



HAL
open science

Rôle du CD31 dans l'issu des lésions tissulaires cardiovasculaire aiguës

Varouna Syvannarath

► **To cite this version:**

Varouna Syvannarath. Rôle du CD31 dans l'issu des lésions tissulaires cardiovasculaire aiguës. Médecine humaine et pathologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2019. Français. NNT : 2019US-PCC081 . tel-03033049

HAL Id: tel-03033049

<https://theses.hal.science/tel-03033049>

Submitted on 1 Dec 2020

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
de l'Université Sorbonne Paris Cité

Préparée à l'Université Paris Diderot

École doctorale 562 – BioSPC

Laboratory for Vascular Translational Science (Inserm U1148)

Rôle du CD31 dans l'issue des lésions tissulaires
cardiovasculaires aiguës

Par Varouna Syvannarath

Thèse dirigée par Giuseppina Caligiuri

Soutenue publiquement à Paris le 3 Juillet 2019 devant un jury composé de :

Président	Dr. Jean-Sébastien Silvestre	PARCC, Inserm UMR_S970
Rapporteur	Pr. Bijan Ghaleh-Marzban	IMRB, Inserm U955
Rapporteur	Pr. Renaud Tissier	ENVA/IMRB, Inserm U955
Examineur	Dr. Stéphane Potteaux	PARCC, Inserm UMR_S970
Examineur	Dr. Delphine Baetz	Université Lyon 1, Inserm U1060
Directeur de thèse	Dr. Giuseppina Caligiuri	LVTS, Inserm U1148
Invitée	Dr. Patricia Sansilvestri-Morel	Institut de Recherches Servier

Mes travaux de thèse ont été menés au sein du laboratoire :

Inserm U1148, Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS)

Équipe 1, « Cardiovascular Immunobiology »

Hôpital Bichat-Claude Bernard

46 rue Henri Huchard

75018 Paris

FRANCE

Mes travaux de thèse ont été financés par les Laboratoires de Recherches Servier :

Institut de Recherches Servier

Unité Cardiovasculaire

11 Rue des Moulineaux

92150 Suresnes

FRANCE

Résumé

Le CD31, aussi appelé PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) est une glycoprotéine transmembranaire de 130 kDa comprenant 6 domaines de type « immunoglobuline » dans sa portion extracellulaire et deux motifs « ITIM » (Immunoreceptor Tyrosine based Inhibition Motif, qui recrutent des phosphatases) dans sa queue cytoplasmique. De par sa nature trans-homophile et son expression exclusive et constitutive par les cellules endothéliales, les plaquettes et les leucocytes, le CD31 joue un rôle central dans les mécanismes de régulation des cellules interagissant au niveau de l'interface sang-vaisseaux.

L'engagement de ses motifs ITIMs favorise les voies de signalisation phosphatase-dépendantes alors que la signalisation tyrosine/inositol-dépendante se retrouve découplée. Ainsi, l'effet inhibiteur ou activateur du CD31 dépend de la nature de la cellule et du rôle des phosphatases recrutées par le CD31 dans chaque type cellulaire : l'engagement éphémère du CD31 par les cellules circulantes exerce un effet plutôt « inhibiteur » en provoquant le détachement cellulaire et l'élévation de seuil d'activation des plaquettes et des leucocytes alors qu'à l'inverse, son engagement pérenne aux niveau des jonctions des cellules endothéliales, stablement ancrées sur leur membrane basale et enchaînées entre elles, est essentiel pour assurer la survie et les fonctions physiologiques de l'endothélium.

La régulation des interactions entre endothélium, plaquettes, et leucocytes par le CD31 pourrait être particulièrement importante au cours des réponses biologiques qui se mettent en place suite à une lésion du système cardiovasculaire.

Pour évaluer cette hypothèse, j'ai étudié au cours de ma thèse le rôle du CD31 dans l'issue des lésions dues à la dissection de l'aorte et à l'ischémie reperfusion myocardique, deux conditions cliniques aiguës comportant un risque vital élevé non seulement dans l'immédiat mais aussi à distance, si le remodelage tissulaire n'est pas approprié. Mes travaux ont montré que la fonction du CD31 est importante dans l'issue des lésions cardiovasculaires aiguës : non seulement elle favorise le retour à l'homéostasie dans la microcirculation pour garantir la perfusion du tissu lésé mais elle contribue activement à la réparation tissulaire, en favorisant l'acquisition d'un phénotype réparateur par les leucocytes infiltrés aux sites de lésion.

En effet, dans le cas de la dissection aortique, nos résultats montrent que la fonction du CD31 est cruciale pour permettre la résorption rapide de l'hématome et la formation d'une cicatrice riche en collagène au niveau de la lésion artérielle permettant ainsi de prévenir l'évolution anévrysmale et le risque de rupture de l'aorte. Dans le cas de l'infarctus du myocarde faisant suite à une séquence d'ischémie reperfusion, l'efficacité des procédures de

recanalisation, aussi promptes soient-elles, dépend du rétablissement de la circulation microvasculaire. En effet, la survie de chaque fibre musculaire cardiaque va dépendre de son propre capillaire. Chez des souris déficientes en CD31, nous avons constaté que la réponse des plaquettes, des leucocytes, et de l'endothélium au sein même de la microcirculation de l'infarctus est inappropriée. Ainsi, en l'absence de CD31, la dysfonction des éléments sanguins interagissant avec l'endothélium dans la microcirculation prévient la reperfusion à l'échelle tissulaire. Ce phénomène, connu comme le « *no-reflow* », correspond à une absence de reperfusion microvasculaire malgré la réouverture de l'artère occluse et se traduit par un élargissement de la nécrose myocardique.

L'ensemble des résultats de mon travail de thèse indique que les fonctions régulatrices du CD31 jouent un rôle particulièrement déterminant dans l'issue des lésions aiguës du système cardiovasculaire, où les contraintes hémodynamiques rendent d'autant plus difficile et urgente la réparation tissulaire.

Mots-clés : lésions tissulaires aiguës ; lésions cardiovasculaires aiguës ; CD31 ; dissection aortique ; ischémie-reperfusion myocardique ; no-reflow ; in vivo

Abstract

CD31 also called PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) is a 130-kDa single pass transmembrane glycoprotein composed of 6 extracellular Ig-like domains and a cytoplasmic tail with two ITIMs motifs (Immunoreceptor Tyrosine based Inhibitory Motifs). CD31 is a trans-homophilic co-signaling receptor expressed exclusively and constitutively by endothelial cells, platelets, and all leukocytes, on which it plays a crucial role in the regulation of the cell-cell crosstalk at the blood-vessel interface.

Upon sequential phosphorylation, the two ITIMs of CD31 promote phosphatase-dependent signaling pathways whereas tyrosine/inositol-dependent pathways are uncoupled. Thus, the net activator or inhibitor effect of CD31 engagement depends on cell type. Within the circulation, the iterative but transient CD31-CD31 interactions drive a mutual cell-cell detachment signal and raise the activation threshold of circulating CD31+ cells, thus acting as a negative co-signaling receptor on platelets and leukocytes. The case is different for the endothelial cells, which adhere on their basal membrane and establish permanent CD31-CD31 interactions at their lateral borders. Here, the SH2 phosphatase-mediated pathways activated by the trans-homophilic interaction of CD31 molecules solicited at the cell-cell junctions of adherent endothelial cells is crucial for their survival and their physiologic functions.

Altogether, the regulation of endothelial, platelet, and leukocyte cell-cell interactions provided by CD31 could be important during the biological responses that develop following acute tissue injuries, which involve a complex sequence of endothelial, platelet and leukocyte interaction. Due to its distribution at the blood vessel interface and its holistic mode of action, including the ability to sense and translate mechanic stimuli, CD31 could become essential for the repair processes of acute lesions affecting specifically the cardiovascular tissues.

My thesis work focused on the role played by CD31 in the outcome of arterial (aortic dissection) and cardiac (myocardial ischemia reperfusion) acute lesions, two life-threatening acute clinical conditions carrying a long term bad outcome in survivors, if the post-lesional tissue remodeling is not appropriate. The clinical, experimental, and translational data obtained during my PhD training suggest that the loss of CD31, which occurs upon cell activation, is deleterious whereas the use of agents able to maintain CD31 co-signaling functions can significantly improve the outcome of acute cardiovascular injuries.

By allowing the occurrence of an effective perfusion upon coronary recanalization, the function of CD31 appears crucial for the repair of the heart subjected to revascularization after a long period of ischemia. The absence of CD31 in KO mice led to an inappropriate response of platelets, leukocytes, and endothelium within the microcirculation and enlargement of the necrotic area. The dysfunction of the microcirculation where blood cells stick to the pathologically activated endothelium that we observed in CD31 KO mice is known as "no-reflow" and corresponds to an absence of microvascular reperfusion despite the re-opening of the occluded artery and results in an enlargement of the necrosis zone. The increase of the no-reflow phenomenon driven by the genetic deficiency of CD31 can explain the greater infarction observed in CD31 KO mice because the survival of each cardiomyocyte depends on the perfusion of the associated capillary (ratio 1:1 in the heart).

In the case of aortic dissection, our results show that the function of CD31 is crucial to allow rapid resorption of the hematoma and the formation of a collagen-rich scar in the arterial lesion thus preventing aneurysmal evolution and the risk of rupture of the aorta.

The beneficial action of CD31 in the repair of the injured arterial wall appeared to be mediated, at least in part, by the effect of CD31 engagement on the control of the inflammatory response, since a reduced neutrophil mobilization, and an accelerated switch of pro-inflammatory monocytes-macrophages to the pro-reparative phenotype was observed at the site of lesion as well as in the systemic circulation of mice treated with a CD31 agonist.

Thus, the regulatory co-signaling functions exerted by CD31 seem to play a crucial role in determining the outcome of acute lesions of the cardiovascular system, where the high hemodynamic stress makes the tissue repair even more difficult and urgent than anywhere else in the body.

Keywords : acute cardiovascular injuries; CD31; acute aortic dissection; acute myocardial ischemia-reperfusion; no-reflow; in vivo

Remerciements

Je souhaite d'abord remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Je remercie le Docteur *Jean-Sébastien Silvestre* d'avoir accepté d'être le président de mon jury.

Un immense merci aux rapporteurs, le Professeur *Renaud Tissier* et le Professeur *Bijan Ghaleh-Marzban*, pour avoir pris le peu de temps que je leur ai donné pour examiner mon manuscrit ! Je vous remercie de tout cœur pour votre compréhension ainsi que pour vos conseils avisés.

Merci au Docteur *Delphine Baetz* et au Docteur *Stéphane Potteaux* qui ont gentilement accepté mon invitation à participer à ce jury de thèse en tant qu'examineur.

Un grand merci au Docteur *Patricia Sansilvestri-Morel* pour sa bienveillance tout au long de cette thèse et ceci jusqu'à sa fin. J'ai conscience que de devoir diriger une personne à distance n'est pas chose facile, et je ne pense pas avoir fait exception à la règle ! Néanmoins tu as toujours été présente et disponible pour moi et je t'en remercie.

Je tiens également à remercier les directeurs d'unité qui se sont succédés au cours de mes années passées au sein du laboratoire. Merci au Docteur *Jean-Baptiste Michel* qui m'a accueilli alors que l'unité portait encore le nom d'Inserm U698. Je ne vous remercierai jamais assez pour votre soutien et votre franc-parler (qu'on aime ou pas !). Ce doux surnom de « Varrrrroun !! » (et non « Warum » !) résonnera toujours dans mon esprit et cela va particulièrement me manquer, je dois bien me l'avouer !

Merci au Docteur *Didier Letourneur*, actuel directeur de l'unité Inserm U1148 pour son accueil (et accessoirement pour avoir été mon capitaine d'équipe du fameux tournoi interne de pétanque de l'unité !). Un grand merci également à *Tony*, actuel co-directeur d'unité mais anciennement chef d'équipe. Merci pour ton accueil au sein de ton équipe. Une équipe que tu as su faire grandir et pour laquelle tu donnes de ta personne et de ton temps d'une façon inconditionnelle ! Je te suis très reconnaissante pour tout cela.

Un immense merci à *Pina*, ma directrice de thèse ! Merci pour tout, pour cette opportunité en or que tu m'as offerte ! Je ne te remercierai jamais assez pour la confiance que tu m'as accordé et surtout pour toute la patience dont tu as fait preuve avec moi ! Ta vision des projets scientifiques et ta façon de les aborder sont hors pair ! J'ai énormément appris à tes côtés et je tiens sincèrement à te remercier pour cet apprentissage unique. Une nouvelle aventure t'attend avec Tridek-One et j'espère tu rencontreras tout le succès souhaité !

Merci également à l'ensemble de l'équipe du 4^{ème}. Vous avez chacun à votre façon contribué à cette thèse donc un grand merci à vous tous pour ces 3 années :

Guillaume, tu as été mon 1^{er} contact au sein de l'équipe du 4^{ème}. C'est toi qui m'a formé pour le modèle (que j'ai amélioré ! ...), aidé à prendre mes marques dans cette équipe, aidé lorsque j'en ai eu besoin, a répondu à toutes mes questions, mes interrogations... et toujours avec une énergie (parfois trop d'énergie !) et une gentillesse qui te caractérise. Tu fais partie des personnes qui ont été indispensables à cette thèse. Et pas qu'à la mienne ! Tu constitues réellement l'un des piliers de l'équipe (sans compter ce que tu fais pour les autres personnes du laboratoire en général) et je ne te remercierai jamais assez ! Je ne peux te souhaiter que le meilleur pour la suite !

Alexia, merci pour ton franc-parler qui te définit tellement. Cette équipe n'aurait sans doute pas été la même sans toi. Je t'avoue que j'envie ta passion pour la recherche et ta façon d'expliquer et d'enseigner les choses aux gens. Je te souhaite bon courage pour ces derniers mois de thèse et pour la suite !

Julie, ma voisine de bureau ! Je dois bien avouer que nos petits moments « Bbbbb***tch !!! » m'ont bien manqué après ton départ pour Sanofi ! Sans compter toutes tes expressions inimaginables et inexistantes. Tu pourrais écrire à toi seule un dictionnaire ! Tu seras la dernière thésarde après mon départ et celui d'*Alexia*, donc je compte sur toi pour nous représenter jusqu'au bout ! Mais je ne m'inquiète pas pour toi, tu seras « on the fleex ! ».

Greg, je tiens à te reféliciter pour ton concours, tu le mérites ! Je pense que tu es quelqu'un qui peut et qui va beaucoup apporter au reste de l'équipe pour ces prochaines années. Merci pour ton calme, tu as une certaine forme de sagesse que j'apprécie beaucoup chez toi et je tiens à te remercier pour ces discussions qu'on a pu avoir.

Kevin, tu es l'une des personnes emblématiques du 4^{ème} ! Cet étage serait bien vide sans toi et sans tes blagues les plus sales et borderline, mais tellement marrantes ! Sache que je ne mange plus aucun McDo sans avoir une petite pensée pour toi maintenant.

Marie, merci pour m'avoir guidé avec les souris CD31 ! Souris que tu as dû (malheureusement ?) récupérer avant mon arrivée et que tu récupères maintenant encore après mon départ (désolée ! ...).

Merci aussi à *Jamila* pour sa bienveillance et sa gentillesse, à *Anh* pour l'animalerie et tous les accouplements inimaginables qu'on a dû te faire faire, à *Marion* pour les marquages et à la microscopie, sans oublier bien évidemment *Lele* et *Benoît* qui m'ont été d'une aide précieuse avec les souris !

Je tiens également à remercier tout particulièrement le Docteur *Marc Isabelle* pour ses conseils, sa rigueur, ses connaissances et son expertise dans le domaine de l'*in vivo*. Malgré la distance et l'avancé du projet, tu as toujours été disponible et présent. Je pensais avoir une certaine rigueur en matière d'expérimentation animale, mais j'ai appris à en avoir encore plus. Donc merci pour ces trois années.

Merci au Docteur *Lucie Peduto* et au Docteur *Selene Di Carlo* pour leur aide si précieuse pour ces expériences de cytométrie ! Je vous remercie pour votre chaleureux accueil au sein de votre équipe à l'Institut Pasteur. Même si je dois avouer que prendre les transports avec des animaux est une chose périlleuse, cela a été un réel plaisir de venir travailler dans un laboratoire aussi calme que le votre !

Merci également au Docteur *Brigitte Escoubet* qui a pris le peu de temps qu'elle avait pour m'initier à l'échographie cardiaque. La formation était stricte mais toujours juste. Cela a été un réel honneur et plaisir d'avoir appris à vos côtés !

Tous mes remerciements les plus sincères et profonds vont également au reste de l'unité INSERM U1148 qui d'une certaine façon ont également contribué à cette thèse, que ce soit par une petite attention ou discussion. Je n'aurai probablement pas d'autres occasions pour vous remercier, j'en profite donc pour le faire ici : *Adrian Brun, Jean-Philippe Desilles, Véronique Ollivier, Martine Jandrot-Perrus, Marie-Christine Bouton, Yacine Boulaftali, Catherine Deschildre, Emilie Monnet, Matthieu Cauchois, Carine LeGoff, Mathilde Varret, Cédric Chauvierre...*

Je tiens à remercier infiniment le Docteur *Benoît Ho-Tin-Noé* ! Je te dois beaucoup et je t'en remercie ! Je me souviendrai toujours de mon stage de M1 durant lequel on devait se partager un morceau de ton bureau avec Amena. Tu avais déjà une stagiaire et tu as quand même accepté de me prendre en supplément. Mille mercis pour ta confiance ainsi que pour la formation exceptionnelle que j'ai pu avoir à tes côtés ! Ce goût pour l'expérimentation animale et ce savoir-faire que j'ai pu développer au fil des années, c'est à toi que je le dois, donc merci !

Un merci particulier pour tous les anciens membres du laboratoire, étudiants ou autres, vous avez tous contribué à ce que ce laboratoire soit un lieu où il fait bon de travailler. D'une certaine façon vous avez vous aussi contribué à ma formation, donc j'aimerais vous en remercier (l'ordre n'a aucune importance): Liliane, Kamel, Angèle, Sophie, Marie-Anne, Richard, Francesco, Hadidja, Asma, Hanine...

Merci aux **BCP** (Davy, Fatou, Samira, Shina, Kobi, Camille et Marie - maintenant éparpillé dans les quatre coins de la Terre, mais toujours là malgré tous ces déménagements !) pour m'avoir porté et soutenu jusqu'à la fin de cette thèse ! Vous savez que ces derniers moments de thèse ont été laborieux pour moi et grâce à vos vécus (ou non !) différents de la thèse, vous m'avez encouragé jusqu'au bout. Je suis la bonne dernière de la bande à boucler la boucle des thèses (enfin ! ...) et je suis très contente de pouvoir partager ce moment avec vous ! Du chemin a été parcouru depuis l'épisode des « mitocell » et j'espère qu'on ne s'arrêtera pas là !

Un grand merci également à ma famille pour leur soutien jusqu'aux derniers instants et surtout pour leur patience ! Vous comprenez peut-être un peu mieux pourquoi je passais certains de mes week-end au laboratoire à venir prendre soin de mes souris plutôt que de faire des repas de famille ou des week-end avec vous !

Enfin, comme on le dit, le meilleur pour la fin. Je tiens à remercier infiniment et du plus profond de mon cœur chacun des membres du **Crouscous** (*Sandrine, Devy et Clément*) ! Merci infiniment pour ces années au sein du laboratoire sans vous cette thèse n'aurait vraiment pas été la même. Vraiment je tiens à vous remercier pour tout ! Pour le quotidien au laboratoire mais aussi en dehors du laboratoire (les calling, les « festivaux » et j'en passe !). Ces quelques lignes ne suffiront jamais à vous dire à quel point je vous remercie et à quel point votre présence au quotidien était essentielle au déroulement de cette thèse. Je pense vraiment que chaque étudiant en thèse devrait avoir son Crouscous et je pense réellement que je ne serai pas allée bien loin sans vous. Donc un immense merci pour ces années et j'espère que la fin de cette thèse ne signe pas la fin de nos aventures !

Table des matières

RESUME	4
ABSTRACT	7
REMERCIEMENTS	10
TABLE DES MATIERES	15
LISTE DES ABREVIATIONS	17
LISTES DES FIGURES	19
LISTE DES TABLEAUX	21
AVANT-PROPOS	22
INTRODUCTION	25
I. CD31	27
I.1. STRUCTURE DU CD31	27
I.2. ENGAGEMENT ET VOIES DE SIGNALISATION DU CD31	28
I.3. FONCTIONS CELLULAIRES DU CD31	30
I.3.a. CD31 et cellules endothéliales	31
I.3.b. CD31 et leucocytes	33
I.3.c. CD31 et plaquettes	34
I.4. CLIVAGE DU CD31 : LE P8RI COMME PEPTIDE AGONISTE	35
I.4.a. Clivage du CD31	35
I.4.b. P8RI : agoniste peptidique du CD31	36
II. LESION ARTERIELLE AIGUË : DISSECTION AORTIQUE	39
II.1. STRUCTURE DE L'AORTE	39
II.2. DISSECTION AORTIQUE	41
II.2.a. Définition et classifications	41
II.2.b. Épidémiologie et facteurs de risque	44
II.2.c. Importance de la biomécanique dans la dissection aortique	44
II.2.d. Traitements actuels	46
II.3. L'ISSUE DE LA DISSECTION AORTIQUE DEPEND DE LA REPARATION TISSULAIRE	47
II.3.a. Importance de la matrice extracellulaire	47
II.3.b. Rôle du CD31 dans la régulation des macrophages	49
II.3.c. Description du modèle de dissection aortique expérimentale : perfusion d'Angiotensine II (Ang II) chez la souris ApoE ^{-/-}	50
III. LESION CARDIAQUE AIGUË : INFARCTUS DANS L'ERE DE LA REPERFUSION	51
III.1. PERFUSION DU MUSCLE CARDIAQUE	51
III.2. ISCHEMIE-REPERFUSION MYOCARDIQUE	53
III.2.a. Définition	53
III.2.b. Epidémiologie et facteurs de risque	53
III.2.c. Mécanismes physiopathologiques	54
III.3. LA RECANALISATION CORONAIRE EPICARDIQUE N'EST PAS SYNONYME DE REPERFUSION MYOCARDIQUE : LE PHENOMENE DE « NO-REFLOW »	63
III.3.a. Définition	63

III.3.b. Physiopathologie du « <i>no-reflow</i> »	63
III.3.c. Une nouvelle cible thérapeutique : le « <i>no-reflow</i> »	65
III.4. ROLE DU CD31 DANS LA REPARATION TISSULAIRE APRES UNE ISCHEMIE REPERFUSION DU MYOCARDE : RATIONNEL	66
OBJECTIFS DE LA THESE	68
RESULTATS EXPERIMENTAUX	69
I. PARTIE 1 : ROLE DU CD31 DANS L'ISSUE DES DISSECTIONS AORTIQUES (ANNEXE I)	71
I.1. CONTEXTE	71
I.2. RESULTATS	73
I.2.a. Etude du CD31 en rapport avec le phénotype macrophagique aux sites de dissection aortique chez l'homme	73
I.2.b. L'absence du CD31 accentue le phénotype pro-inflammatoire des macrophages <i>in vitro</i>	76
I.2.c. La stimulation de la voie de signalisation du CD31 par le P8RI favorise la polarisation des macrophages vers un phénotype pro-réparateur <i>in vitro</i>	77
I.2.d. Le potentiel thérapeutique du P8RI dans un modèle murin de dissection aortique : augmentation du dépôt de collagène et prévention de l'évolution anévrysmale	78
I.2.e. L'effet pro-réparateur du P8RI est associé à une réduction de la réponse inflammatoire et une polarisation M2 des macrophages associés à la lésion aortique	81
I.3. CONCLUSION	82
II. PARTIE 2 : ROLE DU CD31 DANS L'ISSUE DES LESIONS MYOCARDIQUES DUES A L'ISCHEMIE REPERFUSION	85
II.1. CONTEXTE	85
II.2. RESULTATS	88
II.2.a. Etude préliminaire	88
II.2.b. L'absence de CD31 augmente la taille de l'infarctus <i>in vivo</i>	99
II.3. CONCLUSION	107
DISCUSSION	109
I. CONSIDERATIONS TECHNIQUES : CHOIX DES MODELES ANIMAUX	113
I.1. MODELE DE DISSECTION AORTIQUE PAR PERFUSION D'ANGIOTENSINE II CHEZ LES SOURIS ApoE ^{-/-}	113
I.2. MODELE D'ISCHEMIE REPERFUSION MYOCARDIQUE PAR OCCLUSION DE L'ARTERE CORONAIRE GAUCHE	115
II. FONCTIONS DU CD31 A LA PHASE AIGUË DES PATHOLOGIES CARDIOVASCULAIRES : UNE MOLECULE D'ADHERENCE, UN CO-RECEPTEUR TRANS-HOMOPHILE OU UN MECANORECEPTEUR ?	118
II.1. MODULATEUR DE LA REPOSE MACROPHAGIQUE	118
II.2. REGULATION DE L'AGREGATION CELLULAIRE DANS LES MICROVAISSEAUX	120
II.3. MECANORECEPTION : UNE SPECIFICITE DANS LE SYSTEME CARDIOVASCULAIRE	121
II.4. LES ECHECS THERAPEUTIQUES ET LES DEFIS THERAPEUTIQUES ACTUELS	124
III. LE CD31 COMME CIBLE THERAPEUTIQUE	126
CONCLUSION GENERALE	128
BIBLIOGRAPHIE	130
ANNEXES	144

Liste des abréviations

AAA	Anévrisme de l'Aorte Abdominale
ACC/AHA	American College of Cardiology/American Heart Association
ADAM	A Desintegrin And Metalloprotease
AIF	Apoptosis Inducing Factor
Ang II	Angiotensine II
ApoE	Apolipoprotéine E
Arg-I	Arginase-I
AAR	Area At Risk – Aire à risque
B- et TCR	B- et T-Cell Receptor
CE	Cellule Endotheliale
CEC	Circulation Extra-Corporelle
CML	Cellule Musculaire Lisse
CRP	Collagen Related Peptide
DAMPs	Damage-Associated Molecular Patterns
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
ICAM-1	InterCellular Adhesion Molecule-1
IFN γ	Interferon gamma
Ig	Immunoglobuline
IHC	Immunohistochemistry
IL	Interleukine
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase - Oxyde Nitrique Synthase Inductible
IRAD	Registre International de Dissections Aortiques Aiguës
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif
IVA	Artère interVentriculaire Antérieure
KO	Knock-Out
LPS	Lipopolysaccharide
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
MEC	Matrice ExtraCellulaire
mPTP	Mitochondrial Permeability Transition Pore - Pore de Transition de Perméabilité Mitochondriale
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide PhosphHate

NK	Natural Killer
NO	Nitric Oxide – Monoxide d'azote
NRG-1	Neureguline-1
NZ - ZN	Necrotic Zone – Zone Nécrotique
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (CD31)
PLC γ 1	Phospholipase C γ 1
PRRs	Pattern Recognition Receptor
PTK	Protein Tyrosine Kinase
PTP	Protein Tyrosine Phosphatase
r-tPA	recombinant-Tissue Plasminogen Activator
RGD	Arginie-Glycine-Aspartic
ROS - ERO	Reactive Oxygen Species – Espèces réactives à l'Oxygène
RS	Réticulum Sarcoplasmique
RyR-2	Récepteur à la Ryanodine-2
SFK - Src	Src Family Kinases
SH2	Src Homology 2 domain
SHIP-1	SH2-containing Phosphatidylinositol-5'-phosphatase-1
SHP-1/2	SH2-containing Phospho-Tyrosine phosphatase-1/2
Src- SFK	Sc Family Kinase
Syk	Spleen Tyrosine Kinase
t-PA	tissue-Plasminogen Activator
TCM	Trichrome de Masson
TGF- β	Transforming Growth Factor-bêta
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence (microscopy)
TNF α	Tumor Necrosis Factor alpha
TTC	Chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium
WT	Wild-Type

Listes des figures

Figure 1. Le CD31.....	28
Figure 2. Activation du CD31.....	30
Figure 3. Fonctions du CD31 au niveau des cellules endothéliales vasculaires (jonctions latérales).....	32
Figure 4. Structure du P8RI.....	38
Figure 5. Représentation schématique de l'organisation de la paroi artérielle saine.	39
Figure 6. Anatomie de l'aorte thoracique et abdominale.	41
Figure 7. Représentation schématique d'une dissection aortique.....	42
Figure 8. Classification anatomique des dissections aortiques.....	43
Figure 9. Circulation coronarienne.	53
Figure 10. Physiopathologie de l'ischémie myocardique.	56
Figure 11. Mécanismes responsables de la surcharge calcique intracellulaire au cours de la reperfusion.....	58
Figure 12. Physiopathologie de la reperfusion myocardique.	60
Figure 13. Représentation schématique des différents mécanismes impliqués dans le phénomène de <i>no-reflow</i>	65
Figure 14. Mise en évidence du phénotype macrophagique au site de lésion chez des souris.....	75
Figure 15. Schéma de synthèse du rôle de la signalisation du CD31 dans l'issue des dissections aortiques.....	83
Figure 16. Modèle d'ischémie reperfusion myocardique par occlusion de l'artère coronaire gauche.	89
Figure 17. Représentation de la construction génétique.....	91
Figure 18. La réponse inflammatoire post-ischémique : détruire, nettoyer et construire.	93
Figure 19. Représentation schématique de la méthode de quantification de l'AAR et de la taille de l'infarctus.	95
Figure 20. Exemple de délimitation des différentes zones du myocarde pour une analyse quantitative de l'AAR et de la zone nécrotique sur le logiciel ImageJ.	96
Figure 21. Protocole expérimental de l'étude préliminaire.....	97
Figure 22. Représentation de l'aire à risque (AAR) par rapport au ventricule gauche (VG).	98

Figure 23. Taille de la zone nécrotique (ZN) par rapport à l'AAR.	99
Figure 24. Quantification de la taille de l'infarctus.....	100
Figure 25. Mise en évidence d'agrégats plaquettes/globules rouges au sein de l'infarctus chez des souris CD31 KO.....	101
Figure 26. Analyse quantitative par cytométrie en flux des agrégats leucocyto- plaquettaires.	102
Figure 27. Analyse par cytométrie en flux du phénotype leucocytaire au sein des cœurs infarcis.....	104
Figure 28. Recrutement de la population neutrophilaire.....	105
Figure 29. Recrutement monocytaire.	106

Liste des tableaux

Tableau 1. Tableau récapitulatif des fonctions cellulaires du CD31.....	35
Tableau 2. Pharmacocinétique du P8RI chez la souris.....	38
Tableau 3. Formulation sanguine et analyse des biomarqueurs plasmatiques rénaux et cardiaques.	79
Tableau 4. Tableau récapitulatif de l'effectif total de souris de l'étude préliminaire.	98
Tableau 5. Comparaisons des caractéristiques histologiques de la pathologie anévrismale humaine à celles des modèles animaux.	114
Tableau 6. Présentations des différences majeures entre les modèles animaux et les patients présentant un infarctus du myocarde aiguë.	117

Avant-propos

Les lésions tissulaires aiguës représentent un défi constant dans le vivant, face à des stress multiples (de nature mécanique, chimique, biologique) et variablement combinés dans l'espace et avec le temps. L'issue de chaque lésion tissulaire est déterminante pour que l'organisme maintienne ses fonctions physiologiques ou bascule dans la pathologie.

Heureusement, notre propre organisme montre une formidable capacité à se « réparer ». L'étude des phénomènes biologiques qui conduisent à la « réparation tissulaire » dans les suites d'une lésion aiguë a permis de faire un peu de lumière sur les processus extraordinairement bien réglés et en même temps très complexes qui constituent l'essence même du remodelage perpétuel du vivant.

Très peu de tissus maintiennent une véritable capacité de régénération (c'est le cas des gencives) et le plus souvent la réparation des lésions tissulaires donne lieu à la formation de « cicatrices », plus ou moins appropriées pour le maintien des fonctions de l'organe lésé.

La régulation du dialogue entre les différentes cellules impliquées dans la réparation tissulaire est indispensable pour que les étapes de la réparation tissulaire - hémostase, inflammation, résolution de l'inflammation et genèse d'un nouveau tissu - se suivent de façon harmonieuse.

Surtout, on le sait, un temps de repos est indispensable pour guérir ! Le défi est alors particulièrement difficile pour les tissus des organes qui bougent comme les muscles, les poumons, les côtes... et devient presque mission impossible pour le système cardiovasculaire, en perpétuel révolution à chaque cycle cardiaque.

Dans ce contexte nous avons souhaité étudier le rôle du co-récepteur CD31 ou PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) parce que, de par sa nature trans-homophile et son expression constitutive à la surface des cellules endothéliales, plaquettes, et leucocytes, il pourrait assurer des fonctions cruciales dans la régulation intercellulaire des signaux biologiques impliqués dans les différentes étapes de la réparation tissulaire (activation des plaquettes, extravasation des leucocytes, inflammation locale, résolution de l'inflammation, angiogenèse...). De plus, le CD31 est également très important dans la régulation des signaux mécaniques et pourrait donc assumer un rôle encore plus important dans la réparation des tissus en perpétuels mouvement.

Hypothèses de travail :

1) En régulant l'interaction entre plaquettes, leucocytes et cellules endothéliales, le CD31 pourrait jouer un rôle clé dans la prévention de la formation d'agrégats microvasculaires au moment de la revascularisation des organes ischémiés ;

2) En régulant l'extravasation et la réponse des leucocytes infiltrés aux sites de lésion, le CD31 pourrait contribuer substantiellement à contenir les dégâts liés à la phase inflammatoire et à favoriser sa résolution pour assurer le passage à la dernière étape de la réparation.

Objectifs et stratégies :

En utilisant des modèles animaux transgéniques et des molécules agonistes du CD31, au cours de ma thèse, j'ai en particulier étudié le rôle du CD31 dans l'issue de la revascularisation, essentielle pour entamer la cascade des processus impliqués dans la réparation des organes perfusés, et de la phase inflammatoire au cours d'un infarctus du myocarde ainsi que dans le passage de la phase inflammatoire à la phase réparative à l'issue de la dissection aortique.

Introduction

I. CD31

Le CD31, aussi appelé PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) est une protéine de 130 kDa appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Ig). Il est exclusivement et constitutivement exprimés par toutes les cellules hématopoïétiques (plaquettes, neutrophiles, macrophages, éosinophiles, basophiles, mastocytes, les cellules Natural Killer (NK) ainsi que les lymphocytes B et T), ainsi que par les cellules endothéliales, à l'exception des globules rouges (Stockinger, Gadd et al. 1990).

Initialement classé comme une molécule d'adhérence, du fait de sa concentration élevée au niveau des jonctions cellules-cellules des cellules endothéliales ainsi que par sa structure extracellulaire qui ressemble à celle des molécules d'adhérence (Newman, Berndt et al. 1990), le CD31 a été décrit comme étant impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques comme la transmigration des leucocytes, l'activation des plaquettes ou encore l'angiogenèse. Cependant, l'interprétation des premiers travaux doit être revue suite aux nombreuses études biochimiques et fonctionnelles qui ont mis en évidence ses propriétés de récepteur de co-signalisation globalement « inhibitrices », liées aux deux motifs ITIMs (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs) présents dans sa queue cytoplasmique (Newton-Nash and Newman 1999).

I.1. Structure du CD31

Le CD31 a été cloné pour la première fois chez l'homme (Newman, Berndt et al. 1990) puis chez la souris (Xie and Muller 1993) dans les années 90. Il s'agit d'une glycoprotéine (single-pass transmembrane) dont le domaine N-terminal est exposé à l'espace extracellulaire et le domaine C-terminal est cytoplasmique. Sa séquence amino-peptidique mature comporte 574 résidus extracellulaires suivis par une séquence de 19 résidus hydrophobiques, correspondant à la partie transmembranaire, ainsi que d'une queue cytoplasmique composée de 118 résidus. Un peptide signal de 27 acides aminés est quant à lui clivé en N-terminal lors de la maturation de la protéine dans le réticulum endoplasmique. Au cours de cette maturation, de nombreuses glycosylations (N- et O-glycosylations) ont lieu. Elles peuvent représenter jusqu'à 40% du poids moléculaire final du CD31.

Comme le montre la **Figure 1**, le CD31 est composé d'une portion extracellulaire constituée de six domaines Ig-like numérotés de 1 à 6 (le domaine 1 étant le plus éloigné de la membrane plasmique et le domaine 6, le plus proche de cette dernière), d'une région transmembranaire, ainsi que d'une queue cytoplasmique qui contient deux motifs ITIMs. Etant donné les similitudes de son domaine extracellulaire avec celui qui caractérise les molécules Ig-CAM, le CD31 a initialement été classé dans la famille des molécules d'adhérence. Cependant, la

découverte de ses deux motifs ITIMs (Newman 1999) le met définitivement dans la famille des Ig-ITIM.

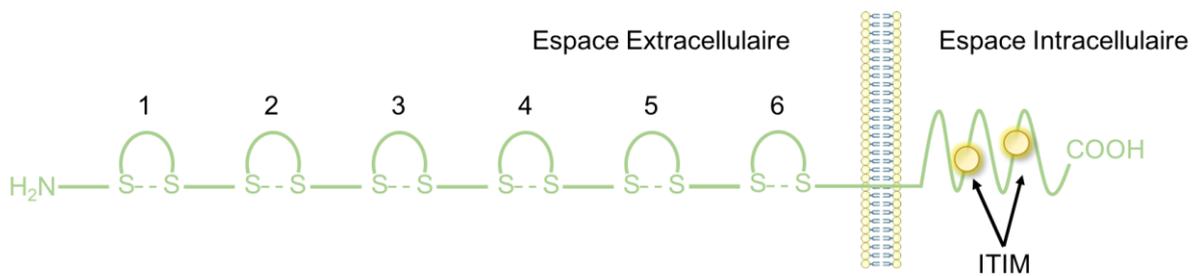


Figure 1. Le CD31. Les six boucles de la région extracellulaire représentent les domaines de type immunoglobuline (Ig). Par convention, ils sont numérotés du plus distal au plus proximal par rapport à la membrane. Les lignes discontinues représentent les ponts disulfures qui stabilisent les domaines de type Ig.

I.2. Engagement et voies de signalisation du CD31

En l'absence de stimulation cellulaire, le CD31 n'est pas phosphorylé car il ne possède pas d'activité kinase intrinsèque. De plus, les molécules de CD31 sont distribuées sous forme monomérique à la surface des cellules non activées, et le CD31 a très peu d'affinité trans-homophile à l'état de monomère. Son engagement nécessite plusieurs étapes, comme décrit ci-dessous ainsi que dans la **Figure 2**.

Première étape : la « clusterisation »

La « clusterisation », c'est-à-dire le regroupement des molécules de CD31 dans les radeaux ou « rafts » lipidiques de la membrane plasmique, est nécessaire pour engager les propriétés de signalisation du récepteur. La clusterisation est initiée par deux types d'interaction homophile qui se produisent au niveau de la partie extracellulaire du CD31.

La première interaction est « trans » -homophile et se produit entre les domaines distaux 1 et 2 des molécules de CD31 des cellules en interaction (Sun, Williams et al. 1996, Paddock, Zhou et al. 2016). Cette première interaction favorise à son tour les interactions « cis » -homophiles entre les domaines 6 proximaux de la membrane, résultant dans la clusterisation des molécules de CD31 à la surface de chaque cellule (Fawcett, Buckley et al. 1995, Newton, Buckley et al. 1997).

Deuxième étape : la phosphorylation des motifs ITIMs

Les motifs ITIMs sont des courtes séquences composées d'un résidu Tyrosine central (Y) suivi d'une Leucine (L) ou Valine (V) en position +3 et généralement précédé d'un acide aminé hydrophobe en position -2 : L/I/V/S-x-Y-x-x-L/V. Cependant, leur phosphorylation ne peut avoir lieu que si le CD31 est recruté dans les rafts lipidiques où sa queue cytoplasmique se trouve à proximité immédiate de tyrosine-kinases intracellulaires. Une fois clustérisé, le CD31 peut être phosphorylé au niveau de ses motifs ITIMs cytoplasmiques par les tyrosine-kinases éventuellement présentes dans les rafts lipidiques, si elles sont activées. Parmi elles, les kinases appartenant à la famille Src (Src Family Kinases ou SFK), telles que Lck, Lyn, Fyn, c-Src ou encore Csk, ont été identifiées comme étant responsables de la phosphorylation du CD31 (Lu, Barreuther et al. 1997, Cao, Huber et al. 1998, Cicmil, Thomas et al. 2000, Newman, Hamilton et al. 2001).

Troisième et dernière étape : le recrutement des tyrosine-phosphatases

Une fois phosphorylés, les motifs ITIMs recrutent et activent des tyrosine-phosphatases telles que SHP-1 et SHP-2 (SH2-containing Phospho-Tyrosine phosphatase-1/2) (Henshall, Jones et al. 2001) ou encore des inositol-phosphatases telles que SHIP-1 (SH2-containing Phosphatidylinositol-5'-phosphatase-1) et PLC γ 1 (Pumphrey, Taylor et al. 1999). Ces tyrosine/inositol-phosphatases peuvent à leur tour inhiber le processus d'activation dépendant de la tyrosine/inositol-kinase, qui avait initialement provoquée la phosphorylation des motifs ITIMs et donc leur recrutement, exerçant ainsi un contrôle rétro-actif sur ces mêmes voies.

Ainsi comme tous les récepteurs à motifs ITIMs, le CD31 découple les voies de signalisation activatrices des récepteurs à motifs ITAMs (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs) et surélève le seuil d'activation des cellules immunitaires qui l'expriment (Ravetch and Lanier 2000). En effet, ces dernières utilisent souvent les voies de signalisation ITIM afin de contrebalancer et contrôler les réponses cellulaires qui découlent des voies de signalisation ITAM. C'est d'ailleurs ce qui caractérise un système immunitaire efficace, à savoir un équilibre entre les voies de signalisation activatrices et inhibitrices afin d'obtenir une réponse immunitaire adéquate face à la situation rencontrée.

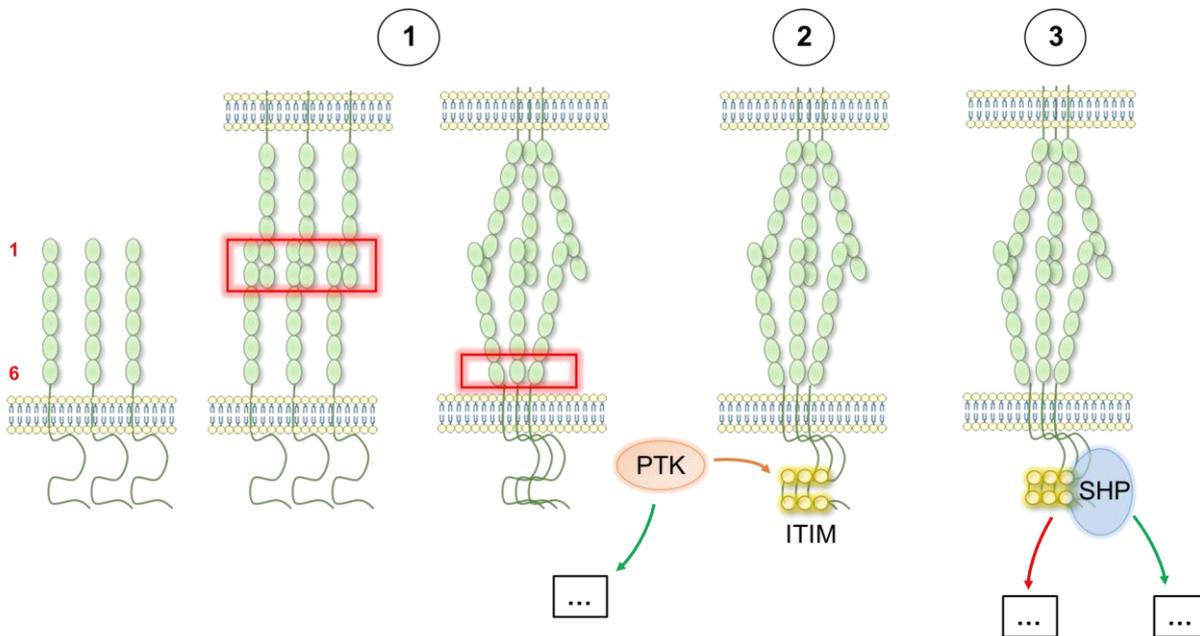


Figure 2. Activation du CD31. 1) Clusterisation du CD31 dans les rafts lipidiques par engagement trans-homophile des domaines distaux 1 et 2 et par engagement cis-homophile du domaine proximal 6. 2) Phosphorylation des motifs ITIMs de la queue cytoplasmique par des protéines tyrosine-kinases (PTK). 3) Recrutement et activation des phosphatases contenant un domaine SH2 (SHP) par les ITIMs phosphorylés. Cascade de signalisation des SHP : inhibition des cascades dépendantes des ITAMs et/ou autres actions en fonction du type cellulaire.

Cependant, comme détaillé dans le prochain paragraphe, « Fonctions cellulaires du CD31 », les principales fonctions du CD31 varient en fonction du type cellulaire concerné, mais aussi des stimuli d'activation perçus par cette dernière.

I.3. Fonctions cellulaires du CD31

Le CD31 est exprimé constitutivement et exclusivement par les cellules de l'interface sanguine. Alors qu'il est exprimé en grande quantité sur les cellules endothéliales (avec $1 \cdot 10^6$ copies par cellule), son niveau d'expression à la surface des cellules hématopoïétiques varie considérablement d'un type cellulaire à l'autre. On compte environ $1 \cdot 10^5$ copies sur les leucocytes de l'immunité innée (neutrophiles et monocytes/macrophages) contre $1 \cdot 10^4$ à la surface des lymphocytes et $5 \cdot 10^3$ à la surface des plaquettes. Il est à noter que le CD31 n'est exprimé que par les cellules endothéliales, les plaquettes et les leucocytes et nulle part ailleurs : pas par les globules rouges, ni par les cellules épithéliales autre que l'endothélium, ou encore les cellules stromales ou mésenchymateuses.

I.3.a. CD31 et cellules endothéliales

Le CD31 est fortement exprimé par les cellules endothéliales, concentré au niveau des jonctions intercellulaires (Newman 1994). L'utilisation d'anticorps spécifiques a donné lieu à la première vague d'hypothèses concernant le rôle du CD31. Puisque l'utilisation d'anticorps spécifiques du CD31 empêche la formation des contacts cellules-cellules, il a été initialement supposé un rôle du CD31 dans la formation des jonctions intercellulaires (Albelda, Muller et al. 1991). De même, de nombreuses expériences *in vitro* et *in vivo* ont montré un effet majeur des anticorps anti-CD31 dans le phénomène de diapédèse des leucocytes (Muller, Weigl et al. 1993, Thompson, Noble et al. 2001, Schenkel, Chew et al. 2004, Bixel, Li et al. 2010) ou encore dans le maintien de l'intégrité de la barrière endothéliale (Ferrero, Ferrero et al. 1995).

En utilisant des modèles transgéniques ou déficients en CD31, *in vitro*, il a été mis en évidence que le CD31 facilite la déphosphorylation et la stabilisation de la β -caténine, via le recrutement de SHP-2, permettant ainsi à la β -caténine de se réassocier à la VE-cadhérine, stabilisant ainsi la jonction (Ilan, Mahooti et al. 1999, Biswas, Canosa et al. 2006).

D'autres études ont également suggéré que le CD31 est un récepteur mécano-sensible permettant aux cellules endothéliales de répondre face à des forces mécaniques, comme un choc hyper- ou hypo-osmotique (Harada, Masuda et al. 1995, Osawa, Masuda et al. 1997), ou encore face au shear stress en modulant notamment l'architecture du cytosquelette (Tzima, Irani-Tehrani et al. 2005, Collins, Guilluy et al. 2012) ou les réponses fonctionnelles comme la libération de facteurs vasodilatateurs, comme la prostacycline ou le monoxyde d'azote (NO) (Fleming, Fisslthaler et al. 2005).

Une étude plus récente a également suggéré un rôle pour le côté « mécanorécepteur » du CD31 dans le développement de l'insuffisance cardiaque (McCormick, Collins et al. 2015) (voir « Discussion »).

Comme le montre la **Figure 3**, de nombreuses autres fonctions ont également été attribuées au CD31 au niveau des cellules endothéliales, comme l'angiogenèse (Zhou, Wang et al. 1997, Kondo, Scheef et al. 2007) ou encore la reconstitution des jonctions endothéliales intercellulaires après induction d'une brèche (Biswas, Canosa et al. 2006). De plus, les chercheurs du laboratoire de Peter Newman, l'un des « pères » du CD31, ont récemment fait le point sur les connaissances accumulées au fil du temps dans une très belle revue (Lertkiatmongkol, Paddock et al. 2016).

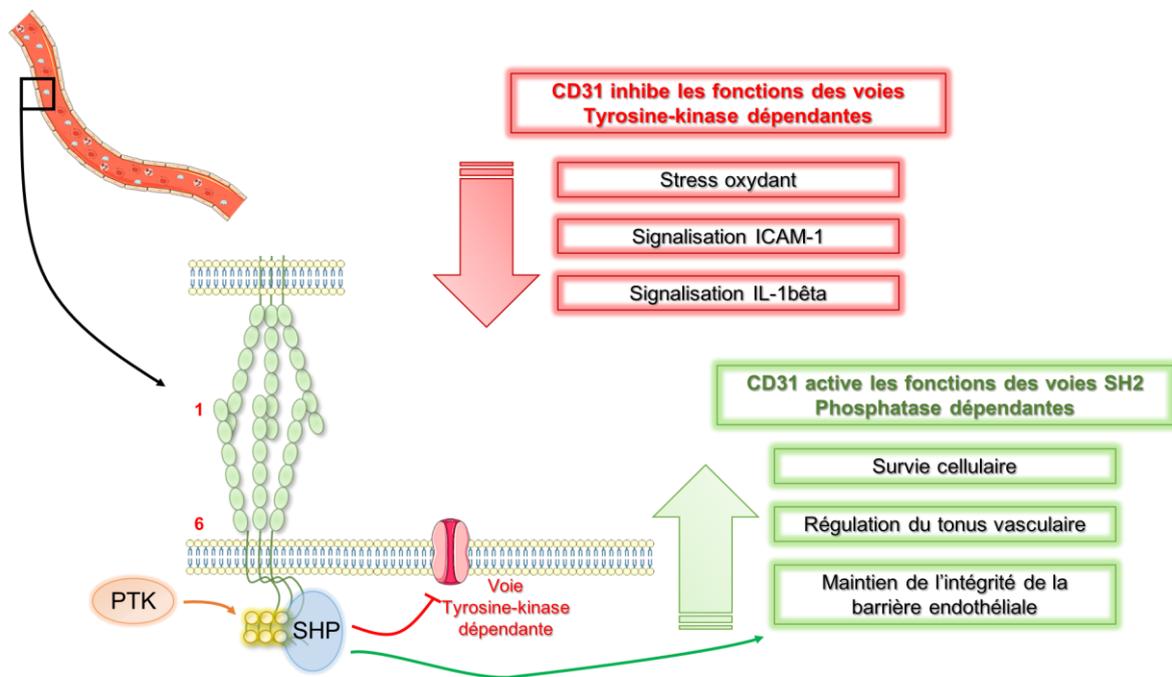


Figure 3. Fonctions du CD31 au niveau des cellules endothéliales vasculaires (jonctions latérales). Le CD31 exerce différentes fonctions au niveau des cellules endothéliales. Au niveau des jonctions latérales cellule-cellule des cellules endothéliales, le CD31 est constamment engagé dans une interaction trans-homophile, prête à être phosphorylée au niveau de ses motifs ITIMs, par des co-récepteurs activateurs regroupés et agissant de manière concomitante capables de conduire des voies dépendantes de la tyrosine-kinase. Les motifs ITIMs phosphorylés peuvent alors recruter et activer des phosphatases contenant le domaine SH2 (SHP) qui médient finalement les fonctions de signalisation du CD31. L'effet net de ce dernier est inhibiteur pour les fonctions cellulaires dépendantes de la tyrosine-kinase et activateur pour les fonctions dépendantes de la SH2 phosphatase. Ainsi, le CD31 endothélial peut inhiber la formation des espèces réactives de l'oxygène et des signaux de signalisation inflammatoire ICAM-1 et IL-1. A l'inverse, il est nécessaire à la survie cellulaire, la régulation du tonus artériel, ou encore au maintien de l'intégrité de la barrière endothéliale (adapté d'après Caligiuri 2019).

I.3.b. CD31 et leucocytes

i. Lymphocytes : B et T

Les premiers travaux visant à étudier la fonction de co-récepteur du CD31 ont été conduits sur les cellules de l'immunité adaptative : les lymphocytes B et T.

Lymphocytes B

La liaison du complexe BCR (B-Cell Receptor) avec le CD31 inhibe la mobilisation intracellulaire du calcium et la réponse effectrice des lymphocytes B (Henshall, Jones et al. 2001). D'autre part, il a été montré que les lymphocytes B dérivés de souris CD31^{-/-}, montraient une hyper-réactivité (augmentation exagérée de la réponse calcique et de la prolifération) lorsqu'ils engageaient leur complexe BCR (Wilkinson, Lyons et al. 2002). En parallèle, les souris CD31^{-/-} ont des concentrations circulantes en IgM et IgG augmentées et développent spontanément, avec l'âge, des maladies auto-immunes (type « Lupus ») (Wilkinson, Lyons et al. 2002).

Lymphocytes T

La liaison du TCR (T-Cell Receptor) avec le CD31 élève le seuil d'activation des lymphocytes T (Newton-Nash and Newman 1999). De même que l'engagement du CD31 à l'aide d'une molécule soluble recombinante contenant toute la portion extracellulaire du CD31 humain (rCD31Rg), réduit la prolifération des lymphocytes T périphériques ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires en réponse à l'engagement du TCR (Prager, Staffler et al. 2001).

Cependant, alors que l'expression du CD31 sur les lymphocytes T est constitutive (dans la moelle osseuse et le thymus), les lymphocytes T de type activés/mémoires circulants dans le sang périphérique n'expriment que très peu ou pas de CD31 à leur surface (Stockinger, Schreiber et al. 1992). La perte d'expression du CD31, que l'on peut constater au fil des cycles d'activation répétés des lymphocytes T (Demeure, Byun et al. 1996), a été montrée, par notre laboratoire, comme résultant du clivage du CD31 (expression constante du domaine 6 proximal –(Fornasa, Groyer et al. 2010), voir « Clivage du CD31 : le P8RI comme peptide agoniste »). La réduction d'expression de CD31 « entier » à la surface des lymphocytes mémoires pourrait, au moins en partie, expliquer pourquoi ces cellules s'activent plus facilement par rapport aux lymphocytes naïfs. Il est important de noter qu'à l'inverse des lymphocytes CD4⁺, l'expression du CD31 est bien maintenue, voir augmentée à la surface des lymphocytes CD8⁺ de type mémoire, probablement pour prévenir l'activation inopinée de ces lymphocytes qui pourraient sinon conduire à une action destructrice systémique des lymphocytes CD8 auto-réactifs, dont la cible (MHC-I) est ubiquitaire (Caligiuri 2018).

ii. Macrophages

Au niveau des macrophages, le CD31 joue également un rôle globalement inhibiteur. En effet, son engagement modère la réponse des macrophages au lipopolysaccharide (LPS) en limitant l'activation de NF κ B, entraînant une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires tout en favorisant leur survie (en permettant la phosphorylation de ERK - (Rui, Liu et al. 2007)).

Puisque le CD31 inhibe également l'agrégation, son engagement prévient la phagocytose par les macrophages des cellules CD31+ viables. En effet, lorsqu'une cellule CD31+ « saine » interagit avec un macrophage, l'engagement trans-homophilique du CD31 transmet mutuellement un signal de répulsion cellulaire, empêchant ainsi la phagocytose de la cellule CD31+ (Brown, Heinisch et al. 2002). A l'inverse, la signalisation, énergie-dépendante, du CD31 ne peut pas se mettre en place dans les cellules en apoptose, ce qui permet alors l'accrochage des cellules mortes et leur phagocytose par les macrophages (Chimini 2002). Ce processus, aussi connu comme « efferocytose » est une étape clé dans la séquence d'évènements de réparation tissulaire.

iii. Neutrophiles

Bien que parmi tous les leucocytes, les neutrophiles expriment la concentration la plus élevée de CD31, peu d'informations sont connues à ce jour sur sa fonction. Néanmoins, il a été mis en évidence que les neutrophiles dérivés des souris CD31^{-/-} ont une mobilité et une capacité à s'allonger qui s'avèrent réduite en réponse à l'IL-8, indiquant un rôle potentiel du CD31 dans la migration neutrophilaire (Wu, Stabach et al. 2005).

I.3.c. CD31 et plaquettes

La fonction du CD31 au sein des plaquettes est globalement une régulation négative de l'activation plaquettaire.

In vitro, les expériences utilisant des agonistes spécifiques des plaquettes (comme le collagène, la collagen-related peptide (CRP) ou encore la convulxine) et dont le CD31 était engagé, ont montré une inhibition de l'agrégation, de la dégranulation mais aussi de la mobilisation du calcium intracellulaire (Cicmil, Thomas et al. 2000, Jones, Garner et al. 2009) sur des plaquettes humaines. D'autre part, il a été mis en évidence que les plaquettes provenant de souris CD31^{-/-} sont plus sensibles au collagène que les souris WT (augmentation de l'agrégation et de la sécrétion des granules alpha). D'autres expériences, *in vitro* et *in vivo*, ont

également démontré qu'en l'absence de CD31 la croissance et la stabilité des thrombi plaquettaires est augmentée (Rathore, Stapleton et al. 2003, Falati, Patil et al. 2006).

Il convient cependant de noter que les résultats obtenus *in vitro*, en l'absence de flux, ou même *in vivo*, en utilisant des anticorps ou autres technologies ciblant la protéine entière et en systémique, ne permettent pas de conclure quant à la fonction dynamique de ce récepteur, si particulier de par sa nature trans-homophile, sa distribution exclusive à l'interface sanguine, et son mécanisme d'action, de co-stimulation et phosphatase dépendante. Dans la mesure du possible, au cours de mes travaux, j'ai alors utilisé non seulement des stratégies « perte de fonction » (notamment souris CD31 KO) mais également des stratégies « gain de fonction » avec des peptides synthétiques capables de soutenir la signalisation par le CD31.

Type cellulaire	Fonction du CD31	Références
Cellules endothéliales	Active la survie, la migration, le maintien de la barrière endothéliale	Lertkiatmongkol et al. Curr Opin Hematol, 2016
Lymphocytes B	Inhibe l'activation	Henshall et al. J Immunol, 2001
Lymphocytes T	Inhibe la prolifération et la production de cytokines pro-inflammatoires	Prager et al. J Immunol, 2001; Fornasa et al. J Immunol, 2010
Monocytes/Macrophages	Inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires et l'efférocytose des cellules saines	Rui et al. J Immunol, 2007; Brown et al. Nature, 2002
Plaquettes	Inhibe l'agrégation plaquettaire	Cicmil et al. Blood, 2002; Jones et al. FEBS, 2009

Tableau 1. Tableau récapitulatif des fonctions cellulaires du CD31.

1.4. Clivage du CD31 : le P8RI comme peptide agoniste

1.4.a. Clivage du CD31

Plusieurs expériences ont montré que lors de l'activation cellulaire, le CD31 subissait un clivage de son domaine extracellulaire (libération d'une protéine soluble d'environ 100 kDa). Ceci a été vérifié aussi bien au niveau des cellules endothéliales (Ilan, Mohsenin et al. 2001), que des plaquettes (Wong, Harbour et al. 2004) ou encore des lymphocytes T (Fornasa, Groyer et al. 2010).

Plus récemment, il a été montré au sein de notre laboratoire que ce clivage se produisait également au niveau de neutrophiles préalablement traités par de l'IL-8 puis stimulés au fMLP (formyl-Méthionyl-Leucyl-Phénylalanine) (travaux non publiés). Ce résultat confirme ce qui a

été précédemment montré par Fornasa et ses collègues au niveau des lymphocytes T, à savoir que le clivage du CD31 n'entraîne pas sa disparition complète à la surface des cellules, mais laisse un fragment ancré à la membrane des cellules activées. Ce segment membranaire tronqué comprend le domaine proximal extracellulaire 6, la partie transmembranaire ainsi que la queue cytoplasmique sur laquelle se trouve les deux motifs ITIMs.

Les protéases impliquées dans le clivage sont multiples et varient selon le type cellulaire et la cascade de signalisation qui l'a activé. Comme pour d'autres protéines à la jonction endothéliale, les protéases de membrane de type « A Disintegrin and Metalloprotease » (ADAM) comme ADAM-10 et ADAM-17, sont susceptibles d'agir sur sa portion extracellulaire. En tous cas, le clivage s'opère en amont d'un fragment comprenant au moins les 23 acides aminés les plus proches de la membrane. Nous avons alors entrepris d'utiliser un peptide synthétique ciblant la portion tronquée restante du CD31 et exposée à la surface des cellules en train de s'activer. Ce peptide, appelé P8RI, est capable de maintenir les fonctions régulatrices du CD31, malgré son clivage, et agit donc en tant qu'agoniste du CD31 (brevet WO-2013190014).

I.4.b. P8RI : agoniste peptidique du CD31

La portion éliminée par le clivage du CD31 comprend les domaines extracellulaires 1 et 2 distaux, qui sont nécessaires pour l'engagement trans-homophile du récepteur. Ainsi, le clivage empêche la première étape d'activation du CD31 (voir « Engagement et voies de signalisation du CD31 »). Cependant, le fragment restant exposé à la surface de la cellule, et étant impliqué dans la clusterisation, c'est-à-dire la deuxième étape d'activation du CD31, nous laisse la possibilité de le cibler pour restaurer la transmission de la signalisation du CD31 à l'intérieur de la cellule, malgré son clivage.

Les bases de ce mécanisme d'action des peptides homotypiques du CD31 extracellulaire juxtamembranaire avaient déjà été posées il y a plus de vingt ans par l'équipe de Zehnder qui avait alors montré que l'utilisation d'un anticorps monoclonal (clone LYP21) dirigé contre les premiers 23 acides aminés juxtamembranaires du CD31 (entre la membrane et la boucle du domaine 6), était capable d'inhiber la prolifération des lymphocytes T de façon spécifique et dose dépendante (Zehnder, Shatsky et al. 1995). Ces mêmes résultats ont été ensuite retrouvés en utilisant un peptide synthétique de 23 résidus, correspondant à l'épitope de l'anticorps LYP21 (Asn-551 à Lys-574) c'est-à-dire aux résidus extracellulaires les plus proximaux du CD31. Cependant, à la surprise des auteurs, l'effet de l'anticorps LYP21 comme de son épitope peptidique synthétique était observé malgré la « perte » de l'expression du CD31 (documentée en utilisant des anticorps dirigés contre les domaines 1-2 du CD31) à la surface des lymphocytes stimulés. Les auteurs avaient alors émis l'hypothèse que le peptide avait interagit avec un ligand hétérotypique.

Ce n'est qu'en 2010 que notre laboratoire a démontré, par cytométrie multiparamétrique et microscopie TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence microscopy), que le peptide clusterisait en interaction directe avec la portion restante du CD31 (Fornasa, Groyer et al. 2010). Suite à cette découverte, notre laboratoire a développé différents peptides capables d'agir en tant qu'agonistes du CD31. En effet, la découverte d'un agent capable de restaurer la voie de signalisation du CD31 constitue un potentiel thérapeutique intéressant dans plusieurs contextes pathologiques où l'invalidation de la voie du CD31, par excès de clivage, serait un facteur aggravant (voir « Lésion artérielle aiguë : dissection aortique » et « Lésion cardiaque aiguë : infarctus dans l'ère de la reperfusion »). C'est ainsi que le peptide P8RI (brevet WO-2013190014) a été développé et utilisé au cours de mes travaux de thèse, en tant qu'outil moléculaire pharmacologique capable de cibler la séquence tronquée du CD31.

Compris dans la séquence intermédiaire de 10 résidus (peptide « PepReg »), elle-même incluse dans la séquence initiale de 23 résidus décrite par l'équipe de Zehnder (Zehnder, Shatsky et al. 1995), le P8RI correspond à une séquence retro-inverso de 8 résidus dans une partie de la protéine qui est fortement conservée entre les espèces (**Figure 4**). Il présente une grande solubilité dans l'eau (contrairement au peptide constitué de 10 acides aminés) ainsi qu'une résistance aux peptidases eucaryotes (grâce à l'utilisation de l'énantiomère dextrogyre des acides aminés - (Tugyi, Uray et al. 2005)) tout en étant aussi efficace que le peptide original (brevet WO-2013190014). L'administration sous-cutanée quotidienne du P8RI à une dose de 2,5 mg/kg est efficace dans la réduction des dégâts dus aux réponses inflammatoires dans un modèle d'athérosclérose compliquée chez la souris (Fornasa, Groyer et al. 2010). Du point de vue des études précliniques et du développement de médicaments, le P8RI a été soumis à une analyse d'absorption, de distribution, de métabolisme et de toxicologie (ADME-tox). Le produit est stable en solution jusqu'à 100 jours à température ambiante et n'a montré aucune génotoxicité *in vitro*. Le profil toxicologique *in vivo* ne montrait aucun signe de toxicité systémique (biochimie sur test sanguin), même à 30 mg/kg (c'est-à-dire des doses 10 fois supérieures à celles utilisées dans les études expérimentales), administré par voie sous-cutanée, quotidiennement, pendant plus de 14 jours. Il reste détectable dans le plasma jusqu'à 8 heures après un bolus sous-cutané. L'analyse de son effet sur les courants potassiques induits par un canal transgénique hERG (human ether-a-go-go related gene) *in vitro*, montre une IC₅₀ du P8RI correspondant à une concentration de 150 µM, soit 40 fois la concentration maximale détectable (C_{max}) dans le plasma après un bolus de 2,5 mg/kg en sous-cutané (**Tableau 2**).

Ainsi, compte tenu de son expression exclusive sur les cellules hématopoïétiques et vasculaires, ainsi que de ses fonctions régulatrices de signalisation, le CD31 représente une cible préférentielle et le P8RI un outil intéressant pour rétablir l'homéostasie dans la circulation.

Voie d'administration	Dose (mg/kg)	C _{max} (ng/mL)	C _{max} /Dose	T _{max} (h)	AUC _t (ng/mL*h)	AUC _t /dose	AUC _{inf} (ng/mL*h)	AUC _{inf} /dose	%AUC _{extra}	F (%)
IV	1	4166	4166	0.05	2311	2311	2316	2316	0.2	1.3
PO	2.5	127	51	0.25	76	30	77	31	1.7	
SC	2.5	3810	1524	0.25	3831	1533	3835	1534	0.1	66.2

Tableau 2. Pharmacocinétique du P8RI chez la souris. Analyse pharmacocinétique du P8RI après une administration unique par voie intraveineuse (IV), orale (per os [PO]) ou sous-cutanée (SC), aux doses indiquées, chez des souris C57BL /6J. C_{max} : concentration maximale dans le sang ; T_{max} : temps à la concentration maximale dans le sang après injection ; AUC_t : temps de distribution ; F : biodisponibilité du peptide dans le sang en comparaison à la dose injectée. n=3 par voie d'administration.

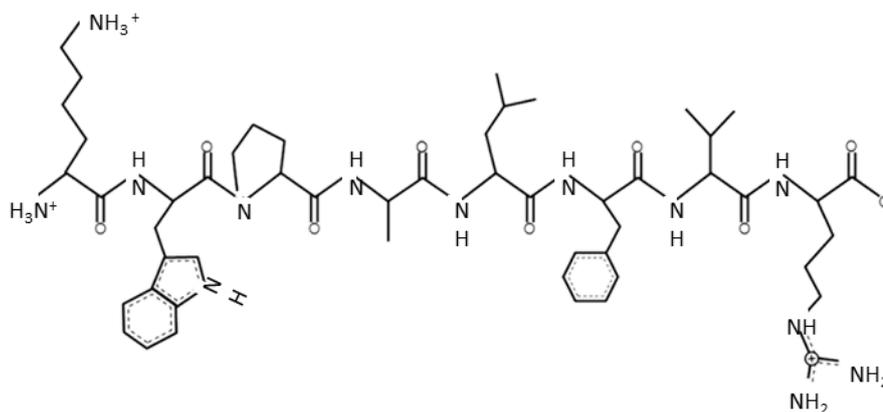


Figure 4. Structure du P8RI. Représentation de la séquence rétro-inverso correspondant au P8RI. Cette séquence montre une grande solubilité dans l'eau (99%) ainsi qu'une résistance aux peptidases eucaryotes du fait de l'utilisation de l'énantiomère dextrogyre (réalisé à l'aide du logiciel Pepdraw).

II. Lésion artérielle aiguë : dissection aortique

L'aorte est l'artère de conductance de plus gros calibre du système cardiovasculaire humain. Riche en fibres élastiques, l'aorte peut ainsi compenser et supporter les fluctuations de la pression artérielle au cours du cycle cardiaque afin de délivrer le sang au reste de l'organisme. Du fait de son rôle important dans la distribution du sang, toute pathologie la concernant est d'emblée grave, souvent mortelle.

La dissection aortique résulte d'une lésion aiguë de la paroi artérielle et représente l'une des principales causes de mortalité parmi les maladies cardiovasculaires (60% à 90% de mortalité en cas d'absence de traitement). La compréhension de la progression et de l'étendue de cette condition est essentielle à l'amélioration des traitements et de la prise en charge des patients à court et long terme.

II.1. Structure de l'aorte

A l'état physiologique, la paroi de l'aorte s'organise en trois tuniques concentriques qui sont de l'intérieur vers l'extérieur : l'intima, la média et l'adventice (**Figure 5**).

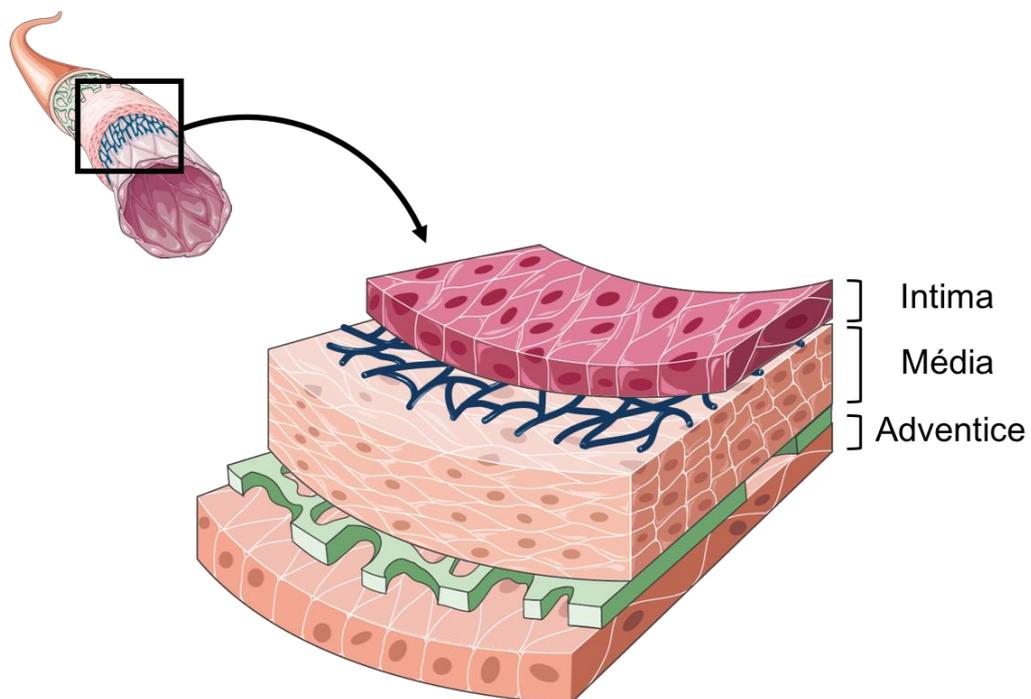


Figure 5. Représentation schématique de l'organisation de la paroi artérielle saine. (Adapté d'après Smart Servier Medical Art).

L'intima

En contact direct avec le sang, l'intima est composée d'une monocouche continue de cellules endothéliales (CE) hautement spécialisées et métaboliquement actives. Elle repose sur une fine couche de tissu conjonctif appelée la membrane basale (composée essentiellement de collagène de type IV, de protéoglycanes, de fibronectines, de laminines et d'élastine). Cette dernière repose elle-même sur la limitante élastique interne faite de fibres élastiques.

Le rôle principal de l'intima est d'assurer un rôle de barrière physique et fonctionnelle entre le sang circulant et le compartiment tissulaire de la paroi artérielle (Michel, Thaumat et al. 2007). L'intima joue un rôle physiologique essentiel dans la modulation de la vasomotricité artérielle (en sécrétant des substances vasodilatatrices comme la prostaglandine I₂ (PGI₂) ou encore le NO), ou encore dans la régulation de la coagulation (en produisant des facteurs antithrombotiques comme le NO et le t-PA (Tissue-Plasminogen Activator)).

La média

La média représente l'essentielle de l'épaisseur de la paroi aortique et constitue sa couche structurante. Principalement composée de cellules musculaires lisses (CML) et de protéines de la matrice extracellulaire (MEC), elle est délimitée par la lame élastique interne, du côté de la lumière vasculaire, et de la lame élastique externe, du côté extérieur.

Les CML qui la composent sont organisées en unités lamellaires. Ce sont des cellules, mononuclées fusiformes et adhérentes, entourées d'une lame basale. Elles sont différenciées mais s'adaptent rapidement à l'environnement local de par leur plasticité phénotypique. Elles peuvent ainsi passer de leur phénotype contractile, qui permet le maintien du tonus musculaire définissant les résistances périphériques à l'écoulement sanguin responsable de la régulation de la pression artérielle sanguine (Lacolley, Regnault et al. 2012), au phénotype sécrétoire, pour contribuer à la synthèse des composants insolubles de la MEC comme le collagène, l'élastine, les protéoglycanes ou encore les glycoprotéines de (Owens, Kumar et al. 2004, Wagenseil et Mecham 2009).

L'adventice

C'est la couche la plus externe de la paroi artérielle. L'adventice est constituée de tissu conjonctif lâche et de fibroblastes qui contribuent à la synthèse de la MEC. Contrairement à la média qui est avasculaire (à l'exception de la partie la plus externe de l'aorte thoracique), l'adventice contient des micro-vaisseaux, les *vasa vasorum* (vaisseaux nourriciers de l'adventice mais servent aussi au drainage des métabolites de la média), des terminaisons nerveuses, des vaisseaux lymphatiques et quelques leucocytes résidents (Michel, Thaumat et al. 2007). Le rôle de l'adventice est de protéger et de fixer l'artère aux organes environnants pour contenir le

déplacement et le stress mécanique généré par chaque cycle cardiaque. L'adventice de l'aorte thoracique avec celle de ses branches intercostales et vertébrales peuvent aisément exercer ce rôle dans la cage thoracique, où l'aorte est pratiquement fixée à la colonne vertébrale. La tâche est plus ardue pour l'aorte abdominale dont les branches sont destinées à des organes souples et relativement mobiles (**Figure 6**).

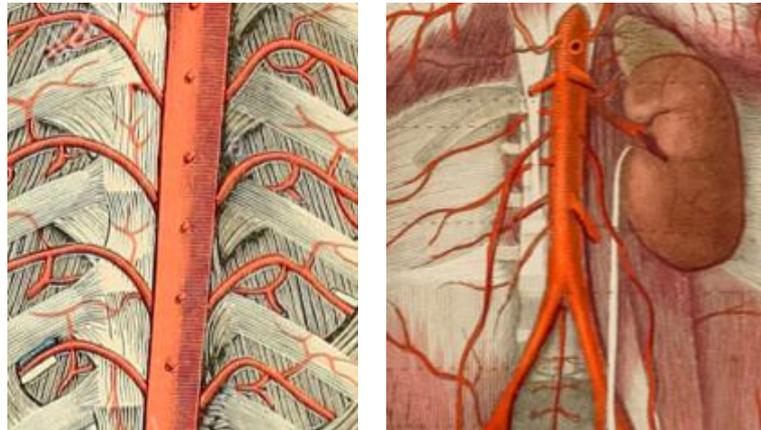


Figure 6. Anatomie de l'aorte thoracique et abdominale. Le stress mécanique exercé aux points de branchement de l'aorte thoracique (à gauche) est en quelque sorte contenu par leur proximité et leurs liens avec les structures portantes du squelette (côtes, vertèbres) qui contiennent et stabilisent les mouvements de l'aorte aux cours de chaque cycle cardiaque. Ce qui n'est pas le cas dans la cavité abdominale (à droite).

II.2. Dissection aortique

II.2.a. Définition et classifications

Une dissection aortique se caractérise par la rupture de la paroi intimale aortique, aussi appelée la « porte d'entrée de la dissection », créant ainsi une brèche par laquelle le sang peut s'y infiltrer. Cette infiltration clive la paroi en deux avec d'un côté le vrai chenal (c'est la lumière physiologique artérielle. Lorsqu'elle est comprimée par le faux chenal, elle peut être totalement virtuelle par endroits) et de l'autre côté le faux chenal. Ces chenaux sont séparés par le flap intimal, correspondant à la lésion la plus caractéristique des dissections aortiques aiguës (**Figure 7**). Dans certains cas, il peut y avoir plusieurs déchirures sur le flap intimal entraînant des communications multiples entre les chenaux. En général, le flux sanguin est plus rapide dans le vrai chenal, mais le faux chenal peut lui-même être circulant ou alors partiellement ou complètement thrombosé selon la vitesse du flux. La propagation de la dissection peut se faire soit de façon antérograde dans le sens physiologique du flux sanguin, ou alors de façon rétrograde, vers la valve aortique. Lorsqu'elle atteint la valve aortique, elle peut créer une insuffisance aortique majeure. Au niveau des vaisseaux périphériques, elle peut être la cause

d'un syndrome de malperfusion viscérale. Le risque de rupture devient majeur lorsque la dissection atteint l'adventice. En effet, l'adventice peut alors se rompre à tout moment : c'est la mort subite. Ces complications sont des urgences thérapeutiques mettant en jeu le pronostic vital du patient.

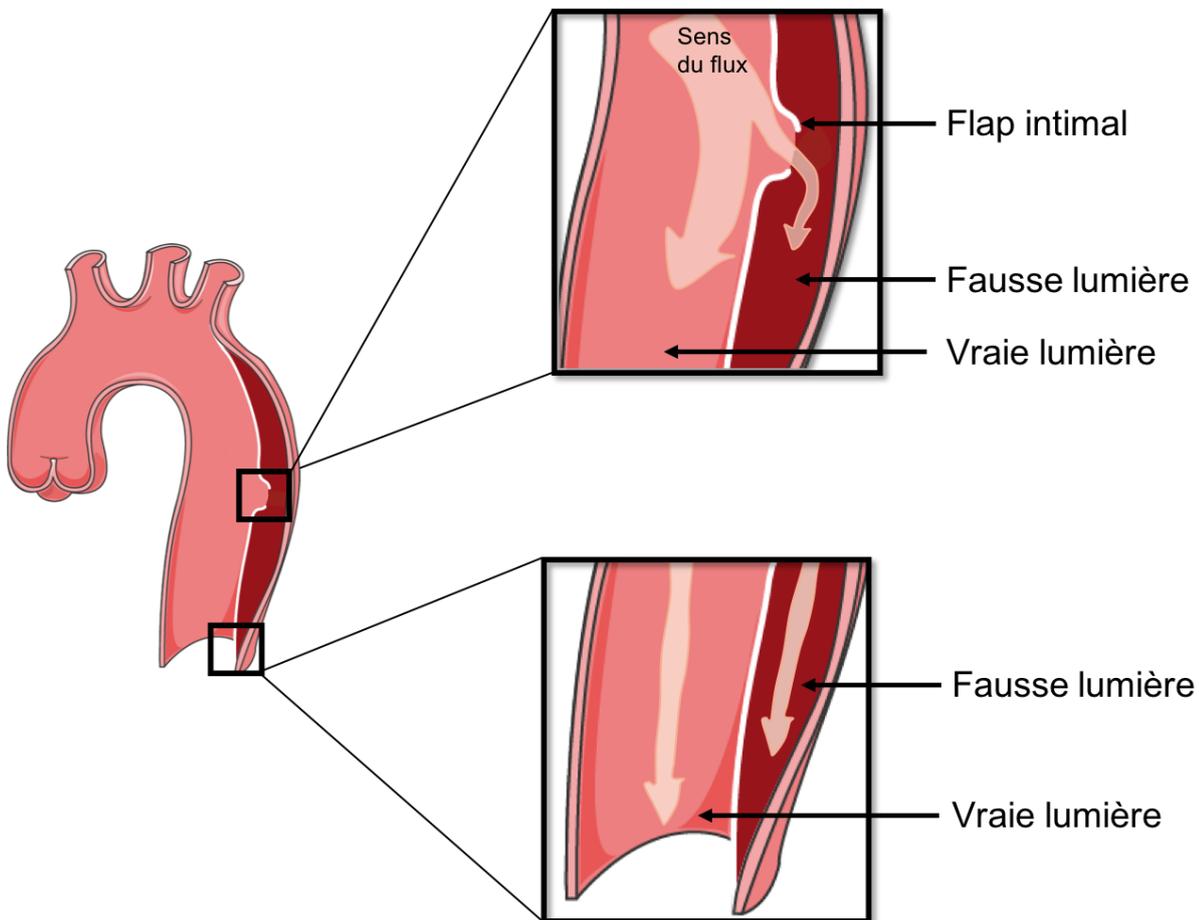


Figure 7. Représentation schématique d'une dissection aortique. La porte d'entrée dans le flap intimal, connecte le chenal physiologique de l'aorte avec le faux chenal de la dissection.

La classification de la dissection aortique se fait en fonction de la localisation de la déchirure ou de l'étendu du faux chenal. On distingue ainsi respectivement la classification de DeBakey de celle de Stanford comme le montre la **Figure 8**.

Classification de DeBakey

Décrite en 1965 (DeBakey, Crawford et al. 1965), elle distingue trois catégories selon l'origine de la dissection aortique :

- Type I : la dissection se trouve au niveau de l'aorte ascendante et s'étend aux parties ascendante ou descendante, voir abdominale ;

- Type II : elle se limite à l'aorte ascendante. La dissection s'arrête au pied du tronc artériel brachio-céphalique ;
- Type III : généralement, la dissection se trouve après l'artère sous-clavière gauche et le ou les faux chenaux s'étendent de l'aorte thoracique descendante à l'aorte abdominale.

Classification de Stanford

Décrite 5 ans après celle de DeBakey, elle distingue les dissections qui touchent l'aorte ascendante (Type A) de celles localisées seulement dans la partie descendante (Type B).

Ainsi les dissections de Type A de Stanford correspondent aux dissections de Types I et II de DeBakey. Elles n'affectent que l'aorte ascendante et leurs prises en charge constituent une urgence vitale (voir « Traitements actuels »). Les dissections de Type B correspondent aux dissections de Type III qui épargnent l'aorte ascendante.

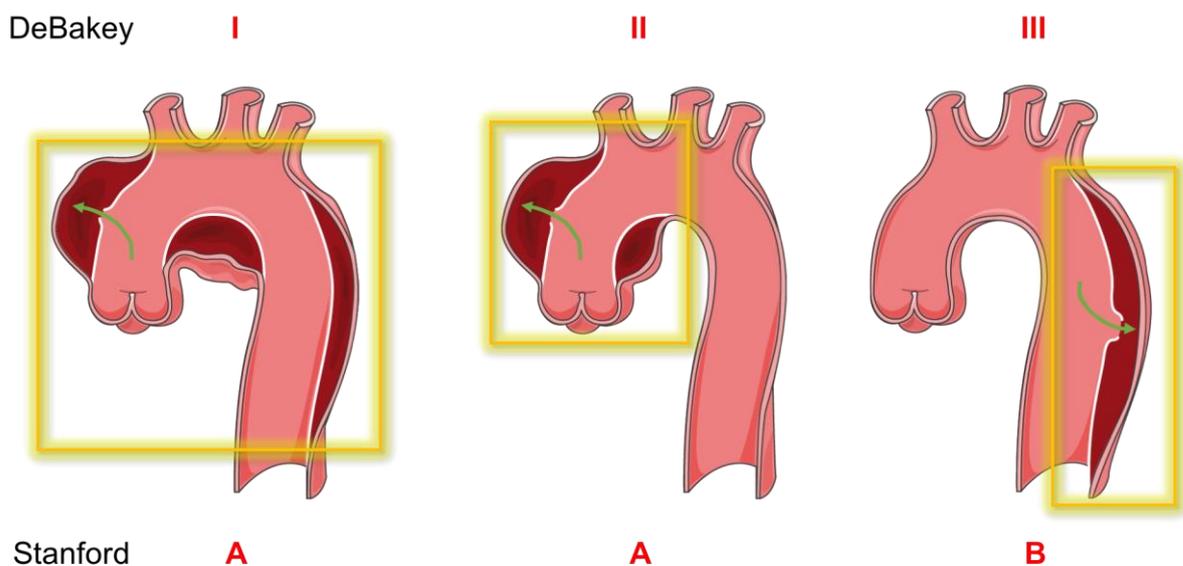


Figure 8. Classification anatomique des dissections aortiques. Les lésions de Stanford de type A impliquent l'aorte ascendante, alors que les lésions de type B se limitent à l'aorte descendante. La classification de DeBakey prend en compte les pathologies affectant à la fois l'aorte ascendante et descendante (I), uniquement le segment ascendant (II) ou uniquement la partie descendante (III) (adapté d'après Smart Servier Medical Art).

II.2.b. Épidémiologie et facteurs de risque

La dissection aortique est une pathologie grave, dont le taux de mortalité, selon le type de dissection, peut atteindre 60 à 90% en cas d'absence de traitement.

Les principaux facteurs de risque associés aux dissections aortiques sont l'âge, le sexe masculin, le tabagisme, l'hypertension artérielle ou encore l'existence d'antécédents familiaux (Golledge and Eagle 2008, Howard, Banerjee et al. 2013, Jahangir, Lipworth et al. 2015, Landenhed, Engstrom et al. 2015). Chez les patients de moins de 60 ans, ce sont surtout les maladies dégénératives, telles que le syndrome de Marfan (déficience de fibrilline-1 responsable d'une altération progressive de la MEC), le syndrome d'Ehlers-Danlos (collagénose sévère) ou encore celui de Loeys-Dietz (maladie des tissus élastiques) qui sont les principaux facteurs de risque (Januzzi, Sabatine et al. 2003).

En France, peu de données épidémiologiques existent. Néanmoins, le Registre International de Dissections Aortiques Aiguës, l'IRAD (the International Registry of Acute Aortic Dissection), a permis d'avoir de nombreuses informations. En effet, ce registre regroupe plus de 1600 cas déclarés ainsi que des données de 26 centres de chirurgie cardiaque de 11 pays.

L'incidence annuelle est estimée entre 2,9 et 3,5 pour 100 000 personnes, c'est donc une pathologie rare (Clouse, Hallett et al. 2004). Mais ces chiffres seraient en augmentation pouvant atteindre 14 pour 100 000 personnes par an (Olsson, Thelin et al. 2006).

Les dissections de type A représente la majorité des cas (73% contre 27% de type B – (Harris, Braverman et al. 2012)). Dans deux tiers des cas, la dissection aortique (de type B) touche les hommes, principalement entre 60 et 70 ans (Hagan, Nienaber et al. 2000). Malgré les progrès chirurgicaux et médicaux actuels, la dissection aortique reste une pathologie grave, avec une mortalité pouvant atteindre 15% au stade aiguë (Clouse, Hallett et al. 2004).

II.2.c. Importance de la biomécanique dans la dissection aortique

L'aorte est exposée à des contraintes hémodynamiques majeures qui impactent non seulement sur le métabolisme et la biologie du tissu qui la compose, mais également sur la survenue d'évènements aigus et leurs issues, comme la dissection et la réparation qui devrait s'en suivre (Caligiuri G, Levy BP, Nicoletti A and Michel J-B. Role of Biomechanical Stress in the Pathology of the Aorta. In: O. H. Stanger, J. R. Pepper and L. G. Svensson, eds. Surgical Management of Aortic Pathology: Current Fundamentals for the Clinical Management of Aortic Disease Vienna: Springer Vienna; 2019: 163-180).

Un stress mécanique dynamique et focalisé se produit au niveau des branches aortiques, à leur origine, où les perturbations de flux sont maximales et la liberté de mouvement de la paroi très limitée. Ainsi, lors de poussées hypertensives ou d'augmentation soudaine de la volémie, de

véritables brèches peuvent se frayer un chemin dans la paroi aortique, en particulier au niveau des premières branches de l'aorte abdominale, comme récemment montré dans une très belle étude expérimentale (Trachet, Aslanidou et al. 2017).

Alors qu'une lésion mécanique est incontestablement à l'origine de la dissection aortique, la source de sang s'écoulant dans la fausse lumière reste débattue (Wheat 1987, O'Gara and DeSanctis 1995, Mehta, O'Gara et al. 2002, Mallat, Tedgui et al. 2016).

Rupture des *vasa vasorum*

Cette première théorie ne préconise pas l'existence de communication entre le vrai et le faux chenal ou de flap intimal chez les patients présentant un hématome de paroi. L'hémorragie intramurale serait le résultat d'une rupture des *vasa vasorum* situés au niveau de la média aortique (Gore 1952, Mohr-Kahaly, Erbel et al. 1994), étirés au niveau où le stress mécanique est maximal. En effet, un épaissement de la paroi aortique mimant un hématome de la paroi a été rapporté après le traumatisme intramural provoqué par le gonflage endoartériel d'un ballonnet (Vilacosta, Castillo et al. 1995) comme après une angioplastie coronaire (Vilacosta, San Roman et al. 1990). Cependant très peu de travaux cliniques ou expérimentaux permettent de corroborer cette hypothèse.

Formation de micro-brèches intimes

La deuxième théorie propose que ce soit une brèche dans la portion luminale de la paroi (flap intimal) qui permet l'entrée de sang de la lumière vers la média, entraînant ainsi la formation de l'hématome dans la paroi. En support de cette théorie, des études récentes utilisant des techniques d'imagerie sensibles, ont montré la présence de brèches dans de nombreux cas d'hémorragie intramurale (Grimm, Loewe et al. 2008, Park, Lim et al. 2008, Uchida, Imoto et al. 2013). Plus récemment, les travaux de notre laboratoire, ont montré que ces brèches intimes étaient le résultat d'un stress hémodynamique exercé par le sang et les éléments qui le compose aux sites de perturbation du flux (Franck, Even et al. 2019).

Que le *primum movens* soit la rupture des *vasa vasorum* ou la brèche intinale, c'est bien l'arrivée du sang le long d'un cheminement dans la paroi artérielle qui entraîne la dissection aortique et, d'après les recommandations de l'American College of Cardiology/American Heart Association (ACC/AHA), tout doit être mis en place le plus rapidement possible pour arrêter la progression de ces hématomes intramuraux et éviter ainsi le risque de rupture totale de la paroi (Hiratzka, Bakris et al. 2010, Erbel, Aboyans et al. 2014).

II.2.d. Traitements actuels

D'après l'IRAD, 25% des patients hospitalisés pour une dissection aortique aiguë présenteront une complication dans les deux semaines qui suivent (Fattori 2008, Fattori, Montgomery et al. 2013). La présence de complications conditionne le choix thérapeutique. En effet, le traitement va dépendre de plusieurs paramètres, tels que la localisation de la dissection ou encore de l'état de santé du patient.

Actuellement, l'objectif des traitements est double :

- Traiter les complications à court terme (syndrome de malperfusion) ;
- Prévenir les évolutions anévrysmales à long terme.

i. Traitement médical

Dans tous les cas, que la dissection soit de type A ou B, le traitement médical est indispensable pour tous les patients avec pour objectif principal le contrôle de la tension (maintien d'une pression systolique contrôlée entre 100 et 120 mmHg et une fréquence cardiaque d'environ 60 battements par minute – (Tsai, Nienaber et al. 2005)) mais aussi de la prise en charge de la douleur.

Les traitements anti-hypertenseurs, type bêta-bloquants, permettent dans un premier temps de réduire le stress au niveau de la paroi aortique (Nienaber and Powell 2012). Ces derniers ont l'avantage d'avoir des effets protecteurs contre l'ischémie myocardique. En deuxième ligne, les vasodilatateurs de type inhibiteurs calciques (nicardipine ou diltiazem) peuvent être utilisés. Cependant, ce traitement médical à lui seul ne suffit pas. En effet, à long terme il n'empêche pas la progression de la pathologie puisqu'à 6 ans, seuls 4% des patients avec une dissection aortique aiguë de type B et traités par thérapie médicamenteuse seront encore en vie et indemnes d'intervention chirurgicale (Durham, Cambria et al. 2015).

ii. Traitements chirurgicaux

Chirurgie à cœur ouvert

Avant l'arrivée des techniques endovasculaires, la chirurgie à cœur ouvert était le seul traitement invasif possible. L'objectif étant de remplacer la partie de l'aorte affectée par une prothèse synthétique afin de prévenir sa rupture. C'est une procédure lourde, qui nécessite entre autres une thoracotomie, l'arrêt du cœur ainsi qu'une circulation sanguine extra-corporelle (CEC). C'est donc une intervention qui expose le patient à d'importantes complications telles que l'accident vasculaire cérébral (AVC - (Nishida, Tabata et al. 2017)) ou encore des lésions ischémiques digestives ou rénales (Lansman, Hagl et al. 2002, Fattori 2008).

De plus, d'après l'IRAD, la mortalité intra-hospitalière est de 32% chez les patients ayant une dissection aortique aiguë de type B et traitement chirurgical à cœur ouvert, contre 9,6% chez les patients avec traitement médical seul et seulement 6,5% pour les patients traités par technique endovasculaire.

Traitement endovasculaire

Ce n'est que depuis la fin des années 90 que la prise en charge des dissections aortiques évolue avec l'arrivée des techniques endovasculaires pour l'aorte thoracique. Contrairement aux interventions cardiovasculaires traditionnelles, les techniques endovasculaires ont l'avantage d'être peu invasives (absence de thoracotomie ou encore de CEC).

Le traitement endovasculaire consiste à déployer une prothèse endovasculaire afin de plaquer la porte d'entrée de la dissection et de bloquer la communication entre le faux chenal et le chenal physiologique. Le flux sanguin est ainsi redirigé dans la vraie lumière physiologique, améliorant la perfusion distale et prévenant la rupture aortique. A long terme, cette procédure vise également à stabiliser l'aorte en induisant un remodelage aortique positif. En effet, la thrombose du faux chenal associée à son rétrécissement permet de prévenir la dégénérescence anévrysmale et donc sa rupture secondaire.

II.3. L'issue de la dissection aortique dépend de la réparation tissulaire

II.3.a. Importance de la matrice extracellulaire

Alors que le traitement endovasculaire combiné au traitement médical classique permet de contenir la progression de l'hématome et fermer la porte d'entrée de la dissection en plaquant le flap intimal, les complications sont fréquentes et le pronostic à long terme reste sombre, aggravé par le risque de récurrence de dissection (Lumsden and Reardon 2008). En effet, si le flap intimal n'arrive pas à cicatriser, à chaque systole il y a une nouvelle entrée de sang qui fait grandir l'hématome et progresser le faux chenal. Cela implique la dégradation de la matrice extracellulaire, par les protéases de la coagulation et de la fibrinolyse, et la fragilisation progressive de la paroi lésée. Ainsi, l'évolution anévrysmale devient inexorable et le risque de rupture grandit avec le temps. Idéalement, il faudrait trouver des moyens thérapeutiques visant à favoriser la production locale de matrice extracellulaire rapide et efficace afin de favoriser et consolider la cicatrisation de la paroi aortique lésée.

En effet, en présence de défauts génétiques perturbant la consolidation de la matrice extracellulaire, comme par exemple dans le syndrome de Marfan, les dissections aortiques

montrent un caractère récidivant/récurrent, malgré un traitement optimal. Ceci souligne l'importance de la réponse appropriée de la MEC dans le processus de réparation (Isselbacher, Bonaca et al. 2016).

Dans le processus de réparation tissulaire après une lésion aiguë, les macrophages infiltrés dans le site de lésion adoptent initialement un phénotype « inflammatoire », participant à la phase de « déblayage » en y phagocytant les débris cellulaires (neutrophiles et cellules mortes). Cependant, afin d'avoir une cicatrice efficace, il est indispensable que ces monocytes puissent passer d'un phénotype pro-inflammatoire vers un phénotype pro-réparateur (Mantovani, Biswas et al. 2013). Il a notamment été montré chez des patients atteints d'ulcères chroniques de la jambe, que la surcharge des macrophages en fer était responsable du maintien de ces derniers dans un état pro-inflammatoire (macrophage de type M1) conduisant à une mauvaise cicatrisation (Sindrilaru, Peters et al. 2011). Ces résultats ont également été retrouvés dans un modèle *in vivo*.

Connu pour leur rôle efficace lors de la phagocytose, les macrophages sont des cellules immunitaires aux effets pléiotropes. En effet, de façon tout aussi efficace que leur fonction de phagocytose, les macrophages sont capables de produire des molécules immunitaires effectrices ainsi que les composants de la matrice extracellulaire. Ils interviennent donc dans des processus physiologiques variés tels que l'élimination de stimuli nocifs ou encore les processus de réparation (cicatrisation) consécutifs à une lésion. Cette plasticité phénotypique des macrophages provient de leur capacité à s'adapter à leur micro-environnement. Ainsi on distingue les macrophages dits de type M1, des macrophages dits de type M2. Les macrophages M1 sont assimilés à un phénotype « pro-inflammatoire ». En effet, ces derniers produisent de grandes quantités d'iNOS (Inducible Nitric Oxide Synthase - Oxyde Nitrique Synthase inductible), de TNF α , d'IL-1 β et d'IL-6 et sont très efficaces dans l'élimination des bactéries. A l'inverse, les macrophages M2 sont identifiés comme « pro-réparateurs ». En raison de leur expression élevée en Arginase-I, d'IL-10 et de TGF- β , ainsi que de leur capacité à produire en grandes quantités des composants de la MEC (Gleissner 2012), les macrophages M2 jouent un rôle majeur dans les mécanismes de cicatrisation et de fibrose. De plus, ils sont incapables de provoquer la mort cellulaire. L'équilibre entre les macrophages M1 et M2 est conditionné par leur micro-environnement. Ainsi ces derniers adaptent leur phénotype en fonction des signaux qu'ils reçoivent. Cet équilibre est indispensable au maintien de l'homéostasie de l'organisme et est d'autant plus important dans des conditions pathologiques. En effet, dans le cas par exemple de l'athérosclérose, au fur et à mesure que la maladie progresse, et que les stimuli persistent et changent, on observe une polarisation opposée des phénotypes des macrophages (Khallou-Laschet, Varthaman et al. 2010). Alors que les macrophages réparateurs M2 sont les premiers arrivés au niveau de la lésion intimale, probablement pour réparer les tissus lésés et favoriser la

cicatrisation de la paroi artérielle touchée, les macrophages M1 se retrouvent dans la plaque suite à une réponse immunitaire adaptative qui se met en place. Elle implique notamment la production locale d'IFN γ (Interferon gamma) et de TNF α par les lymphocytes Th1 (lymphocytes T helper de type 1) favorisant ainsi la prolifération locale des macrophages M1. Cette prolifération de macrophages M1 activés, au lieu de favoriser la cicatrisation des tissus, va plutôt favoriser la croissance de la plaque d'athérosclérose (Robbins, Hilgendorf et al. 2013). De plus, la production locale de NO et de TNF α par les macrophages M1, peut également favoriser la mort cellulaire et la destruction de la matrice extracellulaire, aggravant non seulement la lésion préexistante mais participant aussi à la formation de plaques dites « instables » pouvant éventuellement se rompre et entraîner des complications (Mantovani, Garlanda et al. 2009).

II.3.b. Rôle du CD31 dans la régulation des macrophages

Il a été montré que la voie de signalisation du CD31 régule la réponse des macrophages stimulés par le LPS (lipopolysaccharide impliquée dans la polarisation pro-M1). Cette absence de réponse passe par l'inhibition de la voie NF κ B (Rui, Liu et al. 2007). Ainsi il était donc intéressant d'étudier si l'utilisation d'un agoniste capable de restaurer la voie de signalisation du CD31 peut favoriser la polarisation des macrophages et donc améliorer l'issue de la réparation après une lésion aiguë. Dans le contexte de dissection aortique présentant un environnement riche en fer (hématome intramural), favoriser l'adoption du phénotype M2 par les macrophages pourrait être la clé pour une réparation optimale. En effet, le processus de cicatrisation peut être retardé, voir ne pas avoir lieu à cause de l'accumulation du fer des globules rouges dans l'hématome car le fer empêche le changement de phénotype M1 vers le phénotype M2 des macrophages (Sindrilaru, Peters et al. 2011). C'est pourquoi nous avons cherché à étudier le rôle du CD31 dans la polarisation des macrophages dans un modèle murin de dissection aortique avec hémorragie intramurale. En effet, au-delà de sa fonction de marqueur endothélial (Liu and Shi 2012), l'attention croissante dont fait l'objet le CD31 en tant qu'immunorécepteur inhibiteur via ses motifs ITIMs (Newman 1999), montre son potentiel en tant que cible thérapeutique (Marelli-Berg, Clement et al. 2013). Par ailleurs, notre laboratoire a déjà montré que l'administration d'un peptide agoniste du CD31 réduisait l'apparition de dissections mais aussi d'hématomes intramuraux en diminuant d'une part, l'infiltrat leucocytaire périvasculaire mais aussi en réduisant l'activation des lymphocytes T (Fornasa, Clement et al. 2012). D'autre part, les travaux du laboratoire ont également démontré que le passage des macrophages d'un phénotype M1 (pro-inflammatoire) à un phénotype M2 (pro-réparateur) était bénéfique dans la réparation des lésions vasculaires dans un contexte d'athérosclérose expérimentale (Khallou-Laschet, Varthaman et al. 2010).

II.3.c. Description du modèle de dissection aortique expérimentale : perfusion d'Angiotensine II (Ang II) chez la souris ApoE^{-/-}

Afin d'évaluer le rôle du CD31 dans les suites d'une lésion mécanique aiguë de la paroi aortique dans un contexte expérimental, nous avons utilisé le modèle de dissection aortique provoqué par la perfusion sous-cutanée d'Angiotensine II à 1 mg/kg/jour pendant 28 jours chez des souris hypercholestérolémiques ApoE^{-/-} (Apolipoprotéine E) mâles âgés de 28 semaines, sous régime alimentaire normal.

Malgré quelques inconvénients liés au modèle (un taux de survenu de dissections de 60% et une mortalité de 20% le long de la période de perfusion (Trachet, Fraga-Silva et al. 2015)) et des différences spécifiques avec l'homme (anévrismes impliquant généralement le segment sous-rénal de l'aorte chez l'homme alors que chez la souris, l'aorte supra-rénale est touchée) ce modèle a l'avantage, en plus d'être techniquement simple, de reproduire les caractéristiques de la dissection aortique avec hématome intramural que l'on retrouve chez l'homme, à savoir la présence d'un thrombus, la dilatation du vaisseau, l'inflammation (phagocytose et extravasation de leucocytes) ou encore la dégradation de la média. C'est le modèle qui est le plus utilisé dans les études précliniques.

Décrit par Daugherty et al. il y a 20 ans, ce modèle consiste à administrer de l'Angiotensine II en continu, à une dose allant de 1 à 1,8 mg/kg/jour pendant une période de 2 à 4 semaines via l'implantation sous-cutanée de mini-pompes osmotiques (Trachet, Piersigilli et al. 2016). En utilisant et caractérisant des segments aortiques de souris ApoE^{-/-} perfusés à l'Ang II pendant 1 à 56 jours, l'équipe de Daugherty a réussi à mettre en évidence la séquence d'évènements cellulaires de l'initiation à la maturation de la pathologie (Saraff, Babamusta et al. 2003). C'est entre le 3^{ème} et le 10^{ème} jour de perfusion qu'une ou plusieurs lésions intimes se produisent et conduisent à l'infiltration du sang dans la paroi aortique, ce qui provoque alors la formation d'un hématome intramural et donc une dilatation externe. Cet épisode se caractérise par une accumulation de macrophages au niveau de la paroi, associée à la dégradation du réseau d'élastine et d'une infiltration de lymphocytes B et T (Koch, Robinson et al. 1990). D'autres types cellulaires ont également été évoqués dans ce modèle, comme les cellules endothéliales (Rateri, Howatt et al. 2011, Lu, Howatt et al. 2015).

III. Lésion cardiaque aiguë : infarctus dans l'ère de la reperfusion

Principalement liée aux syndromes coronariens aigus (Lloyd-Jones 2010, Pfleiderer, Marwan et al. 2010), la cardiopathie ischémique représente l'une des principales causes de morbi-mortalité dans les pays industrialisés. Plus de la moitié des décès dus aux maladies cardiovasculaires, sont provoquées par des maladies coronariennes. En France, l'incidence de l'infarctus du myocarde reste encore élevée avec 120 000 cas par an. Bien que le nombre de décès lié aux accidents ischémiques soit en nette diminution, il n'en reste pas moins un problème de santé publique.

L'enjeu majeur dans l'infarctus du myocarde est de limiter la perte des cardiomyocytes, en restaurant une perfusion suffisante afin de limiter les dégâts liés à l'ischémie. Bien que la réouverture précoce de l'artère occluse et la reperfusion tissulaire qui en découle s'accompagnent d'un bénéfice clinique net en termes de mortalité ou encore de survenue d'insuffisance cardiaque, le bénéfice observé n'est pas toujours à l' hauteur du résultat de la recanalisation. En effet, recanalisation n'est pas synonyme de reperfusion. C'est le phénomène de « *no-reflow* ». Ce phénomène est dynamique et s'installe au cours des premiers jours de l'infarctus. Il associe notamment dysfonction endothéliale et obstruction microvasculaire. La conséquence finale est un prolongement et une aggravation de l'ischémie avec à terme la survenue d'une insuffisance cardiaque.

III.1. Perfusion du muscle cardiaque

Comme tous les autres tissus de l'organisme, le cœur doit recevoir du sang riche en oxygène et en nutriments et ses déchets doivent être éliminés. Ceci est assuré par la circulation coronaire qui correspond aux circulations artérielle et veineuse systémiques qui sont propres au cœur (**Figure 9**).

Le réseau coronaire artériel

Les artères coronaires droite et gauche assurent la circulation artérielle. Elles prennent naissance au niveau des sinus coronaires droit et gauche dans la racine de l'aorte, à la sortie du cœur. Les artères coronaires se divisent en grandes et moyennes artères qui parcourent la surface du cœur (artères coronaires épicaudiques) et envoient de plus petites artérioles dans le myocarde.

L'artère coronaire droite se divise en deux branches, l'artère marginale et l'artère interventriculaire postérieure. Elle vascularise les parties inférieures du septum interventriculaire des ventricules et l'essentiel du tissu nodal.

L'artère coronaire gauche (typiquement appelée artère coronaire principale gauche) commence par un tronc commun et se divise également en deux branches, l'artère circonflexe et l'artère interventriculaire antérieure (IVA). Cette dernière suit habituellement le sillon interventriculaire antérieur et, chez certains individus, continue jusqu'à la pointe. L'IVA nourrit la partie antérieure du septum (y compris le système de conduction proximal) et la paroi libre antérieure du ventricule gauche. L'artère circonflexe, habituellement plus petite que l'IVA, vascularise la paroi libre latérale du ventricule gauche.

Ce type de vascularisation terminale est très efficace mais présente un risque d'anoxie en cas de sténose ou d'occlusion.

Le réseau coronaire veineux

Ce réseau est constitué de la grande, moyenne et petite veine cardiaque, ainsi que des petites veines accessoires. Les veines cardiaques collectent le sang contenant les déchets provenant du muscle cardiaque et le drainent dans la grande veine située sur la face postérieure du cœur, appelée le sinus coronaire, qui ramène le sang à l'oreillette droite.

En l'absence de sténose épicaudique significative des trois artères coronaires, la résistance vasculaire (>70%), est déterminée en grande partie par les vaisseaux de petit calibre (artéioles intramurales). En effet, la circulation coronaire s'adapte à la demande métabolique du myocarde par des variations de la résistance vasculaire au niveau des artéioles intramurales, alors que la pression de perfusion reste relativement stable (dans certaines limites) grâce à un mécanisme d'autorégulation. Une demande métabolique augmentée entraîne la production et la libération par le cœur, de molécules vasodilatatrices agissant sur les artéioles intramurales.

Ainsi on comprend qu'une lésion fonctionnelle ou structurale des artéioles de petits calibres, influence le seuil ischémique du cœur. Après recanalisation de l'artère responsable d'un infarctus, la mesure de la fonction microcirculatoire permet d'estimer la qualité de la reperfusion myocardique. L'appréciation de la fonction microvasculaire est un enjeu majeur dans l'évaluation de l'ischémie du myocarde.

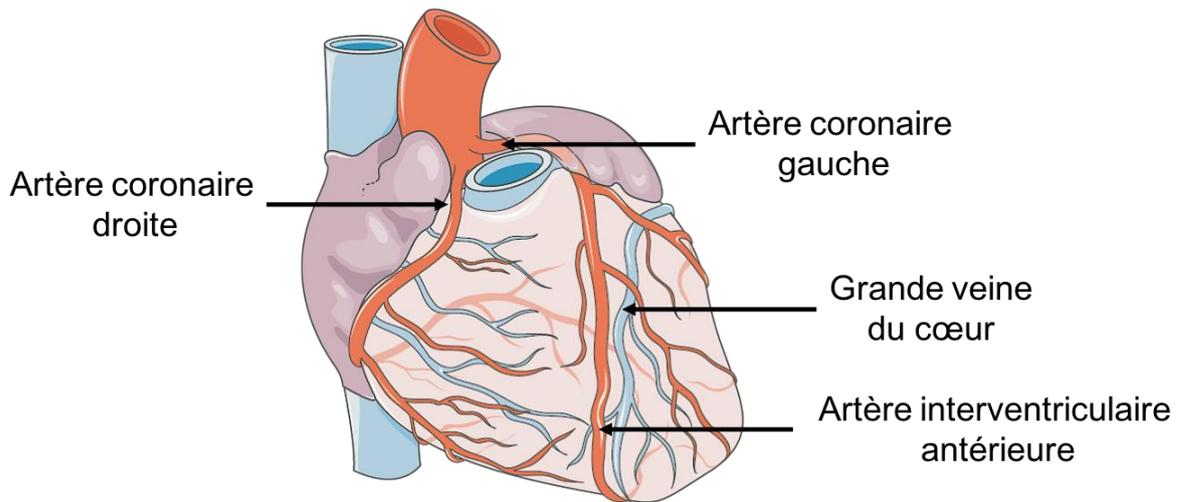


Figure 9. Circulation coronarienne. La circulation coronarienne correspond à la circulation nourricière du cœur. Elle répond à la demande métabolique du cœur en apportant l'oxygène et les nutriments nécessaires à son fonctionnement. Les artères coronaires fournissent le sang oxygéné au muscle cardiaque tandis que les veines drainent le sang et éliminent les déchets une fois qu'il a été désoxygéné (adapté d'après Smart Servier Medical Art).

III.2. Ischémie-reperfusion myocardique

III.2.a. Définition

L'ischémie myocardique se définit comme un déséquilibre entre les besoins (en oxygène et en nutriments), et les apports artériels nécessaires au bon fonctionnement des cellules cardiaques. Dans le cas de l'infarctus du myocarde, l'ischémie résulte d'une obstruction partielle ou totale d'une ou plusieurs artères nourricières du cœur (artères coronaires) suite à une sténose, un thrombus ou encore une plaque d'athérome. Ce déséquilibre va alors vite se transformer en un manque d'oxygène (hypoxie) et de nutriments conduisant à la destruction (par nécrose) du tissu cardiaque. La seule intervention est la reperfusion afin de rétablir le flux en aval de l'artère occluse. Lorsque cette recanalisation intervient dans un intervalle de temps utile, elle permet de limiter les dégâts liés à l'ischémie. Cependant elle n'est pas sans conséquences, car elle s'accompagne de nombreux dommages tissulaires qui lui sont propres et que l'on retrouve sous le terme de « lésions de reperfusion » ou encore de « syndrome de reperfusion » (Becker and Ambrosio 1987).

III.2.b. Epidémiologie et facteurs de risque

En France, selon l'INSERM, environ 120 000 cas d'infarctus sont comptés par an. Environ 10% des victimes décèdent dans l'heure qui suit et le taux de mortalité à 1 an est de 15%. A

cette mortalité, s'ajoute une morbidité ainsi que des retentissements socio-économiques non négligeables en termes de biens médicaux ou encore de coût des soins.

L'incidence des maladies ischémiques ne cesse d'augmenter d'autant plus qu'elles sont la conséquence de plusieurs facteurs de risque en pleine expansion comme le vieillissement de la population, le diabète ou encore l'obésité. L'étude de Framingham, lancée après la Seconde Guerre Mondiale, a notamment largement contribué à comprendre et identifier les facteurs susceptibles de jouer un rôle dans l'étiologie des maladies cardiovasculaires. Les principaux facteurs de risque cardiovasculaires, dont plusieurs modifiables, sont notamment le tabagisme, l'hypercholestérolémie, le diabète, l'obésité ou encore l'hypertension artérielle.

III.2.c. Mécanismes physiopathologiques

i. Ischémie

Au cours de l'ischémie, la sévérité des lésions va dépendre de l'étendue de la zone ischémisée, de la durée de réduction du flux sanguin (Reimer, Lowe et al. 1977) et de l'existence d'une circulation collatérale fonctionnelle (Reimer and Jennings 1979). On distingue ainsi les ischémies de courte durée de celles de longue durée. On parle d'ischémie courte lorsqu'elle dure moins de 20 minutes. Les dommages cellulaires sont alors réversibles sans apparition de nécrose des cardiomyocytes (Reimer, Lowe et al. 1977). A l'inverse, on parle d'ischémie longue lorsque la durée de l'ischémie se prolonge au-delà de 20 minutes (Redel, Jazbutyte et al. 2008) et qu'une partie du muscle cardiaque est irréversiblement lésée.

A l'échelle organique, cela se traduit par une détérioration de la contractilité du cœur et par une perturbation du système de conduction cardiaque (Schaper and Schaper 1983).

A l'échelle tissulaire, ces lésions se caractérisent notamment par la présence d'inclusion mitochondriales denses et de ruptures membranaires menant à la fuite des composants cellulaires et à une perte de la structure architecturale (Allen and Orchard 1987). La nécrose du tissu est d'autant plus importante que la durée de l'ischémie se prolonge de la région transmurale vers l'épicarde (Reimer and Jennings 1979), on parle de « front d'onde ».

Enfin, à l'échelle cellulaire, le manque d'oxygène et de nutriments provoque des modifications biochimiques et métaboliques au sein du myocarde.

En effet, en condition physiologique, l'énergie nécessaire au bon fonctionnement du cœur (Adénosine Triphosphate : ATP) provient principalement du métabolisme oxydatif (oxydation des acides gras (60%) et du glucose (30%) – Grynberg 2002). Le cœur humain produit environ 30 kg d'ATP par jour (80 μ mole/g/min – (Opie 1990)). Cependant, en condition d'ischémie, la diminution de l'apport en oxygène conduit à une stimulation de la glycolyse anaérobie. Celle-ci va permettre de compenser, en partie, le déficit énergétique. Pourtant cette voie métabolique

reste insuffisante pour couvrir les besoins du cœur du fait de son faible rendement (production de 2 molécules d'ATP par molécule de glucose contre 36 en condition aérobie). D'autre part, l'activation de cette voie anaérobie conduit à une production et à une accumulation massive de lactate et de protons (H^+) intracellulaires responsables d'une acidose cellulaire (Allen and Orchard 1987, Opie 1990). Cette accumulation intracellulaire de protons active l'échangeur Na^+/H^+ qui va alors éliminer les protons en excès en échange de l'entrée de sodium afin de rétablir le pH intracellulaire (Pike, Luo et al. 1993, Avkiran and Marber 2002). Par ailleurs, l'absence d'ATP réduit l'activité des pompes Na^+/K^+ -ATPases dépendantes normalement responsables de l'élimination de 3 molécules de sodium contre l'entrée de 2 molécules de potassium. Ceci participe à l'accumulation progressive de sodium intracellulaire. Cette surcharge sodique entraîne à son tour l'activation en mode inversé de l'échangeur Na^+/Ca^{2+} (NCX - normalement entrée de sodium et sortie de calcium) responsable en partie d'une surcharge calcique intracellulaire ((Tani and Neely 1989, Imahashi, Pott et al. 2005) - **Figure 10. Physiopathologie de l'ischémie myocardique.1**).

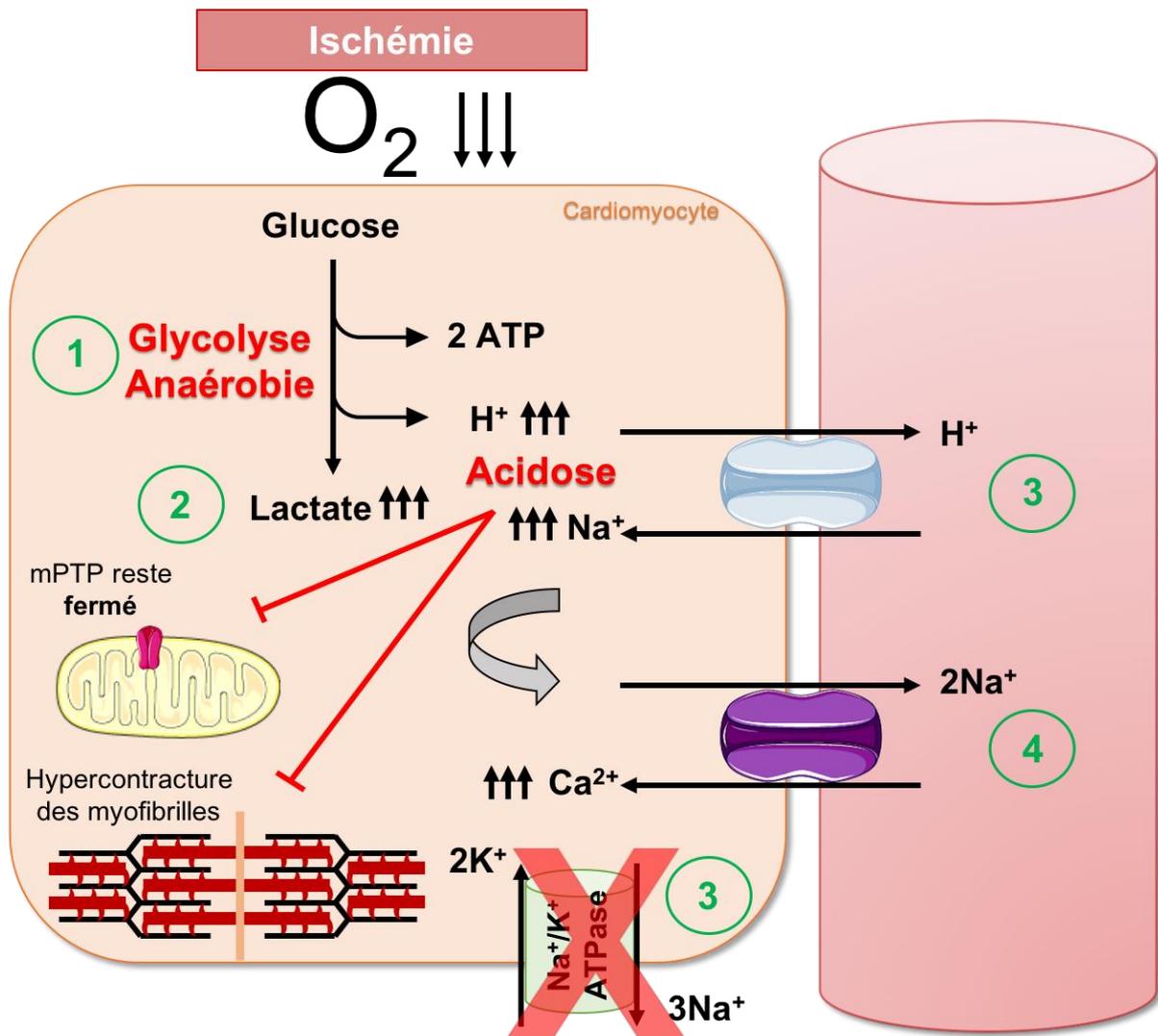


Figure 10. Physiopathologie de l'ischémie myocardique. 1) Au cours d'une ischémie myocardique aiguë, l'absence d'oxygène modifie le métabolisme cellulaire en respiration anaérobie. 2) Ce qui entraîne la production de lactate et une diminution du pH intracellulaire. 3) Cela active l'échangeur Na⁺/H⁺ qui élimine les protons en échange d'une entrée de sodium. 4) Une surcharge sodique se met alors en place, ce qui active à son tour l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ pour fonctionner en sens inverse (sortie de sodium contre une entrée de calcium) entraînant une surcharge calcique intracellulaire. La pompe Na⁺/K⁺-ATPase cesse de fonctionner pendant l'ischémie, ce qui accentue la surcharge de sodium intracellulaire. mPTP : mitochondrial Permeability Transition Pore (adapté d'après Hausenloy et Yellon 2013)).

Ainsi au cours de l'ischémie, l'ensemble des troubles métaboliques (diminution de production d'ATP et acidose) et ioniques (surcharge calcique) conduisent à une altération rapide de la fonction contractile des cellules cardiaques dont la survie va dépendre de la survenue de la reperfusion.

ii. Reperfusion

Il est clairement établi que les cardiomyocytes ne peuvent survivre dans des conditions d'ischémie sévères prolongées. A l'heure actuelle, la reperfusion coronaire (recanalisation) est reconnue comme étant la seule solution efficace pour sauver le myocarde (limiter la taille de l'infarctus, sauver la partie encore viable du myocarde, préserver la fonction systolique du ventricule gauche et ainsi prévenir les débuts d'une insuffisance cardiaque). Elle consiste en effet à rétablir le flux en aval de l'artère occluse. Cette reperfusion peut survenir de façon naturelle (cascade de la fibrinolyse suivant la thrombose), pharmacologique (perfusion de « Recombinant Tissue Plasminogen Activator », r-tPA) ou encore mécanique (angioplastie, implantation de stents). Bien qu'elle soit indispensable à la survie de myocarde, la reperfusion peut apporter des effets délétères qui lui sont propres et que l'on regroupe sous le nom de « syndrome de reperfusion » (Becker and Ambrosio 1987). Ces effets sont liés à la dysfonction mitochondriale des cellules qui ne sont pas mortes, elle-même enclenchée par l'ischémie et déterminée par la réoxygénation qui accompagne la reperfusion. Parmi les principaux facteurs responsables de la dysfonction mitochondriale on trouve, entre autres, le stress oxydant, la surcharge calcique et l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP). Ces mêmes processus surviennent aussi bien dans les cellules vasculaires que celles du sang de la zone ischémisée et sont responsables d'une réponse inflammatoire exagérée, inappropriée, qui finit par endommager, au moins en partie, le tissu qui devait en théorie être sauvé par la reperfusion.

Le concept de « lésions de reperfusion myocardique » a été postulé pour la première fois en 1960 par Jennings et al. Dans un modèle d'ischémie reperfusion myocardique chez le chien, leurs descriptions histologiques du cœur ont ainsi reporté un gonflement cellulaire, une concentration des myofibrilles, une perturbation du sarcolemme ou encore l'apparition de particules de phosphate de calcium dans les mitochondries. D'autres études, tant cliniques, qu'expérimentales, ont mis en évidence les effets délétères propres à la reperfusion et qui sont regroupés sous quatre types de lésions (détaillés plus loin) : les arythmies de reperfusion, la sidération myocardique aussi connue sous le nom de « *myocardial stunning* », l'extension de la nécrose myocardique et le phénomène de « *no-reflow* » (Yellon and Hausenloy 2007). Les deux premières conditions sont réversibles, contrairement aux deux autres.

Au cours de l'ischémie myocardique, les cellules subissent plusieurs modifications métaboliques et biochimiques (voir « Ischémie ») qui préparent aux dégâts survenant au cours de la reperfusion. En particulier, la xantine dehydrogenase cesse de fonctionner et laisse la place à xanthine oxydase. Ainsi, l'apport soudain d'oxygène va conduire à la formation d'espèces réactives à l'oxygène (ERO ou ROS) qui vont être responsables d'un stress oxydant impliqué dans de nombreux effets

délétères sur la cellule comme la dégradation des lipides de membranes plasmiques et des organelles intracellulaires ainsi que des protéines et de l'ADN, ou encore le maintien en l'état contracté du muscle cardiaque à cause de la surcharge calcique (Dixon and Haynes 1990, Granger and Kvietys 2015, Moris, Spartalis et al. 2017). En effet, parmi les cibles des ROS se trouvent les protéines responsables de l'homéostasie calcique au niveau de la membrane plasmique des cardiomyocytes (Dixon and Haynes 1990) mais aussi au niveau du réticulum sarcoplasmique (Bolli and Marban 1999, Zima and Blatter 2006). A ce niveau les ROS conduisent à l'oxydation de la pompe calcique ATPase appelée SERCA-2a qui est normalement responsable de la re-séquestration du calcium dans le réticulum sarcoplasmique (RS). Cette oxydation conduit alors à une surcharge calcique intracellulaire qui va elle-même être responsable d'une hyperphosphorylation des récepteurs à la ryanodine (RyR-2) à l'origine d'une augmentation des fuites de calcium du RS, contribuant ainsi à l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium (Sun, Wang et al. 2005, Gyorke and Carnes 2008). Cette augmentation de la concentration intracellulaire de calcium va alors favoriser la surcharge en calcium de la matrice mitochondriale (chargée négativement) conduisant à des altérations fonctionnelles de cette dernière comme l'ouverture de son méga pore sélectif (détaillé plus loin dans le paragraphe « mort cellulaire ») ((Crompton, Ellinger et al. 1988) – **Figure 11**).

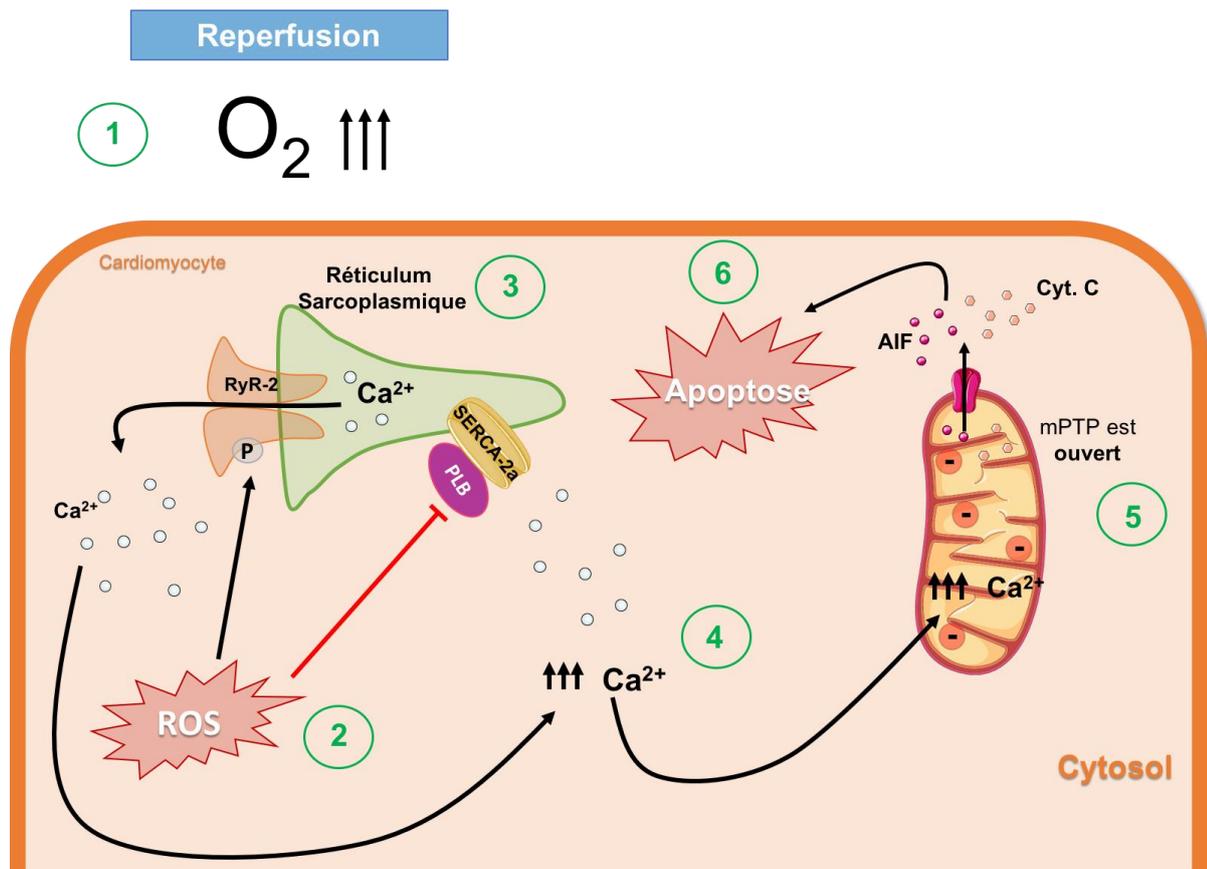


Figure 11. Mécanismes responsables de la surcharge calcique intracellulaire au cours de la

reperfusion.1) L'apport soudain d'oxygène va conduire à la formation excessive d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) qui vont être responsables d'un stress oxydant. 2) Parmi les cibles des ROS, se trouve les protéines responsables de l'homéostasie calcique au niveau de la membrane plasmique mais aussi au niveau du réticulum sarcoplasmique (RS). 3) A ce niveau, les ROS conduisent à l'oxydation de la pompe calcique ATPase appelée SERCA-2a qui normalement est responsable de la re-séquestration du calcium dans le réticulum, ce qui conduit à une surcharge calcique intracellulaire. Ces ROS vont en plus être responsable d'une hyperphosphorylation des récepteurs à la ryanodine (RyR-2) à l'origine d'une augmentation des fuites de calcium du RS, contribuant ainsi à l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium. 4) et 5) Par ailleurs, cette augmentation de la concentration intracellulaire de calcium va également favoriser la surcharge en calcium de la matrice mitochondriale (normalement chargée négativement) conduisant à des altérations fonctionnelles de cette dernière. AIF : Apoptosis Inducing Factor ; Cyt. C : Cytochrome C ; mPTP : mitochondrial Permeability Transition Pore ; PLB : Phospholamban ; RyR-2 : Récepteur à la Ryanodine.

Les lésions tissulaires entraînées par la séquence d'ischémie reperfusion conduisent à une exagération de l'inflammation au cours de la réparation tissulaire. En effet, la peroxydation lipidique et la nécrose cellulaire locale entraînent l'expression de molécules appelées « Damage-Associated Molecular Patterns » (DAMPs). Plusieurs molécules peuvent jouer le rôle de DAMPs, comme les éléments relargués par la mitochondrie ou encore des fragments de la MEC endommagée. Ces molécules sont reconnues par des récepteurs appelés PRRs pour « Pattern Recognition Receptors ». Ces derniers expriment des motifs permettant de reconnaître spécifiquement les DAMPs. Les PRRs sont présents sur les cellules immunitaires (neutrophiles, monocytes circulants ou encore macrophages résidents) mais également au niveau des cellules endothéliales et des cardiomyocytes (Bianchi 2007). La liaison DAMPs/PRRs participe ainsi au recrutement et à l'activation des réponses immunitaires et contribue aux lésions du myocarde (Boros and Bromberg 2006, Timmers, Pasterkamp et al. 2012). En effet, quelques heures après le début de la reperfusion, des neutrophiles s'accumulent dans la zone infarctée en réponse à la libération de chimioattractants comme les ROS et autres cytokines. Cet événement est notamment facilité par l'augmentation de l'expression de molécules d'adhérence cellulaire (P-sélectine ou encore ICAM-1) qui permettent la migration des neutrophiles dans le tissu cardiaque où ils provoquent la mort des cardiomyocytes via la production de ROS ou encore en favorisant la formation de microagrégats cellulaires participant ainsi au phénomène de « *no-reflow* » ((Vinten-Johansen 2004, Buja 2005) – **Figure 12**).

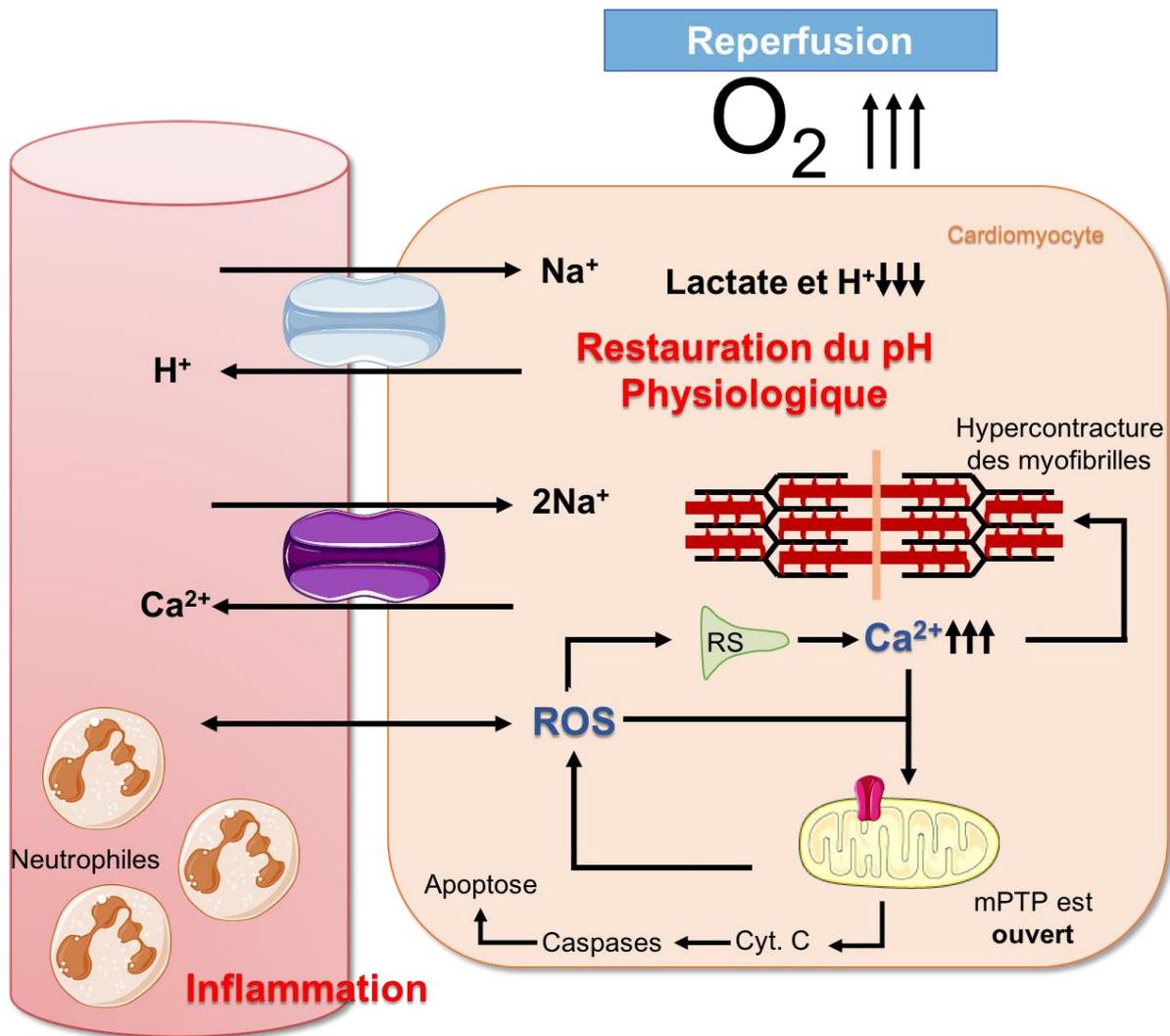


Figure 12. Physiopathologie de la reperfusion myocardique. Au cours de la reperfusion myocardique, le myocarde ischémié est soumis à plusieurs modifications biochimiques et métaboliques abruptes, qui aggravent les modifications générées pendant la période d'ischémie. Ces changements comprennent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), la surcharge de calcium intracellulaire, la restauration rapide du pH physiologique et l'inflammation, qui interagissent tous avec la médiation de la mort des cardiomyocytes par l'ouverture du pore de transition de la perméabilité mitochondriale (mPTP) et l'induction d'une hypercontracture des cardiomyocytes (adapté d'après Hausenloy et Yellon 2013).

Ainsi ces facteurs (ROS, surcharge calcique et inflammation) agissent de concert et sont responsables des effets délétères de la reperfusion qui sont regroupés sous quatre types de lésions : les arythmies de reperfusion, la sidération myocardique aussi connu sous le nom de « myocardial stunning », le phénomène de « no-reflow » et la mort cellulaire (Yellon and Hausenloy 2007).

Les arythmies de reperfusion

Ces troubles du rythme apparaissent de façon précoce quelques instants après la reperfusion. Ils vont de la tachycardie ventriculaire à la fibrillation ventriculaire. Ce sont des évènements réversibles, faciles à traiter ou dans certains cas qui se terminent d'eux-mêmes (Hearse and Tosaki 1987). Il est proposé que les radicaux libres dérivés de l'oxygène ainsi que la surcharge calcique et autres déséquilibres ioniques jouent un rôle critique dans la production d'arythmie de reperfusion (Bernier, Manning et al. 1989, Antoons and Sipido 2008). Une autre cause serait une altération de la conduction des potentiels d'action du fait d'une hétérogénéité tissulaire à la frontière entre la zone encore saine et la zone ischémiée (Wilson and Rosenbaum 2007).

La sidération myocardique ou « *myocardial stunning* »

Elle correspond à une dysfonction contractile temporaire du ventricule. Elle s'observe suite à la reperfusion en l'absence de dommages irréversibles (Bolli and Marban 1999). Cette dysfonction mécanique peut durer quelques jours mais est complètement réversible. La surcharge calcique (altération du couplage excitation-contraction des cardiomyocytes) ainsi qu'une baisse de la réactivité des myofilaments au calcium figurent parmi les mécanismes proposés (Kim, Kudej et al. 2001).

L'extension de la mort cellulaire des cardiomyocytes

Les modifications métaboliques survenant au cours de la reperfusion peuvent augmenter la zone de mort cellulaire des cardiomyocytes par différents mécanismes (Konstantinidis, Whelan et al. 2012) allant de l'autophagie (Hotchkiss, Strasser et al. 2009) et la nécrose (Zhang et al. 2016).

La surcharge calcique et le stress oxydant sont les médiateurs clés de la mort cellulaire provoquée par la reperfusion des cardiomyocytes soumis à une période d'ischémie. Le mécanisme majoritairement évoqué comme étant délétère est l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial (mPTP). Ce pore correspond à un canal voltage-dépendant situé dans la membrane interne de la mitochondrie. Il permet le passage passif de molécules de taille inférieure à 1,5 kDa (Haworth and Hunter 1979). Ce pore est normalement activé par le calcium (Crompton, Ellinger et al. 1988). De ce fait, la surcharge calcique qui s'opère au cours de la reperfusion entraîne l'ouverture de ce pore et donc à une perte de la perméabilité sélective de la membrane mitochondriale. Ceci va alors entraîner un arrêt de la synthèse d'ATP, aggravant ainsi les effets déjà présents au cours de l'ischémie mais aussi à une libération de facteurs proapoptotiques comme le Cytochrome c ou encore la protéine AIF (Apoptosis Inducing Factor) (Borutaite, Jekabsone et al. 2003, Eefting, Rensing et al. 2004). D'autre part, cette surcharge

calcique peut également être responsable de l'activation de protéases dont le mécanisme d'action dépend du calcium. C'est le cas par exemple des calpaïnes qui sont notamment impliquées dans la dégradation du cytosquelette et la rupture de la membrane plasmique du sarcolemme (Vanderklish and Bahr 2000).

Le phénomène de « *no-reflow* »

Il correspond à l'absence partielle ou totale de reperfusion au niveau du réseau microvasculaire, malgré la réouverture de l'artère obstruée (Ito 2006). Ce phénomène a été décrit pour la première fois en 1966 par Krug et al. dans un modèle d'occlusion de l'artère coronaire chez le chat. Par la suite, il a largement été étudié et détaillé par Kloner et Jennings dans les années 70 (Kloner, Ganote et al. 1974). Les mécanismes à l'origine de ce phénomène (Reffellmann and Kloner 2006, Schwartz and Kloner 2012) comprennent la dysfonction endothéliale, consécutive à la présence de ROS (Schwartz et Kloner 2012) et à une diminution de production de NO (Kubes, Suzuki et al. 1991) ; la formation de microagrégats (plaquettes et/ou leucocytes) venant obstruer les micro-vaisseaux ou encore la constitution d'un œdème tissulaire qui comprime les artérioles et les capillaires (Iwakura, Ito et al. 1999).

Alors que le CD31 ne peut avoir d'effet dans les processus cellulaires impliquant directement les cardiomyocytes, il est important de noter que tous les mécanismes sous-jacents le phénomène de *no-reflow* sont régulables par l'engagement du CD31 sur les cellules endothéliales, les leucocytes et les plaquettes (voir « Rôle du CD31 dans la réparation tissulaire après une ischémie reperfusion du myocarde »).

Le phénomène de *no-reflow* est évident surtout à proximité de la zone nécrotique, dans le réseau microvasculaire sous-endocardique, mais peut remonter et occuper également le réseau microvasculaire sous-épicaire, en cas d'ischémie prolongée. Il constitue un enjeu clinique majeur dans le traitement de l'ischémie reperfusion myocardique.

III.3. La recanalisation coronaire épiscopardique n'est pas synonyme de reperfusion myocardique : le phénomène de « *no-reflow* »

III.3.a. Définition

Malgré les avancées technologiques et les techniques modernes de revascularisation chirurgicales, ainsi qu'une restauration du flux épiscopardique (Ito, Tomooka et al. 1992), certaines zones du myocarde restent hypoperfusées, en particulier les zones les plus profondes. Cette absence de reperfusion de la microcirculation qui prolonge et aggrave l'ischémie et la mort cellulaire du territoire concerné, correspond au phénomène de « *no-reflow* ». C'est un phénomène complexe et dynamique qui se développe lors des premiers jours de l'infarctus. Sa physiopathologie combine des mécanismes inflammatoires, comme l'infiltration leucocytaire et la libération de facteurs cytotoxiques, à ceux de la dysfonction endothéliale dont la vasoconstriction ou encore la perte de l'intégrité de la barrière endothéliale. Le *no-reflow* est un facteur de mauvais pronostic clinique qui conduit à long terme au développement d'une insuffisance cardiaque dans les 7 à 8 ans après un infarctus (Hellermann, Jacobsen et al. 2003). En conséquence, un des défis thérapeutiques actuels est la restauration la plus rapide et la plus efficace du tissu myocardique, allant bien au-delà du rétablissement du flux épiscopardique.

III.3.b. Physiopathologie du « *no-reflow* »

Décrit pour la première fois par Krug en 1966 dans un modèle d'ischémie reperfusion chez le chat, le *no-reflow* a ensuite été largement étudié et caractérisé par l'équipe de Kloner dans les années 70 chez le chien (Kloner, Ganote et al. 1974). Dans cette étude, les chiens étaient soumis à une ischémie de 40 ou 90 minutes suivi d'une reperfusion. A des temps variables de la reperfusion, la Thioflavine S était injectée afin de marquer les cellules endothéliales. Les résultats montrent qu'après 40 minutes d'ischémie les cœurs présentaient un marquage uniforme en Thioflavine S contrairement aux cœurs ayant subi une ischémie de 90 minutes dont une partie du sous-endocarde n'était pas marquée, soulignant ainsi une absence de perfusion. Ce défaut de perfusion était spécifiquement localisé dans des régions du cœur qui montraient déjà des signes de nécrose ischémique. Ces signes de mort cellulaire étaient visibles bien avant l'observation des dommages microvasculaires (Braunwald 1980). Ce phénomène de *no-reflow* a ainsi été observé aussi bien chez le cochon (Skyschally, Amanakis et al. 2017), que chez le lapin (Hale and Kloner 2008) et le rat. L'analyse histologique de ces régions du cœur montrait une obstruction microvasculaire qui s'expliquait par un gonflement des cellules endothéliales s'apparentant à des « bulles » ou encore par la présence de protrusions venant ainsi boucher la lumière des petits micro-vaisseaux, dont les capillaires. Une rupture de la

barrière endothéliale a également été révélée par ces analyses. D'autres événements participent à cette occlusion microvasculaire, néanmoins ces derniers semblent être moins fréquents. Parmi ces événements, on note la présence de dépôts de plaquettes et de fibrine, de microagrégats leucocytaires ou encore d'hémorragies. Les capillaires semblaient également être comprimés par des myocytes gonflés ((Kloner, Ganote et al. 1974)- **Figure 13**).

Ainsi, les phénomènes biologiques conduisant au *no-reflow* se produisent au cours de deux phases : 1) la phase d'ischémie « longue » (d'une durée >30 minutes) au cours de laquelle des dommages irréversibles se mettent en place au niveau des cardiomyocytes et des cellules endothéliales ; et 2) la phase de reperfusion, qui est responsable de lésions qui lui sont propres (voir « Reperfusion ») et qui rajoutent des dommages supplémentaires au myocarde.

Au cours de la phase d'ischémie longue, la nécrose des cardiomyocytes entraîne un gonflement des cellules participant à l'écrasement des microvaisseaux ; au niveau de l'endothélium, la mort cellulaire provoque la destruction des jonctions serrées et adhérentes conduisant à la perte de la fonction de la barrière endothéliale (Durrer, Lie et al. 1981). La destruction de cette barrière endothéliale entraîne le passage des globules rouges et des cellules du sang dans le compartiment extravasculaire (c'est pour cela que la zone nécrotique apparaît « infarctée » de globules rouges et que l'on appelle cette condition clinique « infarctus »). La sortie du sang des capillaires vers le tissu ischémié participe à son tour à l'ischémie car elle entraîne la compression de l'extérieur, et donc à la réduction de la lumière des capillaires. L'altération de l'endothélium va également entraîner une perturbation de la production d'agents vasodilatateurs, dont le NO, ce qui contribue notamment à une vasoconstriction spontanée des vaisseaux (Maseri 1991).

L'arrivée du sang au cours de la phase de reperfusion peut aggraver les événements pathologiques déjà mis en place lors de l'ischémie, participant ainsi à la dysfonction endothéliale et la mort cellulaire. En particulier, l'arrivée soudaine de l'oxygène dans le tissu qui s'était adapté à un métabolisme anaérobie, entraîne la production de plusieurs espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui contribuent largement aux processus pathologiques propres de la reperfusion. L'action des ROS favorise le développement d'une inflammation « exagérée » (d'un degré bien supérieur au niveau requis pour le processus de réparation) qui se met en place dès les premières 24 heures. Cette réponse inflammatoire exagérée contribue à l'activation locale des leucocytes, des plaquettes et de l'endothélium (déjà entamée par la production de ROS dans chacun de ces types cellulaires) et donc à la formation de microagrégats constitués de leucocytes et de plaquettes qui s'accrochent à l'endothélium activé, participant ainsi à l'obstruction des microvaisseaux (Abela and Homer-Vanniasinkham 2003).

En effet, au cours de l'ischémie reperfusion myocardique, l'expression de molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales (VCAM-1, ICAM-1 et autres sélectines) ainsi que des cellules circulantes est augmentée. Ceci favorise non seulement l'interaction des leucocytes et des plaquettes à l'endothélium vasculaire mais aussi leur agrégation (Kogaki, Sawa et al. 1999, Kupatt, Wichels et al. 2002).

Les agrégats bloquant les capillaires comprennent également de nombreux globules rouges (Driesen, Zalewski et al. 2012) qui adhèrent, via leurs récepteurs du complément, aux autres types cellulaires sur lesquels le complément, de par sa fonction d'opsonine, s'est déposé (Tas, Klickstein et al. 1999).

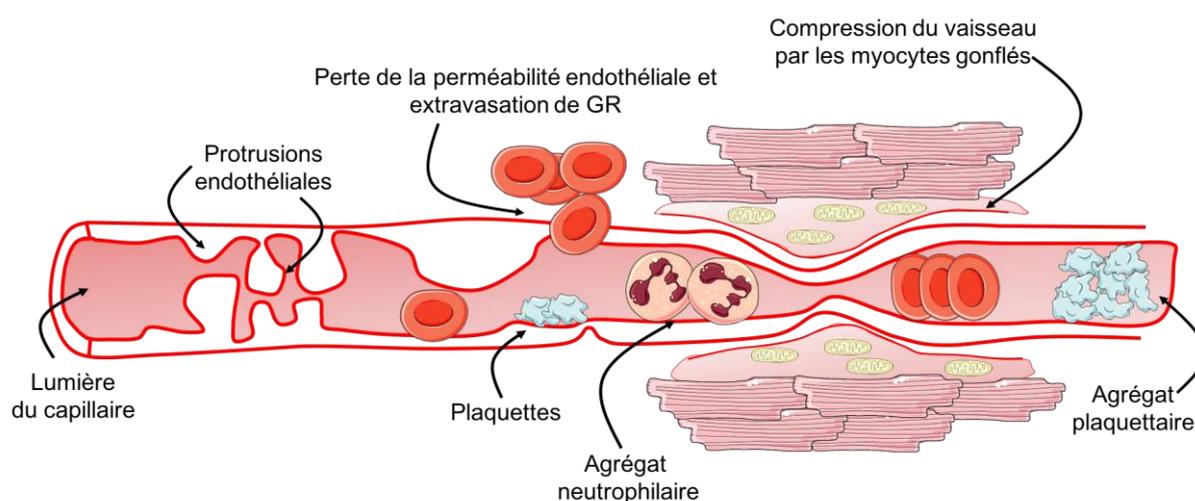


Figure 13. Représentation schématique des différents mécanismes impliqués dans le phénomène de *no-reflow*. (Adapté d'après Reffellmann et Kloner 2002.)

III.3.c. Une nouvelle cible thérapeutique : le « *no-reflow* »

Le *no-reflow*, responsable de l'élargissement de la zone nécrotique, est un facteur de mauvais pronostic clinique pour les patients atteints d'un infarctus, après une procédure de recanalisation coronaire. Il augmente le risque de développer une insuffisance cardiaque à long terme. L'ensemble des études cliniques et expérimentales dans ce domaine ont démontré que l'absence de perfusion microvasculaire (*no-reflow*) est corrélée à une mauvaise cicatrisation de l'infarctus, conduisant à un remodelage ventriculaire gauche défavorable (amincissement et étirement de l'infarctus) entraînant une dilatation de la cavité gauche et *in fine* à une fraction d'éjection diminuée (Ndrepepa, Mehilli et al. 2010). Le *no-reflow* est clairement associé à une incidence accrue d'insuffisance cardiaque et de mortalité (Kloner 2016), indépendamment de la taille de l'infarctus (Bolognese, Carrabba et al. 2004) : en effet l'efficacité de la reperfusion microvasculaire est un facteur prédictif de récupération fonctionnelle encore plus puissant que

la taille de l'infarctus (Nijveldt, Beek et al. 2008). Ainsi, toute stratégie capable de réduire le degré de *no-reflow* après recanalisation coronaire mérite d'être rapidement identifiée et spécifiquement poursuivie dans le but d'améliorer la réparation cardiaque post-infarctus et le pronostic des patients (Niccoli, Kharbanda et al. 2010, Heusch 2016).

III.4. Rôle du CD31 dans la réparation tissulaire après une ischémie reperfusion du myocarde : rationnel

Les processus responsables de la dysfonction de la barrière endothéliale et de la formation de microagrégats de plaquettes et/ou leucocytes sont en principe régulables par l'engagement trans-homophile du récepteur CD31. En effet le CD31 est exprimé de manière constitutive par les cellules endothéliales, les plaquettes ainsi que sur tous les leucocytes, dont le niveau d'expression est le plus élevé au niveau de la membrane des neutrophiles. En plus de sa fonction régulatrice de l'endothélium vasculaire, dont le maintien des jonctions cellulaires (Fleming, Fisslthaler et al. 2005, Privratsky and Newman 2014) et sa fonction vasodilatatrice, il a été montré que l'engagement trans-homophile du CD31 élève le seuil d'activation des cellules sanguines qui l'expriment entraînant un signal de détachement mutuel de ces dernières (Brown, Heinisch et al. 2002). Cela permet aux cellules circulantes du sang de rester dans un état « single cell » empêchant alors toute adhérence à la paroi vasculaire et réduisant le risque de formation de microagrégats dans la circulation. D'autre part, il a été démontré *in vivo* que la voie de signalisation du CD31 était capable d'inhiber l'agrégation plaquettaire. En effet, en utilisant des souris déficientes en CD31 et en induisant une lésion au laser au niveau des artérioles du crémaster, l'équipe de Gibbins et al. a démontré par microscopie intravitale que les thrombi se formaient plus rapidement chez les souris déficientes en CD31 que chez les souris témoins. Ces thrombi étaient plus gros et plus stables que les thrombi formés chez les animaux contrôles. Des résultats similaires ont été retrouvés en injectant des cellules provenant de la moelle osseuse de souris déficientes en CD31 chez des souris contrôles. Les auteurs ont également démontré qu'en utilisant un modèle de thrombose carotidienne au chlorure de fer, les souris qui ne présentaient plus de CD31 avaient un délai d'obstruction des vaisseaux plus court que les souris témoins (Falati, Patil et al. 2006).

Alors que le CD31 est exprimé de façon constitutive, les cellules qui l'expriment le clivent une fois qu'elles ont été stressées (Ilan, Mohsenin et al. 2001). C'est probablement ce qu'il se passe lors d'une ischémie prolongée. Le clivage du CD31 conduit à l'abaissement du seuil d'activation des cellules à l'interface sang-vaisseaux (Marelli-Berg, Clement et al. 2013). C'est pourquoi nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la perte du CD31 favorise les dégâts

microvasculaires occasionnés par la reperfusion du myocarde après l'ischémie, notamment via le phénomène du *no-reflow*.

Objectifs de la thèse

De par sa nature trans-homophile et son expression exclusive et constitutive par les cellules endothéliales, les plaquettes et les leucocytes, le CD31 joue un rôle central dans les mécanismes de régulation des cellules interagissant au niveau de l'interface sang-vaisseaux.

L'objectif principal de ma thèse a été d'étudier le rôle du CD31 au cours des réponses biologiques qui se mettent en place suite à une lésion cardiovasculaire aiguë.

Pour ce faire, j'ai étudié le rôle du CD31 (effet de sa déplétion génétique ainsi que son engagement par un agoniste) dans l'issue de la dissection aortique et de la reperfusion myocardique suite à un ischémie aiguë, deux conditions cliniques comportant un risque vital élevé non seulement dans l'immédiat mais aussi à distance, si le remodelage tissulaire qui s'en suit n'est pas approprié.

Ainsi, le premier objectif de ma thèse a été d'étudier la fonction du CD31 dans la régulation de la signalisation sous-jacente et la polarisation des macrophages, *in vitro* et *in vivo*, dans un contexte de réparation tissulaire post-dissection aortique expérimentale, où l'entrée réitérée du sang artériel dans le faux chenal entrave le déroulé de la réparation tissulaire.

Dans une seconde partie, j'ai évalué le rôle joué par le CD31 dans la régulation de l'interaction entre les plaquettes et les leucocytes du sang avec les cellules endothéliales des micro-vaisseaux dans un contexte d'ischémie reperfusion myocardique où la survenue d'occlusions microvasculaires dues à l'agrégation de ces éléments empêche la réparation tissulaire et abolit les bienfaits de la revascularisation.

Résultats expérimentaux

I. Partie 1 : Rôle du CD31 dans l'issue des dissections aortiques (ANNEXE I)

I.1. Contexte

La dissection aortique est une pathologie qui correspond la déchirure de la paroi intimale de l'aorte entraînant l'irruption de sang à l'intérieur de la paroi de l'aorte (hématome intramural). C'est une pathologie grave, dont le taux de mortalité peut atteindre 60 à 90% en cas d'absence de traitement et selon le type de dissection. Les principaux facteurs de risque associés aux dissections aortiques sont l'âge, le sexe masculin, le tabagisme, l'hypertension artérielle ou encore l'existence d'antécédents familiaux. Les traitements actuels ont pour objectif principal de contrôler la tension (maintien d'une pression systolique contrôlée entre 100 et 120 mmHg et une fréquence cardiaque d'environ 60 battements par minute – (Tsai, Nienaber et al. 2005)). Cependant, ce traitement médical est plutôt d'ordre « palliatif ». En l'absence de médicaments spécifiquement dédiés à favoriser la réparation des structures vasculaires, le risque de progression vers l'anévrisme et de récurrences de rupture de la paroi est inéluctable. En effet, 25 à 30% des patients atteints d'une dissection aortique avec hématome intramural nécessitent une intervention ultérieure en raison d'une expansion anévrysmale, d'une dissection récidivante et progressive et d'autres complications du processus de dissection non résolu (Lumsden and Reardon 2008). Il est important de souligner que le risque et le nombre de récurrences est indépendant du traitement utilisé (chirurgie ouverte ou endovasculaire, traitement anti-hypertenseur) et survient le plus souvent chez les patients atteints de dysfonctions du tissu conjonctif (Isselbacher, Bonaca et al. 2016). Ceci souligne l'importance de la réponse favorisant la consolidation de la paroi artérielle via la production locale de la MEC dans le processus de réparation afin d'améliorer le pronostic des patients à long terme.

La dégradation de la MEC dans la paroi de l'aorte est l'une des clés de la progression des pathologies anévrysmales et de ses complications, dont la rupture (Hellenthal, Buurman et al. 2009). En particulier, le renouvellement approprié du collagène, un composant essentiel de la MEC, est connu pour être responsable du remodelage artériel. Des perturbations dans la micro-architecture des réseaux de collagène, dues soit à sa dégradation soit à un dépôt inapproprié, peuvent altérer la structure de la paroi vasculaire et donc sa réponse au stress mécanique, facilitant la survenue des lésions (Abdul-Hussien, Hanemaaijer et al. 2009). Ainsi, la fonction des cellules produisant de la MEC est essentielle pour favoriser la guérison de la paroi vasculaire lésée.

L'état de réparation des tissus après une lésion aiguë dépend essentiellement de la résolution de la phase inflammatoire initiale. Les macrophages y jouent un rôle crucial. Immédiatement après leur entrée au site de lésion, les monocytes circulants contribuent à la phase de destruction de la plaie en acquérant un phénotype inflammatoire (macrophages de type M1). Bien que cette réponse inflammatoire initiale soit indispensable, elle doit être finement régulée et limitée dans le temps afin de pouvoir réparer convenablement le tissu lésé et prévenir de l'inflammation chronique qui est délétère à long terme. Pour avoir une cicatrisation appropriée des tissus, il est impératif que ces monocytes acquièrent un phénotype réparateur caractérisé par une activité phagocytaire élevée, une production de collagène et de molécules nécessaires à la survie et à la prolifération des cellules stromales environnantes (macrophages de type M2 - (Mantovani, Biswas et al. 2013)). La capacité des macrophages à inverser leur polarisation pour adopter les fonctions de type « M2 » est déterminante pour la « cicatrisation » des lésions artérielles dans des conditions pathologiques (Khallou-Laschet, Varthaman et al. 2010). Cependant, la présence d'éléments dérivés du sang au site de lésion, comme dans le cas des aortes disséquées, prévient le changement phénotypique des macrophages retardant ainsi la cicatrisation (Sindrilaru, Peters et al. 2011).

Nous pensons que le CD31 peut être un acteur clé dans le changement phénotypique des macrophages. En effet, la signalisation par le CD31, via l'engagement de SHP-1/SHP-2, atténue l'activation de NFκB (Clement, Fornasa et al. 2014), le principal facteur de transcription impliqué dans la polarisation M1 (Rui, Liu et al. 2007). En même temps, l'engagement du CD31 pourrait contribuer à découpler la voie STAT1/IRF5 via le SHP-1 recruté dans les rafts lipidiques, d'une façon similaire à celle mise en œuvre par d'autres co-recepteurs à ITIMs (Boekhoudt, Frazier-Jessen et al. 2007).

Avec l'objectif d'évaluer le rôle de la voie de signalisation du CD31 dans la polarisation des macrophages, nous avons analysé le phénotype des macrophages infiltrés dans l'hématome intramural des patients opérés suite à une dissection aortique ainsi que dans un modèle expérimental d'athérosclérose compliquée par une dissection aortique avec hématome intramural. Pour ce modèle, des souris hypercholestérolémiques ApoE^{-/-}, mâles, âgés de 28 semaines ont été implantées avec les mini-pompes osmotiques (modèle 2004, Alzet®) délivrant en continu de l'Angiotensine II à raison de 1 mg/kg/jour, pendant 28 jours (comme décrit dans l'article original de Daugherty (Daugherty, Manning et al. 2000)).

Dans ce modèle, la dissection survient au cours de la première semaine et la progression anévrysmale est appréciable à partir de J14 (Saraff, Babamusta et al. 2003). Pour identifier les souris avec dissection, j'ai pratiqué une échocardiographie à J7 et J14 et les souris présentant un

hématome intramural ont été randomisés pour le traitement avec le peptide agoniste du CD31 (P8RI, 2,5 mg/kg/jour par injection sous-cutanée) ou le solvant (PBS, contrôle, n = 10/groupe), à partir de J14. L'évolution anévrysmale a été tracée individuellement en longitudinal par un suivi échocardiographique, à J21 et J28.

L'analyse histologique et morphométrique des aortes expérimentales a permis d'étudier et de comparer le processus de cicatrisation dans les deux groupes. Le lendemain de la dernière échocardiographie, les souris ont été terminées sous anesthésie générale. Plusieurs prélèvements ont alors été effectués afin de colliger les informations les plus pertinentes pour cerner l'effet du traitement sur la réparation des dissections aortiques dans ce modèle expérimental. La répartition des différents types de monocytes circulants a pu être quantifiée par cytométrie en flux alors que le phénotype M1 et M2 des macrophages infiltrés au site de lésion a été évalué par immunofluorescence, chez l'homme et la souris. L'évaluation de l'effet du CD31 sur la polarisation des macrophages *in vitro* a été faite sur des cellules provenant de la moelle osseuse des souris en utilisant le P8RI (agoniste du CD31) et des souris CD31^{-/-}. Le P8RI a été sélectionné à partir d'une banque de peptides et après criblage fonctionnel *in vitro*. Il s'agit d'une séquence peptidique de 8 acides amines rétro-inverso (P8RI) ayant au préalable subi des analyses d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'excrétion et de toxicologie avant son utilisation.

I.2. Résultats

I.2.a. Etude du CD31 en rapport avec le phénotype macrophagique aux sites de dissection aortique chez l'homme

Dans la perspective d'étudier le rôle du CD31 dans la réparation des lésions artérielles aiguës, nous avons tout d'abord voulu analyser l'expression du CD31 à la surface des macrophages infiltrés au site de lésion. Selon notre hypothèse, l'activation des leucocytes au cours de la première phase « inflammatoire » de la réparation devrait s'accompagner d'une perte du récepteur alors que le passage du phénotype inflammatoire au phénotype réparateur devrait s'accompagner d'une réexpression du CD31.

Nous avons alors évalué l'expression du CD31 et le phénotype des macrophages infiltrés au niveau des sites de rupture de la paroi aortique dans 7 échantillons de tissus d'aorte humaine provenant de patients ayant été soumis à une réparation chirurgicale de l'aorte suite à sa dissection. Ces échantillons, inclus en paraffine, avaient été traités par le département d'anatomie pathologique humaine de l'Hôpital Bichat selon les protocoles du parcours de soin de routine. Une coloration au Trichrome de Masson (TCM) ainsi que différents immunomarquages ont été réalisés sur des nouvelles coupes consécutives des ces blocs en

paraffine. Sur la base du TCM, ces échantillons humains ont été classés par état d'avancement de cicatrisation après la dissection : stade aigu, subaigu et chronique (**Figure 1 A à C, Annexe I**). La localisation de la dissection a été identifiée par l'interruption des faisceaux l'élastine, visible en contraste de phase (**Figure 1 D à F, Annexe I**).

Une fois la lésion artérielle localisée, nous avons identifié les macrophages (marquage CD68 positif) et y avons cherché l'expression du CD31 en fonction du stade de cicatrisation. Nos résultats montrent que l'expression du CD31 est pratiquement absente à la surface des macrophages infiltrant les lésions au stade aigu et subaigu des aortes disséquées (**Figure 1 G et H respectivement, Annexe I**). Le phénotype de ces macrophages est principalement pro-inflammatoire, comme indiqué par l'expression dense du complexe MHC de classe II (antigène leucocytaire humain-DR, HLA-DR) signant la présentation des antigènes (provenant des cellules et molécules phagocytées) au système immunitaire, et l'absence du CD163, l'un des récepteurs de type « scavenger », impliqué dans l'endocytose des complexes d'hémoglobine-haptoglobine et donc dans la résorption de l'hématome, signant la fin de la phase inflammatoire du processus de réparation (**Figure 1 G, H J et K, Annexe I**). En revanche, dans les échantillons prélevés à un stade plus avancé de la cicatrisation, les macrophages se caractérisent par une diminution progressive de l'expression de l'HLA-DR, concomitante à l'acquisition de CD163 et à l'expression de CD31.

Ainsi, ces études chez l'homme montrent que les macrophages infiltrés dans les lésions artérielles perdent l'expression de CD31 et sont associés à un phénotype pro-inflammatoire. A l'inverse, l'expression du CD31 marque les macrophages impliqués dans les phases ultérieures du processus de réparation vasculaire. De façon très intéressante, nous avons pu retrouver ces mêmes caractéristiques sur les macrophages infiltrés dans les lésions survenant au niveau de l'aorte, chez la souris hypercholestérolémique soumise à la perfusion continue d'Angiotensine II (**Figure 14**).

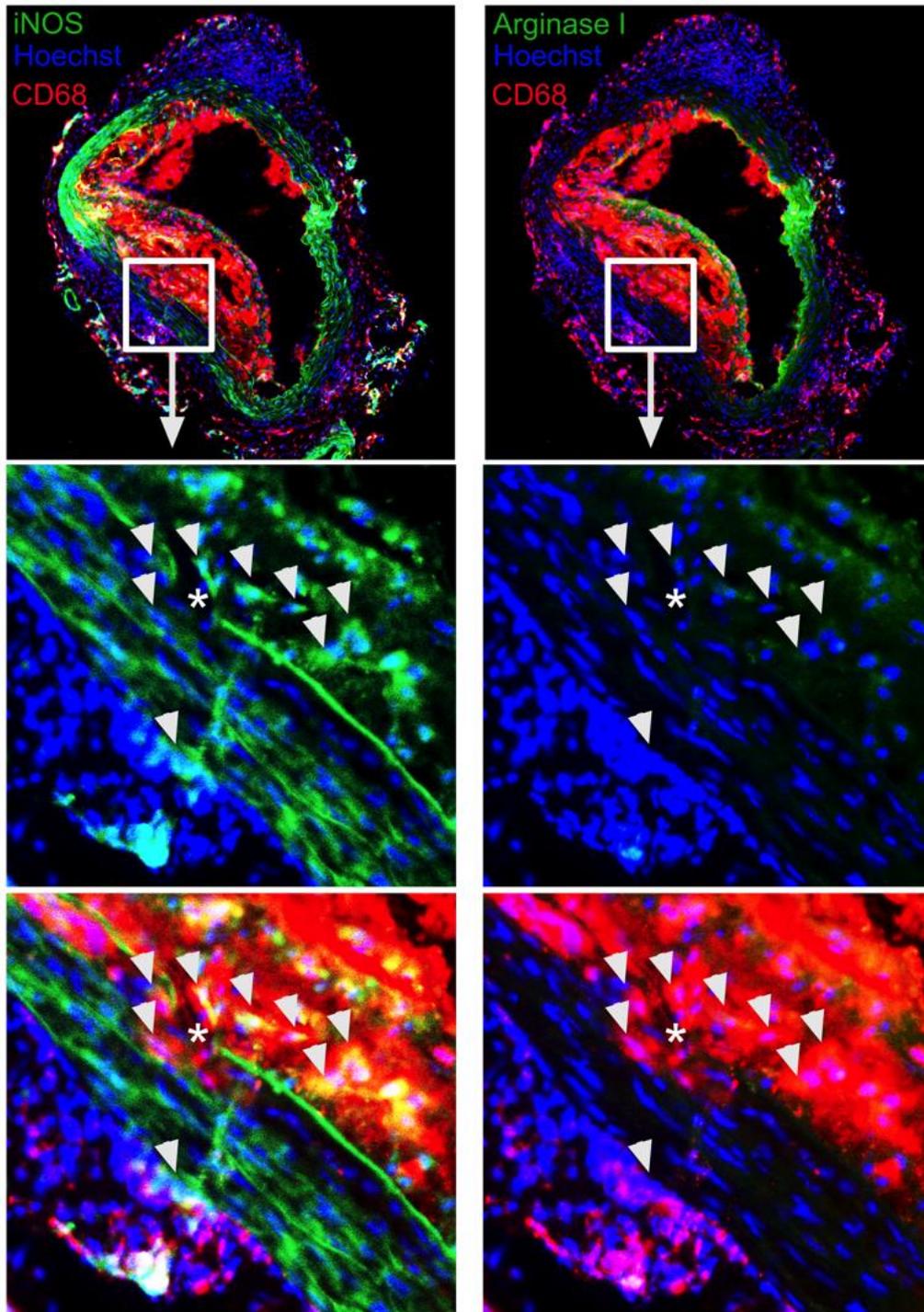


Figure 14. Mise en évidence du phénotype macrophagique au site de lésion chez des souris. Coupes transversales de l'aorte abdominale d'une souris mâle ApoE^{-/-} âgée de 28 semaines. Les sites de rupture spontanée d'élastine (*) sont infiltrés de macrophages CD68⁺ (marquage rouge) (têtes de flèches blanches). Le co-marquage pour l'iNOS (à gauche, marquage vert) ou l'Arginase-I (à droite, marquage vert) a révélé que la plupart des macrophages associés à la rupture de la paroi présentaient un phénotype pro-inflammatoire, iNOS⁺/Arginase-I⁻.

I.2.b. L'absence du CD31 accentue le phénotype pro-inflammatoire des macrophages *in vitro*

L'association de l'expression du CD31 avec le phénotype réparateur des macrophages était très suggestif mais il n'est pas possible de déterminer si l'expression du CD31 joue un rôle dans la polarisation des macrophages seulement sur la base des observations dans les tissus lésés. Nous avons alors entrepris d'évaluer les effets de la signalisation du CD31 sur le comportement des macrophages dans des tests fonctionnels, *in vitro*.

Pour cet objectif, des macrophages dérivés de la moelle osseuse provenant de souris CD31 WT ou KO ont été différenciés *in vitro* avec du M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor) (M0) puis polarisés sur la nuit en macrophages de type M1 (incubation avec 100 ng/mL de LPS + 100 U/mL d'IFN γ) ou de type M2 (IL-4 à 25 ng/mL), en suivant les protocoles les plus utilisés dans la littérature, y compris celle de mon laboratoire (Khallou-Laschet, Varthaman et al. 2010).

L'analyse par RT-PCR des gènes exprimés dans ces conditions expérimentales montrent qu'en l'absence de signalisation CD31, les macrophages sont plus susceptibles de se polariser vers un phénotype M1, caractérisés par une expression plus forte de iNOS (synthase inductible de l'oxyde nitrique) qui utilise l'arginine pour produire l'oxyde nitrique typiquement activé dans les macrophages pro-inflammatoires, de type M1. A l'inverse, l'expression et l'engagement du CD31 favorise l'expression de l'Arginase-I (Arg-I, **Figure 2A, Annexe I**), qui utilise le même substrat que l'iNOS, l'arginine, mais pour la production de polyamines et autres molécules servant à la production de matrice extracellulaire et favorisant la prolifération cellulaire. C'est pour cela que l'expression de l'Arginase-I est considérée comme un marqueur de macrophages réparateurs, de type M2.

L'analyse des cytokines solubles libérées dans le surnageant des mêmes macrophages en culture est en accord avec les résultats en PCR : les macrophages CD31^{-/-} produisent plus de cytokines pro-inflammatoires (MCP-1, IL-6 et MIPI α) que les macrophages CD31^{+/+} après stimulation par le LPS et l'IFN γ . En revanche, la production d'IL-10 dans les macrophages CD31^{-/-} M2 est réduite par rapport à celle des macrophages CD31^{+/+} (**Figure 2B, Annexe I**).

Ainsi, l'absence de signalisation du CD31 potentialise et accentue le phénotype inflammatoire des macrophages lors de la polarisation M1, alors qu'elle atténue le phénotype M2 dans des conditions de polarisation M2.

I.2.c. La stimulation de la voie de signalisation du CD31 par le P8RI favorise la polarisation des macrophages vers un phénotype pro-réparateur *in vitro*

Afin d'évaluer l'effet de la co-signalisation par le CD31 dans les conditions de stimulation favorisant la polarisation M1 par rapport à la polarisation M2, l'agoniste du CD31 (P8RI) a été ajouté aux cultures des macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris wild type (CD31^{+/+}), stimulés par le LPS + IFN γ (polarisation M1) ou l'IL-4 (polarisation M2).

L'engagement du CD31 avec le peptide agoniste, au moment de ces stimulations, résulte en une réduction significative de la polarisation de type M1, comme documenté par la réduction de l'expression du gène de l'iNOS, alors qu'elle entraîne l'augmentation de l'expression de l'Arg-I par les macrophages soumis à la stimulation pro-M2. L'effet pro-M2 de l'agoniste du CD31 était notamment observé dans les conditions de polarisation de type M1, puisque l'ajout du P8RI conduisait à une production importante de la cytokine pro-réparatrice (M2) IL-10 et une production réduite des cytokines pro-inflammatoires (M1) solubles IL-6, TNF- α et IL-12p70 (**Figure 4, Annexe I**), suggérant un rôle possible de l'engagement du CD31 à la surface des macrophages au moment de la phase de « résolution » de l'inflammation, dans la transition de la phase inflammatoire à la phase réparative du processus de cicatrisation.

L'effet du peptide agoniste CD31 sur la polarisation des macrophages est en fait en miroir des résultats obtenus avec les macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris CD31 KO vs WT (**Figure 2, Annexe I**).

L'ensemble de ces données suggèraient que le maintien de la co-signalisation par le CD31, par l'utilisation d'un peptide agoniste, peut limiter l'action des macrophages M1 pro-inflammatoires tout en renforçant les fonctions pro-réparatrices des macrophages de type M2.

En considérant la relative absence de CD31 à la surface des macrophages associés aux dissections évoluant vers l'anévrisme, chez l'homme comme chez la souris (modèle expérimental à l'Angiotensine II chez la souris ApoE, **Figure 14**), nous avons souhaité évaluer le potentiel pro-réparateur du P8RI administré dans les suites d'une dissection aortique avec hématome intramural dans le modèle expérimental.

I.2.d. Le potentiel thérapeutique du P8RI dans un modèle murin de dissection aortique : augmentation du dépôt de collagène et prévention de l'évolution anévrysmale

Les objectifs spécifiques de cette étude étaient d'évaluer l'effet réparateur du P8RI *in vivo*, dans un modèle murin de dissection aortique, en termes de polarisation des macrophages infiltrés au site de la lésion aiguë de la paroi vasculaire et de consolidation du processus de réparation nécessaire pour prévenir l'évolution anévrysmale. Pour cela, des souris ApoE^{-/-} ont reçu pendant 28 jours de l'Angiotensine II (1 mg/kg/jour). La présence d'un hématome intrapariétale et le diamètre antéro-postérieur de l'aorte sous-rénale de ces souris ont été analysés par échographie aux jours 7, 14, 21 et 28 après la pose de la mini-pompe osmotique délivrant l'Angiotensine II (**Figure 5A, Annexe I**). Au cours des 14 derniers jours de perfusion d'Angiotensine II, les souris présentant des signes de dissection aiguë et d'hématome intramural ont été randomisées vers l'un de deux groupes d'animaux : l'un recevant un bolus quotidien sous-cutané de P8RI (2,5 mg/kg/jour) et l'autre recevant le solvant (PBS, n=10 souris/groupe). Une évolution anévrysmale progressive, à partir du jour 7 et jusqu'au jour 28, a été observée chez les souris du groupe contrôle, alors que le diamètre antéro-postérieur de l'aorte est apparu stabilisé, à partir de J14, jour du début du traitement, chez les souris ayant reçu le P8RI. L'évaluation de la fonction cardiaque à J28 ne montrait pas de différence en termes de taille et fonction des cavités cardiaques entre les deux groupes de souris (**Figure 5B, Annexe I**). D'autre part, le peptide n'affecte pas les biomarqueurs plasmatiques de la fonction rénale (créatinine et urée) et cardiaque (créatinine kinase MB) (**Tableau 3**).

Au moment de la dissection, l'analyse macroscopique des segments aortiques sous-diaphragmatiques montrait la persistance d'un hématome intramural dans tous les animaux contrôles alors que l'hématome paraissait résorbé et réduit en taille dans la plupart (7/10) des souris traitées par le P8RI (exemple dans la **Figure 5C, Annexe I**). A l'analyse microscopique par coloration Bleu de Prusse (Perls) et Rouge Sirius sur coupes transversales consécutives des segments aortiques dissequés, nous avons pu observer qu'à parité de degrés d'hématome intramural, comme indiqué par la coloration de Perls (dépôts de ferritine), dans le groupe P8RI une plus grande quantité de collagène, signant l'avancement du processus de cicatrisation, était déposée dans la paroi aortique lésée (**Figure 5D, Annexe I**). Le dépôt de collagène au niveau de la média (définie comme étant la zone située entre les lames élastiques interne et externe) a été quantifié par morphométrie sur les images digitales de chaque coupe (18 à 21 coupes à interval de 200 µm entre le collet proximal et le collet distal du manchon pseudoanévrysmal). Les résultats montrent que l'augmentation de la quantité de collagène intramural, reflétant une

cicatrisation de la paroi aortique disséquée plus avancée dans le groupe d'animaux traités au P8RI, était statistiquement significative (**Figure 6, Annexe I**). Sur ces mêmes coupes on pouvait remarquer le moindre degré d'extension du faux chenal et de la taille de l'hématome intramural à J28 : l'hématome s'étend sur 3.4 ± 0.5 mm chez les souris témoins versus 2.8 ± 0.3 chez les souris traitées par le P8RI (les coupes proches des collets étaient virtuellement exemptes d'hématome intramural). En accord avec ces observations morphologiques, l'analyse du sang des souris montrait une réduction significative de l'hémoglobine, compatible avec la séquestration dans l'hématome chez les souris du groupe de contrôle.

D'un point de vue fonctionnel, la teneur augmentée en collagène intramural du groupe P8RI était associée à la prévention de l'élargissement anévrysmal documenté par le suivi échographique individuel des souris (**Figure 5E, Annexe I**).

	Control (n=10)	P8RI (n=10)	p value
Globules rouges ($10^6/\mu\text{l}$)	8.81 ± 0.48	10.79 ± 0.09	<0.001
Hémoglobine (g/L)	13.08 ± 0.81	15.23 ± 0.32	<0.05
Hématocrite (%)	46.365 ± 2.95	54.04 ± 0.77	<0.05
Volume Globulaire Moyen (μm^3)	52.5 ± 0.40	50 ± 1	<0.05
Plaquettes ($10^3/\mu\text{l}$)	1375 ± 87.36	1050 ± 206	NS
Globules blancs ($10^3/\mu\text{l}$)	6.13 ± 0.51	3.78 ± 0.52	<0.01
Lymphocytes (%)	32.3 ± 8.65	56.73 ± 1.73	<0.05
Monocytes (%)	6.05 ± 0.04	9.9 ± 0.75	<0.001
Neutrophiles (%)	60.05 ± 8.45	29.96 ± 1.63	<0.001
Eosinophiles (%)	1.39 ± 0.24	3.28 ± 0.74	<0.05
Basophiles (%)	0.14 ± 0.15	0.15 ± 0.04	NS
Créatinine ($\mu\text{mol/L}$)	22.09 ± 2.00	25.60 ± 1.47	NS
Urée (mmol/L)	136.66 ± 16.64	174.87 ± 12.26	NS
Créatinine Kinase MB (UI/L)	46856 ± 31115	48434 ± 22923	NS

Tableau 3. Formulation sanguine et analyse des biomarqueurs plasmatiques rénaux et cardiaques.

La formulation sanguine a été obtenue à partir de sang frais prélevé par ponction intracardiaque et anticoagulé à l'EDTA. Le sang a été analysé à l'aide d'un hémocytomètre ABCVet équipé d'une carte de calibration pour souris. Les mesures biochimiques ont été effectuées à l'aide de l'analyseur AU400 d'Olympus.

I.2.e. L'effet pro-réparateur du P8RI est associé à une réduction de la réponse inflammatoire et une polarisation M2 des macrophages associés à la lésion aortique

L'analyse de la formule sanguine par hémocytomètre montrait une réduction de la neutrophilie systémique chez les souris traitées au P8RI, signe d'une réponse inflammatoire plus contenue (**Tableau 3**). Suite à une lésion tissulaire aiguë, la fin de la phase inflammatoire est marquée par le changement de polarisation des macrophages. En effet, alors qu'au début du processus de cicatrisation des plaies, les monocytes/macrophages pro-inflammatoires de type M1 jouent un rôle essentiel dans la phase de destruction, cette phase doit être limitée dans le temps afin de permettre la réparation tissulaire ; la persistance de la phase inflammatoire au long cours empêche la reconstruction du tissu lésé et conduit à une issue clinique défavorable.

Nous avons analysé le phénotype (pro-inflammatoire ou pro-réparateur) des monocytes circulants et des macrophages infiltrés aux sites de lésion aortique, respectivement par cytométrie en flux et immunofluorescence, à l'issue des 28 jours de perfusion d'Angiotensine II.

L'analyse par cytométrie en flux montrait que le traitement au P8RI augmente de façon significative la proportion de monocytes pro-réparateur CD45+CD11b+Ly6C+CX3CR1+ et réduit, en miroir, la proportion de cellules pro-inflammatoires CD45+CD11b+Ly6C+CX3CR1- et globalement le nombre total de cellules myéloïdes circulantes (CD45+CD11b+) était diminué (**Figure 7, Annexe I**).

L'analyse du phénotype des macrophages au site de lésion (rupture de l'élastine) ne montrait que des macrophages M2 (Arginase-I +, iNOS-) dans l'hématome des souris traitées avec le peptide alors que les souris témoins présentaient un mixte de macrophages de type M1 et M2 (**Figure 8, Annexe I**).

Ainsi, ces résultats suggèrent que le P8RI peut favoriser la progression des processus biologiques sous-jacents aux différentes phases de réparation après une dissection aortique aiguë. Cet effet passe notamment par la favorisation de la transition du phénotype des macrophages vers un phénotype pro-réparateur, résultant en une accélération de la synthèse de la matrice extracellulaire et du dépôt de collagène au niveau de la paroi aortique permettant ainsi sa stabilisation. Cet effet est déjà visible dans le protocole expérimental que nous avons utilisé, où la durée du traitement était courte (14 jours) et le début du traitement assez tardif (au 14^{ème} jour de perfusion en Angiotensine II).

I.3. Conclusion

Le rôle des macrophages dans ce modèle de dissection aortique murin dépend de leur phénotype, s'ils restent de type pro-inflammatoire, comme dans les suites immédiates de la dissection, ils participent à l'étendue de la lésion initiale (Saraff, Babamusta et al. 2003) ainsi qu'à l'apparition des dégâts responsables de la transformation anévrismale (Rateri, Howatt et al. 2011). En effet, alors que les macrophages pro-inflammatoires de type M1 sont nécessaires à l'élimination des neutrophiles qui pénètrent dans les plaies dès les premières phases de la guérison (Mantovani, Biswas et al. 2013), des résultats montrent le rôle crucial joué par le passage de ces macrophages associés à la plaie, d'un phénotype pro-inflammatoire vers un phénotype pro-réparateur M2. Ce changement de phénotype permet la résolution de la phase inflammatoire et facilite ainsi le processus de cicatrisation de la plaie (Mantovani, Biswas et al. 2013). L'équilibre entre les macrophages M1 et M2 est conditionné par leur réponse aux signaux qu'ils reçoivent dans leur micro-environnement. Cet équilibre est indispensable au maintien de l'homéostasie de l'organisme et est d'autant plus important dans des conditions pathologiques. Comme les principaux acteurs cellulaires qui sont en interaction au cours des dissections aortiques expriment le CD31, l'utilisation d'un peptide agoniste du CD31 constitue une stratégie prometteuse pour intervenir dans ce dialogue.

Les macrophages pro-inflammatoires de type M1, qui infiltrent les dissections aortiques aiguës humaines ainsi qu'expérimentales, ne peuvent pas engager la co-signalisation par le domaine distal et trans-homophile du CD31 car cette portion du récepteur est absente à leur surface cellulaire. L'administration du peptide, agissant sur la portion la plus proximale de la membrane et qui reste exposée après le clivage du CD31, maintient la co-signalisation par le CD31 et favorise la transition de la polarisation des macrophages vers le type M2 *in vitro* et *in vivo*. La contention des effets délétères des macrophages de type M1 associée à la production de collagène favorisée par les macrophages de type M2 peut expliquer, au moins en partie, l'action anti-progression anévrismale exercée par le P8RI.

Bien que les macrophages ne soient pas les seules cellules impliquées dans la dissection aortique chez la souris, le changement de polarisation des macrophages d'un phénotype pro-inflammatoire vers un phénotype pro-réparateur par l'agoniste de CD31 a pu expliquer, en partie, les effets bénéfiques du peptide agoniste observés *in vivo*. D'un point de vue clinique, l'administration de cet agoniste en combinaison avec le traitement médical actuellement recommandé, chez des patients présentant des signes cliniques de dissection (pénétration du produit de contraste dans la paroi artérielle lors d'un examen d'angioscan) pourrait permettre de mieux prendre en charge les patients atteints d'ADIM.

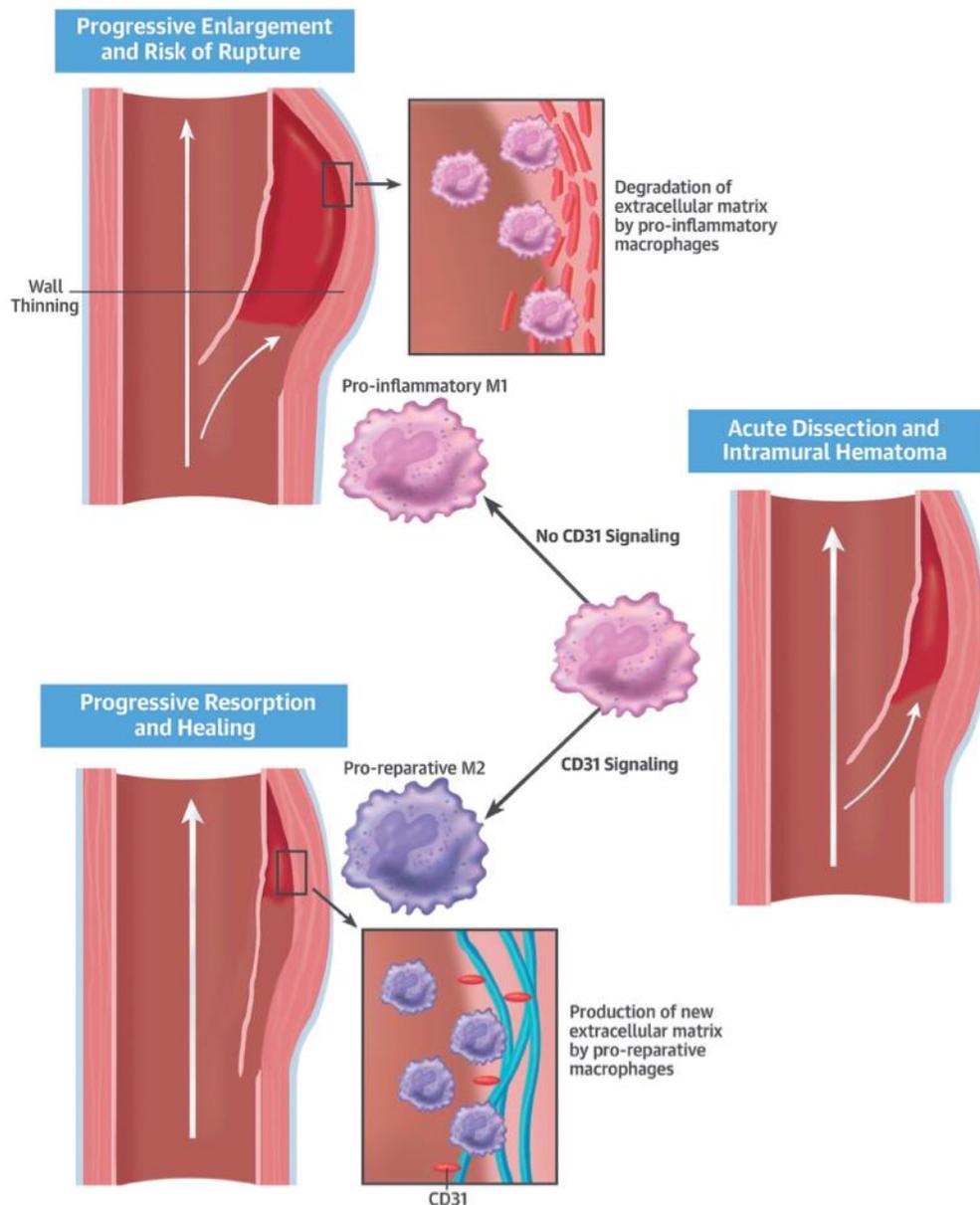


Figure 15. Schéma de synthèse du rôle de la signalisation du CD31 dans l'issue des dissections aortiques. Lors de la survenue d'une dissection aortique aiguë et d'un hématome intramural, l'arrêt rapide et contrôlé des processus de dégradation de la matrice et la survenue de la production d'une nouvelle matrice extracellulaire, permet la stabilisation de la paroi aortique. Ceci est essentiel pour empêcher l'amincissement et la rupture de la couche la plus externe de paroi aortique du fait de la pression exercée par l'arrivée continue de sang dans la fausse lumière.

La dégradation de la matrice extracellulaire (lignes ondulées et hachées rouges, en haut) est provoquée par l'action des macrophages pro-inflammatoires M1 (en roses) au cours de la première phase de « démolition » de la réparation des tissus. À la fin de cette phase, la production d'une nouvelle matrice extracellulaire (lignes ondulées continues vertes, en bas) nécessite la transition des macrophages associés à la lésion vers un phénotype réparateur M2 (en violet). Nos données *in vitro* suggèrent que l'inactivation de la signalisation du CD31 empêche cette transition. Cependant elle est

favorisée par des agonistes spécifiques du CD31. En effet, ces derniers favorisent la réparation de la paroi aortique et limitent la transformation anévrysmale dans un modèle expérimental de dissection aortique aiguë.

II. Partie 2 : Rôle du CD31 dans l'issue des lésions myocardiques dues à l'ischémie reperfusion

II.1. Contexte

L'infarctus du myocarde aigu est l'une des principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde. Le traitement de choix des maladies ischémiques, y compris l'infarctus du myocarde, consiste en une reperfusion opportune, par thrombolyse ou intervention mécanique, ce qui permet de limiter la taille de l'infarctus et de préserver la fonction systolique ventriculaire gauche. Cependant, le processus de reperfusion peut lui-même induire des dommages supplémentaires, en fonction de la durée de l'ischémie. Les phénomènes biologiques qui le caractérisent sont liés à la dysfonction métabolique des cellules du myocarde lésé, l'activation et la dysfonction de l'endothélium vasculaire ainsi que l'adhérence et l'activation des neutrophiles et des plaquettes (en raison, au moins en partie, des mêmes dysfonctions métaboliques provoquées par la séquence d'ischémie). S'ajoute à cela, la stase du sang dans la microcirculation. La reperfusion, avec l'arrivée massive et aiguë d'oxygène dans la zone ischémiée, génère un « *burst oxydatif* » au sein de l'ensemble des cellules. Cela conduit à la production de radicaux libres de l'oxygène (ROS) qui sont responsables de la mort cellulaire « ajoutée » par la reperfusion. Cette dernière est aussi liée indirectement à l'effet de ce *burst oxydatif* dans le sens où la production de ROS, par les cellules de la microcirculation cardiaque, conduit à l'activation intravasculaire des neutrophiles et des plaquettes qui se collent entre eux et avec l'endothélium local, entraînant ainsi une aggravation des dommages cellulaires ischémiques. En effet, malgré la recanalisation de l'artère principale, la perfusion locale n'est pas assurée, c'est le phénomène du *no-reflow* (Carden et Granger 2000, Fordyce et al. 2015).

Le *no-reflow* correspond à l'un des quatre mécanismes sous-jacents les lésions causées par la reperfusion et décrites par Yellon et Hausenloy. Il fait référence à une hypoperfusion, voir une absence totale de perfusion des zones profondes du myocarde et ce malgré la réouverture de l'artère coronaire responsable de l'ischémie. L'étiologie du *no-reflow* est complexe et multifactorielle. Parmi les caractéristiques de ce phénomène se trouve notamment une fonction altérée des capillaires (changements anatomiques et fonctionnels), comme la formation de protrusions endothéliales, un gonflement des cellules endothéliales, une obstruction de la lumière du vaisseau par les cellules circulantes ou encore le développement d'un œdème compressif consécutif à l'augmentation de la perméabilité capillaire et aux lésions vasculaires (Kloner, Ganote et al. 1974, Braunwald 1980 – **Figure 13**). L'occlusion microvasculaire, due à la présence de microagrégats neutrophilaires au sein des capillaires des tissus post-ischémiques,

est l'un des mécanismes majeurs évoqués pour expliquer le *no-reflow* (Butler, Chan et al. 2011, Heusch 2016). Plusieurs hypothèses ont été formulées quant à leurs formations. Ces agrégats peuvent notamment s'expliquer par le fait que les leucocytes activés soient moins déformables au travers d'un capillaire qui lui-même est déjà endommagé et rétréci, mais aussi du fait de l'augmentation des molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales et des neutrophiles, ralentissant ainsi leur migration (Engler, Schmid-Schonbein et al. 1983). Des expériences menées chez des souris rendues neutropéniques ou chez lesquelles l'adhérence des neutrophiles était empêchée par l'utilisation d'anticorps dirigés contre les épitopes du CD11/CD18 sur les leucocytes ou ciblant la P-sélectine de l'endothélium, montrent une amélioration des bénéfices de la reperfusion (Palazzo, Jones et al. 1998, Palazzo, Jones et al. 1998, Hoffmeyer, Scalia et al. 2000). Le rôle des plaquettes dans le *no-reflow* a également été démontré (Golino, Maroko et al. 1987, Xu, Huo et al. 2006). En formant des agrégats homotypiques (plaquettes-plaquettes) et hétérotypiques (plaquettes-leucocytes), les plaquettes contribueraient à l'occlusion des capillaires dans le *no reflow*. Là encore, il a été montré *in vivo* que l'utilisation d'un inhibiteur de la glycoprotéine GPIIb/IIIa (récepteur du fibrinogène et du facteur de von Willbrand facilitant l'activation plaquettaire) améliore la perfusion (Kunichika, Ben-Yehuda et al. 2004).

La littérature actuelle montre un intérêt grandissant pour le phénomène de *no-reflow* parce qu'il pourrait être, à long terme la cible des nouvelles thérapies dans les conditions pathologiques liées à l'ischémie reperfusion. Cependant, alors que les études expérimentales chez les animaux ont montré un effet bénéfique de la déplétion neutrophilaire et plaquettaire ou encore des anticorps ciblant les molécules d'adhérence, les études cliniques utilisant quelques unes de ces approches thérapeutiques se sont révélées décevantes. Ces résultats négatifs reflètent probablement l'effet négatif de ces interventions sur le processus de réparation qui peut contre-balancer les bénéfices sur le phénomène de *no-reflow*.

En effet, pour que le processus de réparation puisse commencer, il est nécessaire de laisser les plaquettes amorcer la phase « d'hémostase » et les neutrophiles enchaîner avec la phase inflammatoire, étape préalable indispensable à la réparation tissulaire.

C'est pourquoi, le rôle de la régulation trans-homophile du CD31 est particulièrement intéressant, car ce récepteur module mais n'empêche pas l'activation appropriée (déclenchée par des stimuli assez forts) des cellules qui l'expriment. Le CD31 est exprimé de manière constitutive par les principaux acteurs cellulaires du *no-reflow*. En effet, on le retrouve sur l'endothélium, les plaquettes ainsi que tous les leucocytes, dont le plus haut niveau d'expression se trouve sur les membranes des neutrophiles. L'engagement de ses motifs ITIMs favorise les voies de signalisation phosphatase-dépendantes tandis que la signalisation tyrosine/inositol-

dépendante se retrouve découplée. Ainsi, l'effet inhibiteur ou activateur du CD31 dépend de la nature de la cellule. Son engagement éphémère par les cellules circulantes exerce un effet plutôt « inhibiteur » en provoquant le détachement cellulaire et l'élévation du seuil d'activation des plaquettes et des leucocytes (Marelli-Berg, Clement et al. 2013). A l'inverse, son engagement pérenne au niveau des jonctions des cellules endothéliales, stablement ancrées sur leur membrane basale et enchaînées entre elles, est essentiel pour assurer la survie et les fonctions physiologiques de l'endothélium (Lertkiatmongkol, Paddock et al. 2016).

Dans cette deuxième partie de ma thèse, j'ai étudié l'impact d'un déficit génétique en CD31 sur la taille de l'infarctus, en analysant son effet sur l'obstruction microvasculaire après la recanalisation coronaire et le phénotype des leucocytes infiltrés localement dans un modèle murin d'ischémie reperfusion cardiaque.

L'ischémie cardiaque a été induite chez des souris WT et KO pour le CD31 (n = 30, 15 femelles et 15 mâles dans chaque groupe) par occlusion de l'artère coronaire gauche, provoquant l'ischémie d'une grande partie de la paroi antérieure, du septum antérieur et pratiquement toute la pointe du VG. Afin de déterminer les meilleures conditions expérimentales (produisant les résultats les plus reproductibles) et notamment la durée optimale du temps de l'ischémie, j'ai effectué des études préliminaires chez les souris WT. Nous avons alors retenu un protocole où l'occlusion est maintenue pendant 45 minutes, suivie d'une reperfusion pendant 72 heures. Après resserrement du nœud (laissée sur place), les coeurs ont été rétroperfusés avec un colorant bleu (le Luconyl) permettant d'identifier les zones du myocarde potentiellement atteintes par l'ischémie. L'aire à risque (AAR) et la zone nécrotique (NZ), comprises dans le myocarde non coloré en bleu, ont été évaluées après coloration au chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium (TTC, colorant vital, marquant en rouge les tissus vivants) sur trois tranches consécutives de 2 mm d'épaisseur, allant de la ligature jusqu'à la pointe du ventricule gauche (VG), à l'aide du logiciel ImageJ. Des séries d'expériences parallèles et indépendantes, par microscopie à fluorescence et par cytométrie, ont servi à évaluer la présence d'occlusions microvasculaires et le phénotype leucocytaire dans la zone ischémisée par rapport à la zone péri-nécrotique.

II.2. Résultats

II.2.a. Etude préliminaire

i. Modèle expérimental : modèle d'occlusion de l'artère coronaire gauche chez la souris

Le modèle murin d'ischémie reperfusion myocardique a été largement décrit dans la littérature au cours de ces deux dernières décennies (Kolk, Meyberg et al. 2009, Tarnavski 2009, Xu, Alloush et al. 2014). Décrit par Michael et al. dans les années 90, il consiste à fermer de manière transitoire l'artère coronaire gauche chez la souris (Michael et al. 1995). Les animaux sont anesthésiés par injection intrapéritonéale avec un mélange de Kétamine et Xylazine (respectivement 100 mg/kg et 5 mg/kg). Ce mélange procure une anesthésie profonde en adéquation avec notre temps d'ischémie (45 minutes) sans avoir à administrer une deuxième dose d'anesthésie. Au regard des changements réglementaires constants ainsi que des contraintes qui sont propres au modèle (comme le temps d'ischémie), le choix de l'anesthésie joue un rôle crucial dans le bon déroulement et l'issue du modèle au regard. En effet, afin de suivre les règles d'éthique (en perpétuelles changement) et garantir le bien-être animal, l'anesthésie doit être assez profonde pour éviter toute souffrance de l'animal, mais elle doit également pouvoir tenir dans le temps, afin que l'animal ne se réveille pas en cours de procédure. Pour cela plusieurs tests d'anesthésie ont été réalisés (résultats non montrés) et notre choix s'est arrêté sur cette combinaison.

Une fois anesthésiée, les souris sont intubées et ventilées artificiellement avec l'air ambiant, à un débit de 175 insufflation/min et avec un volume de 200 μ l/cycle respiratoire (Harvard Apparatus Rodent Ventilator model 845). Leur température corporelle est maintenue entre 37°C et 38°C durant toute la durée de la procédure à l'aide d'un thermostat connecté à une sonde rectale (Harvard Apparatus Homeothermic monitor). La température corporelle de la souris peut chuter de manière significative au cours de la procédure chirurgicale (notamment directement après l'anesthésie, cette dernière peut chuter jusqu'à atteindre 33°C-34°C). Le maintien de la température corporelle est essentiel dans le modèle d'ischémie reperfusion. En effet, la taille de l'infarctus va dépendre non seulement de la durée de l'occlusion mais aussi de la température corporelle. Il est donc essentiel qu'elle soit maintenue constante pendant cette procédure. Les animaux sont ensuite placés en position décubitus latérale afin avant de faire une incision oblique partant de la pointe du sternum et remontant vers le bas de l'aisselle gauche. Une fois les muscles pectoraux séparés, une perforation est réalisée au niveau du 3ème espace intercostal. Après ouverture délicate du péricarde et visualisation de l'artère coronaire gauche (équivalente à l'artère interventriculaire antérieure chez l'homme) qui émerge en

surface à peu près au milieu du bord inférieur de l'oreillette gauche, un fil de suture 8.0 en soie tressée est passé sous l'artère coronaire gauche et une occlusion est réalisée en resserrant le nœud du fil autour d'un morceau de cathéter PE-10 (2 mm de longueur et 0,6 mm de diamètre) afin d'arrêter le flux sanguin. L'occlusion est confirmée par la décoloration de la pointe du cœur (passant de rouge à rose pâle). Pour la reperfusion, après une période de 45 minutes, le tube en PE-10 est retiré, tout en laissant le nœud lâche en place (il permettra d'identifier ultérieurement l'AAR par rétroperfusion avec le colorant bleu). L'efficacité de la reperfusion est confirmée visuellement par le retour de la couleur normale (rouge) de la paroi antérieure du VG (cela peut prendre quelques secondes). La cage thoracique est ensuite refermée en rapprochant les côtes par un seul point de suture. Le plan cutané est refermé par des sutures en prenant soin de bien évacuer l'air dans la cage thoracique et en ayant au préalable bloqué le retour d'air du respirateur afin de ré-expandre les poumons et limiter au maximum le résiduel d'air dans l'espace pleural. Une surveillance post-opératoire est réalisée en observant une reprise spontanée de la respiration. Les animaux sont alors extubés et gardés en observation dans une cage maintenue à 37°C jusqu'à leur récupération complète avant d'être remis dans leur cage respective avec nourriture et eau à volonté.

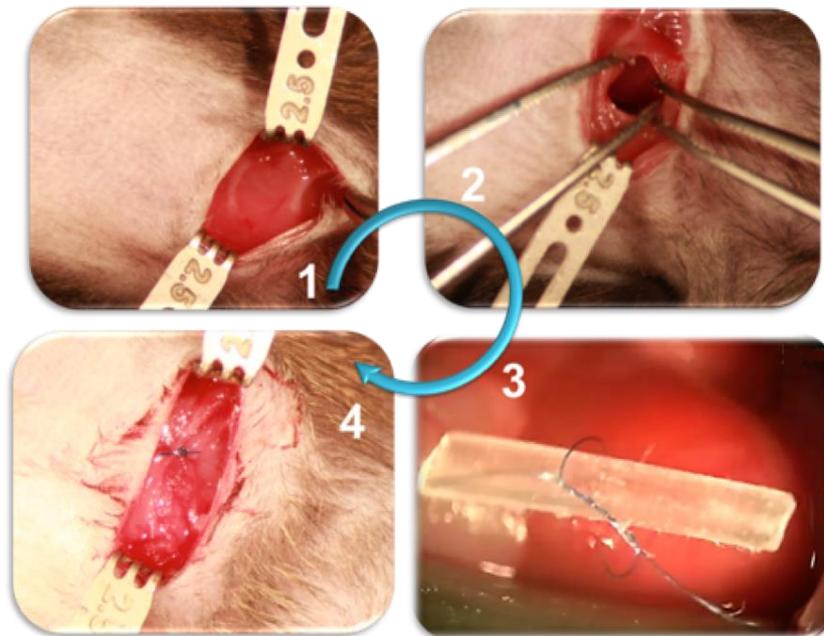


Figure 16. Modèle d'ischémie reperfusion myocardique par occlusion de l'artère coronaire gauche. 1) Dégagement des muscles pectoraux et visualisation des côtes. 2) Perforation du 3^{ème} espace intercostal. 3) Visualisation et occlusion de l'artère coronaire gauche en insérant un bout de cathéter PE-10 entre le nœud et la coronaire. 4) Fermeture du plan cutané après une période d'ischémie de 45 minutes.

ii. Souris knock-out pour le CD31

La création de souris knock-out (KO) est un moyen puissant de modifier l'expression d'un gène spécifique afin de mieux comprendre le rôle biologique de la protéine encodée.

Les souris CD31 KO disponibles étant imparfaites (« fuite » du génotype par recombinaison et épissage de la séquence stop), nous avons généré des nouvelles souris CD31 KO en utilisant le système Cre/loxP (Kos 2004) en collaboration avec le Dr. J. Hadchouel, au PARCC (Hôpital Européen Georges Pompidou).

En insérant deux sites loxP de chaque côté du segment comprenant les exons 3 et 4 de l'ADN du gène du CD31, la production de la protéine entière est censée être supprimée. Par croisement génétique avec des souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur CMV, nous avons obtenu des souris n'exprimant plus de CD31 de façon constitutive et globale (**Figure 17**). Ces dernières ont été backcrossées afin d'avoir un fond génétique C57BL/6J. Nous avons aussi tenté d'obtenir des souris où l'expression du CD31 pouvait être modulée par croisement entre des souris lox avec des souris où l'expression de la Cre recombinase est sous le contrôle du récepteur aux estrogènes (théoriquement, l'administration de tamoxifène génère le KO au temps voulu). Cependant nous avons constaté que l'expression du CD31 persistait, de façon non reproductible, sur les cellules endothéliales (où le gène est fortement exprimé constitutivement) de plusieurs lits vasculaires.

Ainsi le modèle d'ischémie reperfusion myocardique a été réalisé chez ces souris CD31 KO (absence totale et constitutive du récepteur), et des souris WT, mâles et femelles âgées de 10 à 12 semaines (pour que leur cœur soit celui d'un « adulte »).

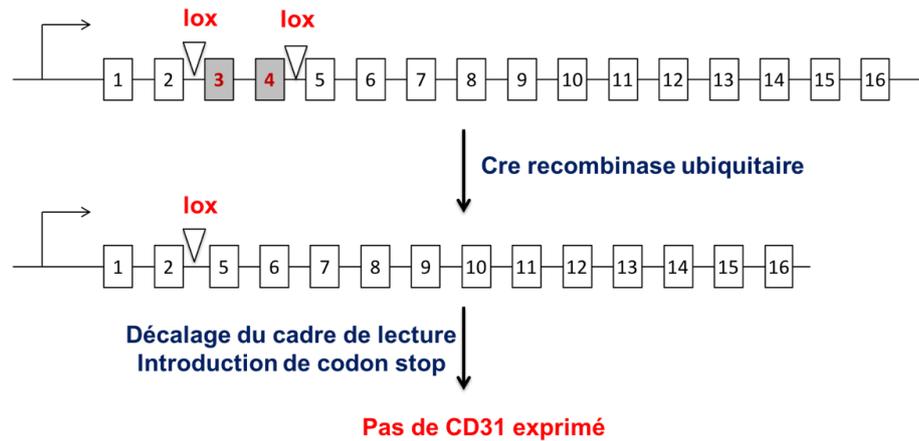


Figure 17. Représentation de la construction génétique.

iii. Détermination de la durée optimale du temps d'ischémie et reproductibilité du modèle

En utilisant le modèle d'ischémie reperfusion myocardique dans le but d'analyser la taille de l'infarctus, il est important de vérifier, d'une part, la reproductibilité de la procédure chirurgicale. En effet, il est essentiel que la variation entre les souris soumises à la même procédure soit réduite au maximum. D'autre part, il est nécessaire d'identifier au préalable les conditions expérimentales qui permettent d'analyser les effets de l'intervention, à savoir une AAR assez importante pour avoir des infarctus (zones nécrotiques) détectables mais aussi que ces infarctus occupent une partie assez importante de l'AAR pour pouvoir voir les effets de l'absence du CD31. Ce dernier critère n'étant pas dépendant de la taille de l'AAR mais bien de la durée d'occlusion. Il a donc été nécessaire de définir des critères d'inclusion ainsi que le temps optimal d'ischémie.

Critères d'inclusion

Sur la base du consortium CAESAR (Consortium for preclinical assessment of cardioprotective therapies – Jones, Tang et al. 2015) et de la littérature, il est nécessaire d'avoir une aire à risque représentant au moins 20% du VG. En effet, il a été démontré que plus l'AAR était petite, plus la proportion du myocarde qui est capable de compenser par rapport à la cicatrice est importante. Ainsi le fait d'avoir un seuil minimum d'AAR fixé à 20% du VG, permet de dire que l'on travaille dans des conditions où l'infarctus sera assez important pour avoir un impact fonctionnel et donc étudier l'effet voulu. Concernant la taille de l'infarctus (zone nécrotique), le seuil minimum a été fixé à 50% de l'AAR. Ce seuil permet de voir si l'absence de

CD31 est néfaste ou non, c'est-à-dire une dégradation ou une amélioration. Ce dernier critère est dépendant du temps d'occlusion.

Critère d'exclusion

Les souris présentant des problèmes techniques majeurs, comme des difficultés d'intubation, des saignements importants lors de la chirurgie ou encore des temps de récupérations anormalement longs ; toutes lésions artéfactuelles au niveau du cœur au moment de l'ischémie et/ou de la reperfusion ; des souris se trouvant en dehors de la fourchette d'âge de 10 à 12 semaines ou avec une AAR <20% du VG ont été exclues de l'analyse finale.

Temps d'ischémie et de reperfusion

Les deux temps d'ischémie les plus couramment retrouvés dans la littérature sont 30 minutes et 45 minutes d'occlusion. Afin de savoir laquelle de ces deux périodes permet d'avoir une ischémie assez longue entraînant une nécrose, mais une nécrose minimale pour pouvoir analyser l'effet du CD31, deux groupes de souris C57BL/6J et deux groupes de souris de type CD31 WT mâles, âgés entre 10 et 12 semaines, ont respectivement subi 30 ou 45 minutes d'occlusion, suivi d'une reperfusion de 72 heures. Le temps de reperfusion a quant à lui été fixé à 3 jours. Ce temps correspond à la phase du processus de réparation au cours de laquelle les monocytes macrophages sont censés changer de phénotype, phénomène sensible à la fonction du CD31 (voir « Partie 1 : Rôle du CD31 dans l'issue des dissections aortiques (ANNEXE I) »). En effet, comme dans les autres tissus, la réponse de réparation suite à un infarctus comprend une phase inflammatoire et une phase de réparation/maturation (**Figure 18**). Brièvement, durant la phase inflammatoire la mort des cardiomyocytes entraînent la libération de chimiokines, cytokines, de DAMPs et l'expression de molécules d'adhérence et des PPRs sur les cellules endothéliales microvasculaires. Ceci conduit au recrutement des leucocytes dans la zone ischémisée. Ce sont majoritairement des neutrophiles et des monocytes systémiques qui s'y infiltreront. Ces cellules favorisent l'élimination des débris et des cardiomyocytes morts mais aussi le dépôt d'une matrice de fibrine temporaire pour remplacer les cellules mortes. Au cours de la phase de réparation, l'inflammation est contenue par l'acquisition du phénotype « M2 » par les monocytes et les macrophages résidents, propice à la cicatrisation. Cette phase s'accompagne du recrutement de lymphocytes, de l'angiogenèse et de la différenciation des myofibroblastes. Une matrice à base de collagène remplace alors le dépôt initial de fibrine (tissu de granulation). La dernière phase correspond à la phase de maturation de la cicatrice formée. Généralement cette cicatrice est dépourvue de cardiomyocytes et majoritairement riche en collagène mature qui forme un réseau dense avec des fibroblastes et des cellules immunitaires (Chen and Frangogiannis 2016).

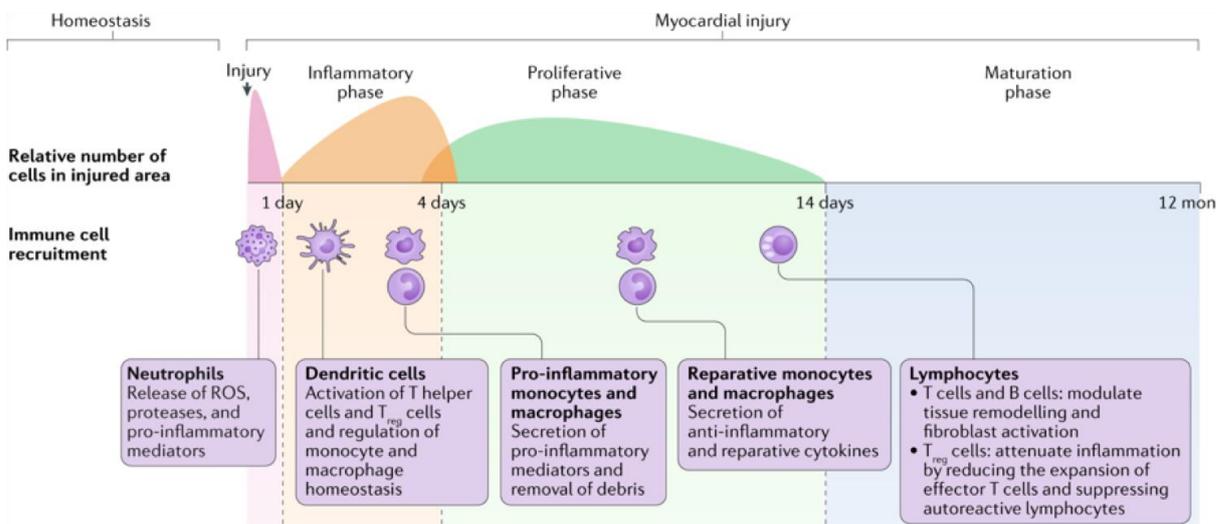


Figure 18. La réponse inflammatoire post-ischémique : détruire, nettoyer et construire. (adapté d'après Forte et al. 2018))

Le temps 72 heures post-ischémie correspond à la phase au cours de laquelle la résolution de l'inflammation a lieu. C'est à ce moment que la présence du CD31 peut peser sur l'issue des lésions, car les stimuli pro-inflammatoires sont théoriquement déblayés, les macrophages re-expriment le CD31 et leur régulation par le CD31 peut donc avoir lieu. De plus, ce délai permet d'étudier les événements stables de la reperfusion, comme la consolidation de la zone nécrotique et la présence de microagrégats dans les capillaires dans la zone péri-nécrotique.

iv. Optimisation des méthodes d'analyse de la taille de l'infarctus

Détermination de la zone à risque (AAR) et de la zone nécrotique

Lors de l'étude comparative de la taille de l'infarctus entre différents groupes d'animaux, il est important de vérifier que la zone soumise à l'ischémie ou aire à risque (AAR) était similaire entre les groupes. Cette dernière est déterminée par l'endroit où a été placé la ligature au moment de l'occlusion de l'artère coronaire. Contrairement au modèle d'occlusion permanente où tout le territoire occlus se nécrose, la taille de l'infarctus après une ischémie reperfusion est généralement plus variable, non transmurale et ne concerne pas tout le territoire occlus. Par conséquent, il est nécessaire de distinguer les trois zones du myocarde :

- La zone dite « *remote* » : myocarde se trouvant à distance de l'occlusion et non affectée par l'infarctus ;

- La zone à risque (AAR) : partie du myocarde qui se trouve en aval de l'occlusion et qui a été soumise à l'ischémie ;
- La zone de nécrose (ZN) : zone qui est comprise dans l'AAR et qui correspond à la fraction de tissu non viable. Lorsque l'on parle de la taille de l'infarctus, on fait ainsi référence à cette zone nécrotique.

Pour pouvoir distinguer ces différentes zones, il a ainsi été nécessaire de mettre au point une coloration. La méthode standard consiste à réocclure l'artère coronaire en reserrant le nœud laissé autour de l'artère coronaire le jour de l'ischémie avant de perfuser le cœur avec un colorant vital (le Luconyl) via l'artère carotide commune préalablement cathétérisée. Cette première étape permet de délimiter l'AAR de la zone *remote*. Dans la littérature, le bleu Evans est le colorant hydrosoluble le plus couramment utilisé. Cependant selon notre expérience, l'utilisation du bleu Evans ne permet pas d'avoir une démarcation précise entre l'AAR et la zone saine, conduisant à des artefacts d'analyse. En effet, la coloration au bleu Evans conduit à un étalement de la coloration au moment du découpage du cœur, entraînant une ambiguïté dans la détermination des différentes zones du myocarde. De plus, la combinaison du bleu Evans avec le TTC conduit à la précipitation de ses pigments. Le Luconyl, constitue ainsi une alternative à ces problèmes rencontrés avec le bleu Evans. En effet, avec une coloration homogène du cœur, il permet une définition précise des parties du myocarde.

La deuxième étape consiste à récupérer le cœur, à le nettoyer (retrait des oreillettes et du ventricule droit) et à le placer dans une solution de chlorure de potassium saturée afin de le mettre en diastole avant de faire 3 coupes transversales de 2 mm d'épaisseur puis de le colorer à l'aide d'une solution de TTC 2% à 37°C. Les tranches de cœur sont alors incubées pendant 20 minutes sous agitation douce, afin d'éviter que les bords des coupes ne soient en contact direct avec les parois du flacon pour ainsi obtenir une coloration homogène. Il est à noter que la perfusion directe du TTC induit une contraction tissulaire, qui affecte la morphologie des cœurs de petite taille comme ceux de la souris, ce qui peut ainsi empêcher la bonne perfusion du colorant et donc la coloration du cœur. Cette seconde étape permet d'identifier la zone nécrotique qui se trouve au sein de l'AAR. Le TTC est un colorant incolore qui est réduit en un précipité rouge/rose (le formazan) par réduction du sel de tétrazolium par les déshydrogénases en présence de NADH au sein de la mitochondrie. Contrairement aux cellules viables qui contiennent encore les réactifs nécessaires à cette réaction enzymatique, les cellules mortes ne peuvent pas réduire le TTC et restent donc blanches. Afin de mieux démarquer le tissu nécrotique (négatif à la coloration TTC), les tranches de cœurs sont ensuite incubées dans du formol (formaldéhyde 4% en PBS) sur la nuit à 4°C. Cette étape améliore le contraste entre le rouge de l'AAR et le blanc de la zone nécrotique (Bohl et al. 2009). Les coupes de cœur sont

ensuite rincées dans du PBS et photographiées sur chaque face avant d'être incluses en paraffine.

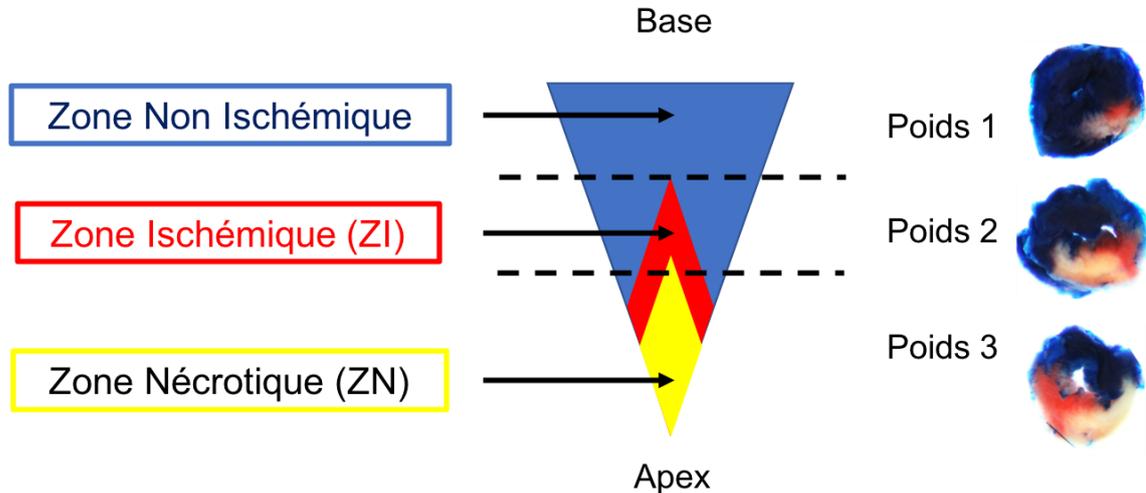


Figure 19. Représentation schématique de la méthode de quantification de l'AAR et de la taille de l'infarctus. La zone à risque et la zone nécrotique sont respectivement délimitées par une coloration au Luconyl (en bleu) et au chlorure de triphényltétrazolium (en blanc et rouge). Le cœur a été soumis à une ischémie de 45 minutes suivie d'une reperfusion de 72 heures. La partie du cœur colorée en bleu, correspond à la zone saine. Par exclusion, la partie du myocarde qui n'apparaît pas en bleu correspond à l'AAR. Cette AAR comprend une fraction viable (en rouge) et non viable (en blanc). Cette dernière correspond à la zone nécrotique.

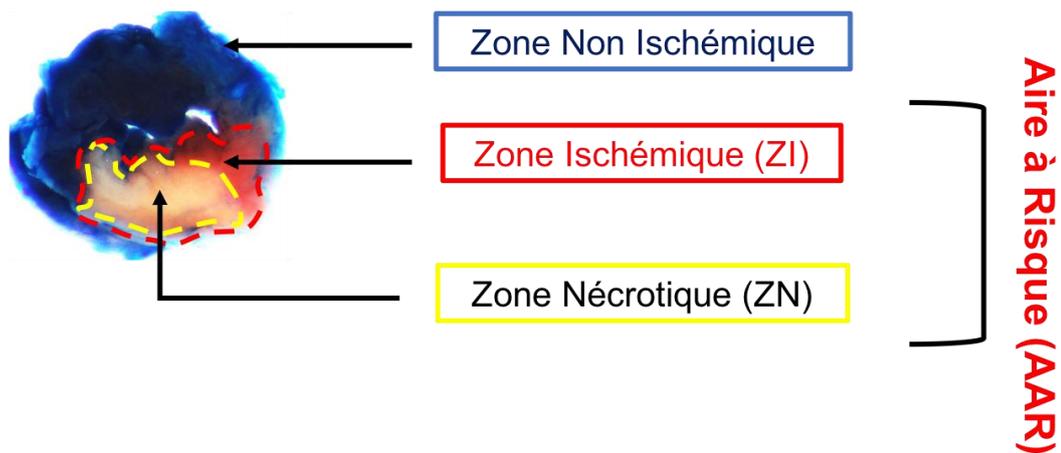
Quantification de l'AAR et de la taille de l'infarctus

La quantification de l'AAR et de la taille de l'infarctus se fait à partir des images acquises après coloration et fixation des tranches de cœur. A l'aide du logiciel d'analyse d'image ImageJ, les surfaces des différentes zones du myocarde sont délimitées manuellement pour chacune des tranches. Ces surfaces sont ensuite pondérées par le poids de la tranche. Ainsi en connaissant le poids de chaque tranche et en ayant la surface de chacune des zones du myocarde, on peut ainsi en déduire la taille de l'AAR et de la zone nécrotique totale selon les formules suivantes :

$$AAR = \left(\frac{\text{Surface ischémique}_{N^{\circ}1} \times \text{Poids}_{N^{\circ}1}}{\text{Surface totale}_{N^{\circ}1}} \right) + \left(\frac{\text{Surface ischémique}_{N^{\circ}2} \times \text{Poids}_{N^{\circ}2}}{\text{Surface totale}_{N^{\circ}2}} \right) + \left(\frac{\text{Surface ischémique}_{N^{\circ}3} \times \text{Poids}_{N^{\circ}3}}{\text{Surface totale}_{N^{\circ}3}} \right)$$

$$\text{Zone nécrotique} = \left(\frac{\text{Surface nécrotique}_{N^{\circ}1} \times \text{Poids}_{N^{\circ}1}}{\text{Surface totale}_{N^{\circ}1}} \right) + \left(\frac{\text{Surface nécrotique}_{N^{\circ}2} \times \text{Poids}_{N^{\circ}2}}{\text{Surface totale}_{N^{\circ}2}} \right) + \left(\frac{\text{Surface nécrotique}_{N^{\circ}3} \times \text{Poids}_{N^{\circ}3}}{\text{Surface totale}_{N^{\circ}3}} \right)$$

La taille finale de l'infarctus peut donc s'exprimer soit par rapport à l'AAR, soit par rapport au VG.



Multiplier par le poids de la tranche

Figure 20. Exemple de délimitation des différentes zones du myocarde pour une analyse quantitative de l'AAR et de la zone nécrotique sur le logiciel ImageJ. Image représentative d'une coupe transversale de cœur durant l'analyse de l'AAR et de la zone nécrotique sur le logiciel ImageJ. Après coloration au Lyconyl, les cœurs sont arrêtés en diastole, avant d'isoler le VG et de le couper en 3 tranches de 2 mm d'épaisseur. Les coupes sont ensuite incubées dans une solution de TTC 2% à 37°C pendant 20 minutes afin de mettre en évidence la zone nécrotique au sein de l'AAR. Après incubation sur la nuit à 4°C dans du formol 4%, les tranches de cœur sont prises en photos sur chaque face. La zone en bleu correspond à la partie du myocarde qui se trouve à distance de l'infarctus et qui est donc saine. La zone la plus claire correspond à la zone nécrotique après coloration au TTC, alors que la zone qui apparaît en rouge/rose représente la portion saine de l'AAR.

v. Résultats de l'étude préliminaire

Dans cette étude préliminaire, deux groupes de souris C57BL/6J et deux groupes de souris de type CD31 WT mâles, âgés entre 10 et 12 semaines, ont respectivement subi 30 ou 45 minutes d'ischémie, suivi d'une reperfusion de 72 heures (**Figure 21**). Pour cela, au sein de notre laboratoire, nous avons à notre disposition des souris CD31 WT dites « littermate » (notées CD31 +/+). Cependant leur disponibilité étant limitée, nous avons décidé d'utiliser des souris C57BL/6J fournies par un revendeur agréé (Janvier).

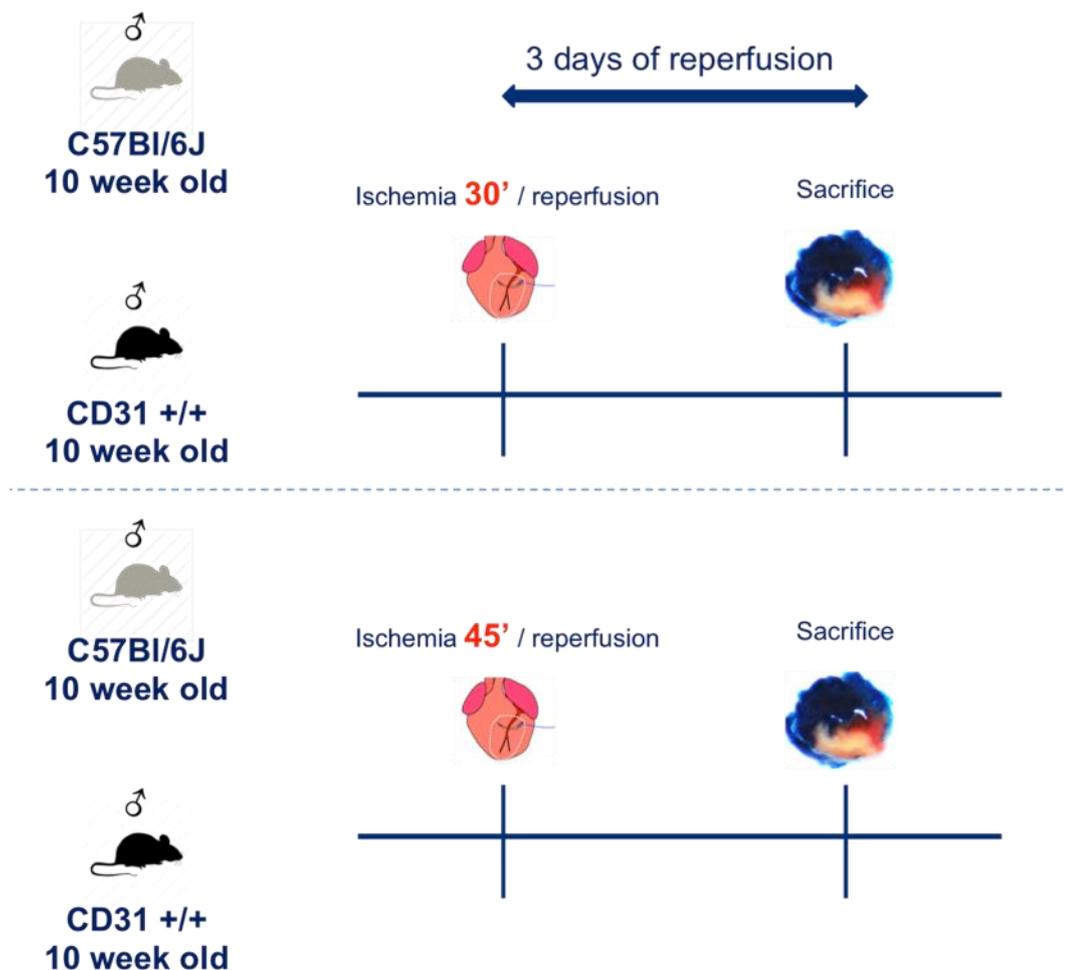


Figure 21. Protocole expérimental de l'étude préliminaire. Afin de déterminer le temps d'ischémie adéquat, des souris C57BL/6J et CD31 WT mâles, âgés entre 10 et 12 semaines, ont respectivement subi 30 ou 45 minutes d'ischémie, suivi d'une reperfusion de 72 heures.

Les résultats de la taille de l'AAR sont représentés sur la **Figure 22** et montrent que l'AAR reste identique quelque soit la durée de l'ischémie et la provenance des animaux. Ceci montre une bonne reproductibilité du modèle quelque soit le temps de l'ischémie. Cela nous laisse également penser, que le réseau vasculaire se trouvant au niveau du cœur des souris est similaire. D'autre part, il est à noter que le nombre de souris décédées a été plus important au temps d'ischémie le plus court (30 minutes) et ceci aussi bien chez les souris C57BL/6J que les souris issues de notre élevage (1 souris sur 10 est décédée chez les souris C57BL/6J) contre 3 décès sur 5 chez les CD31 WT – **Tableau 4**

Tableau 4. Tableau récapitulatif de l'effectif total de souris de l'étude préliminaire.

).

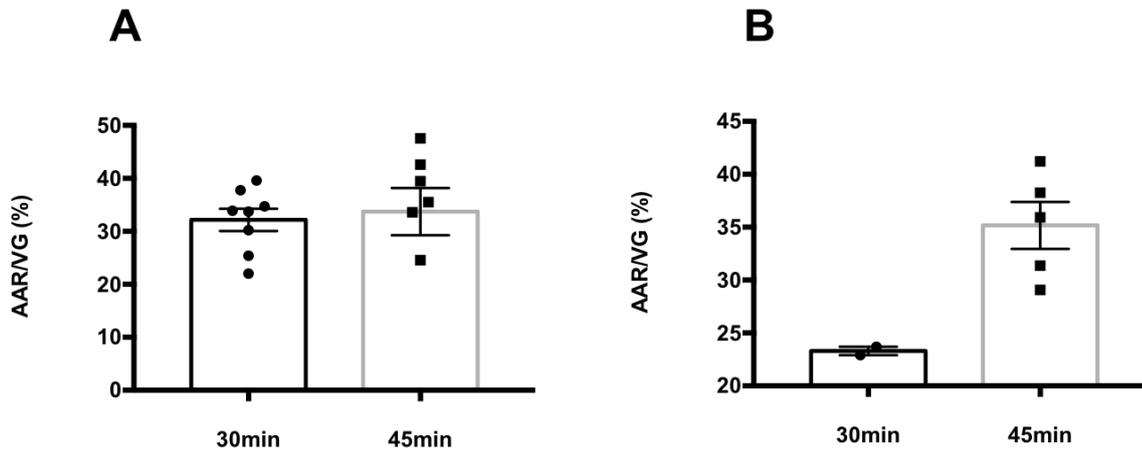


Figure 22. Représentation de l'aire à risque (AAR) par rapport au ventricule gauche (VG). La représentation de l'AAR est exprimée en pourcentage du VG, moyenne \pm SEM. A) Souche C57BL/6J. B) Souche CD31 +/+ « littermate ».

	C57BL/6J 30 minutes	C57BL/6J 45 minutes	CD31 WT 30 minutes	CD31 WT 45 minutes
Nbr inclus	8	6	2	5
Nbr exclus (Autre que décès)	1	4	0	0
Nbr décès	1	0	3	1
Total opérés	10	10	5	6

Tableau 4. Tableau récapitulatif de l'effectif total de souris de l'étude préliminaire.

Concernant la taille d'infarctus, la **Figure 23** montre que l'infarctus (zone de nécrose) est plus important après 45 minutes d'ischémie. De plus, la variabilité dans les groupes 45 minutes d'ischémie est réduite par rapport à celle des groupes 30 minutes.

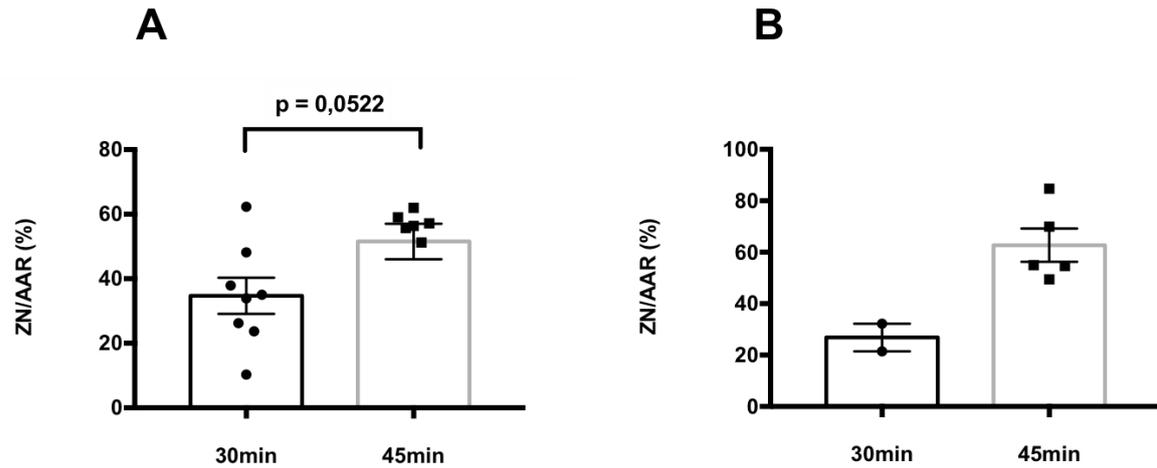


Figure 23. Taille de la zone nécrotique (ZN) par rapport à l'AAR. La taille de l'infarctus (ou zone nécrotique) est exprimée en pourcentage de l'AAR, moyenne \pm SEM. A) Souche C57BL/6J. B) Souche CD31 +/+ « littermate ».

II.2.b. L'absence de CD31 augmente la taille de l'infarctus *in vivo*

Dans cette étude, une ischémie cardiaque a été induite chez des souris WT et KO pour le CD31 (n = 30, 15 femelles et 15 mâles dans chaque groupe) par occlusion de l'artère coronaire antérieure gauche pendant 45 minutes, suivie d'une reperfusion pendant 72 heures. Concernant le nombre d'animaux à opérer par groupe, il a été obtenu, (sur la base de la variabilité observée pendant l'étude préliminaire) de sorte à avoir une puissance de 80% (alpha 0.05) pour évaluer statistiquement une augmentation de 20% de la taille de nécrose (algorithme « k Sample », logiciel statistique JMP®) et en intégrant dans nos calculs une mortalité liée à la chirurgie de 30%.

A 72h après la reperfusion, nos résultats montrent que, pour une même aire à risque les souris CD31 KO ont une taille d'infarctus (zone de nécrose) plus importante que les souris CD31 WT, indiquant qu'en absence de CD31 le bénéfice de la reperfusion est limité, et l'aire à risque soluble est réduite (**Figure 24**). Les mécanismes pouvant expliquer un tel impact sur l'issue de la reperfusion comprennent le *no-reflow* et la constitution d'une réponse inflammatoire inappropriée. En effet, bien que la restauration de la circulation soit essentielle pour la récupération des tissus après une ischémie, la reperfusion a des effets profonds sur les événements cellulaires responsables de la réparation et du remodelage. Paradoxalement, la restauration du flux sanguin dans la zone ischémique déclenche une cascade de réactions inflammatoires pouvant entraîner des lésions tissulaires supplémentaires. Notamment, la production massive d'espèces réactives de l'oxygène entraîne l'activation finale, la dégranulation et la mort des neutrophiles et l'adhérence entre les cellules sanguines et les

cellules endothéliales de la microcirculation entraînant ainsi une occlusion des microvaisseaux (Kaminski et al. 2002, Cooper et al. 2002).

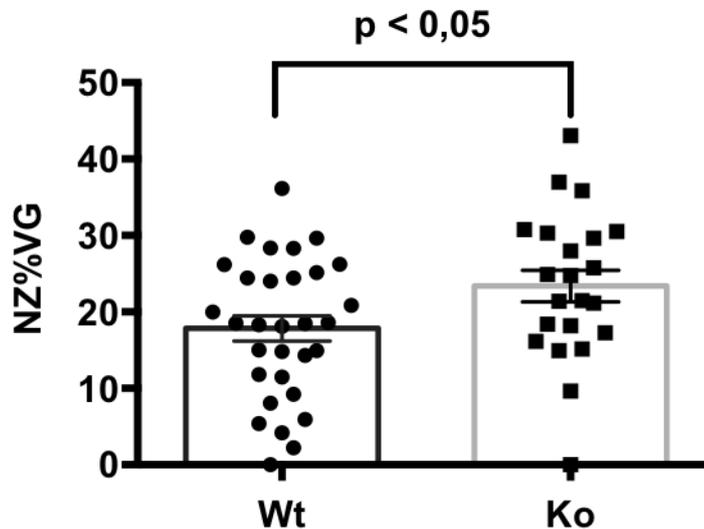


Figure 24. Quantification de la taille de l'infarctus. La taille de l'infarctus (ou zone nécrotique) est exprimée en pourcentage de VG, moyenne \pm SEM. Pour une même AAR, la taille de l'infarctus est significativement plus grande chez les souris CD31 KO que chez les souris WT ($23,4 \pm 2$ vs $17,8 \pm 1,6$ de VG, $p < 0,05$).

Comme décrit dans la section « Contexte », le *no-reflow* correspond à une hypoperfusion, voir une absence totale de perfusion des zones profondes du myocarde et ce malgré la réouverture de l'artère coronaire responsable de l'ischémie. Ce processus biologique implique des interactions pathologiques entre les leucocytes et les plaquettes bloquant le passage du sang dans la microcirculation (Carden et Granger 2000, Fordyce et al. 2015). De nombreuses expériences ont montré la présence de microagrégats neutrophilaires au sein des capillaires des tissus post-ischémiques (Engler et al. 1983, Schmid-Schönbein et Engler 1987). Nos résultats obtenus par immunofluorescence confirment ces observations, montrant la présence d'agrégats leucocytaires, de plaquettes (et de globules rouges) dans les cœurs infarcis. De façon intéressante, ces agrégats semblent plus évidents chez les animaux n'exprimant pas de CD31 (**Figure 25**). Cette impression a été confirmée par l'analyse quantitative par cytométrie en flux, qui montre qu'à 3 jours après reperfusion, ces agrégats sont plus importants chez les souris KO et qu'ils se localisent aussi bien dans la zone infarctée que dans la zone péri-nécrotique, théoriquement saine (**Figure 26**). Ce phénomène peut notamment expliquer la diminution des effets de la reperfusion et donc la présence d'une zone de nécrose plus importante chez ces animaux.

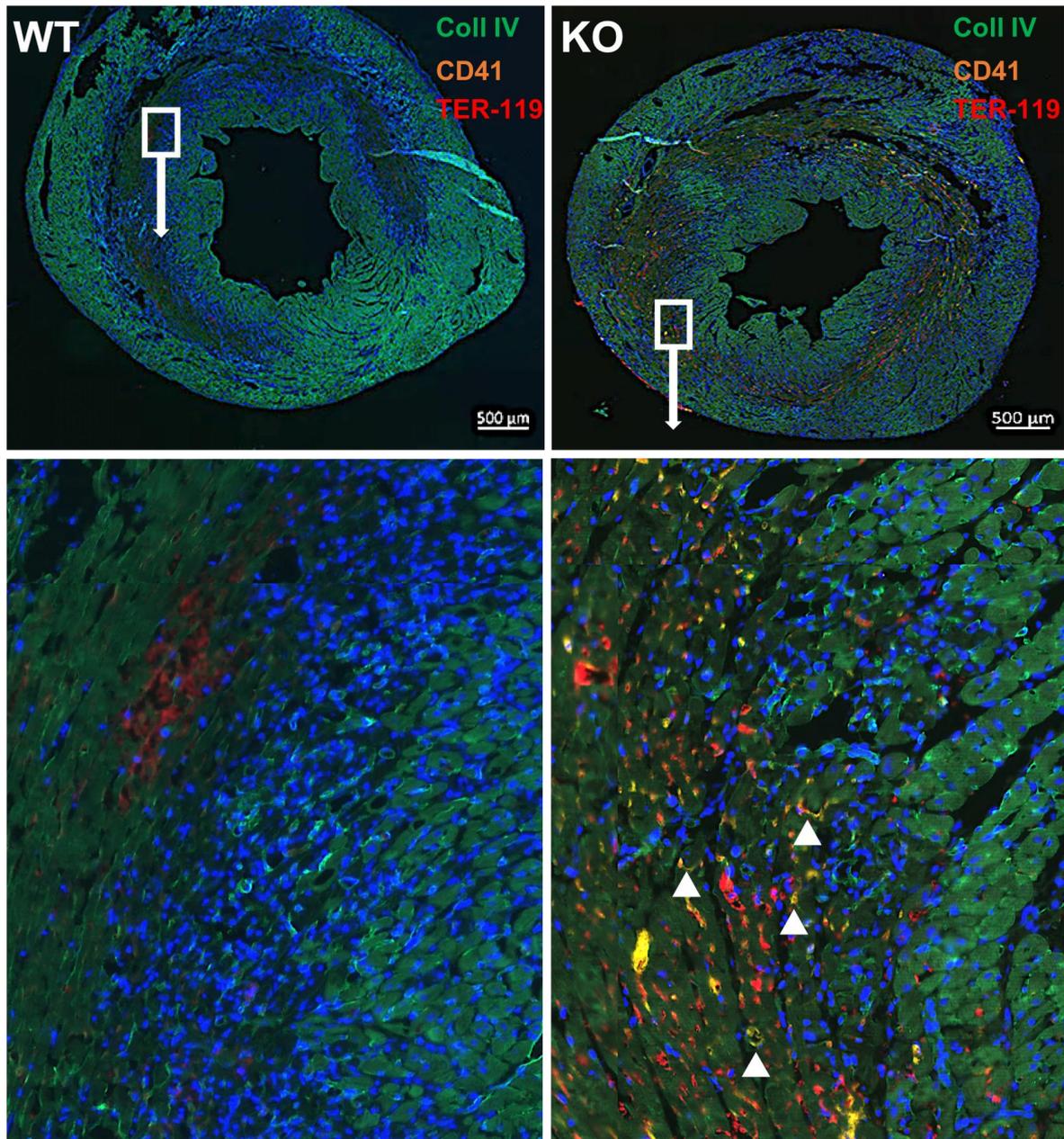


Figure 25. Mise en évidence d'agrégats plaquettes/globules rouges au sein de l'infarctus chez des souris CD31 KO. Coupes transversales congelées de cœurs de souris (CD31 WT à gauche et CD31 KO à droite) ayant eu une ischémie de 45 minutes suivie de 3 jours de reperfusion. Les zones infarctées des souris KO sont infiltrées de plaquettes CD41+ (marquage orange) et de globules rouges (marquage TER-119 en rouge) (têtes de flèches blanches). Le marquage au collagène de type IV (vert) permet la localisation des vaisseaux. Ces marquages ont été faits indépendamment de la quantification de la taille de l'infarctus.

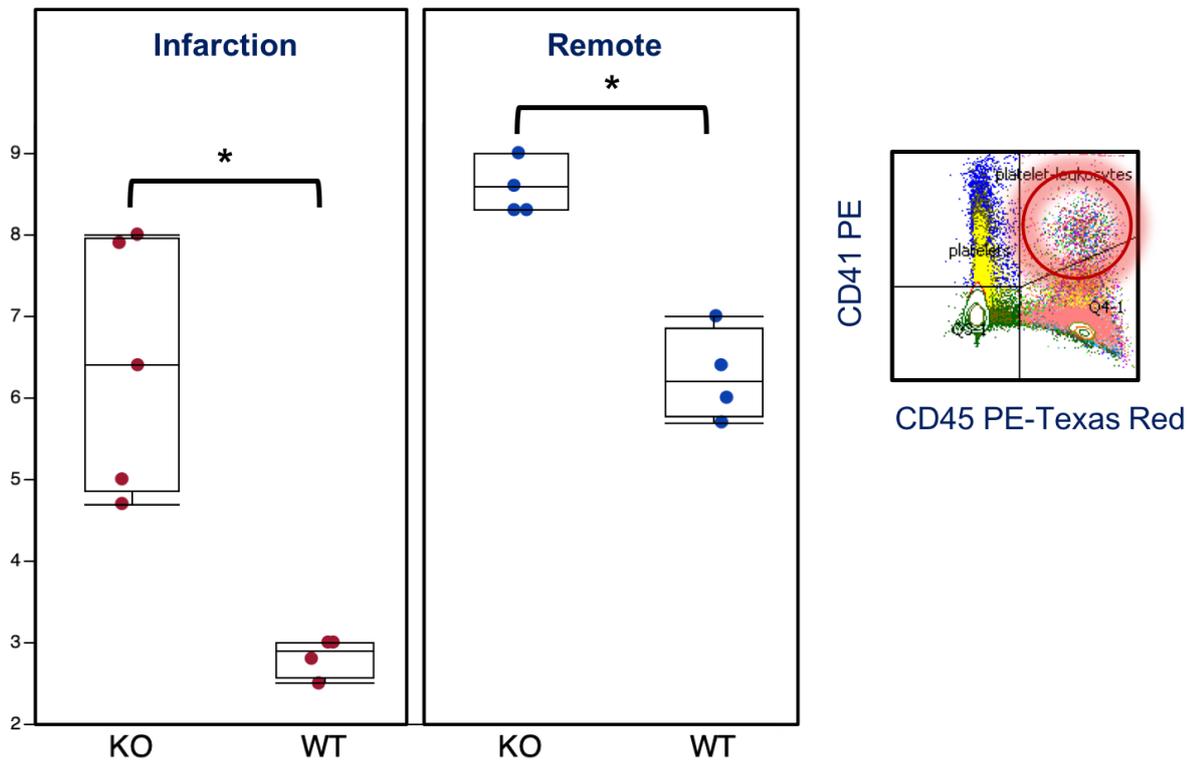


Figure 26. Analyse quantitative par cytométrie en flux des agrégats leucocyto-plaquettaires. Ces expériences de cytométrie en flux ont été réalisées indépendamment de la quantification de la taille de l'infarctus. Pour cela, des souris CD31 WT et KO mâles, âgés de 10 à 12 semaines, ont subi une ischémie de 45 minutes suivie d'une reperfusion de 72 heures. A l'issue des 3 jours de reperfusion, les cœurs ont été récupérés puis la zone infarctée a été délicatement séparée de la zone saine dite « remote » qui correspond à la zone qui se trouve à distance de l'infarctus. Chaque zone a ensuite été digérée à l'aide d'une solution enzymatique contenant de la Liberase DL (Roche®) et de la DNase (Sigma) avant d'être marquée par un panel d'anticorps permettant l'analyse et la caractérisation des cellules présentes dans chaque zone du cœur. Les agrégats leucocyto-plaquettaires ont été identifiés par le double marquage CD41+ (marqueur plaquettaire) et CD45+ (marqueur leucocytaire) (expériences faites en collaboration avec l'équipe du Dr. Lucie Peduto, Institut Pasteur Paris - Fortessa BD®).

L'analyse par cytométrie en flux, nous a également permis d'analyser de plus près le phénotype des leucocytes présents au niveau des différentes parties du cœur. Nous avons ainsi mis en évidence, chez les souris CD31 KO, que les leucocytes vivants (CD45+) exprimaient plus le marqueur MHC-II, et ceci aussi bien dans la zone saine que la zone nécrotique (**Figure 27**), suggérant que ces leucocytes se trouvent dans un état plus « activé ». L'étude de la population myéloïde nous a également informé sur la capacité des souris à recruter les neutrophiles et les monocytes aux sites de lésion. Pour cela, nous avons eu recours à l'analyse du marqueur CD11b

ou Mac-1. Il est à noter que le CD11b est une bêta-intégrine qui existe sous deux configurations : ouverte et fermée. La configuration ouverte, est synonyme d'un état d'adhérence et de migration cellulaire. De plus dans cette configuration l'intégrine devient alors plus accessible à l'anticorps. Ainsi, nos résultats mettent en évidence un nombre plus important de cellules myéloïdes au sein de la zone infarctée chez les souris KO et il semblerait que ces cellules soient en état d'adhérence et de migration. De façon intéressante, cela confirme des résultats récemment obtenus au sein de notre laboratoire montrant que d'un point de vue fonctionnel, le CD31 pourrait jouer un rôle dans le contrôle de l'activité des intégrines au niveau de neutrophiles provenant de chez l'homme. En effet, il avait été observé, par microscopie à fluorescence, une localisation dynamique du CD31 et de l'intégrine dans les neutrophiles mobiles. Le CD31 fonctionnel se redistribuait rapidement au niveau de l'uropode lors de la migration cellulaire, alors que les intégrines étaient sous une forme inactive. Etant donné que l'uropode est caractérisé par un état de faible adhérence, nos résultats suggèraient que le CD31 pouvait limiter l'activité des intégrines et pouvait donc jouer un rôle dans le contrôle du trafic de neutrophiles au cours de processus inflammatoires (abstract présenté à la SFI, à Reims en Novembre 2017).

Live leucocytes MHCII FITC Median

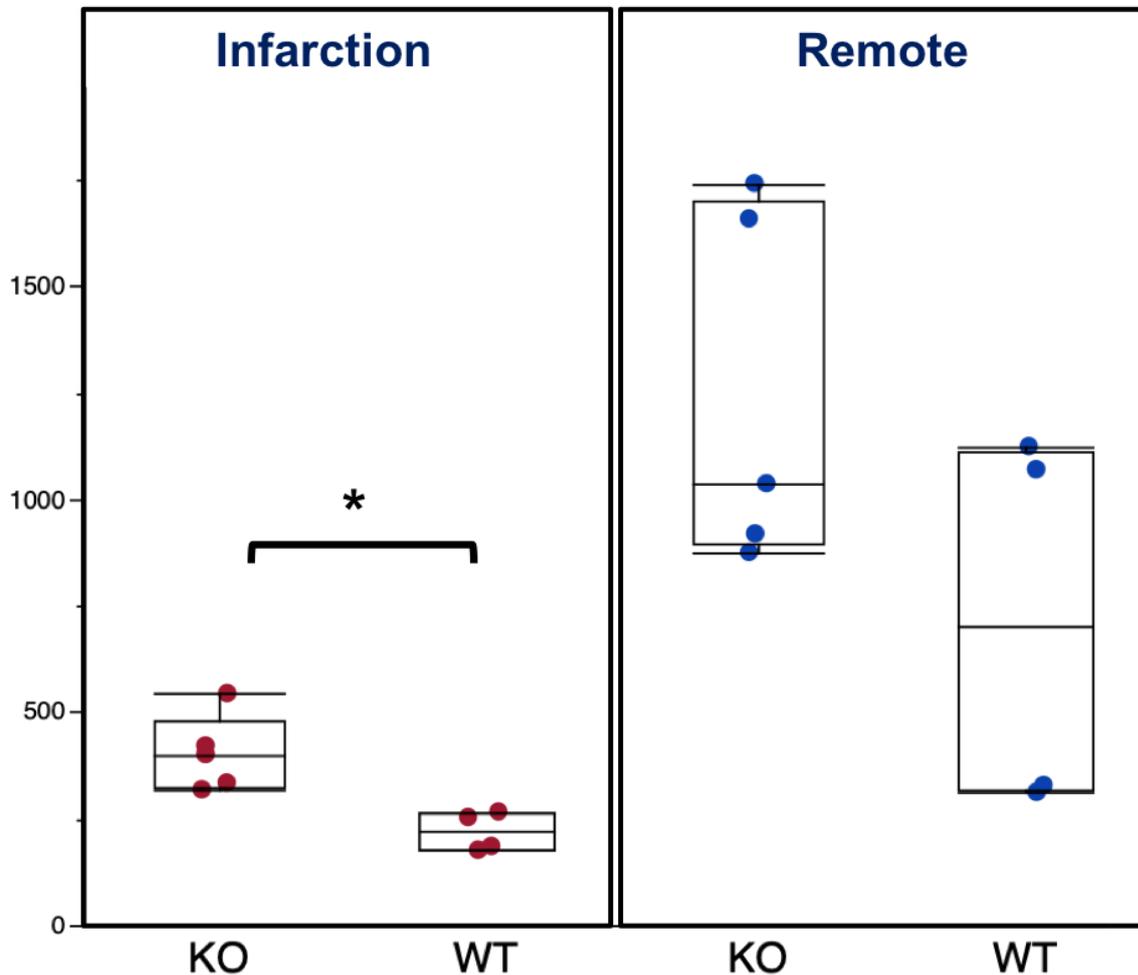


Figure 27. Analyse par cytométrie en flux du phénotype leucocytaire au sein des cœurs infarctés. Le marqueur MHC-II a été analysé au sein de la population leucocytaire vivante (CD45+). Ce dernier a été utilisé afin d'identifier l'état d'activation des leucocytes. Les résultats montrent que les leucocytes des souris CD31 KO sont plus activés que les souris WT.

La caractérisation des différentes sous-populations myéloïdes montrent également que le recrutement des neutrophiles (CD11b+/Ly6G+) chez les souris CD31 KO n'est pas altéré (**Figure 28**) et montre une réponse inflammatoire plus importante chez ces dernières. Ceci n'est pas étonnant car l'analyse se fait à 72h post-reperfusion. Au niveau de la réponse réparative, cette période correspond à la fin de la phase inflammatoire et au début de la phase proliférative (**Figure 18**). Concernant les monocytes (CD11b+/Ly6C+/Ly6G-) et conformément aux résultats obtenus par immunofluorescence, le nombre de monocytes recruté est plus important chez les souris CD31 KO. De façon surprenante, ces derniers sont plus nombreux dans la zone saine. L'analyse détaillée du phénotype de ces monocytes montre une fraction de monocytes classiques (CD11b+/Ly6C high) augmentée chez les souris KO à la fois dans la zone infarctée et

dans la zone à distance de l'infarctus. Fait intéressant, la fraction de monocytes alternatifs (CD11b+/Ly6C low), donc réparateurs, est diminuée dans la zone saine chez les animaux KO par rapport aux WT (**Figure 29**).

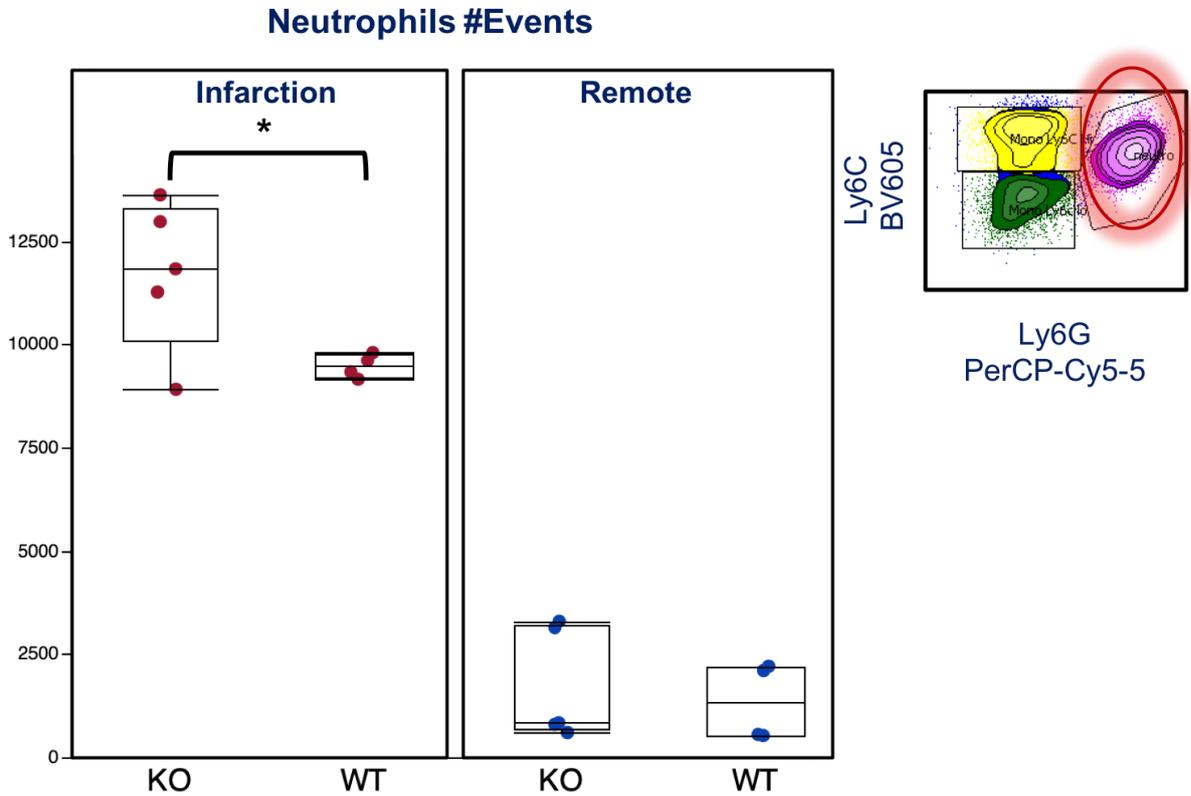
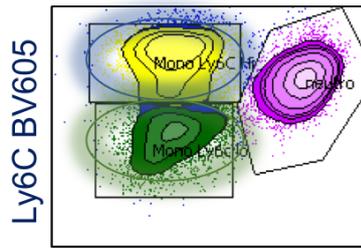
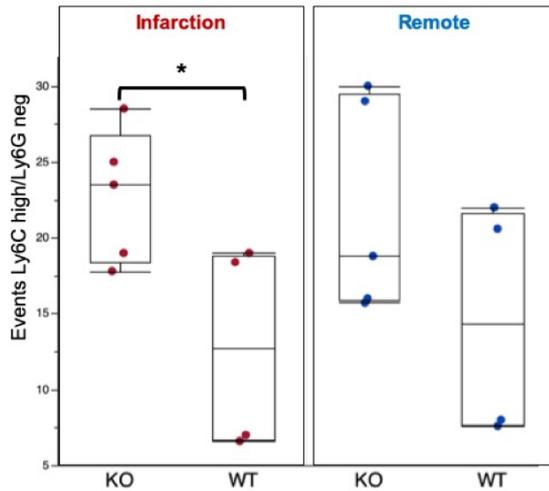


Figure 28. Recrutement de la population neutrophilaire. Les neutrophiles (Ly6G+) ont été identifiés parmi les cellules myéloïdes CD11b+. Ce recrutement neutrophilaire n'est pas altéré chez les souris CD31 KO et est plus important que chez les souris WT.



Monocytes classiques



Monocytes alternatifs

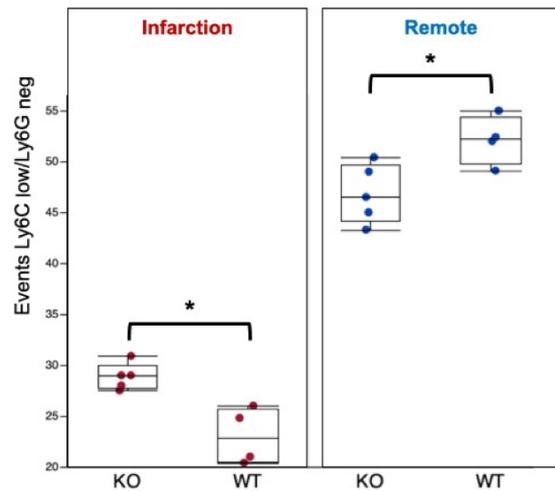


Figure 29. Recrutement monocytaire. En fonction de l'intensité du marquage Ly6C, deux sous population de monocytes se distinguent : les cellules Ly6C high correspondent aux monocytes dits classiques que l'on pourrait comparer aux macrophages M1. Alors que les cellules Ly6C low correspondent aux monocytes alternatifs que l'on pourrait comparer aux macrophages M2. La fraction de monocytes alternatifs (CD11b+/Ly6C low), donc réparateurs, est diminuée dans la zone saine chez les animaux KO par rapport aux animaux WT alors que la fraction de monocytes classiques (CD11b+/Ly6C high) semble augmentée.

Ainsi l'ensemble de nos résultats, montre d'une façon générale, que l'absence de CD31 entraîne un état d'hyperactivation des leucocytes de l'immunité inée, tout comme on l'avait observé dans la réponse immunitaire adaptative (Fornasa, Groyer et al. 2010).

II.3. Conclusion

Nos résultats montrent une AAR similaire chez les souris CD31 KO et WT ($41,7 \pm 3,4\%$ vs $31 \pm 2,9$ du VG, NS), tandis que la taille de l'infarctus est significativement plus grande chez les souris CD31 KO que chez les souris WT ($23,4 \pm 2$ vs $17,8 \pm 1,6\%$ de VG, $p < 0,05$). La microscopie à immunofluorescente montre une augmentation du nombre d'agrégats microvasculaires. Ces agrégats sont riches en plaquettes et se localisent principalement autour de l'infarctus chez les souris CD31 KO. Ce résultat est confirmé par l'analyse en cytométrie en flux (9749 ± 573 vs 5976 ± 376 agrégats plaquettes-leucocytes/mg de tissu, $p < 0,001$). De plus, nous avons constaté que le rapport entre les macrophages de type M1 et M2 dans le myocarde se trouvant à distance de l'infarctus est significativement augmenté chez les souris CD31 KO ($0,7 \pm 0,07$) par rapport aux souris WT ($0,4 \pm 0,06$, $p < 0,01$). Nos données suggèrent que le CD31 est important pour réduire la taille de la nécrose à la suite d'une procédure de recanalisation coronaire. Parmi les mécanismes d'action proposés, on retrouve un rôle possible du CD31 dans le *no-reflow* mais aussi dans la contention de la phase inflammatoire à l'avantage de la phase réparative du processus de cicatrisation post-lésionelle.

Discussion

La dissection aortique et l'ischémie reperfusion myocardique constituent deux conditions cliniques liées à des lésions tissulaires aiguës, comportant un risque vital élevé non seulement dans l'immédiat mais aussi à distance, si le remodelage tissulaire n'est pas approprié. La dissection aortique aiguë est une pathologie grave dont la mortalité peut atteindre 50% dès les 48 premières heures. Afin de limiter le risque de rupture de l'aorte, la prise en charge clinique se veut essentiellement palliative (réduction de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque). Néanmoins, 25 à 30% des patients nécessitent d'une intervention chirurgicale ultérieure du fait de l'absence d'agents thérapeutiques spécifiques visant à limiter l'expansion anévrysmale ou d'autres complications. Il a été montré qu'une cicatrisation associée à une réponse de la matrice extracellulaire appropriée étaient nécessaires dans le processus de guérison et un pronostic favorable à long terme.

Dans le cas de l'ischémie reperfusion myocardique, la restauration la plus rapide de la circulation coronaire, après un épisode ischémique, est le seul moyen de limiter la mort des cardiomyocytes. Cependant, le rétablissement du flux coronaire n'est pas toujours efficace. En effet, 30% des patients ne tirent aucun avantage de cette procédure, c'est ce que l'on appelle le phénomène de *no-reflow*. Le *no-reflow* est également associé à une incidence accrue d'insuffisance cardiaque et de mortalité (Ito 2006, Kloner 2016). Ainsi la compréhension des mécanismes physiopathologiques responsables de ces maladies, constitue un véritable enjeu de la recherche biomédicale actuelle.

Mon hypothèse de travail était que CD31, un co-récepteur trans-homophile à motifs ITIMs, exprimé de manière constitutive à la surface des cellules circulantes se trouvant à l'interface sang-vaisseaux (à l'exception des globules rouges), joue un rôle important dans les mécanismes de régulation de ces cellules. En effet, la régulation des interactions entre l'endothélium, les plaquettes, et les leucocytes par le CD31 pourrait être particulièrement importante au cours des réponses biologiques qui se mettent en place suite à une lésion cardiovasculaire.

Dans des conditions de lésion vasculaire aiguë telles que la dissection aortique en présence d'hématome intramural, mes résultats expérimentaux montrent que les macrophages au site de lésions artérielles sont associés à un phénotype pro-inflammatoire (M1) et n'expriment pas de CD31. Cette absence de signalisation du CD31 semble potentialiser et accentuer le phénotype inflammatoire des macrophages lors de la polarisation M1, alors qu'elle diminue le phénotype pro-réparateur (M2) dans des conditions de polarisation M2. De façon intéressante, l'engagement du CD31 à l'aide d'un peptide agoniste, permet l'induction des macrophages préférentiellement d'un phénotype pro-inflammatoire vers un phénotype pro-réparateur.

D'autre part, mes résultats de thèse montrent un rôle important du CD31 dans les dégâts faisant suite à une ischémie reperfusion myocardique. En effet, nous avons mis en évidence que l'absence de CD31 entraîne une taille d'infarctus plus grande chez des souris qui n'expriment plus la protéine. Nous avons notamment démontré que l'infiltration leucocytaire était plus importante chez ces souris déficientes en CD31 et que cette infiltration est plus élevée au niveau de la zone infarctée. D'autre part, les leucocytes qui s'y trouvent semblent davantage activés chez les souris KO que chez les souris WT. Qui plus est, parmi ces leucocytes, la fraction de monocytes réparateurs y est plus importante. Cependant de façon intrigante, ce résultat s'avère inversé au niveau de la zone saine. En effet, alors que l'on retrouve toujours plus de leucocytes chez les animaux n'exprimant plus de CD31, la portion de monocytes réparateurs y apparaît en revanche diminuée. Par ailleurs, il est à noter que cette augmentation de la taille de l'infarctus peut également s'expliquer par la présence d'un nombre important d'agrégats composés de plaquettes mais aussi de leucocytes et de globules rouges. Ces agrégats se localisent non seulement dans la zone infarctée mais aussi au niveau du myocarde qui se trouve à distance de l'ischémie expliquant en partie une taille de nécrose plus grande chez les souris déficientes en CD31.

Dans ce travail de thèse plusieurs considérations sont à prendre en compte comme les modèles animaux utilisés ou encore les fonctions du CD31 exploitées et ciblées. Dans ce chapitre, je tenterai d'interpréter les principaux résultats et conclusions de mes travaux dans un contexte plus large et en tenant compte de ce qui est actuellement proposé dans la littérature. J'essayerai également d'apporter un regard critique sur les approches employées ainsi que sur leurs limites tout en proposant des solutions pour y remédier.

I. Considérations techniques : choix des modèles animaux

Les maladies cardiovasculaires sont des pathologies multifactorielles complexes qui, du fait de l'hétérogénéité génétique chez l'homme mais aussi des interactions gène-environnement, sont difficiles à étudier. Les modèles murins sont devenus des outils incontournables pour tester les hypothèses dans un cadre interventionnel dans la perspective de mettre au point des traitements plus efficaces pour traiter les patients. En effet les modèles murins ne cessent de gagner en popularité. Plusieurs raisons peuvent l'expliquer, parmi elles on peut notamment citer un temps de gestation relativement court (21 jours), une taille de portée importante (en fonction des lignées utilisées et des gènes étudiés) ou encore des coûts faibles associés. De plus, les avancées majeures dans les domaines de la biologie moléculaire et de la génétique ont permis de caractériser le génome de la souris montrant que des gènes et des voies de signalisation similaires régulent le développement du cœur et du système vasculaire chez la souris et chez l'homme (Braunwald E, Zipes DP, and Libby P. Heart Disease (6th ed.). Philadelphia: Saunders, 2001, p. 1–18, 1114–1219, 1955–1976.). D'autre part, la création de souris knock-out (KO) est un moyen de modifier l'expression d'un gène spécifique afin de mieux comprendre son rôle biologique.

Au cours de ma thèse, nous avons eu recours à deux modèles expérimentaux murins afin d'améliorer notre compréhension du rôle du CD31 dans le remodelage vasculaire et tissulaire à la suite d'une lésion vasculaire aiguë. Pour cela, nous avons appliqué ces modèles à des souris qui ont été conçues au sein de notre laboratoire. Il s'agit d'une lignée de souris générée par la méthode de transgénèse ciblée (recombinaison homologue avec le système Cre/loxP) et qui permet d'obtenir des souris dont les cellules n'expriment plus de CD31 de façon constitutive. Bien que ces modèles expérimentaux soient bien décrits dans la littérature et d'une grande importance pour comprendre la pathogenèse des maladies cardiovasculaires, il n'en demeure pas moins que leurs utilisations puissent faire face à des limites.

I.1. Modèle de dissection aortique par perfusion d'Angiotensine

II chez les souris ApoE^{-/-}

La première modélisation des anévrismes a été réalisée chez le rat, d'autres modèles ont par la suite vu le jour chez les gros animaux (lapin, chiens ou encore moutons) et la souris (**Tableau 5**). Actuellement, il n'existe pas de modèle « idéal » qui présente l'ensemble des caractéristiques des AAA humains, à savoir une atteinte de l'aorte sous-rénale, une croissance continue de l'AAA menant à sa rupture, un thrombus endoluminal en contact direct avec les éléments du sang

circulant, des calcifications liées à l'athérosclérose ou encore une protéolyse médiale et un infiltrat leucocytaire dans la paroi. En effet, chaque modèle expérimental ne permet d'étudier que quelques unes de ces caractéristiques. Néanmoins, cela ne devrait pas être considéré comme un inconvénient mais bien comme un avantage, puisque cela permet d'étudier l'effet d'un mécanisme à la fois, théoriquement sans que les autres n'interfèrent dans sa compréhension. Dans notre cas, nous avons utilisé le modèle de perfusion d'Angiotensine II chez des souris rendues hypercholestérolémiques par délétion de l'apolipoprotéine E (ApoE^{-/-}). Ce modèle, précédemment décrit par l'équipe de Daugherty dans les années 2000 (Daugherty, Manning et al. 2000) est un modèle désormais reconnu comme très utile pour l'étude des dissections aortiques et de leur issue anévrysmale.

	Pathologie humaine	Perfusion aortique d'élastase	Xélogreffe décellularisée	Administration de Chlorure de calcium	Perfusion d'Ang II	Dysfonction de la lysyl-oxydase	Modèle d'anévrisme sacculaire	Administration d'agonistes du récepteur aux minéralocorticoïdes + Sel
Rupture	+	_*	-	-	+	+	+ #	+
Modèle disséquant	+	-	-	-	+	+	+ #	+
Croissance	+	-	-	-	-	-	+ #	-
Thrombus intraluminal	+	+	+	-	-	-	+ #	-
Thrombus intramural	+	-	-	-	+	-	-	+
Athérosclérose	+	-	-	-	+	-	-	-
Dégénérescence de la média	+	+	+	+	+	+	+	+
Infiltration leucocytaire	+	+	+	+	+	-	+	+
Espèce		Rat et souris	Rat	Lapin et souris	Souris ApoE ^{-/-}	Rat et souris	Chien et rat	Souris
Références		Anidjar et al., 1990 Pyo et al., 2000	Allaire et al., 1994	Gertz et al., 1988 Chiou et al., 2001	Daugherty and Cassis, 1999 Daugherty et al., 2000	Li et al., 2013 Mäki et al., 2002	Kallmes et al., 1999 Frösen et al., 2006	Liu et al., 2013

Tableau 5. Comparaisons des caractéristiques histologiques de la pathologie anévrysmale humaine à celles des modèles animaux. *évènement pouvant survenir précocement ; #évènements observés lorsque la greffe décellularisée a été utilisée (adapté d'après Sénémaud et al. 2017).

Malgré quelques inconvénients liés au modèle (un taux de survenu d'anévrisme de 60% et une mortalité de 20% le long de la période de perfusion (Trachet, Fraga-Silva et al. 2015)) et des différences spécifiques avec l'homme (anévrismes impliquant généralement le segment sous-rénal de l'aorte chez l'homme alors que chez la souris, l'aorte ascendante ou la portion supra-rénale est touchée), le modèle par perfusion d'Angiotensine II a l'avantage, comme le montre le **Tableau 5**, en plus d'être techniquement simple, d'être le modèle qui reproduit le plus les

caractéristiques de la dissection aortique avec un hématome intramural que l'on retrouve chez l'homme. C'est d'ailleurs le modèle qui est le plus utilisé dans les études précliniques. D'après le **Tableau 5**, un autre modèle aurait pu être sélectionné. Il s'agit du modèle par administration d'agonistes du récepteur aux minéralocorticoïdes couplé à l'absorption de sel chez la souris C57BL/6J (Liu, Xie et al. 2013). En effet, ce modèle partage les mêmes caractéristiques histologiques que le modèle par perfusion d'Angiotensine II à l'exception du critère d'athérosclérose qui peut être palié en mettant les souris sous régime gras. Cependant un des inconvénients de ce modèle vient du fait qu'il soit dépendant de l'âge des animaux et qu'il nécessite l'utilisation de souris âgées de 10 mois. D'autre part, les mécanismes d'action de ce modèle sont peu connus. Un des mécanismes serait que l'activation du récepteur des minéralocorticoïdes, sur les cellules inflammatoires circulantes et les cellules vasculaires, par ses agonistes (désoxycorticostérone ou DOCA ou l'aldostérone) en présence d'une forte teneur en sel favorise l'infiltration de monocytes/macrophages, des neutrophiles et des lymphocytes T dans l'aorte afin de produire des MMPs et un stress oxydatif. Cela entraîne alors la dégradation de l'élastine et la dégénérescence des cellules vasculaires mais aussi à la formation et à la rupture d'anévrisme aortique (Liu, Xie et al. 2013).

Nous avons décidé d'utiliser le modèle de perfusion d'Angiotensine II afin d'étudier les mécanismes de réparation vasculaire impliquant la polarisation des macrophages dans un modèle de dissection aortique en présence d'un hématome intramural. Toutes ces conditions d'étude étant réunies dans ce modèle. En effet, la stimulation par l'Angiotensine II entraîne une voie de signalisation intracellulaire dépendante du NO dans les cellules endothéliales, ainsi qu'une augmentation des molécules d'adhérence (VCAM-1), une translocation nucléaire du facteur nucléaire- κ B (Pueyo, Gonzalez et al. 2000) agissant sur la perméabilité endothéliale et l'adhérence des monocytes/macrophages (Liu, Wu et al. 2015, Liu, Wang et al. 2015).

1.2. Modèle d'ischémie reperfusion myocardique par occlusion de l'artère coronaire gauche

La cardiopathie ischémique représente l'une des principales causes de morbi-mortalité dans les pays industrialisés. La pratique de la revascularisation est désormais à la portée de tous mais le résultat n'est pas toujours celui espéré. Pour comprendre les mécanismes à l'origine de l'échec éventuel de la reperfusion et la mise au point d'approches thérapeutiques adaptées, il convient d'utiliser une technique d'analyse rigoureuse et reproductible et d'utiliser un modèle capable de refléter au mieux la pathologie humaine et l'intervention dans des conditions standardisées. Pour cela, nous avons utilisé le modèle d'occlusion de l'artère coronaire gauche. Décrit par Michael et al. dans les années 90, ce modèle murin d'ischémie reperfusion

myocardique a été largement décrit dans la littérature au cours de ces deux dernières décennies (Kolk, Meyberg et al. 2009, Tarnavski 2009, Xu, Alloush et al. 2014). Il a l'avantage de pouvoir être utilisé aussi bien pour l'analyse des lésions d'ischémie reperfusion aiguës à court terme, que pour des lésions à long terme (modèle de ligature permanente). Cependant la difficulté du modèle réside dans la technique chirurgicale qui permet le positionnement précis et reproductible du nœud autour de l'artère coronaire. En effet, un positionnement précis de la ligature augmente la reproductibilité de la taille de l'infarctus, produisant ainsi des résultats fiables et réduisant le nombre d'animaux nécessaire à des études statistiquement pertinentes.

Ainsi dans un premier temps, il a donc été nécessaire de standardiser le modèle. En effet, ce besoin de standardisation des modèles animaux s'est révélé nécessaire alors qu'au cours des 40 dernières années de nombreux traitements visant à réduire la taille de l'infarctus, ont été déclarés comme efficaces chez l'animal mais se sont avérés décevants une fois arrivés chez l'homme (Bolli, Becker et al. 2004). Il en est de même pour le manque de reproductibilité d'un laboratoire à un autre. Ces échecs s'expliquent entre autres par le manque de rigueur dans la mise en place des études (absence de randomisation des animaux, de critères d'inclusion et d'exclusion préalablement définis ou encore un manque de précision dans la détermination de la taille de l'échantillon). C'est donc dans ces conditions d'échecs thérapeutiques répétés et suite à l'appel du Dr. Francis Collins, directeur du National Institutes of Health (NIH), qu'a vu le jour, en 2015, le consortium CAESAR (Jones, Tang et al. 2015). Son objectif est de proposer des protocoles accessibles, à l'ensemble de la communauté scientifique, qui permettent de vérifier de façon rigoureuse des thérapies prometteuses qui ont les meilleures chances de succès clinique.

L'impossibilité de transposer les résultats bénéfiques obtenus chez les animaux vers la clinique, avait déjà été souligné dès 2004 par l'équipe de Lathrop en se demandant si les modèles d'infarctus chez les souris étaient assez pertinents pour l'homme (Bolli, Becker et al. 2004). Plusieurs explications ont alors été avancées pour expliquer la disparité entre les résultats obtenus chez les animaux et chez les patients **Tableau 6**.

Caractéristiques	Modèles animaux	Etudes cliniques
Population	Groupe homogène d'animaux relativement jeunes et ne présentant aucune pathologie	Groupe hétérogène d'âge moyen et présentant des pathologies co-existantes (diabète, hypertension, dyslipidémie...)
Traitement	Aucun	Les patients peuvent être sous traitement pouvant influencer l'issue des analyses
Durée d'ischémie	Les animaux sont soumis à une même période d'ischémie	La plupart des patients présentent une ischémie dont la durée et la gravité varient d'un patient à un autre
Modèle d'infarctus	L'occlusion de l'artère coronaire se fait mécaniquement sur des artères saines	Chez la plupart des patients, l'occlusion de la coronaire est due à la formation d'un thrombus au site de rupture de plaque d'athérosclérose

Tableau 6. Présentations des différences majeures entre les modèles animaux et les patients présentant un infarctus du myocarde aiguë. (adapté d'après Yellon et Hausenloy 2007)

Fort de ce constat, nous avons ainsi essayé de nous mettre dans les meilleures conditions expérimentales. Néanmoins, bien que le modèle ait été standardisé au sein de notre laboratoire, plusieurs limites techniques sont à soulever. Comme par exemple, l'analyse de la taille de l'infarctus en utilisant la coloration au TTC puis l'analyse des images avec le logiciel ImageJ. En effet, la qualité des images reste très variable d'un cœur à un autre et est souvent médiocre en termes de contraste, ce qui rend difficile la délimitation des bords. Cela introduit un biais non négligeable au moment de l'analyse des différentes zones du myocarde, ce qui peut notamment entraîner un manque de précision et donc potentiellement des conclusions erronées. Afin d'éviter cela, une fois colorées au TTC, les tranches de cœur ont ensuite été plongées dans du PFA 4% sur la nuit à 4°C. Cette procédure améliore le contraste entre la couleur rouge/rose des tissus viables de l'AAR et le blanc des tissus morts de la zone nécrotique. Cependant, il est à noter qu'en cas d'incubation prolongée, la coloration rouge/rose du TTC peut blanchir et donc conduire à une surestimation de la zone nécrotique.

Au cours de ma thèse j'ai également appris à effectuer et analyser la fonction cardiaque des souris par échocardiographie, et utilisé cette technique d'imagerie pour d'autres études, notamment dans le cadre de l'insuffisance cardiaque (abstract présenté au Printemps de la cardiologie en Avril 2018).

Cette technique n'est cependant pas bien exploitable à J3 après une intervention car la fenêtre parasternale est limitée à cause de la lésion des tissus devant le cœur (côtes, muscles, peau).

II. Fonctions du CD31 à la phase aiguë des pathologies cardiovasculaires : une molécule d'adhérence, un co-récepteur trans-homophile ou un mécanorécepteur ?

II.1. Modulateur de la réponse macrophagique

Les macrophages sont des cellules immunitaires incroyables, aux effets pléiotropes. Ils sont capables d'intervenir dans des processus physiologiques variés comme l'élimination de stimuli nocifs pour l'organisme ou encore dans les processus de réparation (cicatrisation) suites à une lésion. De façon tout aussi efficace que leur fonction de phagocytose, les macrophages sont capables de produire des molécules immunitaires effectrices ainsi que les composants de la matrice extracellulaire. Cette plasticité phénotypique vient de leur capacité à s'adapter à leur micro-environnement. Ainsi dans des conditions pro-inflammatoires, ce micro-environnement favorise la polarisation des macrophages vers un phénotype inflammatoire M1, tandis que des conditions non inflammatoires renforcent la polarisation des macrophages vers un phénotype M2, qui exerce alors des fonctions pro-réparatrices. Cet équilibre, entre macrophages de type M1 et M2, est indispensable au maintien de l'homéostasie de l'organisme et est d'autant plus important dans des conditions pathologiques. En effet, au début du processus de cicatrisation des plaies, les monocytes/macrophages pro-inflammatoires de type M1 jouent un rôle essentiel dans la phase de destruction. Néanmoins, bien que cette phase soit nécessaire, elle doit être résorbée afin d'avoir une réparation tissulaire efficace et d'empêcher la mise en place d'une réponse inflammatoire délétère chronique.

Il a ainsi été démontré que les macrophages, provenant de souris déficientes en CD31 et soumis à une stimulation par le LPS (lipopolysaccharide impliquée dans la polarisation pro-M1), présentaient une activation de NFκB significativement supérieure, entraînant une production plus importante d'IL-6 et de TNFα (cytokines M1) (Rui, Liu et al. 2007). NFκB étant le principal facteur de transcription induisant la polarisation M1. D'autre part, les souris CD31 KO se sont révélées plus sensibles aux chocs septiques induites par les LPS que les souris WT, en raison de la production accrue d'IL-6 (Carrithers, Tandon et al. 2005). A l'inverse, il a été montré que l'activation de la voie de signalisation du CD31 inhibe la réponse des macrophages stimulés par le LPS. Cette absence de réponse passe notamment par l'inhibition de la voie NFκB (Rui, Liu et al. 2007). Ces résultats laissent donc supposer que le CD31 est capable d'exercer, physiologiquement, un rôle régulateur sur l'activité des macrophages.

Nos résultats montrent que les macrophages M1 s'accumulent régulièrement sur le site de lésion artérielle. Ceci a été démontré aussi bien dans les échantillons de patients ayant subi une réparation chirurgicale de l'aorte suite à une dissection que chez la souris ApoE où leur persistance est associée à un hématome intramural non résolu et à un dépôt de collagène défectueux au niveau de la paroi des aortes blessées (**Figure 1 G, H J et K, Annexe I et Figure 14** respectivement). Alors que les macrophages M1 sont jugés nécessaires pour éliminer les neutrophiles qui pénètrent dans les plaies dès les premières phases de la guérison (Mantovani, Biswas et al. 2013), il est nécessaire que ces macrophages changent de phénotype afin d'empêcher la prolongation de cette phase inflammatoire qui si elle persiste devient délétère.

Cette polarisation macrophagique semble être dépendante de la présence du CD31. En effet nos données suggèrent que l'absence de signalisation du CD31 potentialise et accentue le phénotype inflammatoire des macrophages lors de la polarisation M1, alors qu'elle atténue le phénotype M2 dans des conditions de polarisation M2 (**Figure 2, Annexe I**). D'autre part, en utilisant la stratégie inverse, nous avons démontré *in vitro* que le rétablissement de la voie de signalisation du CD31, par utilisation d'un peptide agoniste synthétique, favorisait la polarisation des macrophages vers un phénotype pro-réparateur M2 (**Figure 4, Annexe I**). De façon intéressante, l'administration du peptide, *in vivo*, chez des souris ApoE présentant une dissection aortique (14 jours après perfusion d'Angiotensine II) stabilise l'élargissement anévrysmal via une augmentation du dépôt de collagène (**Figure 5A à 5D et Figure 6, Annexe I**). L'analyse par cytométrie en flux des monocytes périphériques montre que pour un même nombre de globules blancs acquis (CD45+), l'administration du P8RI est associée à une diminution significative des monocytes circulants (CD11b+). Ce résultat s'explique par la diminution de la fraction principale qui correspond aux monocytes pro-inflammatoires (Ly6C+ CX3CR1-) qui initialement représente 90% de la population. Fait intéressant, la fraction de monocytes pro-réparateurs (Ly6C+ CXCR1+) est quant à elle augmentée chez les souris traitées au P8RI (**Figure 7, Annexe I**).

Ainsi, la signalisation CD31 peut moduler les fonctions des macrophages, à la fois directement et indirectement. En effet, alors que la perte génétique du CD31 augmente la polarisation des macrophages M1, le maintien de la signalisation du CD31 entraîne une augmentation de l'expression de l'Arginase-I (marqueur des macrophages M2). L'effet « curatif » obtenu chez les souris traitées au P8RI, alors que le traitement a débuté bien après l'apparition des signes de dissection, laisse penser qu'un tel effet protecteur de la signalisation CD31 dans la cicatrisation des plaies artérielles comprend plusieurs cibles moléculaires et cellulaires, autre que les macrophages. Cela implique probablement plusieurs facteurs qui affectent les résultats de la réparation tissulaire. Notamment, il a été mis en évidence que le traitement par le P8RI de

souris ApoE perfusées en Angiotensine II entraînait une réduction de la formation d'anévrisme de l'aorte abdominale mais aussi une réduction de la croissance de la plaque d'athérosclérose (Fornasa, Clement et al. 2012). Entre autres, ce résultat s'accompagnait d'une augmentation relative de lymphocytes Treg CD4+ dans le sang périphérique mais également d'une augmentation de macrophages M2 infiltrés dans les tissus. Cette augmentation des lymphocytes Treg CD4+ pourrait jouer un rôle bénéfique car ces derniers sont notamment impliqués dans le changement phénotypique des macrophages vers un phénotype pro-réparateur M2 (Shu, Qin et al. 2011). L'augmentation de ce pool périphérique de lymphocytes Treg CD4+ s'explique notamment par la restauration de la phosphorylation intracellulaire de SHP-2 par le P8RI. En effet, il a été démontré que la voie CD31-SHP2 était capable d'inhiber simultanément l'activation dépendante de la tyrosine kinase tout en favorisant la survie des lymphocytes T via la voie Erk / MAP kinase (Ma, Wang et al. 2010).

D'autre part, afin de compléter ces expériences, il serait intéressant de combiner le modèle de perfusion d'Angiotensine II et l'utilisation des souris ApoE KO croisées avec les CD31 KO afin d'étudier la réparation dans des conditions pathologiques requises par le modèle (pas de dissection chez les WT) et dans des conditions où la fonction du CD31 est invalidée. Les souris CD31 KO ont bien été utilisées dans ces expériences mais seulement pour les expériences *in vitro* pour étudier le comportement des macrophages issus des cellules de la moelle osseuse.

II.2. Régulation de l'agrégation cellulaire dans les microvaisseaux

Comme son nom l'indique PECAM-1 pour Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 ou encore le CD31 est une molécule d'adhérence. Initialement identifiée comme telle ce n'est qu'après la découverte de ses deux motifs ITIMs au niveau de sa queue cytoplasmique qu'il a ensuite été reclassé dans la famille des récepteurs immunomodulateurs (Newton, Buckley et al. 1997). De par sa nature trans-homophile et son expression exclusive et constitutive par les cellules endothéliales, les plaquettes et les leucocytes, le CD31 joue un rôle central dans l'homéostasie vasculaire (Newman and Newman 2003). Des études expérimentales ont montré l'importance de la signalisation du CD31 pour prévenir l'adhérence des leucocytes circulants (Brown, Heinisch et al. 2002), la survenue de maladies inflammatoires chroniques (Wong and Jackson 2004) ou encore la thrombose plaquettaire (Falati, Patil et al. 2006). D'autre part, les résultats obtenus au sein de notre laboratoire ont également contribué à la compréhension du rôle du CD31 en tant que co-récepteur immunomodulateur de la réponse immunitaire adaptative et/ou innée dans les pathologies inflammatoires chroniques (Groyer, Nicoletti et al. 2007, Fornasa, Clement et al. 2012, Clement, Fornasa et al. 2014). Récemment, notre laboratoire

a également mis en évidence un rôle potentiel du CD31 en tant que cible thérapeutique dans un modèle d'ischémie reperfusion mésentérique aiguë chez le rat. En effet, les résultats montrent un effet protecteur de l'administration préventive du P8RI. Son mécanisme d'action passe notamment par la protection de la muqueuse intestinale en diminuant la réponse neutrophilaire locale et systémique (Hoang, Nuzzo et al. 2018).

Au-delà des mécanismes impliquant la réponse immunitaire dans le processus de réparation du cœur après un infarctus, et bien que les résultats ne montrent pas de différence dans les AAR, d'autres hypothèses sont à envisager. L'une d'entre elles serait qu'en l'absence de CD31 le réseau de collatéral serait altéré. En effet, plusieurs articles font état de l'importance du réseau de collatéral dans l'issue de l'ischémie reperfusion myocardique. Il a clairement été démontré que le CD31 joue un rôle dans la régulation de l'intégrité de la jonction endothéliale, la migration transendothéliale ainsi que l'angiogenèse (Privratsky and Newman 2014). Ainsi il serait envisageable d'analyser par angiographie l'état des vaisseaux collatéraux chez les animaux CD31 KO. Cela pourrait, pas totalement, mais en parti expliquer le phénomène de *no-reflow*.

Malgré toutes les précautions qui ont été préalablement prises, une des limites du protocole est notamment la détermination de l'efficacité de la reperfusion capillaire. En effet, au moment de reperfuser les cœurs, le seul critère nous permettant d'affirmer la présence d'une reperfusion est la recoloration du cœur (passage de blanc à rose). Il ne s'agit donc que d'une analyse qui reste purement visuelle et qui peut être appréciée différemment en fonction des expérimentateurs. Qui plus est, au moment de cette procédure, seule une petite portion de la partie antérieure du cœur n'est visible et ne rend pas compte de la totalité du cœur. Ainsi, un système de suivi en temps réel des données physiologiques par télémétrie aurait été nécessaire. Ce système permet d'éviter toute erreur de jugement. Dans notre cas, on devrait plus parler de recanalisation plutôt que de reperfusion, car aucune analyse de flux n'a été réalisée.

Nous envisageons de croiser les souris lox CD31 avec des souris exprimant la Cre recombinase sous le promoteur d'un gène enrichi dans des cellules spécifiques afin d'étudier le rôle du CD31 spécifiquement dans les plaquettes et/ou les neutrophiles dans ce modèle, en sachant que les interactions neutrophiles-plaquettes sont récemment apparues comme essentielles pour maintenir l'homéostasie et limiter l'aggravation des lésions vasculaires liées à l'inflammation (Gros, Syvannarath et al. 2015).

II.3. Mécanoréception : une spécificité dans le système cardiovasculaire

Le rôle du CD31 en tant que molécule régulatrice spécifique des fonctions plaquettaires et leucocytaires, a largement été décrit (Jones, Garner et al. 2009, Marelli-Berg, Clement et al. 2013). En conditions pathologiques (états inflammatoires), les fonctions endothéliales du CD31 sont importantes notamment pour guider et limiter l'accumulation de leucocytes dans le tissu cible (Marelli-Berg, Clement et al. 2013). En plus de son rôle dans la régulation de l'extravasation des leucocytes, le CD31 est également important pour favoriser la réparation vasculaire, en permettant l'acquisition d'un phénotype cellulaire réparateur (Andreati, Syvannarath et al. 2018). Cependant, au-delà de ces fonctions bien connues, le CD31 a également été caractérisé comme mécanorécepteur au niveau des cellules endothéliales vasculaires. En effet, ces dernières sont idéalement positionnées pour servir de transducteurs, afin de relayer les modifications hémodynamiques et biochimiques en événements moléculaires vers les autres couches de la paroi vasculaire (Davies, Barbee et al. 1995). La surface des cellules endothéliales est constituée de nombreux mécanorécepteurs capables de détecter et de répondre aux contraintes de cisaillement (cavéoles, canaux ioniques, intégrines...). Ainsi, il a été identifié que le CD31 faisait parti d'un complexe mécanosensoriel capable de médier les réponses de la cellule endothéliale vasculaire face aux forces de cisaillement (Tzima, Irani-Tehrani et al. 2005).

Au niveau du cœur, les cellules endothéliales des capillaires se trouvent individuellement à proximité physique des cardiomyocytes. En effet, chaque cardiomyocyte est entouré d'un réseau dense de vaisseaux capillaires constitués de cellules endothéliales. Ces derniers sont amenés à communiquer les uns avec les autres, notamment via la sécrétion de facteurs (NO, neureguline-1 (NRG-1)). Des études ont montré un lien important entre une dysfonction des cellules endothéliales vasculaires et la survenue de cardiomyopathie dilatée (Roura, Planas et al. 2007). La cardiomyopathie dilatée se caractérise par une dilatation ainsi qu'une contraction altérée du cœur pouvant conduire jusqu'à l'insuffisance cardiaque. Cependant peu de résultats sont actuellement connus sur les voies de signalisation régulatrices de la communication entre les cellules endothéliales vasculaires et les cardiomyocytes. Une des voies de signalisation proposée est la voie NRG-1/ErbB2. En effet, une attention particulière a été portée sur cette voie de signalisation depuis que l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre ErbB2 (le trastuzumab) augmente le risque de développer une insuffisance cardiaque (Slamon, Leyland-Jones et al. 2001).

La Neureguline-1 (NRG-1) est un membre de la famille des facteurs de croissance épidermique (EGF) connu pour activer la prolifération, la différenciation et la survie de nombreux types de tissus. Dans le cœur, la NRG-1 est synthétisée et libérée par l'endothélium microvasculaire endocardique et cardiaque. Des études ont montré que la NRG-1 est essentielle

au développement du système cardiovasculaire et au maintien de la fonction cardiaque chez l'adulte (Odiete, Hill et al. 2012). Le stress physiologique, y compris le stress mécanique, est l'un des principaux déclencheurs de la ré-expression endothéliale de NRG-1 dans les microvaisseaux du cœur chez l'adulte atteint d'insuffisance cardiaque (Lemmens, Segers et al. 2006).

Le CD31 est une des glycoprotéines constitutives la plus abondante des cellules endothéliales. Il tapisse le système cardiovasculaire et forme la première ligne de contact cellulaire avec le sang. En s'associant à la plupart des récepteurs endothéliaux impliqués dans la mécanoperception, le CD31 régule ainsi la réponse aux stimuli biomécaniques. Des études récentes sur des souris CD31 KO ont notamment suggéré son rôle protecteur dans la prévention de l'insuffisance cardiaque (McCormick, Collins et al. 2015).

Ainsi, étant donné l'importance du dialogue entre les cellules endothéliales vasculaires et les cardiomyocytes dans la régulation de la fonction cardiaque et que la communication cellulaire dans la paroi vasculaire est perturbée en l'absence de CD31 (Bagi, Frangos et al. 2005, Chen and Tzima 2009), dans ce contexte, au cours de ma thèse, je me suis donc également intéressée à cette fonction peu connue et peu étudiée du CD31 qui est le « *mechanosensing* » ou la mécanoréception.

En utilisant des coeurs explantés de patients souffrants d'insuffisance cardiaque post-ischémique, nous avons évalué le lien présumé entre l'intégrité du CD31 et l'expression de NRG-1 par les cellules endothéliales microvasculaires cardiaques.

Pour cela, les zones myocardiques à distance du site de l'infarctus ont été microdissectées, fixées dans du paraformaldéhyde à 4% puis incluses en paraffine. La portion du CD31 intracellulaire (iCD31) et extracellulaire (eCD31), la NRG-1, le collagène IV (Coll IV) et collagène I (Coll I) ont été évalués sur des coupes en série de 6 donneurs différents par immunofluorescente et par analyse en microscopie confocale. Les cellules endothéliales microvasculaires ont été identifiées par leur lame basale (coloration positive au collagène IV). La présence de collagène interstitiel I a servi à identifier les zones de fibrose myocardique interstitielle (remodelage pathologique). Le CD31 intact dans les cellules endothéliales microvasculaires a été documenté par la co-expression à la fois de CD31 intracellulaire (iCD31) et extracellulaire (eCD31), tandis que le clivage du CD31 a été détecté par le marquage positif de la portion intracellulaire et le marquage négatif de la portion extracellulaire.

Nos résultats préliminaires montrent que les microvaisseaux (marquage collagène IV) positifs pour la NRG-1 et le CD31 étaient pratiquement absents dans les zones myocardiques faisant l'objet d'un remodelage pathologique, détecté par la présence de collagène I (fibrose). A l'inverse, ces vaisseaux étaient facilement détectés dans les zones dépourvues de fibrose. Fait

intéressant, le CD31 n'était pas absent dans les microvaisseaux n'exprimant pas la NRG-1, mais tronqué comme le montre le marquage de la portion intracellulaire du CD31.

Ainsi, nos résultats préliminaires laissent supposer que le clivage du CD31, compromet la fonction physiologique de ce mécanorécepteur, et pourrait, au moins en partie, expliquer l'absence de réexpression de NRG-1 sur les microvaisseaux, conduisant à une communication inappropriée entre l'endothélium et les cardiomyocytes dans l'insuffisance cardiaque post-ischémique humaine (abstract présenté à Vienne, FCVB 2018).

II.4. Les échecs thérapeutiques et les défis thérapeutiques actuels

La dissection aortique aiguë et l'hématome intramural (anévrisme disséquant) sont des pathologies potentiellement mortelles avec une mortalité de 50% dans les premières 48 heures. Lorsque l'aorte ascendante n'est pas impliquée, la prise en charge des patients est essentiellement palliative et vise à réduire autant que possible la pression artérielle systémique et la fréquence cardiaque, limitant ainsi la propagation du faux chenal et évitant les dommages aux organes cibles et le risque de rupture (Mussa, Horton et al. 2016). En raison de l'absence d'agents thérapeutiques spécifiques visant à favoriser la cicatrisation rapide des tissus, 25 à 30% des patients ont besoin d'une intervention chirurgicale ultérieure du fait d'une expansion anévrysmale, d'une dissection progressive ou encore d'autres complications provenant du processus de dissection qui n'a pas été résolu en amont (Lumsden and Reardon 2008). Fait intéressant, le taux d'événements récurrents est indépendant de la stratégie de traitement (chirurgie ouverte, réparation endovasculaire ou traitement antihypertenseur agressif) et se produit plus fréquemment chez les patients qui présentent des troubles du tissu conjonctif (Isselbacher, Bonaca et al. 2016), ce qui souligne l'importance d'une réponse appropriée de la matrice extracellulaire dans le processus de guérison et le pronostic à long terme.

Dans de nombreux cas d'ischémie reperfusion myocardique, mais pas pour tous, plus l'infarctus est petit, plus la zone de *no-reflow* le sera également. Il serait donc tentant de trouver une thérapie pouvant réduire la taille de l'infarctus. C'est le cas de nombreuses thérapies qui ont vu le jour et qui avaient pour objectif de réduire la taille de l'infarctus ou encore les dégâts liés à la reperfusion. Néanmoins il a été démontré que la taille de l'infarctus n'était pas associée aux effets néfastes du *no-reflow* (Ndrepepa, Mehilli et al. 2004, Bolognese 2010). Ainsi, il serait plus judicieux de trouver des thérapies qui permettent de réduire et/ou de prévenir le *no-reflow* (Niccoli, Kharbanda et al. 2010, Heusch 2016). Actuellement, aucune ligne directrice n'est

officiellement définie pour traiter le *no-reflow* et les traitements couramment utilisés dans la pratique clinique ne sont pas spécifiques au *no-reflow*.

L'état actuel de la littérature montre un intérêt grandissant pour le *no-reflow* laissant ainsi supposer qu'il pourrait être, à long terme, un événement pronostic et justifiant par la même occasion le besoin de trouver des nouvelles thérapies ciblant ce phénomène. En effet, alors que les études expérimentales chez les animaux ont montré un effet bénéfique de la déplétion neutrophilaire et plaquettaire ou encore des anticorps ciblant les molécules d'adhérence, les études cliniques utilisant quelques unes de ces approches thérapeutiques se sont révélées décevantes. Ces résultats négatifs soulignent la nécessité d'identifier les mécanismes exacts de ce phénomène mais aussi de nouvelles cibles susceptibles de le limiter voire de l'abolir.

Une explication pouvant justifier ces échecs, est le manque de rigueur dans l'élaboration des protocoles expérimentaux (taille de l'échantillon, critères d'inclusion et d'exclusion...). En effet, le besoin de standardiser les modèles animaux s'est révélé nécessaire alors qu'au cours des 40 dernières années de nombreux traitements visant à réduire la taille de l'infarctus, ont été déclarés comme efficaces chez l'animal mais se sont avérés décevants une fois arrivés chez l'homme (Bolli, Becker et al. 2004). C'est donc dans ces conditions d'échecs thérapeutiques répétés que le consortium CAESAR (Jones, Tang et al. 2015) voit le jour en 2015. Ce consortium vise à proposer des protocoles accessibles, à l'ensemble de la communauté scientifique, qui permettent de vérifier de façon rigoureuse des thérapies prometteuses qui ont les meilleures chances de succès clinique dans le cadre de la cardioprotection. Concernant les modèles de dissection aortique et comme montré dans le **Tableau 5**, plusieurs modèles existent dans la littérature. Un consortium à l'image de CAESAR pour la cardioprotection, n'existe pas à ce jour pour les modèles de dissection aortique. Néanmoins, il est de la responsabilité de chaque expérimentateur de s'assurer que le modèle utilisé convienne à l'hypothèse formulée et étudiée.

Dans le cas de l'ischémie reperfusion, les échecs des anti-neutrophiles ou anti-molécules d'adhérence viennent aussi du fait, que dans ces expériences menées *in vivo*, les temps d'étude étaient des temps relativement précoces/courts (30 minutes d'ischémie suivie de 24 heures voire seulement 120 minutes de reperfusion). Bien que les résultats menés chez la souris aient montré un bénéfice de ces thérapies (réduction de la taille de l'infarctus, diminution du recrutement des neutrophiles), ces résultats ne reflètent que les effets à court terme et ne tiennent pas compte du rôle nécessaire des neutrophiles dans la première phase de réparation tissulaire. Longtemps considéré comme délétères, en réalité, l'activation des neutrophiles doit être finement régulée (Horckmans, Ring et al. 2017). En effet, ces derniers favorisent notamment le recrutement des monocytes et permettent d'éliminer les débris au site de lésion

afin que la phase de cicatrisation se mette convenablement en place (Nahrendorf, Swirski et al. 2007). Ainsi en l'absence de neutrophiles, le recrutement de monocytes pro-inflammatoires est diminué et les fonctions de ces derniers ne peuvent être assurées par les macrophages résidents, qui manquent d'activité phagocytaire. Cette absence de cellules myéloïdes pro-inflammatoires entraîne alors une augmentation du nombre de myofibroblastes et du dépôt de collagène, ce qui entraîne un remodelage tissulaire inapproprié conduisant à terme à insuffisance cardiaque (Frodermann and Nahrendorf 2017).

Des expériences menées chez des souris rendues neutropéniques, de même que l'utilisation d'anticorps dirigés contre les épitopes du CD11/CD18 sur les leucocytes ou encore ciblant la P-sélectine de l'endothélium, montrent une amélioration de la reperfusion (Palazzo, Jones et al. 1998, Palazzo, Jones et al. 1998, Hoffmeyer, Scalia et al. 2000). Le rôle des plaquettes dans le *no-reflow* a également été démontré (Golino, Maroko et al. 1987, Xu, Huo et al. 2006). En formant des agrégats homotypiques (plaquettes-plaquettes) et hétérotypiques (plaquettes-leucocytes), les plaquettes contribueraient à l'occlusion des capillaires. D'autre part, il a été montré *in vivo* que l'utilisation d'un inhibiteur de la glycoprotéine GPIIb/IIIa (récepteur du fibrinogène et du facteur de von Willberand facilitant l'activation plaquettaire) améliore la perfusion (Kunichika, Ben-Yehuda et al. 2004). Cependant, de façon surprenante, les plaquettes ne semblent pas impliquées dans le modèle utilisé. En effet, les analyses histologiques ne montraient pas d'obstructions plaquettaires dans la microcirculation ni chez les animaux témoins, ni chez les animaux traités.

III. Le CD31 comme cible thérapeutique

Grâce à ses propriétés uniques de co-récepteurs trans-homophiles (Newton, Buckley et al. 1997), le CD31 peut orchestrer des réponses croisées provenant de stimuli aussi bien de nature biomécanique, que métabolique ou encore inflammatoire tout en ayant des effets spécifiques aux voies de signalisation associées et aux cellules qui l'engagent. Le CD31 se trouve donc au centre de différents dialogues intercellulaires survenant dans les suites des lésions tissulaires cardiovasculaires est pourrait donc constituer une cible unique, grâce à ses effets bénéfiques pléiotropes, sur l'ensemble du système cardiovasculaire.

Nos données suggèrent que de cibler la voie du CD31, avec un peptide agoniste synthétique, empêche non seulement l'installation d'une réponse inflammatoire chronique délétère, mais favorise également une réponse réparatrice. Ce peptide a déjà montré un rôle prometteur dans la limitation des dégâts liés à l'ischémie reperfusion mésentérique (Hoang, Nuzzo et al. 2018).

Le mécanisme d'action du peptide consiste notamment à favoriser le passage des macrophages pro-inflammatoires M1 vers un phénotype M2 pro-réparateur et à diminuer les concentrations de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-12p70 ou encore le TNF α . D'autre part, il est à noter que la concentration de cytokines pro-réparatrices, comme l'IL-10, augmente dans le surnageant des macrophages qui ont été polarisés en présence de P8RI (**Figure 4, Annexe I**). *In vivo*, les effets du peptide s'expliquent surtout par une augmentation du dépôt de collagène. Cette teneur en collagène étant associée à une prévention de l'élargissement anévrysmal (**Figure 5E, Annexe I**).

Conclusion générale

En conclusion, les données obtenues au cours de mon travail de thèse révèlent un rôle déterminant des fonctions régulatrices du CD31 dans l'issue des lésions tissulaires aiguës du système cardiovasculaire impliquant son action sur les cellules immunitaires innées ainsi que sur l'interaction entre cellules circulantes se trouvant à l'interface avec les cellules endothéliales, dans les zones malades.

Dans le cas de la dissection aortique, la fonction du CD31 est cruciale pour permettre la résorption rapide de l'hématome et la formation d'une cicatrice riche en collagène au niveau de la lésion artérielle permettant ainsi de prévenir l'évolution anévrysmale et le risque de rupture de l'aorte. Il en est de même dans le cas de l'infarctus du myocarde où l'efficacité des procédures de recanalisation va dépendre du rétablissement de la circulation microvasculaire. En l'absence du CD31, la réponse des plaquettes, des leucocytes, et de l'endothélium dans la microcirculation au niveau de l'infarctus est inappropriée et se traduit par un élargissement de la paroi myocardique morte à cause du phénomène de *no-reflow*.

Alors que la perte du CD31 favorise le développement de réponses pathologiques, de manière intéressante, nous montrons que l'utilisation d'un peptide agoniste synthétique et spécifique du CD31 capable de maintenir sa signalisation, permet de rétablir ses fonctions régulatrices lorsque ces dernières sont perdues lors d'une activation des cellules qui l'expriment.

Bibliographie

- Abdul-Hussien, H., R. Hanemaaijer, J. H. Verheijen, J. H. van Bockel, R. H. Geelkerken and J. H. Lindeman (2009). "Doxycycline therapy for abdominal aneurysm: Improved proteolytic balance through reduced neutrophil content." *J Vasc Surg* **49**(3): 741-749.
- Abela, C. B. and S. Homer-Vanniasinkham (2003). "Clinical implications of ischaemia-reperfusion injury." *Pathophysiology* **9**(4): 229-240.
- Albelda, S. M., W. A. Muller, C. A. Buck and P. J. Newman (1991). "Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule." *J Cell Biol* **114**(5): 1059-1068.
- Allen, D. G. and C. H. Orchard (1987). "Myocardial contractile function during ischemia and hypoxia." *Circ Res* **60**(2): 153-168.
- Andreatta, F., V. Syvannarath, M. Clement, S. Delbosc, K. Guedj, G. Fornasa, J. Khallou-Laschet, M. Morvan, G. Even, E. Procopio, A. T. Gaston, M. Le Borgne, L. Deschamps, A. Nicoletti and G. Caligiuri (2018). "Macrophage CD31 Signaling in Dissecting Aortic Aneurysm." *J Am Coll Cardiol* **72**(1): 45-57.
- Antoons, G. and K. R. Sipido (2008). "Targeting calcium handling in arrhythmias." *Europace* **10**(12): 1364-1369.
- Avkiran, M. and M. S. Marber (2002). "Na(+)/H(+) exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects." *J Am Coll Cardiol* **39**(5): 747-753.
- Bagi, Z., J. A. Frangos, J. C. Yeh, C. R. White, G. Kaley and A. Koller (2005). "PECAM-1 mediates NO-dependent dilation of arterioles to high temporal gradients of shear stress." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**(8): 1590-1595.
- Becker, L. C. and G. Ambrosio (1987). "Myocardial consequences of reperfusion." *Prog Cardiovasc Dis* **30**(1): 23-44.
- Bernier, M., A. S. Manning and D. J. Hearse (1989). "Reperfusion arrhythmias: dose-related protection by anti-free radical interventions." *Am J Physiol* **256**(5 Pt 2): H1344-1352.
- Bianchi, M. E. (2007). "DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger." *J Leukoc Biol* **81**(1): 1-5.
- Biswas, P., S. Canosa, D. Schoenfeld, J. Schoenfeld, P. Li, L. C. Cheas, J. Zhang, A. Cordova, B. Sumpio and J. A. Madri (2006). "PECAM-1 affects GSK-3beta-mediated beta-catenin phosphorylation and degradation." *Am J Pathol* **169**(1): 314-324.
- Bixel, M. G., H. Li, B. Petri, A. G. Khandoga, A. Khandoga, A. Zarbock, K. Wolburg-Buchholz, H. Wolburg, L. Sorokin, D. Zeuschner, S. Maerz, S. Butz, F. Krombach and D. Vestweber (2010). "CD99 and CD99L2 act at the same site as, but independently of, PECAM-1 during leukocyte diapedesis." *Blood* **116**(7): 1172-1184.
- Boekhoudt, G. H., M. R. Frazier-Jessen and G. M. Feldman (2007). "Immune complexes suppress IFN-gamma signaling by activation of the FcgammaRI pathway." *J Leukoc Biol* **81**(4): 1086-1092.
- Bolli, R., L. Becker, G. Gross, R. Mentzer, Jr., D. Balshaw, D. A. Lathrop and N. W. G. o. t. T. o. T. f. P. t. H. f. Ischemia (2004). "Myocardial protection at a crossroads: the need for translation into clinical therapy." *Circ Res* **95**(2): 125-134.
- Bolli, R. and E. Marban (1999). "Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning." *Physiol Rev* **79**(2): 609-634.
- Bolognese, L. (2010). "Changing patterns of ST elevation myocardial infarction epidemiology." *Am Heart J* **160**(6 Suppl): S1-3.
- Bolognese, L., N. Carrabba, G. Parodi, G. M. Santoro, P. Buonamici, G. Cerisano and D. Antoniucci (2004). "Impact of microvascular dysfunction on left ventricular remodeling and long-term clinical outcome after primary coronary angioplasty for acute myocardial infarction." *Circulation* **109**(9): 1121-1126.
- Boros, P. and J. S. Bromberg (2006). "New cellular and molecular immune pathways in ischemia/reperfusion injury." *Am J Transplant* **6**(4): 652-658.
- Borutaite, V., A. Jekabsone, R. Morkuniene and G. C. Brown (2003). "Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents mitochondrial dysfunction, cytochrome c release and apoptosis induced by heart ischemia." *J Mol Cell Cardiol* **35**(4): 357-366.

Braunwald, E. (1980). "Treatment of the patient after myocardial infarction. The last decade and the next." N Engl J Med **302**(5): 290-293.

Brown, S., I. Heinisch, E. Ross, K. Shaw, C. D. Buckley and J. Savill (2002). "Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment." Nature **418**(6894): 200-203.

Buja, L. M. (2005). "Myocardial ischemia and reperfusion injury." Cardiovasc Pathol **14**(4): 170-175.

Butler, M. J., W. Chan, A. J. Taylor, A. M. Dart and S. J. Duffy (2011). "Management of the no-reflow phenomenon." Pharmacol Ther **132**(1): 72-85.

Caligiuri, G. (2018). "The comeback of immunoregulatory receptors on memory and aging CD8+ T cells: The wisdom of youth." J Leukoc Biol **104**(5): 879-881.

Cao, M. Y., M. Huber, N. Beauchemin, J. Famiglietti, S. M. Albelda and A. Veillette (1998). "Regulation of mouse PECAM-1 tyrosine phosphorylation by the Src and Csk families of protein-tyrosine kinases." J Biol Chem **273**(25): 15765-15772.

Carrithers, M., S. Tandon, S. Canosa, M. Michaud, D. Graesser and J. A. Madri (2005). "Enhanced susceptibility to endotoxic shock and impaired STAT3 signaling in CD31-deficient mice." Am J Pathol **166**(1): 185-196.

Chen, Z. and E. Tzima (2009). "PECAM-1 is necessary for flow-induced vascular remodeling." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(7): 1067-1073.

Chen, B. and N. G. Frangogiannis (2016). "Macrophages in the Remodeling Failing Heart." Circ Res **119**(7): 776-778.

Chimini, G. (2002). "Apoptosis: repulsive encounters." Nature **418**(6894): 139-141.

Cicmil, M., J. M. Thomas, T. Sage, F. A. Barry, M. Leduc, C. Bon and J. M. Gibbins (2000). "Collagen, convulxin, and thrombin stimulate aggregation-independent tyrosine phosphorylation of CD31 in platelets. Evidence for the involvement of Src family kinases." J Biol Chem **275**(35): 27339-27347.

Clement, M., G. Fornasa, K. Guedj, S. Ben Mkaddem, A. T. Gaston, J. Khallou-Laschet, M. Morvan, A. Nicoletti and G. Caligiuri (2014). "CD31 is a key coinhibitory receptor in the development of immunogenic dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(12): E1101-1110.

Clouse, W. D., J. W. Hallett, Jr., H. V. Schaff, P. C. Spittell, C. M. Rowland, D. M. Ilstrup and L. J. Melton, 3rd (2004). "Acute aortic dissection: population-based incidence compared with degenerative aortic aneurysm rupture." Mayo Clin Proc **79**(2): 176-180.

Collins, C., C. Guilluy, C. Welch, E. T. O'Brien, K. Hahn, R. Superfine, K. Burrridge and E. Tzima (2012). "Localized tensional forces on PECAM-1 elicit a global mechanotransduction response via the integrin-RhoA pathway." Curr Biol **22**(22): 2087-2094.

Crompton, M., H. Ellinger and A. Costi (1988). "Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress." Biochem J **255**(1): 357-360.

Daugherty, A., M. W. Manning and L. A. Cassis (2000). "Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice." J Clin Invest **105**(11): 1605-1612.

Davies, P. F., K. A. Barbee, R. Lal, A. Robotewskyj and M. L. Griem (1995). "Hemodynamics and atherogenesis. Endothelial surface dynamics in flow signal transduction." Ann N Y Acad Sci **748**: 86-102; discussion 102-103.

DeBakey, M. E., E. S. Crawford, H. E. Garrett, A. C. Beall, Jr. and J. F. Howell (1965). "Surgical considerations in the treatment of aneurysms of the thoraco-abdominal aorta." Ann Surg **162**(4): 650-662.

Demeure, C. E., D. G. Byun, L. P. Yang, N. Vezzio and G. Delespesse (1996). "CD31 (PECAM-1) is a differentiation antigen lost during human CD4 T-cell maturation into Th1 or Th2 effector cells." Immunology **88**(1): 110-115.

Dixon, D. A. and D. H. Haynes (1990). "The calmodulin-activated form of the Ca²⁺-pumping ATPase of the cardiac sarcolemmal membrane produces Ca²⁺ gradients with a thermodynamic efficiency of 100%." J Bioenerg Biomembr **22**(2): 181-195.

- Driesen, R. B., J. Zalewski, N. Vanden Driessche, K. Vermeulen, J. Bogaert, K. R. Sipido, F. Van de Werf and P. Claus (2012). "Histological correlate of a cardiac magnetic resonance imaged microvascular obstruction in a porcine model of ischemia-reperfusion." Cardiovasc Pathol **21**(3): 129-131.
- Durham, C. A., R. P. Cambria, L. J. Wang, E. A. Ergul, N. J. Aranson, V. I. Patel and M. F. Conrad (2015). "The natural history of medically managed acute type B aortic dissection." J Vasc Surg **61**(5): 1192-1198.
- Durrer, J. D., K. I. Lie and F. J. van Capelle (1981). "Treatment of acute myocardial infarction with sodium nitroprusside during 24 hours, followed by isosorbide dinitrate." Acta Med Scand Suppl **651**: 163.
- Eefting, F., B. Rensing, J. Wigman, W. J. Pannekoek, W. M. Liu, M. J. Cramer, D. J. Lips and P. A. Doevendans (2004). "Role of apoptosis in reperfusion injury." Cardiovasc Res **61**(3): 414-426.
- Engler, R. L., G. W. Schmid-Schonbein and R. S. Pavelec (1983). "Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog." Am J Pathol **111**(1): 98-111.
- Erbel, R., V. Aboyans, C. Boileau, E. Bossone, R. Di Bartolomeo, H. Eggebrecht, A. Evangelista, V. Falk, H. Frank, O. Gaemperli, M. Grabenwoger, A. Haverich, B. Iung, A. J. Manolis, F. Meijboom, C. A. Nienaber, M. Roffi, H. Rousseau, U. Sechtem, P. A. Sirnes, R. S. von Allmen, C. J. Vrints and a Grupa Robocza Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego do spraw rozpoznawania i leczenia chorob (2014). "[2014 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of aortic diseases]." Kardiol Pol **72**(12): 1169-1252.
- Falati, S., S. Patil, P. L. Gross, M. Stapleton, G. Merrill-Skoloff, N. E. Barrett, K. L. Pixton, H. Weiler, B. Cooley, D. K. Newman, P. J. Newman, B. C. Furie, B. Furie and J. M. Gibbins (2006). "Platelet PECAM-1 inhibits thrombus formation in vivo." Blood **107**(2): 535-541.
- Fattori, R. (2008). "Endovascular treatment of aortic dissection: are we going into the right direction?" Eur J Vasc Endovasc Surg **36**(5): 520-521.
- Fattori, R., D. Montgomery, L. Lovato, S. Kische, M. Di Eusanio, H. Ince, K. A. Eagle, E. M. Isselbacher and C. A. Nienaber (2013). "Survival after endovascular therapy in patients with type B aortic dissection: a report from the International Registry of Acute Aortic Dissection (IRAD)." JACC Cardiovasc Interv **6**(8): 876-882.
- Fawcett, J., C. Buckley, C. L. Holness, I. N. Bird, J. H. Spragg, J. Saunders, A. Harris and D. L. Simmons (1995). "Mapping the homotypic binding sites in CD31 and the role of CD31 adhesion in the formation of interendothelial cell contacts." J Cell Biol **128**(6): 1229-1241.
- Ferrero, E., M. E. Ferrero, R. Pardi and M. R. Zocchi (1995). "The platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1) contributes to endothelial barrier function." FEBS Lett **374**(3): 323-326.
- Fleming, I., B. Fisslthaler, M. Dixit and R. Busse (2005). "Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells." J Cell Sci **118**(Pt 18): 4103-4111.
- Fornasa, G., M. Clement, E. Groyer, A. T. Gaston, J. Khallou-Laschet, M. Morvan, K. Guedj, S. V. Kaveri, A. Tedgui, J. B. Michel, A. Nicoletti and G. Caligiuri (2012). "A CD31-derived peptide prevents angiotensin II-induced atherosclerosis progression and aneurysm formation." Cardiovasc Res **94**(1): 30-37.
- Fornasa, G., E. Groyer, M. Clement, J. Dimitrov, C. Compain, A. T. Gaston, A. Varthaman, J. Khallou-Laschet, D. K. Newman, S. Graff-Dubois, A. Nicoletti and G. Caligiuri (2010). "TCR stimulation drives cleavage and shedding of the ITIM receptor CD31." J Immunol **184**(10): 5485-5492.
- Franck, G., G. Even, A. Gautier, M. Salinas, A. Loste, E. Procopio, A. T. Gaston, M. Morvan, S. Dupont, C. Deschildre, S. Berissi, J. Laschet, P. Nataf, A. Nicoletti, J. B. Michel and G. Caligiuri (2019). "Haemodynamic stress-induced breaches of the arterial intima trigger inflammation and drive atherogenesis." Eur Heart J **40**(11): 928-937.
- Frodermann, V. and M. Nahrendorf (2017). "Neutrophil-macrophage cross-talk in acute myocardial infarction." Eur Heart J **38**(3): 198-200.
- Gleissner, C. A. (2012). "Macrophage Phenotype Modulation by CXCL4 in Atherosclerosis." Front Physiol **3**: 1.

Golino, P., P. R. Maroko and T. E. Carew (1987). "Efficacy of platelet depletion in counteracting the detrimental effect of acute hypercholesterolemia on infarct size and the no-reflow phenomenon in rabbits undergoing coronary artery occlusion-reperfusion." Circulation **76**(1): 173-180.

Golledge, J. and K. A. Eagle (2008). "Acute aortic dissection." Lancet **372**(9632): 55-66.

Gore, I. (1952). "Pathogenesis of dissecting aneurysm of the aorta." AMA Arch Pathol **53**(2): 142-153.

Granger, D. N. and P. R. Kvietys (2015). "Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept." Redox Biol **6**: 524-551.

Grimm, M., C. Loewe, R. Gottardi, M. Funovics, D. Zimpfer, S. Rodler, M. Dorfmeister, M. Schoder, J. Lammer, S. Aharinejad and M. Czerny (2008). "Novel insights into the mechanisms and treatment of intramural hematoma affecting the entire thoracic aorta." Ann Thorac Surg **86**(2): 453-456.

Gros, A., V. Syvannarath, L. Lamrani, V. Ollivier, S. Loyau, T. Goerge, B. Nieswandt, M. Jandrot-Perrus and B. Ho-Tin-Noe (2015). "Single platelets seal neutrophil-induced vascular breaches via GPVI during immune-complex-mediated inflammation in mice." Blood **126**(8): 1017-1026.

Groyer, E., A. Nicoletti, H. Ait-Oufella, J. Khallou-Laschet, A. Varthaman, A. T. Gaston, O. Thauinat, S. V. Kaveri, R. Blatny, H. Stockinger, Z. Mallat and G. Caligiuri (2007). "Atheroprotective effect of CD31 receptor globulin through enrichment of circulating regulatory T-cells." J Am Coll Cardiol **50**(4): 344-350.

Gyorke, S. and C. Carnes (2008). "Dysregulated sarcoplasmic reticulum calcium release: potential pharmacological target in cardiac disease." Pharmacol Ther **119**(3): 340-354.

Hagan, P. G., C. A. Nienaber, E. M. Isselbacher, D. Bruckman, D. J. Karavite, P. L. Russman, A. Evangelista, R. Fattori, T. Suzuki, J. K. Oh, A. G. Moore, J. F. Malouf, L. A. Pape, C. Gaca, U. Sechtem, S. Lenferink, H. J. Deutsch, H. Diedrichs, J. Marcos y Robles, A. Llovet, D. Gilon, S. K. Das, W. F. Armstrong, G. M. Deeb and K. A. Eagle (2000). "The International Registry of Acute Aortic Dissection (IRAD): new insights into an old disease." JAMA **283**(7): 897-903.

Hale, S. L. and R. A. Kloner (2008). "The antianginal agent, ranolazine, reduces myocardial infarct size but does not alter anatomic no-reflow or regional myocardial blood flow in ischemia/reperfusion in the rabbit." J Cardiovasc Pharmacol Ther **13**(3): 226-232.

Harada, N., M. Masuda and K. Fujiwara (1995). "Fluid flow and osmotic stress induce tyrosine phosphorylation of an endothelial cell 128 kDa surface glycoprotein." Biochem Biophys Res Commun **214**(1): 69-74.

Harris, K. M., A. C. Braverman, K. A. Eagle, E. M. Woznicki, R. E. Pyeritz, T. Myrmel, M. D. Peterson, M. Voehringer, R. Fattori, J. L. Januzzi, D. Gilon, D. G. Montgomery, C. A. Nienaber, S. Trimarchi, E. M. Isselbacher and A. Evangelista (2012). "Acute aortic intramural hematoma: an analysis from the International Registry of Acute Aortic Dissection." Circulation **126**(11 Suppl 1): S91-96.

Haworth, R. A. and D. R. Hunter (1979). "The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site." Arch Biochem Biophys **195**(2): 460-467.

Hearse, D. J. and A. Tosaki (1987). "Reperfusion-induced arrhythmias and free radicals: studies in the rat heart with DMPO." J Cardiovasc Pharmacol **9**(6): 641-650.

Hellenthal, F. A., W. A. Buurman, W. K. Wodzig and G. W. Schurink (2009). "Biomarkers of AAA progression. Part 1: extracellular matrix degeneration." Nat Rev Cardiol **6**(7): 464-474.

Hellermann, J. P., S. J. Jacobsen, G. S. Reeder, F. Lopez-Jimenez, S. A. Weston and V. L. Roger (2003). "Heart failure after myocardial infarction: prevalence of preserved left ventricular systolic function in the community." Am Heart J **145**(4): 742-748.

Henshall, T. L., K. L. Jones, R. Wilkinson and D. E. Jackson (2001). "Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatases, SHP-1 and SHP-2, are required for platelet endothelial cell adhesion molecule-1/CD31-mediated inhibitory signaling." J Immunol **166**(5): 3098-3106.

Heusch, G. (2016). "Myocardial Ischemia: Lack of Coronary Blood Flow or Myocardial Oxygen Supply/Demand Imbalance?" Circ Res **119**(2): 194-196.

Hiratzka, L. F., G. L. Bakris, J. A. Beckman, R. M. Bersin, V. F. Carr, D. E. Casey, Jr., K. A. Eagle, L. K. Hermann, E. M. Isselbacher, E. A. Kazerooni, N. T. Kouchoukos, B. W. Lytle, D. M. Milewicz, D. L. Reich, S. Sen, J. A. Shinn, L. G. Svensson, D. M. Williams, F. American College of Cardiology, G. American Heart Association Task Force on Practice, S. American Association for Thoracic, R. American College of, A. American Stroke, A. Society of Cardiovascular, A. Society for Cardiovascular, Interventions, R. Society of Interventional, S. Society of Thoracic and M. Society for Vascular (2010). "2010 ACCF/AHA/AATS/ACR/ASA/SCA/SCAI/SIR/STS/SVM guidelines for the diagnosis and management of patients with thoracic aortic disease: executive summary. A report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, American Association for Thoracic Surgery, American College of Radiology, American Stroke Association, Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Interventional Radiology, Society of Thoracic Surgeons, and Society for Vascular Medicine." Catheter Cardiovasc Interv **76**(2): E43-86.

Hoang, Q. T., A. Nuzzo, L. Louedec, S. Delbosc, F. Andreato, J. Khallou-Laschet, M. Assadi, P. Montravers, D. Longrois, O. Corcos, G. Caligiuri, A. Nicoletti, J. B. Michel and A. Tran-Dinh (2018). "Peptide binding to cleaved CD31 dampens ischemia/reperfusion-induced intestinal injury." Intensive Care Med Exp **6**(1): 27.

Hoffmeyer, M. R., R. Scalia, C. R. Ross, S. P. Jones and D. J. Lefer (2000). "PR-39, a potent neutrophil inhibitor, attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **279**(6): H2824-2828.

Horckmans, M., L. Ring, J. Duchene, D. Santovito, M. J. Schloss, M. Drechsler, C. Weber, O. Soehnlein and S. Steffens (2017). "Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype." Eur Heart J **38**(3): 187-197.

Hotchkiss, R. S., A. Strasser, J. E. McDunn and P. E. Swanson (2009). "Cell death." N Engl J Med **361**(16): 1570-1583.

Howard, D. P., A. Banerjee, J. F. Fairhead, J. Perkins, L. E. Silver, P. M. Rothwell and S. Oxford Vascular (2013). "Population-based study of incidence and outcome of acute aortic dissection and premorbid risk factor control: 10-year results from the Oxford Vascular Study." Circulation **127**(20): 2031-2037.

Ilan, N., S. Mahooti, D. L. Rimm and J. A. Madri (1999). "PECAM-1 (CD31) functions as a reservoir for and a modulator of tyrosine-phosphorylated beta-catenin." J Cell Sci **112 Pt 18**: 3005-3014.

Ilan, N., A. Mohsenin, L. Cheung and J. A. Madri (2001). "PECAM-1 shedding during apoptosis generates a membrane-anchored truncated molecule with unique signaling characteristics." FASEB J **15**(2): 362-372.

Imahashi, K., C. Pott, J. I. Goldhaber, C. Steenbergen, K. D. Philipson and E. Murphy (2005). "Cardiac-specific ablation of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger confers protection against ischemia/reperfusion injury." Circ Res **97**(9): 916-921.

Isselbacher, E. M., M. P. Bonaca, M. Di Eusanio, J. Froehlich, E. Bassone, U. Sechtem, R. Pyeritz, H. Patel, A. Khojenezhad, H. H. Eckstein, G. Jondeau, F. Ramponi, M. Abbasi, D. Montgomery, C. A. Nienaber, K. Eagle, M. E. Lindsay and I. International Registry of Aortic Dissection (2016). "Recurrent Aortic Dissection: Observations From the International Registry of Aortic Dissection." Circulation **134**(14): 1013-1024.

Ito, H. (2006). "No-reflow phenomenon and prognosis in patients with acute myocardial infarction." Nat Clin Pract Cardiovasc Med **3**(9): 499-506.

Ito, H., T. Tomooka, N. Sakai, H. Yu, Y. Higashino, K. Fujii, T. Masuyama, A. Kitabatake and T. Minamino (1992). "Lack of myocardial perfusion immediately after successful thrombolysis. A predictor of poor recovery of left ventricular function in anterior myocardial infarction." Circulation **85**(5): 1699-1705.

Iwakura, K., H. Ito, N. Nishikawa, K. Hiraoka, K. Sugimoto, Y. Higashino, T. Masuyama, M. Hori, K. Fujii and T. Minamino (1999). "Early temporal changes in coronary flow velocity patterns in patients with acute myocardial infarction demonstrating the "no-reflow" phenomenon." Am J Cardiol **84**(4): 415-419.

Jahangir, E., L. Lipworth, T. L. Edwards, E. K. Kabagambe, M. T. Mumma, G. A. Mensah, S. Fazio, W. J. Blot and U. K. Sampson (2015). "Smoking, sex, risk factors and abdominal aortic aneurysms: a prospective study of 18 782 persons aged above 65 years in the Southern Community Cohort Study." *J Epidemiol Community Health* **69**(5): 481-488.

Januzzi, J. L., Jr., M. S. Sabatine, Y. Wan, S. J. Servoss, P. M. DiBattiste, I. Jang and P. Theroux (2003). "Interactions between age, outcome of acute coronary syndromes, and tirofiban therapy." *Am J Cardiol* **91**(4): 457-461.

Jones, C. I., S. F. Garner, L. A. Moraes, W. J. Kaiser, A. Rankin, C. Bloodomics, W. H. Ouwehand, A. H. Goodall and J. M. Gibbins (2009). "PECAM-1 expression and activity negatively regulate multiple platelet signaling pathways." *FEBS Lett* **583**(22): 3618-3624.

Jones, S. P., X. L. Tang, Y. Guo, C. Steenbergen, D. J. Lefer, R. C. Kukreja, M. Kong, Q. Li, S. Bhushan, X. Zhu, J. Du, Y. Nong, H. L. Stowers, K. Kondo, G. N. Hunt, T. T. Goodchild, A. Orr, C. C. Chang, R. Ockaili, F. N. Salloum and R. Bolli (2015). "The NHLBI-sponsored Consortium for preclinical assessment of cardioprotective therapies (CAESAR): a new paradigm for rigorous, accurate, and reproducible evaluation of putative infarct-sparing interventions in mice, rabbits, and pigs." *Circ Res* **116**(4): 572-586.

Kaminski, K. A., T. A. Bonda, J. Korecki and W. J. Musial (2002). "Oxidative stress and neutrophil activation--the two keystones of ischemia/reperfusion injury." *Int J Cardiol* **86**(1): 41-59.

Khallou-Laschet, J., A. Varthaman, G. Fornasa, C. Compain, A. T. Gaston, M. Clement, M. Dussiot, O. Levillain, S. Graff-Dubois, A. Nicoletti and G. Caligiuri (2010). "Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis." *PLoS One* **5**(1): e8852.

Kim, S. J., R. K. Kudej, A. Yatani, Y. K. Kim, G. Takagi, R. Honda, D. A. Colantonio, J. E. Van Eyk, D. E. Vatner, R. L. Rasmusson and S. F. Vatner (2001). "A novel mechanism for myocardial stunning involving impaired Ca(2+) handling." *Circ Res* **89**(9): 831-837.

Kloner, R. A. (2016). "Remote Ischemic Conditioning: Its Benefits and Limitations." *J Cardiovasc Pharmacol Ther* **21**(2): 219-221.

Kloner, R. A., C. E. Ganote and R. B. Jennings (1974). "The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog." *J Clin Invest* **54**(6): 1496-1508.

Koch, A. E., P. G. Robinson, J. A. Radosovich and R. M. Pope (1990). "Distribution of CD45RA and CD45RO T-lymphocyte subsets in rheumatoid arthritis synovial tissue." *J Clin Immunol* **10**(4): 192-199.

Kogaki, S., Y. Sawa, T. Sano, T. Matsushita, T. Ohata, S. Kurotobi, S. J. Tojo, H. Matsuda and S. Okada (1999). "Selectin on activated platelets enhances neutrophil endothelial adherence in myocardial reperfusion injury." *Cardiovasc Res* **43**(4): 968-973.

Kolk, M. V., D. Meyberg, T. Deuse, K. R. Tang-Quan, R. C. Robbins, H. Reichenspurner and S. Schrepfer (2009). "LAD-ligation: a murine model of myocardial infarction." *J Vis Exp*(32).

Kondo, S., E. A. Scheef, N. Sheibani and C. M. Sorenson (2007). "PECAM-1 isoform-specific regulation of kidney endothelial cell migration and capillary morphogenesis." *Am J Physiol Cell Physiol* **292**(6): C2070-2083.

Konstantinidis, K., R. S. Whelan and R. N. Kitsis (2012). "Mechanisms of cell death in heart disease." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**(7): 1552-1562.

Kubes, P., M. Suzuki and D. N. Granger (1991). "Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(11): 4651-4655.

Kunichika, H., O. Ben-Yehuda, S. Lafitte, N. Kunichika, B. Peters and A. N. DeMaria (2004). "Effects of glycoprotein IIb/IIIa inhibition on microvascular flow after coronary reperfusion. A quantitative myocardial contrast echocardiography study." *J Am Coll Cardiol* **43**(2): 276-283.

Kupatt, C., R. Wichels, J. Horstkotte, F. Krombach, H. Habazettl and P. Boekstegers (2002). "Molecular mechanisms of platelet-mediated leukocyte recruitment during myocardial reperfusion." *J Leukoc Biol* **72**(3): 455-461.

Lacolley, P., V. Regnault, A. Nicoletti, Z. Li and J. B. Michel (2012). "The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles." *Cardiovasc Res* **95**(2): 194-204.

- Landenhed, M., G. Engstrom, A. Gottsater, M. P. Caulfield, B. Hedblad, C. Newton-Cheh, O. Melander and J. G. Smith (2015). "Risk profiles for aortic dissection and ruptured or surgically treated aneurysms: a prospective cohort study." *J Am Heart Assoc* **4**(1): e001513.
- Lansman, S. L., C. Hagl, D. Fink, J. D. Galla, D. Spielvogel, M. A. Ergin and R. B. Griep (2002). "Acute type B aortic dissection: surgical therapy." *Ann Thorac Surg* **74**(5): S1833-1835; discussion S1857-1863.
- Lemmens, K., V. F. Segers, M. Demolder and G. W. De Keulenaer (2006). "Role of neuregulin-1/ErbB2 signaling in endothelium-cardiomyocyte cross-talk." *J Biol Chem* **281**(28): 19469-19477.
- Lertkiatmongkol, P., C. Paddock, D. K. Newman, J. Zhu, M. J. Thomas and P. J. Newman (2016). "The Role of Sialylated Glycans in Human Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (PECAM-1)-mediated Trans Homophilic Interactions and Endothelial Cell Barrier Function." *J Biol Chem* **291**(50): 26216-26225.
- Liu, H., X. Wu, N. Gang, S. Wang, W. Deng, L. Zan and S. Yu (2015). "Macrophage functional phenotype can be consecutively and reversibly shifted to adapt to microenvironmental changes." *Int J Clin Exp Med* **8**(2): 3044-3053.
- Liu, L. and G. P. Shi (2012). "CD31: beyond a marker for endothelial cells." *Cardiovasc Res* **94**(1): 3-5.
- Liu, S., Z. Xie, A. Daugherty, L. A. Cassis, K. J. Pearson, M. C. Gong and Z. Guo (2013). "Mineralocorticoid receptor agonists induce mouse aortic aneurysm formation and rupture in the presence of high salt." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**(7): 1568-1579.
- Liu, Z., Q. Wang, J. Ren, C. R. Assa, S. Morgan, J. Giles, Q. Han and B. Liu (2015). "Murine abdominal aortic aneurysm model by orthotopic allograft transplantation of elastase-treated abdominal aorta." *J Vasc Surg* **62**(6): 1607-1614 e1602.
- Lloyd-Jones, D. M. (2010). "Cardiovascular risk prediction: basic concepts, current status, and future directions." *Circulation* **121**(15): 1768-1777.
- Lu, H., D. A. Howatt, A. Balakrishnan, J. J. Moorleggen, D. L. Rateri, L. A. Cassis and A. Daugherty (2015). "Subcutaneous Angiotensin II Infusion using Osmotic Pumps Induces Aortic Aneurysms in Mice." *J Vis Exp*(103).
- Lu, T. T., M. Barreuther, S. Davis and J. A. Madri (1997). "Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 is phosphorylatable by c-Src, binds Src-Src homology 2 domain, and exhibits immunoreceptor tyrosine-based activation motif-like properties." *J Biol Chem* **272**(22): 14442-14446.
- Lumsden, A. B. and M. J. Reardon (2008). "Once dissected always dissected! Can stent grafts change the natural history of type B dissections?: a report from the International Registry of Acute Aortic Dissection." *JACC Cardiovasc Interv* **1**(4): 403-404.
- Ma, H., J. Wang, D. P. Thomas, C. Tong, L. Leng, W. Wang, M. Merk, S. Zierow, J. Bernhagen, J. Ren, R. Bucala and J. Li (2010). "Impaired macrophage migration inhibitory factor-AMP-activated protein kinase activation and ischemic recovery in the senescent heart." *Circulation* **122**(3): 282-292.
- Mallat, Z., A. Tedgui and D. Henrion (2016). "Role of Microvascular Tone and Extracellular Matrix Contraction in the Regulation of Interstitial Fluid: Implications for Aortic Dissection." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **36**(9): 1742-1747.
- Mantovani, A., S. K. Biswas, M. R. Galdiero, A. Sica and M. Locati (2013). "Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling." *J Pathol* **229**(2): 176-185.
- Mantovani, A., C. Garlanda and M. Locati (2009). "Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**(10): 1419-1423.
- Marelli-Berg, F. M., M. Clement, C. Mauro and G. Caligiuri (2013). "An immunologist's guide to CD31 function in T-cells." *J Cell Sci* **126**(Pt 11): 2343-2352.
- Maseri, A. (1991). "Coronary vasoconstriction: visible and invisible." *N Engl J Med* **325**(22): 1579-1580.
- McCormick, M. E., C. Collins, C. A. Makarewich, Z. Chen, M. Rojas, M. S. Willis, S. R. Houser and E. Tzima (2015). "Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 mediates endothelial-

cardiomyocyte communication and regulates cardiac function." *J Am Heart Assoc* **4**(1): e001210.

Mehta, R. H., P. T. O'Gara, E. Bossone, C. A. Nienaber, T. Myrmet, J. V. Cooper, D. E. Smith, W. F. Armstrong, E. M. Isselbacher, L. A. Pape, K. A. Eagle, D. Gilon and I. International Registry of Acute Aortic Dissection (2002). "Acute type A aortic dissection in the elderly: clinical characteristics, management, and outcomes in the current era." *J Am Coll Cardiol* **40**(4): 685-692.

Michel, J. B., O. Thaunat, X. Houard, O. Meilhac, G. Caligiuri and A. Nicoletti (2007). "Topological determinants and consequences of adventitial responses to arterial wall injury." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**(6): 1259-1268.

Mohr-Kahaly, S., R. Erbel, P. Kearney, M. Puth and J. Meyer (1994). "Aortic intramural hemorrhage visualized by transesophageal echocardiography: findings and prognostic implications." *J Am Coll Cardiol* **23**(3): 658-664.

Moris, D., M. Spartalis, E. Tzatzaki, E. Spartalis, G. S. Karachaliou, A. S. Triantafyllis, G. I. Karaolani, D. I. Tsilimigras and S. Theocharis (2017). "The role of reactive oxygen species in myocardial redox signaling and regulation." *Ann Transl Med* **5**(16): 324.

Muller, W. A., S. A. Weigl, X. Deng and D. M. Phillips (1993). "PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes." *J Exp Med* **178**(2): 449-460.

Mussa, F. F., J. D. Horton, R. Moridzadeh, J. Nicholson, S. Trimarchi and K. A. Eagle (2016). "Acute Aortic Dissection and Intramural Hematoma: A Systematic Review." *JAMA* **316**(7): 754-763.

Nahrendorf, M., F. K. Swirski, E. Aikawa, L. Stangenberg, T. Wurdinger, J. L. Figueiredo, P. Libby, R. Weissleder and M. J. Pittet (2007). "The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions." *J Exp Med* **204**(12): 3037-3047.

Ndrepepa, G., J. Mehilli, M. Schwaiger, H. Schühlen, S. Nekolla, S. Martinoff, C. Schmitt, J. Dirschinger, A. Schomig and A. Kastrati (2004). "Prognostic value of myocardial salvage achieved by reperfusion therapy in patients with acute myocardial infarction." *J Nucl Med* **45**(5): 725-729.

Ndrepepa, G., J. Mehilli, K. Tiroch, M. Fusaro, S. Kufner, J. Ellert, J. Goedel, A. Schomig and A. Kastrati (2010). "Myocardial perfusion grade, myocardial salvage indices and long-term mortality in patients with acute myocardial infarction and full restoration of epicardial blood flow after primary percutaneous coronary intervention." *Rev Esp Cardiol* **63**(7): 770-778.

Newman, D. K., C. Hamilton and P. J. Newman (2001). "Inhibition of antigen-receptor signaling by Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (CD31) requires functional ITIMs, SHP-2, and p56(lck)." *Blood* **97**(8): 2351-2357.

Newman, P. J. (1994). "The role of PECAM-1 in vascular cell biology." *Ann N Y Acad Sci* **714**: 165-174.

Newman, P. J. (1999). "Switched at birth: a new family for PECAM-1." *J Clin Invest* **103**(1): 5-9.

Newman, P. J., M. C. Berndt, J. Gorski, G. C. White, 2nd, S. Lyman, C. Paddock and W. A. Muller (1990). "PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily." *Science* **247**(4947): 1219-1222.

Newman, P. J. and D. K. Newman (2003). "Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**(6): 953-964.

Newton, J. P., C. D. Buckley, E. Y. Jones and D. L. Simmons (1997). "Residues on both faces of the first immunoglobulin fold contribute to homophilic binding sites of PECAM-1/CD31." *J Biol Chem* **272**(33): 20555-20563.

Newton-Nash, D. K. and P. J. Newman (1999). "A new role for platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31): inhibition of TCR-mediated signal transduction." *J Immunol* **163**(2): 682-688.

Niccoli, G., R. K. Kharbanda, F. Crea and A. P. Banning (2010). "No-reflow: again prevention is better than treatment." *Eur Heart J* **31**(20): 2449-2455.

- Nienaber, C. A. and J. T. Powell (2012). "Management of acute aortic syndromes." *Eur Heart J* **33**(1): 26-35b.
- Nijveldt, R., A. M. Beek, A. Hirsch, M. B. Hofman, V. A. Umans, P. R. Algra and A. C. van Rossum (2008). "'No-reflow' after acute myocardial infarction: direct visualisation of microvascular obstruction by gadolinium-enhanced CMR." *Neth Heart J* **16**(5): 179-181.
- Nishida, H., M. Tabata, T. Fukui, Y. Sato, H. Kin and S. Takanashi (2017). "A systematic approach to improve the outcomes of type A aortic dissection." *J Thorac Cardiovasc Surg* **154**(1): 89-96 e81.
- O'Gara, P. T. and R. W. DeSanctis (1995). "Acute aortic dissection and its variants. Toward a common diagnostic and therapeutic approach." *Circulation* **92**(6): 1376-1378.
- Odiete, O., M. F. Hill and D. B. Sawyer (2012). "Neuregulin in cardiovascular development and disease." *Circ Res* **111**(10): 1376-1385.
- Olsson, C., S. Thelin, E. Stahle, A. Ekbom and F. Granath (2006). "Thoracic aortic aneurysm and dissection: increasing prevalence and improved outcomes reported in a nationwide population-based study of more than 14,000 cases from 1987 to 2002." *Circulation* **114**(24): 2611-2618.
- Opie, L. H. (1990). "Myocardial ischemia--metabolic pathways and implications of increased glycolysis." *Cardiovasc Drugs Ther* **4 Suppl 4**: 777-790.
- Osawa, M., M. Masuda, N. Harada, R. B. Lopes and K. Fujiwara (1997). "Tyrosine phosphorylation of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) in mechanically stimulated vascular endothelial cells." *Eur J Cell Biol* **72**(3): 229-237.
- Owens, G. K., M. S. Kumar and B. R. Wamhoff (2004). "Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease." *Physiol Rev* **84**(3): 767-801.
- Paddock, C., D. Zhou, P. Lertkiatmongkol, P. J. Newman and J. Zhu (2016). "Structural basis for PECAM-1 homophilic binding." *Blood* **127**(8): 1052-1061.
- Palazzo, A. J., S. P. Jones, D. C. Anderson, D. N. Granger and D. J. Lefer (1998). "Coronary endothelial P-selectin in pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury." *Am J Physiol* **275**(5): H1865-1872.
- Palazzo, A. J., S. P. Jones, W. G. Girod, D. C. Anderson, D. N. Granger and D. J. Lefer (1998). "Myocardial ischemia-reperfusion injury in CD18- and ICAM-1-deficient mice." *Am J Physiol* **275**(6): H2300-2307.
- Park, K. H., C. Lim, J. H. Choi, K. Sung, K. Kim, Y. T. Lee and P. W. Park (2008). "Prevalence of aortic intimal defect in surgically treated acute type A intramural hematoma." *Ann Thorac Surg* **86**(5): 1494-1500.
- Pflederer, T., M. Marwan, T. Schepis, D. Ropers, M. Seltmann, G. Muschiol, W. G. Daniel and S. Achenbach (2010). "Characterization of culprit lesions in acute coronary syndromes using coronary dual-source CT angiography." *Atherosclerosis* **211**(2): 437-444.
- Pike, M. M., C. S. Luo, M. D. Clark, K. A. Kirk, M. Kitakaze, M. C. Madden, E. J. Cragoe, Jr. and G. M. Pohost (1993). "NMR measurements of Na⁺ and cellular energy in ischemic rat heart: role of Na⁽⁺⁾-H⁺ exchange." *Am J Physiol* **265**(6 Pt 2): H2017-2026.
- Prager, E., G. Staffler, O. Majdic, M. Saemann, S. Godar, G. Zlabinger and H. Stockinger (2001). "Induction of hyporesponsiveness and impaired T lymphocyte activation by the CD31 receptor:ligand pathway in T cells." *J Immunol* **166**(4): 2364-2371.
- Privratsky, J. R. and P. J. Newman (2014). "PECAM-1: regulator of endothelial junctional integrity." *Cell Tissue Res* **355**(3): 607-619.
- Pueyo, M. E., W. Gonzalez, A. Nicoletti, F. Savoie, J. F. Arnal and J. B. Michel (2000). "Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**(3): 645-651.
- Pumphrey, N. J., V. Taylor, S. Freeman, M. R. Douglas, P. F. Bradfield, S. P. Young, J. M. Lord, M. J. Wakelam, I. N. Bird, M. Salmon and C. D. Buckley (1999). "Differential association of cytoplasmic signalling molecules SHP-1, SHP-2, SHIP and phospholipase C-gamma1 with PECAM-1/CD31." *FEBS Lett* **450**(1-2): 77-83.

Rateri, D. L., D. A. Howatt, J. J. Moorleggen, R. Charnigo, L. A. Cassis and A. Daugherty (2011). "Prolonged infusion of angiotensin II in apoE(-/-) mice promotes macrophage recruitment with continued expansion of abdominal aortic aneurysm." *Am J Pathol* **179**(3): 1542-1548.

Rathore, V., M. A. Stapleton, C. A. Hillery, R. R. Montgomery, T. C. Nichols, E. P. Merricks, D. K. Newman and P. J. Newman (2003). "PECAM-1 negatively regulates GPIIb/IIIa signaling in murine platelets." *Blood* **102**(10): 3658-3664.

Ravetch, J. V. and L. L. Lanier (2000). "Immune inhibitory receptors." *Science* **290**(5489): 84-89.

Redel, A., V. Jazbutyte, T. M. Smul, M. Lange, T. Eckle, H. Eltzschig, N. Roewer and F. Kehl (2008). "Impact of ischemia and reperfusion times on myocardial infarct size in mice in vivo." *Exp Biol Med (Maywood)* **233**(1): 84-93.

Reffellmann, T. and R. A. Kloner (2006). "The no-reflow phenomenon: A basic mechanism of myocardial ischemia and reperfusion." *Basic Res Cardiol* **101**(5): 359-372.

Reimer, K. A. and R. B. Jennings (1979). "The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow." *Lab Invest* **40**(6): 633-644.

Reimer, K. A., J. E. Lowe, M. M. Rasmussen and R. B. Jennings (1977). "The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs." *Circulation* **56**(5): 786-794.

Robbins, C. S., I. Hilgendorf, G. F. Weber, I. Theurl, Y. Iwamoto, J. L. Figueiredo, R. Gorbatov, G. K. Sukhova, L. M. Gerhardt, D. Smyth, C. C. Zavitz, E. A. Shikani, M. Parsons, N. van Rooijen, H. Y. Lin, M. Husain, P. Libby, M. Nahrendorf, R. Weissleder and F. K. Swirski (2013). "Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis." *Nat Med* **19**(9): 1166-1172.

Roura, S., F. Planas, C. Prat-Vidal, R. Leta, C. Soler-Botija, F. Carreras, A. Llach, L. Hove-Madsen, G. Pons Llado, J. Farre, J. Cinca and A. Bayes-Genis (2007). "Idiopathic dilated cardiomyopathy exhibits defective vascularization and vessel formation." *Eur J Heart Fail* **9**(10): 995-1002.

Rui, Y., X. Liu, N. Li, Y. Jiang, G. Chen, X. Cao and J. Wang (2007). "PECAM-1 ligation negatively regulates TLR4 signaling in macrophages." *J Immunol* **179**(11): 7344-7351.

Saraff, K., F. Babamusta, L. A. Cassis and A. Daugherty (2003). "Aortic dissection precedes formation of aneurysms and atherosclerosis in angiotensin II-infused, apolipoprotein E-deficient mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**(9): 1621-1626.

Schaper, J. and W. Schaper (1983). "Reperfusion of ischemic myocardium: ultrastructural and histochemical aspects." *J Am Coll Cardiol* **1**(4): 1037-1046.

Schenkel, A. R., T. W. Chew and W. A. Muller (2004). "Platelet endothelial cell adhesion molecule deficiency or blockade significantly reduces leukocyte emigration in a majority of mouse strains." *J Immunol* **173**(10): 6403-6408.

Schwartz, B. G. and R. A. Kloner (2012). "Coronary no reflow." *J Mol Cell Cardiol* **52**(4): 873-882.

Shu, P., J. Qin, X. Y. Qin, Y. H. Sun, Z. B. Shen, Y. N. Wang and J. L. Liu (2011). "[Expression and prognostic value of M2 macrophages and regulatory T cells in gastric carcinoma tissue]." *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* **14**(5): 368-371.

Sindrilaru, A., T. Peters, S. Wieschalka, C. Baican, A. Baican, H. Peter, A. Hainzl, S. Schatz, Y. Qi, A. Schlecht, J. M. Weiss, M. Wlaschek, C. Sunderkotter and K. Scharffetter-Kochanek (2011). "An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice." *J Clin Invest* **121**(3): 985-997.

Skyschally, A., G. Amanakis, M. Neuhauser, P. Kleinbongard and G. Heusch (2017). "Impact of electrical defibrillation on infarct size and no-reflow in pigs subjected to myocardial ischemia-reperfusion without and with ischemic conditioning." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **313**(5): H871-H878.

Slamon, D. J., B. Leyland-Jones, S. Shak, H. Fuchs, V. Paton, A. Bajamonde, T. Fleming, W. Eiermann, J. Wolter, M. Pegram, J. Baselga and L. Norton (2001). "Use of chemotherapy plus a

monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2." N Engl J Med **344**(11): 783-792.

Stockinger, H., S. J. Gadd, R. Eher, O. Majdic, W. Schreiber, W. Kasinrerker, B. Strass, E. Schnabl and W. Knapp (1990). "Molecular characterization and functional analysis of the leukocyte surface protein CD31." J Immunol **145**(11): 3889-3897.

Stockinger, H., W. Schreiber, O. Majdic, W. Holter, D. Maurer and W. Knapp (1992). "Phenotype of human T cells expressing CD31, a molecule of the immunoglobulin supergene family." Immunology **75**(1): 53-58.

Sun, H. Y., N. P. Wang, F. Kerendi, M. Halkos, H. Kin, R. A. Guyton, J. Vinten-Johansen and Z. Q. Zhao (2005). "Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺ overload." Am J Physiol Heart Circ Physiol **288**(4): H1900-1908.

Sun, J., J. Williams, H. C. Yan, K. M. Amin, S. M. Albelda and H. M. DeLisser (1996). "Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) homophilic adhesion is mediated by immunoglobulin-like domains 1 and 2 and depends on the cytoplasmic domain and the level of surface expression." J Biol Chem **271**(31): 18561-18570.

Takagi, H., Y. Matsui and J. Sadoshima (2007). "The role of autophagy in mediating cell survival and death during ischemia and reperfusion in the heart." Antioxid Redox Signal **9**(9): 1373-1381.

Tani, M. and J. R. Neely (1989). "Role of intracellular Na⁺ in Ca²⁺ overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H⁺-Na⁺ and Na⁺-Ca²⁺ exchange." Circ Res **65**(4): 1045-1056.

Tarnavski, O. (2009). "Mouse surgical models in cardiovascular research." Methods Mol Biol **573**: 115-137.

Tas, S. W., L. B. Klickstein, S. F. Barbashov and A. Nicholson-Weller (1999). "C1q and C4b bind simultaneously to CR1 and additively support erythrocyte adhesion." J Immunol **163**(9): 5056-5063.

Thompson, R. D., K. E. Noble, K. Y. Larbi, A. Dewar, G. S. Duncan, T. W. Mak and S. Nourshargh (2001). "Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1)-deficient mice demonstrate a transient and cytokine-specific role for PECAM-1 in leukocyte migration through the perivascular basement membrane." Blood **97**(6): 1854-1860.

Timmers, L., G. Pasterkamp, V. C. de Hoog, F. Arslan, Y. Appelman and D. P. de Kleijn (2012). "The innate immune response in reperfused myocardium." Cardiovasc Res **94**(2): 276-283.

Trachet, B., L. Aslanidou, A. Piersigilli, R. A. Fraga-Silva, J. Sordet-Dessimoz, P. Villanueva-Perez, M. F. M. Stampanoni, N. Stergiopoulos and P. Segers (2017). "Angiotensin II infusion into ApoE^{-/-} mice: a model for aortic dissection rather than abdominal aortic aneurysm?" Cardiovasc Res **113**(10): 1230-1242.

Trachet, B., R. A. Fraga-Silva, A. Piersigilli, A. Tedgui, J. Sordet-Dessimoz, A. Astolfo, C. Van der Donckt, P. Modregger, M. F. Stampanoni, P. Segers and N. Stergiopoulos (2015). "Dissecting abdominal aortic aneurysm in Ang II-infused mice: suprarenal branch ruptures and apparent luminal dilatation." Cardiovasc Res **105**(2): 213-222.

Trachet, B., A. Piersigilli, R. A. Fraga-Silva, L. Aslanidou, J. Sordet-Dessimoz, A. Astolfo, M. F. Stampanoni, P. Segers and N. Stergiopoulos (2016). "Ascending Aortic Aneurysm in Angiotensin II-Infused Mice: Formation, Progression, and the Role of Focal Dissections." Arterioscler Thromb Vasc Biol **36**(4): 673-681.

Tsai, T. T., C. A. Nienaber and K. A. Eagle (2005). "Acute aortic syndromes." Circulation **112**(24): 3802-3813.

Tugyi, R., K. Uray, D. Ivan, E. Fellingner, A. Perkins and F. Hudecz (2005). "Partial D-amino acid substitution: Improved enzymatic stability and preserved Ab recognition of a MUC2 epitope peptide." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(2): 413-418.

Tzima, E., M. Irani-Tehrani, W. B. Kiosses, E. Dejana, D. A. Schultz, B. Engelhardt, G. Cao, H. DeLisser and M. A. Schwartz (2005). "A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress." Nature **437**(7057): 426-431.

- Uchida, K., K. Imoto, N. Karube, T. Minami, T. Cho, M. Goda, S. Suzuki and M. Masuda (2013). "Intramural haematoma should be referred to as thrombosed-type aortic dissection." Eur J Cardiothorac Surg **44**(2): 366-369; discussion 369.
- Vanderklisch, P. W. and B. A. Bahr (2000). "The pathogenic activation of calpain: a marker and mediator of cellular toxicity and disease states." Int J Exp Pathol **81**(5): 323-339.
- Vilacosta, I., J. A. Castillo, V. Peral, E. Batlle, M. J. Rollan and L. Sanchez-Harguindey (1995). "Intramural aortic haematoma following intra-aortic balloon counterpulsation. Documentation by transoesophageal echocardiography." Eur Heart J **16**(12): 2015-2016.
- Vilacosta, I., J. A. San Roman and V. Roca (1990). "Eustachian valve endocarditis." Br Heart J **64**(5): 340-341.
- Vinten-Johansen, J. (2004). "Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury." Cardiovasc Res **61**(3): 481-497.
- Wagenseil, J. E. and R. P. Mecham (2009). "Vascular extracellular matrix and arterial mechanics." Physiol Rev **89**(3): 957-989.
- Wheat, M. W., Jr. (1987). "Acute dissection of the aorta." Cardiovasc Clin **17**(3): 241-262.
- Wilkinson, R., A. B. Lyons, D. Roberts, M. X. Wong, P. A. Bartley and D. E. Jackson (2002). "Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) acts as a regulator of B-cell development, B-cell antigen receptor (BCR)-mediated activation, and autoimmune disease." Blood **100**(1): 184-193.
- Wilson, L. D. and D. S. Rosenbaum (2007). "Mechanisms of arrhythmogenic cardiac alternans." Europace **9 Suppl 6**: vi77-82.
- Wong, M. X., S. N. Harbour, J. L. Wee, L. M. Lau, R. K. Andrews and D. E. Jackson (2004). "Proteolytic cleavage of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) is regulated by a calmodulin-binding motif." FEBS Lett **568**(1-3): 70-78.
- Wong, M. X. and D. E. Jackson (2004). "Regulation of B cell activation by PECAM-1: implications for the development of autoimmune disorders." Curr Pharm Des **10**(2): 155-161.
- Wu, Y., P. Stabach, M. Michaud and J. A. Madri (2005). "Neutrophils lacking platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 exhibit loss of directionality and motility in CXCR2-mediated chemotaxis." J Immunol **175**(6): 3484-3491.
- Xie, Y. and W. A. Muller (1993). "Molecular cloning and adhesive properties of murine platelet/endothelial cell adhesion molecule 1." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(12): 5569-5573.
- Xu, Y., Y. Huo, M. C. Toufektsian, S. I. Ramos, Y. Ma, A. D. Tejani, B. A. French and Z. Yang (2006). "Activated platelets contribute importantly to myocardial reperfusion injury." Am J Physiol Heart Circ Physiol **290**(2): H692-699.
- Xu, Z., J. Alloush, E. Beck and N. Weisleder (2014). "A murine model of myocardial ischemia-reperfusion injury through ligation of the left anterior descending artery." J Vis Exp(86).
- Yellon, D. M. and D. J. Hausenloy (2007). "Myocardial reperfusion injury." N Engl J Med **357**(11): 1121-1135.
- Zehnder, J. L., M. Shatsky, L. L. Leung, E. C. Butcher, J. L. McGregor and L. J. Levitt (1995). "Involvement of CD31 in lymphocyte-mediated immune responses: importance of the membrane-proximal immunoglobulin domain and identification of an inhibiting CD31 peptide." Blood **85**(5): 1282-1288.
- Zhou, M., P. Wang and I. H. Chaudry (1997). "Endothelial nitric oxide synthase is downregulated during hyperdynamic sepsis." Biochim Biophys Acta **1335**(1-2): 182-190.
- Zima, A. V. and L. A. Blatter (2006). "Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters." Cardiovasc Res **71**(2): 310-321.

Annexes

Macrophage CD31 Signaling in Dissecting Aortic Aneurysm



Francesco Andreato, PhD,^{3,*} Varouna Syvannarath, MSc,^{3,*} Marc Clement, PhD,^{3,*} Sandrine Delbosc, PhD,^{3,*} Kevin Guedj, PhD,³ Giulia Fornasa, PhD,³ Jamila Khallou-Laschet, PhD,³ Marion Morvan, BSc,³ Guillaume Even, BSc,³ Emanuele Procopio, MSc,³ Anh-Thu Gaston, BSc,³ Marie Le Borgne, PhD,³ Lydia Deschamps, MD, PhD,^b Antonino Nicoletti, PhD,^a Giuseppina Caligiuri, MD, PhD^{a,c}

ABSTRACT

BACKGROUND The authors recently found that a CD31 agonist peptide reaches macrophages in injured aortas and exerts beneficial effects on apolipoprotein E-knockout (Apo E^{-/-}) mice subjected to angiotensin (Ang) II infusion, a model of experimental acute aortic dissection and intramural hematoma (ADIM).

OBJECTIVES The purpose of this study was to evaluate the therapeutic potential of a drug-suitable agonist peptide in experimental ADIM.

METHODS P8RI, a retro-inverso sequence of the best candidate identified by functional in vitro screening of a peptide library, passed an absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicology analysis. Apo E^{-/-} mice (male, 28-week-old) implanted with Ang II-releasing pumps received P8RI (2.5 mg/kg/day) or vehicle from day 14 (n = 10/group). Leukocytes were analyzed by flow cytometry. Healing features of human and mouse dissected aortic segments were assessed by histology and immunofluorescence. The effect of CD31 on macrophages was evaluated using cells from CD31^{-/-} mice and P8RI, in vitro.

RESULTS Human and experimental ADIM were characterized by the infiltration of proinflammatory macrophages. The absence of CD31 enhanced the proinflammatory polarization of macrophages, whereas the CD31 agonist P8RI favored reparative macrophages both in vitro and in vivo. The administration of P8RI after the occurrence of ADIM prevented aneurysmal transformation by promoting the resolution of intramural hematoma and the production of collagen in dissected aortas in vivo, associated with enrichment of M2 macrophages at the site of injury.

CONCLUSIONS CD31 signaling promotes the switching of proinflammatory macrophages to the reparative phenotype and favors the healing of experimental dissected aortas. Treatment with a drug-suitable CD31 agonist may facilitate the clinical management of ADIM. (J Am Coll Cardiol 2018;72:45-57) © 2018 by the American College of Cardiology Foundation.

Acute aortic dissection and intramural hematoma (ADIM) (dissecting aneurysm) is a life-threatening disease with a mortality of 50% within the first 48 h. In the absence of involvement of the ascending aorta, the clinical management is essentially palliative and is directed at reducing the systemic blood pressure and heart rate as much as possible, which limits the propagation of the false



Listen to this manuscript's audio summary by JACC Editor-in-Chief Dr. Valentin Fuster.



From the ^aINSERM U1148, DHU FIRE, Université Paris Diderot, PRES Sorbonne Paris Cité, Paris, France; ^bAssistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bichat, Département de Pathologie, Paris, France; and the ^cAssistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bichat, Service de Cardiologie et de Physiologie, Paris, France. *Drs. Andreato, Syvannarath, Clement, and Delbosc contributed equally to this work and are joint first authors. This study was funded in part by grants from the French National Research Agency (ANR-08-EBIO-04 "BROSCI"; ANR-14-CE17-0014 "IMPLANTS"; DS0404-16-RHUS-00010 "IVASC"), "Fondation de France" (FDF 2008-002724), Fondation pour la Recherche Médicale (DBS2014090764), Fondation de l'Avenir, Inserm-Transfert [CoPOC 2013 and 2014], European Commission (FP7-HEALTH-2013-INNOVATION- 603131 "VIA"), Bruxelles, Belgium. Dr. Syvannarath is the recipient of a doctoral grant "CIFRE" (Convention industrielle de formation par la recherche) from the French National Research and Technology association (ANRT) and funded by the Institut de Recherche Servier ("Avenant 1" of the collaborative research agreement with Inserm-Transfert, N° 140830/12026B10), Paris, France. Drs. Andreato and Clement were the recipients of a doctoral grant from the Region Ile de France (CORDDIM). All authors have reported that they have no relationships relevant to the contents of this paper to disclose.

Manuscript received March 23, 2018; accepted April 12, 2018.

ISSN 0735-1097/\$36.00

<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.04.047>

ABBREVIATIONS AND ACRONYMS

ADIM = acute aortic dissection and intramural hematoma

Ang II = angiotensin II

Apo E^{-/-} = apolipoprotein E knockout

BMDM = bone marrow-derived macrophage

IL = interleukin

iNOS = inducible nitric oxide synthase

US = ultrasound

lumen and prevents end-organ damage and risk of rupture (1).

Due to the lack of specific therapeutic agents aimed at favoring rapid tissue healing, 25% to 30% of ADIM patients require subsequent intervention because of aneurysmal expansion, progressive dissection, and other complications from the unresolved dissection process (2). Interestingly, the rate of recurrent events is independent of the treatment strategy (open surgery, endovascular repair, or aggressive antihypertensive treatment) and occurs more frequently in patients affected by connective tissue disorders (3), highlighting the importance of an appropriate extracellular matrix response for the healing process and long-term prognosis.

SEE PAGE 58

The outcomes of tissue healing after an acute injury essentially depend on the resolution of the initial inflammatory phase, and macrophages play a crucial role in this process. Immediately after entering the wound site, circulating monocytes contribute to the demolition phase of wound healing by acquiring a proinflammatory phenotype; however, for appropriate tissue healing, the monocytes must exert fundamental functions including the acquisition of a reparative phenotype (4). Importantly, the wound healing process may be consistently delayed and can even remain unachieved in the presence of blood-derived elements, as in the case of dissected aortas, which prevent the macrophages from switching from the proinflammatory to the reparative phase (5).

In this work, we sought to assess the role of CD31, an immunoregulatory receptor, in macrophage polarization and ADIM outcome in apolipoprotein E-knockout (Apo E^{-/-}) mice subjected to chronic angiotensin (Ang) II infusion, an experimental model of ADIM (6).

METHODS

IDENTIFICATION OF A DRUG-SUITABLE CD31 AGONIST PEPTIDE. The drug-suitable CD31 agonist used in this study was selected from 2 peptide libraries, as detailed in [Online Table 1](#).

The absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicology analysis was performed on the retro-inverso sequence of the best candidate, termed P8RI, and included the measurement of potassium currents mediated by the human ether-a-go-go-related gene channel; bacterial reverse mutation test; blood half-life (pharmacokinetic studies) after

intravenous, oral, and subcutaneous administration in C57BL/6 mice; and in vivo toxicity evaluated during a 14-day subcutaneous dose-range study in C57BL/6 mice, as detailed in [Online Appendix 1](#).

ANALYSIS OF MOUSE MACROPHAGE POLARIZATION IN VITRO. Bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were prepared and analyzed as described in [Online Appendix 1](#) from the femurs of 10-week-old male CD31^{+/+} and CD31^{-/-} (7) mice derived in our animal facility by breeding CD31^{+/-} mice (C57BL/6 background), which were generously provided by Dr. Debra K. Newman (Blood Center of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin).

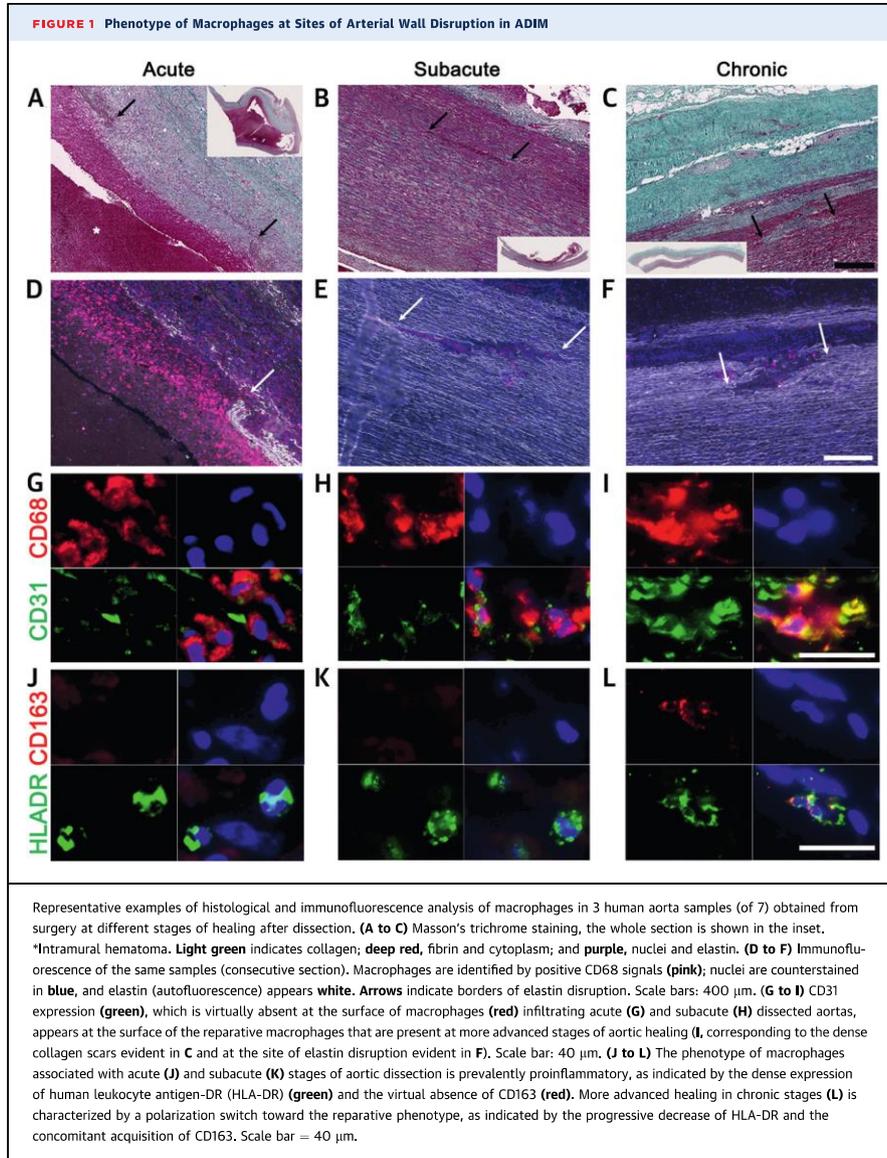
ANG II INFUSION IN APO E^{-/-} MICE. Twenty-eight-week-old male Apo E^{-/-} mice (B6.129P2-ApoEtm1Unc/Crl, Charles River Laboratories, Saint Germain Nuelles, France) were maintained on a regular chow diet under standard conditions. Ang II (#A9525, 1 mg/kg/day, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) was continuously infused into the experimental mice via osmotic pumps (Model 2004, Alzet, Charles River Laboratories). All investigations conformed to the Directive 2010/63/EU of the European Parliament, and the local animal ethics committee (Comité d'éthique Bichat-Debré) granted formal approval.

ULTRASOUND IMAGING, HISTOLOGY, IMMUNO-FLUORESCENCE, AND FLOW CYTOMETRY. Ultrasound imaging (US) was used to monitor aortic diameter changes over time and heart function in experimental mice. Microscopy and flow cytometry analyses were performed as detailed in [Online Appendix 1](#).

STATISTICAL METHODS. The results are expressed as mean ± SEM. The differences among groups were evaluated by 1-way analysis of variance with Fisher post hoc tests or by Mann-Whitney nonparametric tests, as appropriate. Any differences between groups were considered to be significant when p values were <0.05. All analyses were performed with JMP 6.0 Software (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina).

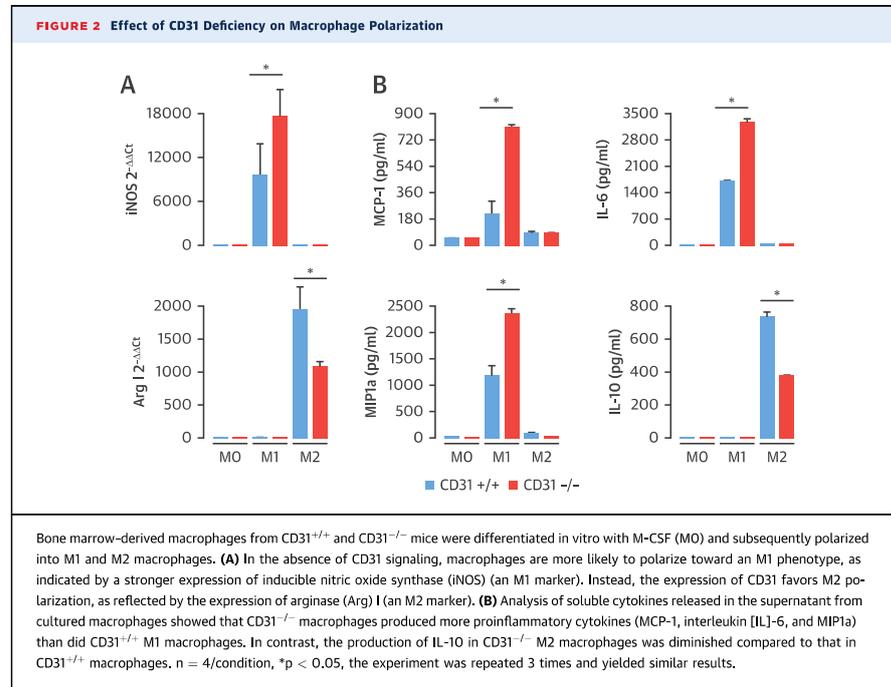
RESULTS

PROINFLAMMATORY MACROPHAGES LACKING CD31 EXPRESSION ACCUMULATE AT THE SITE OF INJURY IN ADIM. The sites of arterial wall dissection (detected as sites of elastin rupture) were consistently associated with the presence of proinflammatory M1 macrophages in both human ([Figure 1](#)) and experimental ADIM ([Online Figure 1](#)), further supporting the key role played by macrophages in the pathophysiology of aortic wall injury. Of note, CD31



was virtually absent at the surface of the proinflammatory macrophages that had infiltrated at the site of acute injury, but its expression was readily detectable on the macrophages that had switched to the M2 phenotype of human samples taken at more advanced healing stages (Figure 1).

ABSENCE OF CD31 SIGNALING PROMOTES THE DEVELOPMENT M1-LIKE MACROPHAGES. Because CD31 expression varied according to the polarization of macrophages in vivo, we wanted to analyze the effect of CD31 on macrophage polarization in vitro. To this end, BMDMs were obtained from CD31^{+/+} and



CD31^{-/-} mice and polarized toward M1-like (lipopolysaccharide + interferon- γ) or M2-like (interleukin [IL]-4) phenotypes.

We found that the M2-polarized macrophages from CD31^{-/-} mice had lower arginase I expression than did the M2 macrophages from CD31^{+/+} mice. Accordingly, the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) was higher in M1 macrophages in the absence of CD31 signaling than in macrophages from CD31^{+/+} mice (Figure 2A).

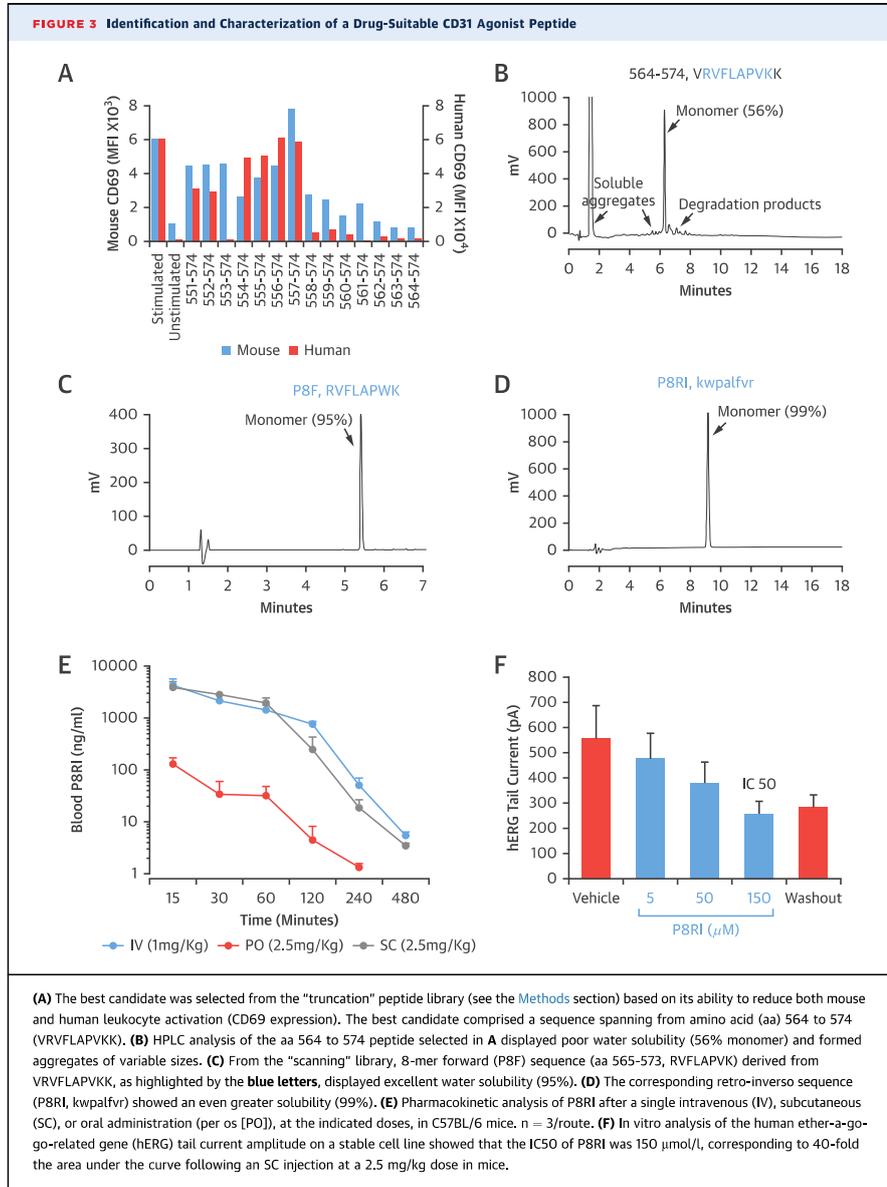
Importantly, the levels of inflammatory cytokines produced by M1 macrophages, such as MCP-1, IL-6, and MIP1 α , were significantly up-regulated under M1-polarizing conditions in the absence of CD31 expression. In contrast, IL-10 secretion was reduced in the absence of CD31 expression in M1 macrophages (Figure 2B).

Therefore, the absence of CD31 potentiates and accentuates the inflammatory phenotype during M1 polarization, while it attenuates the phenotype of M2 macrophages under M2-polarizing conditions.

IDENTIFICATION OF A DRUG-SUITABLE CD31 AGONIST PEPTIDE. Because of its poor solubility in water, the parent 23-mer peptide of CD31 was not suitable for further development as a candidate

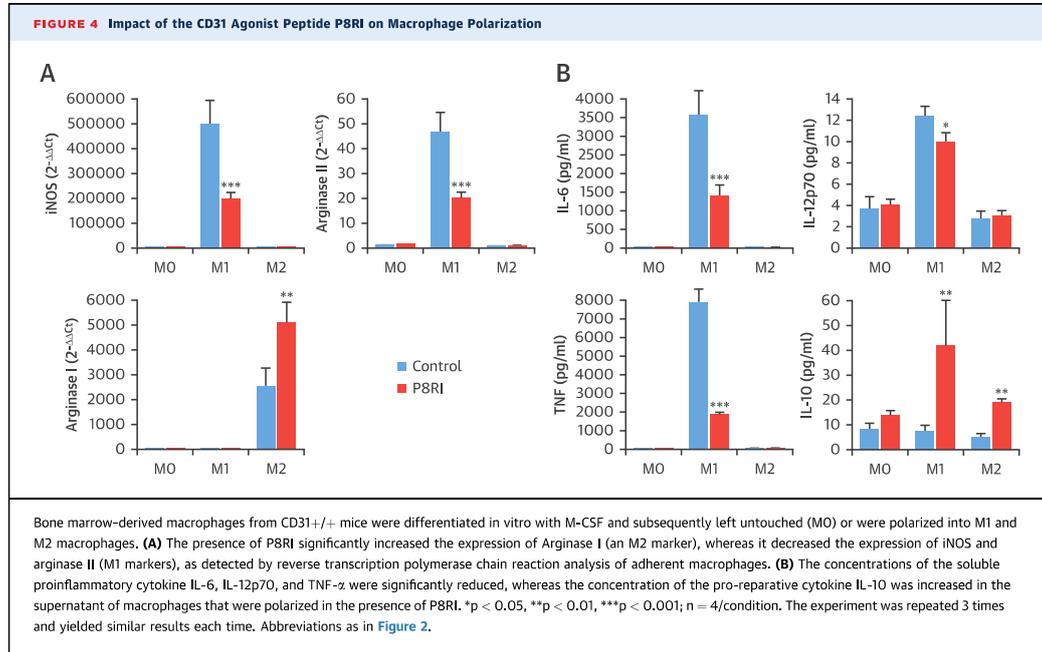
drug molecule for clinical use. To identify a drug-suitable CD31 agonist peptide, we screened 2 peptide libraries derived from the human and mouse parent sequences (Figure 3A). The best candidate was found within the most proximal extracellular sequence of the CD31 molecule (aa 564-574) (Figure 3B), which is highly conserved between mice and humans. Within this conserved sequence, we identified an 8-mer peptide (P8F, L-amino acids, “forward” sequence) that was more readily soluble in water with minimal aggregated/degraded products (Figure 3C). The corresponding 8-mer retro-inverso peptide (P8RI, D-amino acids, inverse order sequence) displayed very high water solubility and a satisfying HPLC profile in saline solution (Figure 3D). P8F and P8RI peptides were as effective as the parent 23-mer peptide in reducing the extent of T-lymphocyte activation (8). Therefore, we chose peptidase-resistant P8RI for further development and preclinical studies in mice.

Based on the efficacy of the parent peptide in a previous study (9), we decided to use the same dose range and schedule (daily subcutaneous injection of a 2.5 mg/kg dose) with the newly derived sequence. The calculated bioavailability in the blood of a single



subcutaneous injection was 66% with a maximal detectable concentration (C_{max}) of 3.8 $\mu\text{g/ml}$ (**Online Table 2**). The injected peptide was detectable in the plasma for up to 8 h after injection (**Figure 3E**), which supported the daily administration of the peptide.

From the perspective of preclinical and drug development studies, P8RI was subjected to absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicology analysis. As shown in **Figure 1F**, the IC₅₀ of P8RI based on the human ether-a-go-go-related gene



tail current amplitude was 150 μg/ml, which represents an ≈40-fold Cmax of the drug in the plasma of subcutaneously injected mice. Of note, at the concentration of 5 μg/ml, which is higher than the Cmax in the blood after subcutaneous injection, the peptide has no effect on the tail amplitude of the potassium channel (Figure 3F). The product is stable in solution for up to 100 days at room temperature (Online Figure 2) and showed no genotoxicity in vitro (Online Appendix 2). The toxicology profile in vivo was excellent: no signs of systemic toxicity (blood test biochemistry) in vivo, even at doses >10-fold of those used for the experimental study (30 mg/kg/day) administered subcutaneously, daily, over 14 days (Online Appendix 3).

CD31 PEPTIDE INFLUENCES MACROPHAGE POLARIZATION TOWARD THE M2 PROFILE. We next wanted to assess whether activating CD31 signaling using peptides has an effect on the polarization of BMDMs from CD31^{+/+} mice. As shown in Figure 4, P8RI significantly affected the polarization of macrophages, resulting in a dramatic reduction in M1 markers such as the expression of iNOS and arginase II and the production of IL-6, IL-12p70, and TNF-α, whereas it enhanced the M2 phenotype, as detected

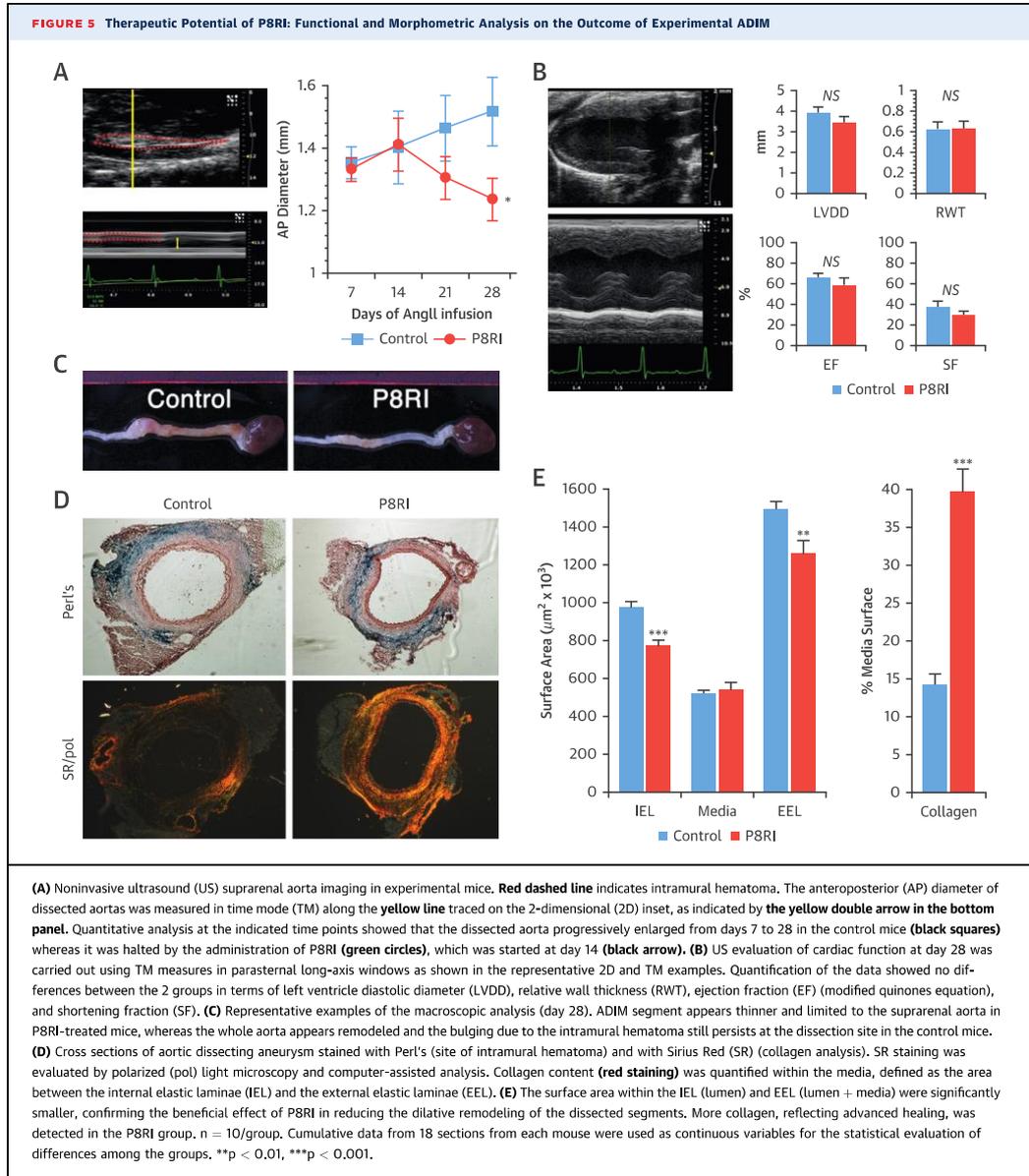
by an increased expression of arginase I and production of IL-10 (Figure 4).

These findings prompted us to evaluate the potential therapeutic effect of CD31 agonists, such as P8RI, in the healing of experimental ADIM.

CURATIVE TREATMENT WITH P8RI PROMOTES THE HEALING OF EXPERIMENTAL DISSECTING ANEURYSM IN ATHEROSCLEROTIC MICE. All mice were subjected to abdominal aorta US imaging weekly starting from day 7 after the implantation of the osmotic pump delivering Ang II. During the last 14 days of Ang II infusion (i.e., well after the establishment of aortic dissection, which occurs within the first 7 days [10,11]), mice displaying signs of acute dissection and intramural hematoma (Figure 5A) were randomly assigned to 1 of 2 groups (n = 10 mice/group) to receive a daily subcutaneous injection of either P8RI (2.5 mg/kg/day) or the vehicle (“control”).

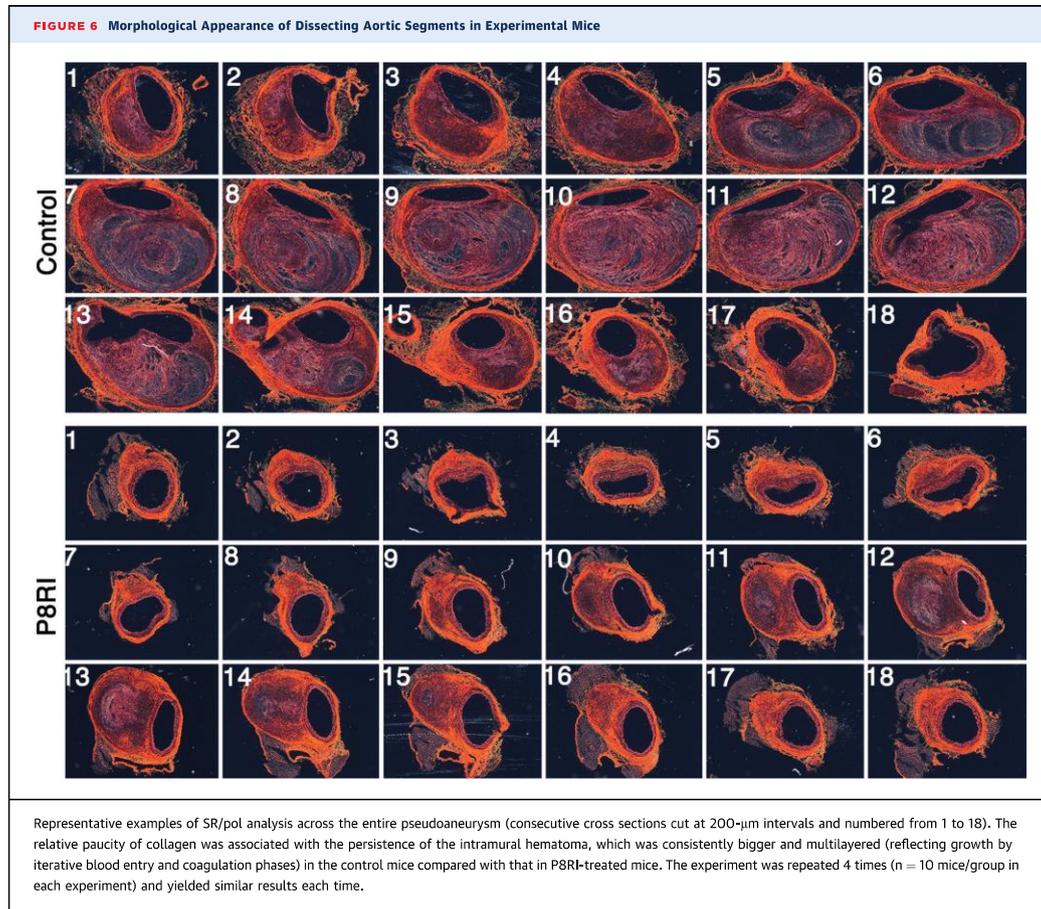
Heart function evaluated by US imaging on day 28 was not affected by the treatment (Figure 5B). This enabled us to specifically study the overall effect of the peptide on aortic tissue repair and clinical outcome of experimental ADIM.

Aneurysmal transformation was significantly reduced by P8RI treatment, as illustrated by



macroscopic, US, and computer-assisted morphometric analysis (Figures 5A to 5C). Of note, at sites showing a similar degree of intramural hematoma, as indicated by Perl's blue-stained ferritin deposits, a

greater extent of collagen bundles was evident in the P8RI group, and quantitative analysis showed that this improved arterial wall healing was associated with the prevention of aneurysmal enlargement of



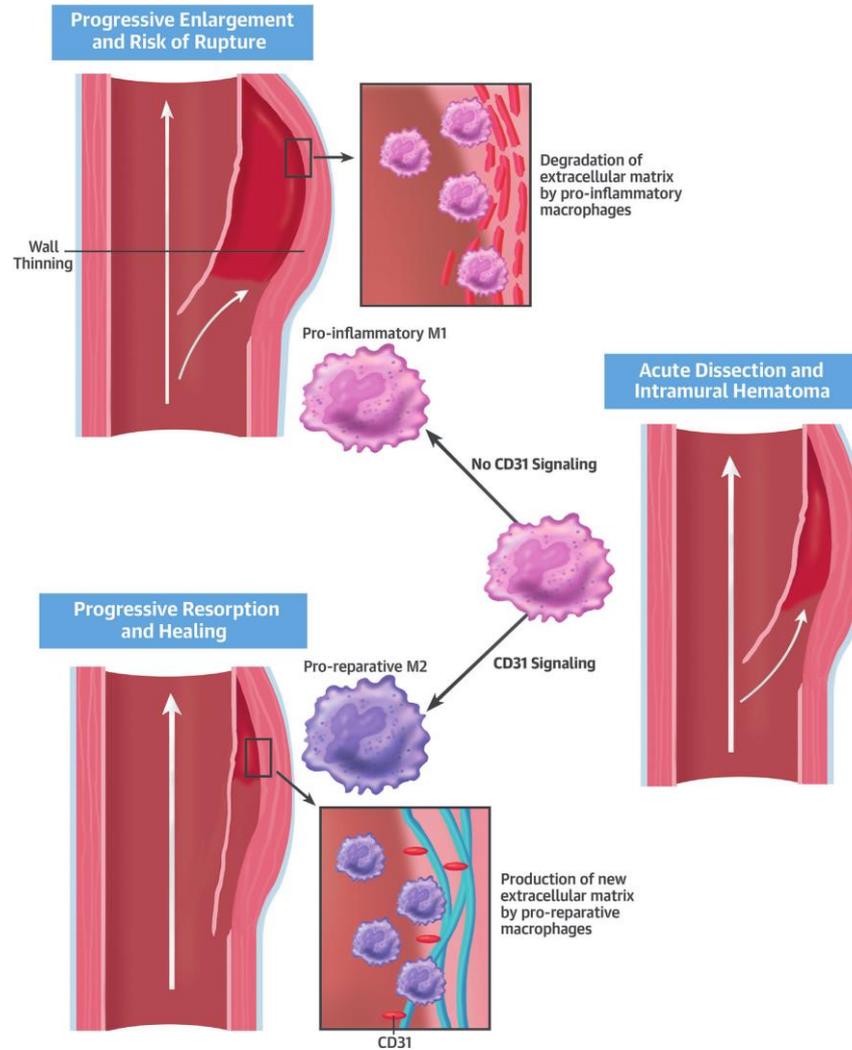
dissected aortas, as evidenced by morphometric analysis (Figures 5D to 5E).

Furthermore, blood analysis showed limited signs of internal hemorrhage (relatively higher red blood cell count and hemoglobin concentration) (Online Table 3), and the morphological analysis of Sirius Red–stained microscopic slides showed that more extended and multilayered residual intramural hematomas within the dissected segment were consistently observed in control mice. Overall, these observations support a favorable effect of CD31 agonist molecules on the resorption of injured tissues and the limitation of blood entry in the false lumen following the occurrence of dissecting aneurysms (Figure 6, Central Illustration).

Plasma biomarkers of renal (creatinine, urea) or of heart (creatinine kinase-MB) damage were not affected by the treatment (Online Table 3).

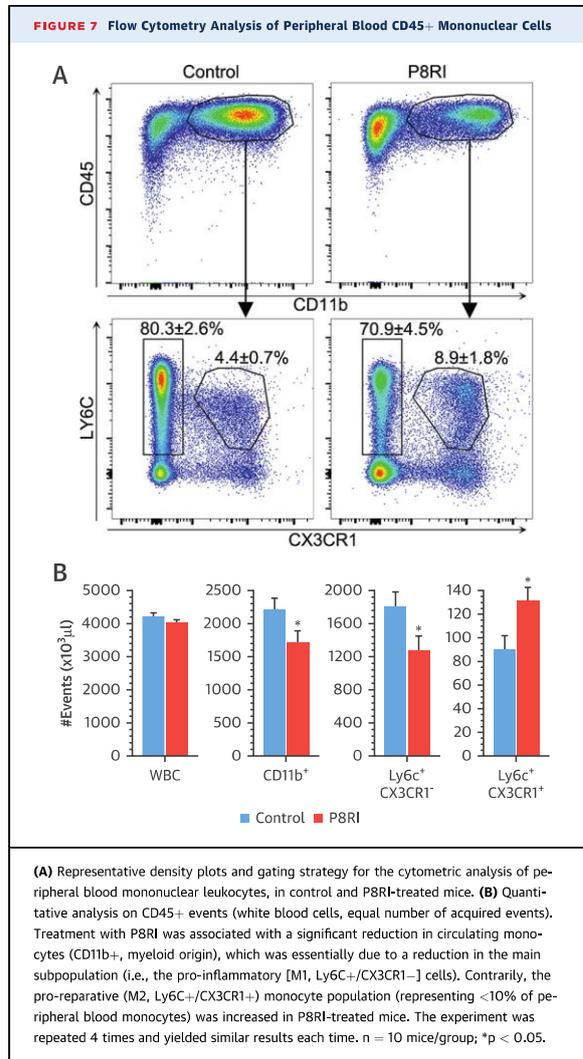
TISSUE HEALING PROPERTIES OF P8RI ARE ASSOCIATED WITH THE M2-TYPE OF MONOCYTES/MACROPHAGES. Blood formula revealed a global reduction of the neutrophil count in P8RI-treated mice, in agreement with a blunted inflammatory response (Online Table 3). Proinflammatory M1 monocytes/macrophages are essential for the initiation of wound healing, but these cells must switch to a pro-reparative phenotype for successful tissue repair. Circulating monocytes and resident macrophages, which contribute to these sequential tissue healing phases, were analyzed at the end of the study period,

CENTRAL ILLUSTRATION CD31 Signaling Favors the Switch of Injury-Associated Macrophages From the Proinflammatory M1 to the Reparative M2 Phenotype



Andreato, F. et al. *J Am Coll Cardiol*, 2018;72(1):45-57.

Upon the occurrence of an acute aortic dissection and intramural hematoma, the stabilization of the aortic wall by prompt cessation of matrix-degrading processes and by the production of new extracellular matrix is essential for preventing the thinning of the outermost wall layer, which can rupture due to the pressure of the blood flow in the false lumen. The degradation of the extracellular matrix (red, hashed wavy lines) is driven by the action of pro-inflammatory (violet) macrophages during the early "demolition" phase of tissue healing. Upon completion of this phase, the production of new extracellular matrix (green wavy lines) requires the transition of injury-associated macrophages to a reparatory phenotype (blue). Our in vitro data suggest that this transition is hampered by the invalidation of CD31 signaling, but it is favored by suitable CD31-agonist drugs. The latter species were able to promote aortic wall healing and limit aneurysmal transformation in an experimental model of acute aortic dissection.



when most of the monocytes/macrophages should have assumed the reparative phenotype.

Flow cytometric analysis of peripheral blood monocytes (CD45⁺CD11b⁺ mononuclear cells) revealed that the proportion of pro-reparative Ly6C⁺CX3CR1⁺ cells was significantly increased in the circulation of P8RI-treated mice (Figure 7). In contrast, the pro-inflammatory Ly6C⁺CX3CR1⁻ cells (accounting for >90 peripheral blood monocytes)

were significantly reduced in P8RI-treated mice, resulting in a decrease in the total circulating monocyte (CD11b⁺, mononuclear) number (Figure 7).

More importantly, at day 28, the vast majority of CD11b⁺ macrophages infiltrating the dissecting aneurysmal tissue expressed arginase I—which is predominantly expressed by M2 macrophages—in tissues derived from P8RI-treated mice, whereas the presence of iNOS⁺ M1 macrophages could only be detected in control mice (Figure 8).

Therefore, following the occurrence of an acute aortic dissection induced by Ang II infusion in Apo E^{-/-} mice, the beneficial effects on aortic repair of the curative treatment with a CD31 agonist could be explained, at least in part, by the role of the agonist in the polarization of monocytes/macrophages from a pro-inflammatory to a pro-reparative phenotype.

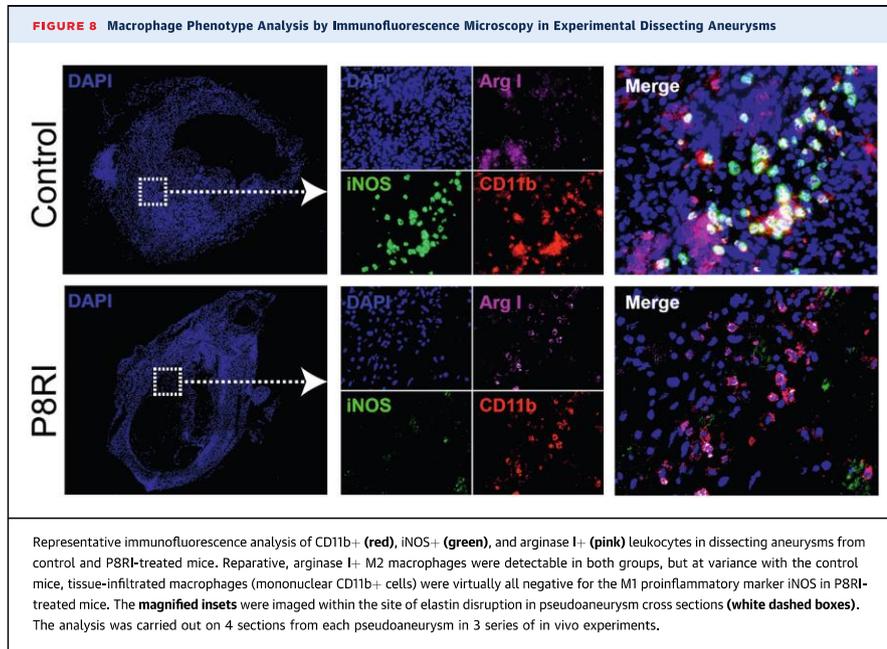
DISCUSSION

Appropriate arterial healing is crucial for the homeostasis of the circulatory system. Indeed, the arterial wall is continuously subjected to mechanical stress, which eventually causes focal injury such as intimal flaps that can give rise to intramural hematoma and/or arterial wall dissection. Although extensive work has been done in the field of skin and other soft tissue injury, little is known about the factors that can favor or hamper the healing of arterial wall injuries.

The analysis of ADIM samples from patients undergoing surgical aortic repair showed that the expression of CD31 is lost by the pro-inflammatory M1 macrophages that densely infiltrate the sites of acute arterial wall lesions, whereas CD31 re-expression accompanies the appearance of M2 and the disappearance of M1 macrophages at the sites of effective arterial wall healing, suggesting a role for CD31 in aortic tissue healing following ADIM (Central Illustration).

The chronic Ang II infusion model in Apo E^{-/-} mice is widely used in preclinical studies to explore the therapeutic potential of novel treatments (12). The apparent luminal dilatation of the abdominal aorta due to the chronic Ang II infusion in aged male Apo E^{-/-} mice (13) indeed reproduces the features of ADIM in humans, despite some specific differences (suprarenal instead of infrarenal injury because of the rupture of an aortic branch and the formation of intramural hematoma) (6).

Previously, we found that the administration of a CD31 agonist peptide could dramatically reduce the occurrence of dissection and intramural hematoma in this model (9). The administered peptide could bind to wound-associated leukocytes, including



macrophages. The role of macrophages in this model is dual, however, as macrophages are involved both in the initiation (10) and in the outcomes of events that lead to aneurysmal transformation (14). Thus, the prophylactic administration of the peptide might have prevented the initiation of the pathological processes rather than exerting an effect on the subsequent phases of wound healing in our previous work (9).

In the present study, the CD31 agonist was optimized for further clinical development and used as a curative treatment schedule with the treatment starting *after* the occurrence of the aortic complication, allowing us to specifically evaluate the therapeutic potential of CD31 agonists in arterial wound repair.

The protective effect of CD31 signaling in arterial wound healing most likely comprises multiple molecular and cellular targets involving several factors that affect the outcomes of tissue repair. We found that M1 macrophages consistently accumulate at the site of arterial injury both in patients' and in experimental mouse ADIM samples and that their persistence is associated with an unresolved intramural hematoma and defective collagen deposition at the wall of injured aortas. Whereas M1 macrophages are

thought to be necessary for the clearance of neutrophils that first enter wounds in the early phases of healing (4), consistent evidence points at a crucial role for the switching of wound-associated macrophages from a proinflammatory M1 to a pro-reparative M2 phenotype to drive the resolution of the inflammatory phase and facilitate the wound healing process (4).

M2 macrophages are frequently found within human aneurysmal samples (15); however, to the best of our knowledge, the role of the M1 to M2 switch has never been studied in ADIM. Experimental studies show that the presence of blood, as observed in the case of intramural hematoma, drives an unrestrained proinflammatory M1 macrophage population that impairs wound healing (5). Moreover, in the context of experimental atherosclerosis, we previously found that the switch from an M1 to M2 phenotype is beneficial for the outcomes of vascular lesions (16).

Importantly, we found that CD31 and M2 marker expression at the surface of tissue-infiltrated macrophages increases with the healing stage following ADIM in patients. Furthermore, our in vitro data clearly show that CD31 signaling plays a direct and key role in the M1 to M2 phenotype switching of macrophages.

Beyond its role as an endothelial marker (17), CD31 is receiving increasing attention for its function as an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-bearing receptor (18), indicating its potential as a promising therapeutic target in inflammatory diseases (19). In the regulation of macrophage functions, CD31 signaling may play a crucial role in the resolution of inflammation, because, unlike other immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-bearing receptors, it is constitutively expressed by both macrophages and neutrophils and because its trans-homophilic engagement is indispensable for the efficient engulfment of dead neutrophils (20), which is a prerequisite for favorable tissue repair irrespective of the injured organ.

STUDY LIMITATIONS. In its present form, the CD31 agonist that we have developed can be administered through an intravenous or subcutaneous injection. These administration routes are not suitable for prolonged treatment, but are compatible with in-hospital or short treatment regimens. Further studies in complementary experimental models are warranted from the perspective of using this therapeutic strategy in human ADIM, but the results of the present study strongly suggest that a treatment lasting 14 days can be sufficient to favor the repair and prevent subsequent aneurysmal transformation of an acute dissecting aortic wound.

CONCLUSIONS

We have identified a drug-suitable CD31 agonist peptide that favors the polarization of macrophages

toward a reparative phenotype and promotes the healing of experimental ADIM.

ACKNOWLEDGMENTS The authors are indebted to Jean-Michel Gautier and François Bellami for their support in the development of a drug-suitable CD31 agonist; and the authors sincerely thank Corinne Legrand for her continuous support, stimulating discussions, and excellent management of research funding.

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE: Dr. Giuseppina Caligiuri, INSERM U1148, University Hospital Bichat, 46 rue Henri Huchard, F-75018 Paris, France. E-mail: giuseppina.caligiuri@inserm.fr. Twitter: @Inserm.

PERSPECTIVES

COMPETENCY IN MEDICAL KNOWLEDGE:

Proinflammatory macrophages contribute to the adverse remodeling responsible for the expansion of dissecting aortic aneurysms that typically precedes rupture. In a mouse model of dissecting aortic aneurysm, a CD31 agonist peptide (P8RI) enhanced reparative macrophage function and reduced the rate of segmental aneurysm expansion.

TRANSLATIONAL OUTLOOK: Further investigation should focus on the regulatory mechanisms responsible for molecular switching of macrophage polarization in animal models and patients with acute arterial injury.

REFERENCES

- Mussa FF, Horton JD, Moridzadeh R, Nicholson J, Trimarchi S, Eagle KA. Acute aortic dissection and intramural hematoma: a systematic review. *JAMA* 2016;316:754-63.
- Lumsden AB, Reardon MJ. Once dissected always dissected! Can stent grafts change the natural history of type B dissections? A report from the International Registry of Acute Aortic Dissection. *J Am Coll Cardiol Intv* 2008;1:403-4.
- Isselbacher EM, Bonaca MP, Di Eusanio M, et al. Recurrent aortic dissection: observations from the International Registry of Aortic Dissection. *Circulation* 2016;134:1013-24.
- Mantovani A, Bitsvas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodeling. *J Pathol* 2013; 229:176-85.
- Sindrilaru A, Peters T, Wieschalka S, et al. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *J Clin Invest* 2011;121:985-97.
- Trachet B, Fraga-Silva RA, Piersigilli A, et al. Dissecting abdominal aortic aneurysm in Ang II-infused mice: suprarenal branch ruptures and apparent luminal dilatation. *Cardiovasc Res* 2015; 105:213-22.
- Duncan GS, Andrew DP, Takimoto H, et al. Genetic evidence for functional redundancy of Platelet/Endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1): CD31-deficient mice reveal PECAM-1-dependent and PECAM-1-independent functions. *J Immunol* 1999;162:3022-30.
- Caligiuri G, Nicoletti A, inventors. Improved cd31 peptides. 2013:PCT/EP2013/062806. June 19, 2013.
- Fornasa G, Clement M, Groyer E, et al. A CD31-derived peptide prevents angiotensin II-induced atherosclerosis progression and aneurysm formation. *Cardiovasc Res* 2012;94:30-7.
- Saraff K, Babamusta F, Cassis LA, Daugherty A. Aortic dissection precedes formation of aneurysms and atherosclerosis in angiotensin II-infused, apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1621-6.
- Cao RY, Amand T, Ford MD, Piomelli U, Funk CD. The Murine angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm model: rupture risk and inflammatory progression patterns. *Front Pharmacol* 2010;1:9.
- Liu J, Daugherty A, Lu H. Angiotensin II and abdominal aortic aneurysms: an update. *Curr Pharm Des* 2015;21:4035-48.
- Daugherty A, Manning MW, Cassis LA. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest* 2000;105:1605-12.
- Rateri DL, Howatt DA, Moorleghen JJ, Charnigo R, Cassis LA, Daugherty A. Prolonged infusion of angiotensin II in apoE(-/-) mice promotes macrophage recruitment with continued expansion of abdominal aortic aneurysm. *Am J Pathol* 2011;179:1542-8.

15. Rubio-Navarro A, Amaro Villalobos JM, Lindholt JS, et al. Hemoglobin induces monocyte recruitment and CD163-macrophage polarization in abdominal aortic aneurysm. *Int J Cardiol* 2015; 201:66-78.
16. Khallou-Laschet J, Varthaman A, Fornasa G, et al. Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PLoS One* 2010;5:e8852.
17. Liu L, Shi GP. CD31: beyond a marker for endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2012;94:3-5.
18. Newman PJ. Switched at birth: a new family for PECAM-1. *J Clin Invest* 1999;103:5-9.
19. Marelli-Berg FM, Clement M, Mauro C, Caligiuri G. An immunologist's guide to CD31 function in T-cells. *J Cell Sci* 2013;126: 2343-52.
20. Vernon-Wilson EF, Aurade F, Tian L, et al. CD31 delays phagocyte membrane repolarization to promote efficient binding of apoptotic cells. *J Leukoc Biol* 2007;82:1278-88.

KEY WORDS aortic dissection, CD31, drug discovery, intramural hematoma, macrophages, peptides

APPENDIX For an expanded Methods section as well as supplemental figures and tables, please see the online version of this paper.

Résumé

Le CD31, aussi appelé PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) est une glycoprotéine transmembranaire de 130 kDa comprenant 6 domaines de type « immunoglobuline » dans sa portion extracellulaire et deux motifs « ITIM » (Immunoreceptor Tyrosine based Inhibition Motif, qui recrutent des phosphatases) dans sa queue cytoplasmique. De par sa nature trans-homophile et son expression exclusive et constitutive par les cellules endothéliales, les plaquettes et les leucocytes, le CD31 joue un rôle central dans les mécanismes de régulation des cellules interagissant au niveau de l'interface sang-vaisseaux.

L'engagement de ses motifs ITIMs favorise les voies de signalisation phosphatase-dépendantes alors que la signalisation tyrosine/inositol-dépendante se retrouve découplée. Ainsi, l'effet inhibiteur ou activateur du CD31 dépend de la nature de la cellule et du rôle des phosphatases recrutées par le CD31 dans chaque type cellulaire : l'engagement éphémère du CD31 par les cellules circulantes exerce un effet plutôt « inhibiteur » en provoquant le détachement cellulaire et l'élévation de seuil d'activation des plaquettes et des leucocytes alors qu'à l'inverse, son engagement pérenne aux niveau des jonctions des cellules endothéliales, stablement ancrées sur leur membrane basale et enchaînées entre elles, est essentiel pour assurer la survie et les fonctions physiologiques de l'endothélium.

La régulation des interactions entre endothélium, plaquettes, et leucocytes par le CD31 pourrait être particulièrement importante au cours des réponses biologiques qui se mettent en place suite à une lésion du système cardiovasculaire.

Pour évaluer cette hypothèse, j'ai étudié au cours de ma thèse le rôle du CD31 dans l'issue des lésions dues à la dissection de l'aorte et à l'ischémie reperfusion myocardique, deux conditions cliniques aiguës comportant un risque vital élevé non seulement dans l'immédiat mais aussi à distance, si le remodelage tissulaire n'est pas approprié. Mes travaux ont montré que la fonction du CD31 est importante dans l'issue des lésions cardiovasculaires aiguës : non seulement elle favorise le retour à l'homéostasie dans la microcirculation pour garantir la perfusion du tissu lésé mais elle contribue activement à la réparation tissulaire, en favorisant l'acquisition d'un phénotype réparateur par les leucocytes infiltrés aux sites de lésion.

En effet, dans le cas de la dissection aortique, nos résultats montrent que la fonction du CD31 est cruciale pour permettre la résorption rapide de l'hématome et la formation d'une cicatrice riche en collagène au niveau de la lésion artérielle permettant ainsi de prévenir l'évolution anévrysmale et le risque de rupture de l'aorte. Dans le cas de l'infarctus du myocarde faisant suite à une séquence d'ischémie reperfusion, l'efficacité des procédures de

recanalisation, aussi promptes soient-elles, dépend du rétablissement de la circulation microvasculaire. En effet, la survie de chaque fibre musculaire cardiaque va dépendre de son propre capillaire. Chez des souris déficientes en CD31, nous avons constaté que la réponse des plaquettes, des leucocytes, et de l'endothélium au sein même de la microcirculation de l'infarctus est inappropriée. Ainsi, en l'absence de CD31, la dysfonction des éléments sanguins interagissant avec l'endothélium dans la microcirculation prévient la reperfusion à l'échelle tissulaire. Ce phénomène, connu comme le « *no-reflow* », correspond à une absence de reperfusion microvasculaire malgré la réouverture de l'artère occluse et se traduit par un élargissement de la nécrose myocardique.

L'ensemble des résultats de mon travail de thèse indique que les fonctions régulatrices du CD31 jouent un rôle particulièrement déterminant dans l'issue des lésions aiguës du système cardiovasculaire, où les contraintes hémodynamiques rendent d'autant plus difficile et urgente la réparation tissulaire.