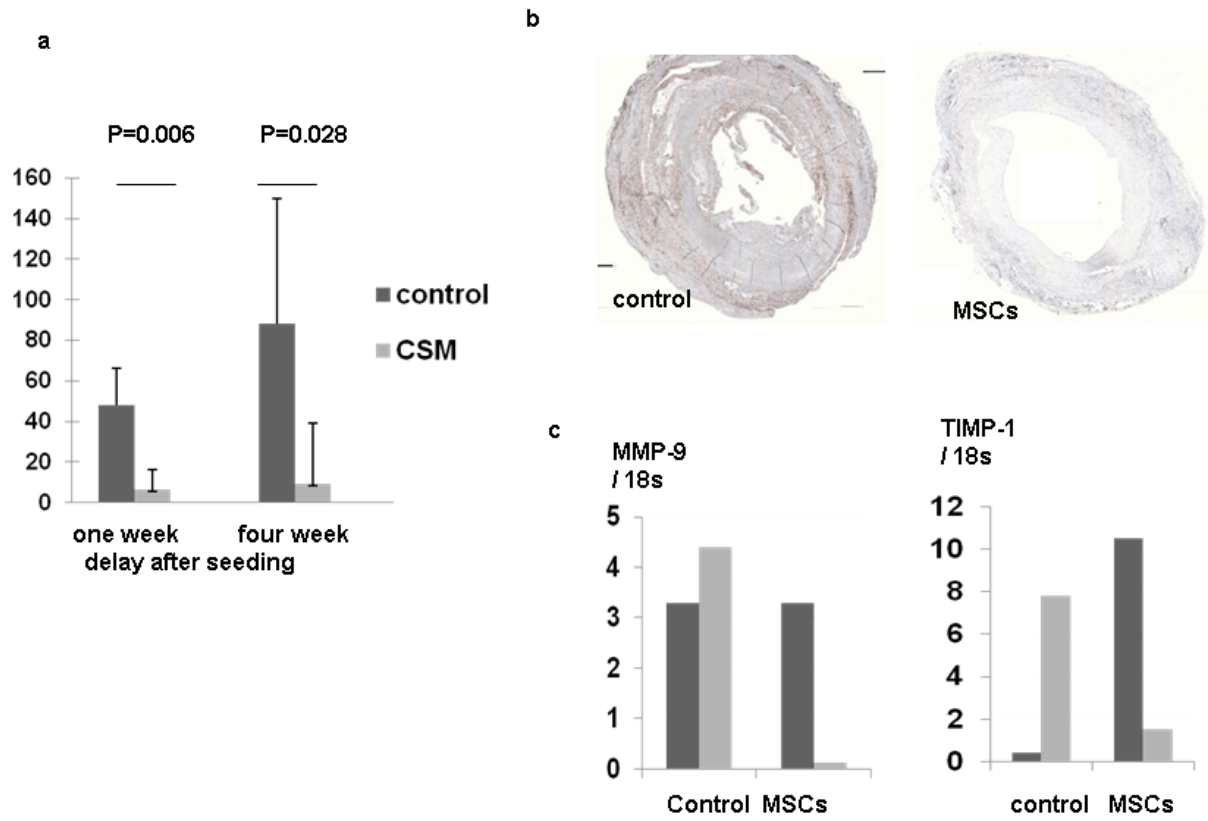


Figure 4. a. Diameter expansion of formed AAAs. **b.** Representative view of immunohistochemistry against ED-1 (original magnification: x4). **c.** Semi-quantitative RT-PCR of mRNAs encoding for MMP-9 and TIMP-1 in AAA extracts one week after endovascular infusion, over the domestic gene 18s.

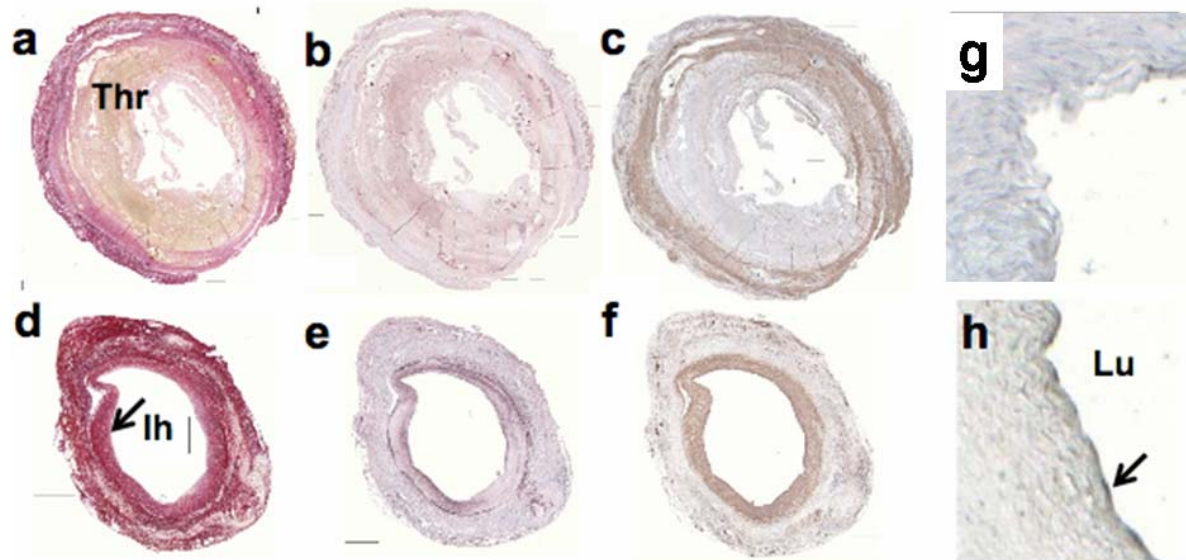


Figure 5. Cross-sectional views of AAAs four weeks after endovascular treatment. Upper panel: control; lower panel: MSC treated AAA. a, d: Sirius red; b, e: orcein; c, f: anti-smooth muscle alpha-actin immunostaining. Original magnification: x4. Thr: luminal thrombus; Ih: intimal hyperplasia. g, h: immunostaining of rat endothelial cells (arrow: endothelium lining on the luminal aspect; Lu: lumen), original magnification x40.

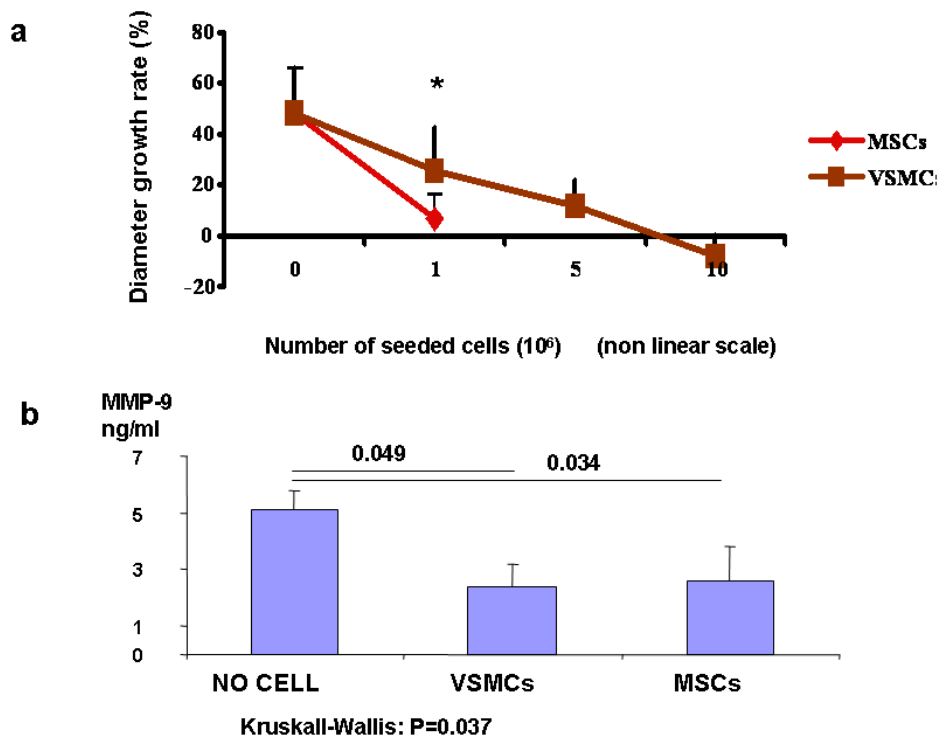


Figure 6. a. Dose-response experiment comparing a single quantity of seeded MSCs with increasing quantities of VSMCs. **b.** ELISA quantification of MMP-9 in a human explants model.

Reference List

- (1) Sakalihan N, Limet R, Defawe OD. Abdominal aortic aneurysm. *Lancet* 2005;365:1577-89.
- (2) Allaire E, Schneider F, Saucy F et al. New insight in aetiopathogenesis of aortic diseases. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2009 May;37:531-7.
- (3) Allaire E, Muscatelli-Groux B, Pagès C et al. Vascular smooth muscle cell endovascular therapy stabilizes already developed aneurysms in a model of aortic injury elicited by inflammation and proteolysis. *Annals of Surgery* 2004;239:417-27.
- (4) Dai J, Losy F, Guinault A-M et al. Overexpression of Transforming Growth Factor-beta 1 stabilizes already-formed aortic aneurysms. A first approach to induction of unctinal healing by endovascular gene therapy. *Circulation* 2005;112:1108-15.
- (5) Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 1974;2:83-92.
- (6) Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997 April 4;276:71-4.
- (7) Hill JM, Zalos G, Halcox JP et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003 February 13;348:593-600.
- (8) Bobik A, Agrotis A, Kanellakis P et al. Distinct patterns of transforming growth factor-beta isoform and receptor expression in human atherosclerotic lesions : colocalization implicates TGF-beta in fibrofatty lesion development [In Process Citation]. *Circulation* 1999 June 8;99:2883-91.
- (9) Agrotis A, Saltis J, Bobik A. Effect of transforming growth factor-beta 1 on platelet-derived growth factor receptor binding and gene expression in vascular smooth muscle cells from SHR and WKY rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1994 February;21:145-8.
- (10) Nabel EG, Yang Z, Liptay S et al. Recombinant platelet-derived growth factor B gene expression in porcine arteries induce intimal hyperplasia in vivo. *J Clin Invest* 1993 April;91:1822-9.

- (11) Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, Wang S, Caplice NM. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation* 2002 September 3;106(10):1199-204.
- (12) da Silva ML, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 2006 June 1;119(Pt 11):2204-13.
- (13) Allaire E, Mandet C, Bruneval P, Bensenane S, Becquemin JP, Michel JB. Cell and extracellular matrix rejection in arterial concordant and discordant xenografts in rat. *Transplantation* 1996;62:794-803.
- (14) Touat Z, Ollivier V, Dai J et al. Renewal of mural thrombus releases plasma markers and is involved in aortic abdominal aneurysm evolution. *Am J Pathol* 2006 March;168:1022-30.
- (15) Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*. 2007;25(11):2896-902
- (16) Mortality results for randomised controlled trial of early elective surgery or ultrasonographic surveillance for small abdominal aortic aneurysms. The UK Small Aneurysm Trial Participants. *Lancet* 1998 November 21;352:1649-55.
- (17) Jawien A, Bowen-Pope DF, Lindner V, Schwartz SM, Clowes AW. Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty. *J Clin Invest* 1992;89:507-11.
- (18) Sartore S, Chiavegato A, Faggin E et al. Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant. *Circ Res* 2001 December 7;89:1111-21.
- (19) Zerneck A, Schober A, Bot I et al. SDF-1alpha/CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. *Circ Res* 2005 Apr 15 ;96 (7):784 -91 Epub 2005 Mar 10 2005 April 15;96:784-91.
- (20) Zhang F, Tsai S, Kato K et al. Transforming growth factor-beta promotes recruitment of bone marrow cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells through stimulation of MCP-1 production in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2009 June 26;284(26):17564-74.
- (21) Henderson EL, Geng YJ, Sukhova GK, Whittmore AD, Knox J, Libby P. Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms. *Circulation* 1999 January 5;99:96-104.
- (22) Meilhac O, Ho-Tin-Noe B, Houard X, Philippe M, Michel JB, Angles-Cano E. Pericellular plasmin induces smooth muscle cell anoikis. *FASEB J* 2003 July;17(10):1301-3.

- (23) Drake CJ, Hungerford JE, Little CD. Morphogenesis of the first blood vessels. *Ann N Y Acad Sci* 1998 October 23;857:155-79.:155-79.
- (24) Yokote K, Take A, Nakaseko C et al. Bone marrow-derived vascular cells in response to injury. *J Atheroscler Thromb* 2003;10(4):205-10.
- (25) Xu Q, Zhang Z, Davison F, Hu Y. Circulating progenitor cells regenerate endothelium of vein graft atherosclerosis, which is diminished in ApoE-deficient mice. *Circ Res* 2003 October 17;93(8):e76-e86.
- (26) Cheng S, Cohen KS, Shaw SY et al. Association of colony-forming units with coronary artery and abdominal aortic calcification. *Circulation* 2010 September 21;122(12):1176-82.
- (27) Abi-Younes S, Sauty A, Mach F, Sukhova GK, Libby P, Luster AD. The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques. *Circ Res* 2000 February 4;86:131-8.
- (28) Zernecke A, Schober A, Bot I et al. SDF-1alpha/CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. *Circ Res* 2005 April 15;96:784-91.
- (29) Fontaine V, Touat Z, Mtairag eM et al. Role of leukocyte elastase in preventing cellular re-colonization of the mural thrombus. *Am J Pathol* 2004 June;164:2077-87.
- (30) Valenzuela-Fernandez A, Planchenault T, Baleux F et al. Leukocyte elastase negatively regulates Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCR4 binding and functions by amino-terminal processing of SDF-1 and CXCR4. *J Biol Chem* 2002 May 3;277:15677-89.
- (31) Liao S, Curci JA, Kelley BJ, Sicard GA, Thompson RW. Accelerated replicative senescence of medial smooth muscle cells derived from abdominal aortic aneurysms compared to the adjacent inferior mesenteric artery. *J Surg Res* 2000 July;92(1):85-95.
- (32) Simper D, Mayr U, Urbich C et al. Comparative proteomics profiling reveals role of smooth muscle progenitors in extracellular matrix production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010 July;30(7):1325-32.
- (33) Stenbaek J, Kalin B, Swedenborg J. Growth of thrombus may be a better predictor of rupture than diameter in patients with abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000 November;20:466-9.
- (34) Allaire E, Forough R, Clowes MM, Starcher B, Clowes AW. Local overexpression of TIMP-1 prevents aortic aneurysm degeneration and rupture in a rat model. *J Clin Invest* 1998;102:1413-20.

- (35) Allaire E, Hasenstab D, Kenagy RD, Starcher B, Clowes MM, Clowes AW. Prevention of aneurysm development and rupture by local overexpression of plasminogen activator inhibitor-1 [see comments]. *Circulation* 1998 July 21;98:249-55.
- (36) Mirza A, Hyvelin JM, Rochefort GY, Lermusiaux P, Antier D, Awede B, Bonnet P, Domenech J, Eder V. Undifferentiated mesenchymal stem cells seeded on a vascular prosthesis contribute to the restoration of a physiological vascular wall. *J Vasc Surg* 2008;47(6):1313-21
- (37) Bartosh TJ, Ylostalo JH, Mohammadipoor A et al. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 August 3;107(31):13724-9.
- (38) Strauer BE, Brehm M, Zeus T et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002 October 8;106:1913-8.
- (39) Assmus B, Schachinger V, Teupe C et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002 December 10;106(24):3009-17.
- (40) Bel A, Messas E, Agbulut O et al. Transplantation of autologous fresh bone marrow into infarcted myocardium: a word of caution. *Circulation* 2003 September 9;108 Suppl 1:II247-II252.
- (41) van Laake LW, Vainas T, Dammers R, Kitslaar PJ, Hoeks AP, Schurink GW. Systemic dilation diathesis in patients with abdominal aortic aneurysms: a role for matrix metalloproteinase-9? *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005 April;29:371-7.

RESUME

L'athérosclérose et la pathologie anévrysmale sont principalement caractérisées par un remodelage de la paroi artérielle au cours de leur évolution. Ce travail a examiné un aspect de la destruction de la paroi artérielle à travers l'étude de la métalloprotéase MMP-14 au cours de l'athérome et un aspect de reconstruction artérielle à travers l'étude d'une thérapie cellulaire d'un modèle d'Anévrysme de l'Aorte Abdominale (AAA) par Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSMs).

En utilisant un modèle de greffe de Moëlle Osseuse (MO) dans des souris *Ldlr^{-/-}*, nous avons montré que la délétion d'expression de MMP-14 dans les cellules issues de la MO provoquait une accumulation de collagène interstitiel dans la plaque athéromateuse sans modification de la composition cellulaire ni variation de taille. Une mesure de l'activité collagénolytique par substrat fluorescent a confirmé que la délétion en MMP-14 chez les macrophages provoquait une baisse de l'activité collagénolytique. Cette activité est indépendante de l'activité MMP-2 et MMP-8 et pourrait être médiée partiellement par l'activation de MMP-13.

Nous avons mis en évidence la présence de CSMs à la surface luminale de thrombus de AAA et nous avons montré une diminution significative des CSMs circulantes chez des patients porteurs de AAA. Nous avons pu stabiliser la croissance de AAA expérimentaux chez le rat à partir de xéno greffe artérielle par perfusion endoluminale de CSMs. La perfusion de CSMs provoquait une diminution de l'inflammation à court terme et favorisait la reconstruction artérielle par accumulation de collagène et d'élastine à moyen terme.

En conclusion, l'activité collagénolytique de MMP-14 est un des mécanismes moléculaires possibles de l'évolution de la plaque athéromateuse par rupture de plaque. Elle ouvre la perspective d'une nouvelle approche thérapeutique et pourrait être une cible comme substrat pour une imagerie fonctionnelle de la plaque athéromateuse. L'évolution de la maladie anévrysmale pourrait être secondaire à une altération des systèmes de réparation tissulaire dont les CSMs seraient des acteurs clé. La perfusion endoluminale des CSMs dans un modèle expérimental a permis la restauration de ces systèmes de réparation tissulaire et ouvre la perspective d'un nouvel outil thérapeutique contre les AAA.

Mots-clés : Athérome - MMP-14 (MT1-MMP) - Thérapie cellulaire - Cellules Souches Mésoenchymateuses - Anévrysme