



**HAL**  
open science

# Rôle de variants génétiques rares d'ANGPTL6 et de CTSO dans la formation des anévrismes intracrâniens

Milène Fréneau

► **To cite this version:**

Milène Fréneau. Rôle de variants génétiques rares d'ANGPTL6 et de CTSO dans la formation des anévrismes intracrâniens. Médecine humaine et pathologie. Nantes Université, 2023. Français. NNT : 2023NANU1005 . tel-04147378

**HAL Id: tel-04147378**

**<https://theses.hal.science/tel-04147378>**

Submitted on 30 Jun 2023

**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.

# THESE DE DOCTORAT

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

*Biologie-Santé*

Spécialité : *Physiologie, physiopathologie, biologie systémique médicale*

Par

**Milène FRENEAU**

## **Rôle de variants génétiques rares d'ANGPTL6 et de CTSO dans la formation des anévrismes intracrâniens**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 08/03/2023

Unité de recherche : l'institut du thorax, INSERM UMR1087, CNRS UMR 6291, Nantes Univ  
UFR Médecine et Techniques médicales

### **Rapporteurs avant soutenance :**

Anne JOUTEL Directrice de recherche, INSERM, HDR, Université Paris Cité  
Patrick LACOLLEY Directeur de recherche, INSERM, HDR, Université de Lorraine

### **Composition du Jury :**

Président : Romain BOURCIER PU-PH, HDR, CHU Nantes, Nantes Université  
Rapporteurs : Anne JOUTEL Directrice de recherche, INSERM, HDR, Université Paris Cité  
Patrick LACOLLEY Directeur de recherche, INSERM, HDR, Université de Lorraine  
Examineurs : Sandrine MOREL Collaboratrice scientifique, Université de Genève  
Yacine BOULAFTALI Chargé de recherche, INSERM, Université Paris Cité / Sorbonne Paris Nord  
Dir. de thèse : Gervaise LOIRAND Directrice de recherche, INSERM, HDR, Nantes Université  
Co-enc : Anne-Clémence VION Chargée de recherche, CNRS, Nantes Université

## Remerciements

Je tiens à remercier Dr Anne Joutel et Dr Patrick Lacolley pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Merci pour votre temps accordé. Je vous remercie pour la pertinence de vos remarques et espère avoir satisfait vos attentes. Je souhaite également remercier Dr Sandrine Morel, Dr Yacine Boulaftali et Pr Romain Bourcier qui ont accepté de faire partie de mon jury de soutenance, en tant qu'examineurs.

Un merci tout particulier à ma directrice de thèse, Dr Gervaise Loirand. Je vous remercie de m'avoir donné l'opportunité d'intégrer votre équipe. Merci d'avoir cru en moi. Vous avez su transmettre cette passion que vous avez pour la recherche. Ces stages de master et cette thèse m'ont permis de découvrir la science à travers votre regard. Merci pour tous vos précieux conseils durant nos échanges scientifiques. Merci beaucoup pour votre aide très importante dans la rédaction de cette thèse.

Un très grand merci à ma co-encadrante, Dr Anne-Clémence Vion. Merci pour tout le panel de techniques que tu as pu m'enseigner. Merci pour la pertinence de tes remarques, conseils, idées, etc... Merci pour tous les moments partagés, scientifiques ou non. J'admire ta réussite et te souhaite de grandes choses pour la suite, professionnellement et personnellement. Merci pour ta bonne humeur et ton soutien permanent. Merci également pour ton aide précieuse dans la rédaction de cette thèse.

Je tiens aussi à remercier Dr Sandrine Morel et Dr Stéphane Germain, membres de mon comité de suivi individuel. Merci pour vos remarques pertinentes et vos conseils avisés.

Merci à Stéphane Cuénot, de l'institut des matériaux Jean Rouxel de Nantes, pour les expérimentations d'AFM. Merci aux différentes plateformes avec lesquelles j'ai pu réaliser certaines expériences : MicroPICell, CytoCell, GenoBiRD. Merci à l'UTE pour la gestion des animaux. Merci également à Joëlle Véziers de SC3M pour les images de microCT.

Merci à toute l'équipe clinique du service de neuroradiologie du CHU de Nantes et à l'équipe de génétique de l'unité de recherche de l'institut du thorax sans qui ces projets n'auraient pas été possibles.

Merci à NExT pour leur financement qui m'a permis de continuer en tant que doctorante au sein de l'équipe. Par la même occasion, merci à Genavie pour les mois supplémentaires dont j'avais besoin. Merci à Patricia Lemarchand et au DHU2020 qui m'ont permis de débiter ce double parcours et d'en être ici, aujourd'hui.

Merci à Richard Redon et au pôle administratif et logistique de l'institut du thorax, grâce auquel j'ai pu réaliser cette thèse dans de bonnes conditions.

**Cette thèse a également été l'occasion de faire de formidables rencontres.**

D'abord mon équipe : MERCI. Merci à tous les membres de l'équipe III pour votre soutien au quotidien et votre bonne humeur permanente. Merci pour tous les petits moments partagés au sein et en dehors du labo. Évidemment encore un grand merci à **Gervaise** et **Anne-Clémence**, merci pour tout votre soutien et votre implication. **Céline**, partenaire de bureau, merci d'avoir eu la patience de m'apprendre tout ce que tu m'as appris. Quand je suis arrivée au labo, je ne savais rien faire, pas même pipetter... Merci pour la superbe formation, pas que technique ! Merci pour ton écoute, ton attention, ton aide et ta présence. J'ai adoré travailler avec toi, je te félicite pour ton parcours et je te souhaite le meilleur pour la suite. **Morgane**, quand je suis arrivée dans l'équipe, tu étais momentanément absente (à cause d'un problème au genou, j'ai voulu prendre exemple sur toi apparemment...). Puis je t'ai rencontré, j'ai vite compris que tu étais le rayon de soleil de l'équipe, que tu allais être mon petit rayon de soleil. Merci pour tout. Merci pour ta joie de vivre, ton organisation redoutable (#Morganization), tous les services que tu m'as rendus, tes magnifiques (et super bon) gâteaux. Merci, merci, merci. **Marc**, merci pour tout ce que tu as pu m'enseigner, merci pour les isolements de cellules (je ne t'égalerais jamais...). Je ne te remercie pas pour tes blagues douteuses... ahaha 😊 **Vincent**, c'est toi qui m'as donné envie d'intégrer l'équipe, alors, merci pour ça ! Merci pour tes conseils tout au long de ma présence au labo. **Corentin**, merci pour ta présence et de renforcer la team AIC 😊 **Lindsay, Surya, Dorian**, on s'est suivi en thèse, je vous souhaite le meilleur à venir !! Merci aux nouvelles recrues de l'équipe. **Thibaut, Tom**, pas si récent mais quand même ahaha. **Hugo, Mary-Adel, Coralie, Marie, Nathan, Sarah, Laurent**, merci pour vos conseils avisés et vos talents culinaires 😊 Je vous souhaite de passer de super moments dans cette équipe !! (un merci particulier à **Marie** pour la reprise des fonctions de gestion des réunions d'équipes ahah).

Evidemment, hormis l'équipe III, j'ai eu la chance d'interagir avec l'ensemble de l'institut du thorax. **Maud**, toujours là pour régler un problème, merci à toi. **Aurélie, Corinne, Elise** et **Mélissa**, toujours là pour répondre à nos questions, merci à vous. Merci à toutes les personnes qui ont égayé mes journées, juste avec un sourire et un bonjour dans un couloir, **Gilliane, Lise, Antoine, Xavier, Simon, Aurore, Nathalie, Céline, Isabelle, Gildas, Flavien, Jérôme, Virginie V., Virginie F., Pascal, Romain, Jean, Estelle, Walid, Victoria, Marine D., Barbara, Floriane, Marine S., Hugo, Angélique E., Agnès H., Agnès T., Guillaume** et merci pour votre aide aussi !! Merci à **Benjamin** et **Yannick** (hors institut, mais ça passe !) pour votre enseignement en master 2. Au-delà de l'aspect scientifique, merci pour votre bonne humeur et votre convivialité.

Merci aux doctorants avec qui on s'est quand même bien marré aux 48h, aux week-ends post-48h, aux week-ends juste pour le plaisir dans un gîte à St Martin des Tilleuls ahah. Merci à **Adrien, Cyrielle, Eléonore, Thibaud, Angélique**. Merci aux bébés doctorants (qui sont en fait pas si bébé que ça...). Merci **Benjamin**, de ne pas me juger quand je mets de la musique en salle de culture ahaha. Merci **Amandine**, j'ai pleinement confiance en toi pour assurer ton nouveau rôle de représentante du collège des doctorants !! **Marine**, merci à toi pour tous les moments passés ensemble (surtout en dehors du labo je dois dire.....), maintenant que je sais que t'es à Nantes pour 3 ans je vais pas te lâcher ahah. Merci aux anciens, **Antoine, Ludivine, Yolène, Anaïs**, vous n'êtes plus au labo mais merci pour tous les souvenirs que j'ai avec vous là-bas. Merci à **Raphaël**, mon co-auteur préféré ahah, merci de nous faire boire des pintes dès le mardi soir, sinon c'est vrai qu'on perdrait l'habitude..... Merci à **Virginie A.** pour tes histoires de soirées qui se recoupent parfois avec les miennes ahaha. Merci **Charlène** et **Marie** pour les petites pauses café qui font du bien, et les afterworks qui font du bien aussi 😊



On arrive ensuite à la crème de la crème, la cerise sur le gâteau, l'élite de l'élite : l'équipe KOH-LANTAAAAA !!!! Merci à vous pour tous ces moments, nos apéros (heureusement que vous augmentez le niveau car si on comptait que sur mes restes...), nos soirées aussi ahah. Rejoins récemment par **Michelle**, qui adore vraiment le concept de l'émission (surtout la finale hein !) ahah, merci pour tes riches commentaires « disgusting ». Merci **Robin**, arrivé dans la team il y a peu de temps mais déjà parti pour Chicago, je te souhaite le meilleur là-bas. **Yoann**, docteur depuis... Je sais plus tellement ça fait longtemps, merci de revenir nous voir à Nantes de temps en temps quand même, parfois il te suffit pas de grand-chose pour te motiver 😊. **Bastien**, merci pour tout, je t'ai toujours dit que tu étais mon modèle, c'est le cas, merci d'avance pour les cours l'année (universitaire) prochaine ahah. **Manon** merci à toi pour ces crises de fou rire inexplicables en période de gros stress. Merci **Enora**, pour les soirées, les festivals, les bars, toujours motivée !!! Merci **Thomas** pour les pauses café (faudrait peut-être se limiter à 2 par jour, non ?), merci pour les commérages. Merci **Constance**, maintenant tu es à Boston, même à 5000km t'es là pour me répondre... Merci d'être là. J'ai hâte de venir voir ta nouvelle petite vie. Toute l'équipe Koh-lanta, merci, merci merci, vous m'avez beaucoup apporté, non vous n'êtes pas de simples « Collègues »..... ahaha

**Cette thèse n'aurait pas pu se faire sans ma famille et mes amis les plus proches.**

Merci à Papa, Maman, Carine et Tristan, Magali, Damien et Fabienne, Hugo et Salomé d'avoir toujours été là et d'avoir cru en moi. Merci pour les repas improvisés et les week-ends familles dans des gîtes les plus incongrus les uns que les autres (merci Maman pour les réservations !!).

Merci à la plus belle découverte de ma thèse, Pierre. Merci à toi d'être là, merci d'être toi. Même si tu es un traquenard à toi tout seul (peut-être que moi aussi...), même si tu n'aimes pas les champignons, ni le thon-st moret, je suis la plus heureuse de t'avoir rencontré. Je vous souhaite le meilleur à deux.

Merci Audrey et Stéphanie, merci d'être présentes depuis si longtemps (je préfère pas compter...). On est pas de la même famille mais c'est vraiment tout comme. Je ne me vois pas vivre sans vous. Merci de m'avoir toujours écoutée, comprise, conseillée. Je vous aime de tout mon cœur.

Merci à toi Elisa, merci d'être là tout simplement. Merci pour tous les moments passés ensemble, merci pour toutes les soirées, tous les sorties improvisées. Je t'aime ma voisine préférée.

Merci Laura. Même si tu as ta petite vie dans le Ch'nord, t'oublies jamais de prendre des nouvelles, toujours un avis bienveillant. Merci pour les moments, que ce soit petit restau posé ou grosse soirée.

Merci Angélique, Rémi, Juliette et Erwan. Merci d'avoir été là tout au long de mon parcours. Malgré nos agendas pas toujours compatibles, on réussit à se voir de temps en temps et à chaque fois c'est un plaisir (surtout les escapes-game..... horreur ? encore plus !) ahah. Merci Juju pour les corrections !!!

Merci Lisa, Margot, Pauline. Merci pour les petits repas de midi illico presto ahah. Merci pour les petites histoires, oh surtout celles de Pauline, on adooooore ahaha.

Merci à tous mes copains de médecine, merci à Cul Jet (à prononcer QG) ! Merci d'avoir été là, Marie, Audeline, Héloïse, Camille, Suzanne, Marie, Mathéo, Seb, Marine, Céline, Louise, Sophie. Merci pour tous les moments partagés même si, parfois, ça n'a pas été les plus heureux. Merci Anthony, j'aurais tellement aimé que tu sois là pour ma soutenance. Merci mon Bodyguard, merci pour tout.



# Table des matières

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>1</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>11</b>
<b>LISTES DES TABLEAUX</b> .....	<b>11</b>
<b>AVANT-PROPOS</b> .....	<b>13</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>15</b>
<b>I. LES ANEURISMES INTRACRANIENS</b> .....	<b>17</b>
<b>1. Données cliniques</b> .....	<b>17</b>
A. Epidémiologie .....	17
B. Traitements préventifs de la rupture d'AIC .....	17
C. Facteurs de risque d'AIC .....	19
a. Facteurs de risque de survenue d'AIC.....	19
b. Facteurs de risque de rupture d'AIC .....	20
<b>2. Physiopathologie des AIC</b> .....	<b>21</b>
A. Spécificité des artères cérébrales .....	21
a. Histologie .....	21
b. Hémodynamique .....	22
B. Remodelage de la paroi au niveau de l'AIC .....	24
a. Description générale de la paroi de l'AIC.....	24
b. Rôle des contraintes hémodynamiques et de l'endothélium dans la formation des AIC .....	25
c. Rôle des CMLV dans la formation des AIC .....	31
d. Rôle des cellules inflammatoires dans la formation des AIC .....	34
C. Intérêt des modèles animaux dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques des AIC.....	37
<b>3. Prédispositions génétiques aux AIC</b> .....	<b>41</b>
A. AIC syndromiques .....	41
B. AIC non syndromiques .....	44
a. Analyses de liaison .....	45
b. Approche gène candidat .....	45
c. Etudes d'association pangénomiques.....	46
d. Séquençage d'exome entier dans des formes familiales .....	48
<b>II. ANGPTL6</b> .....	<b>52</b>
<b>1. Structure protéique des angiotensin-like</b> .....	<b>52</b>
<b>2. Rôle vasculaire des angiotensin-like</b> .....	<b>53</b>
<b>3. ANGPTL6</b> .....	<b>54</b>

III. CTSO .....	56
1. Généralités sur les cathepsines .....	56
A. Structure protéique et classification.....	56
B. Activation des cathepsines .....	58
C. Rôles physiologiques des cathepsines .....	58
a. Rôles des cathepsines dans le lysosome.....	59
b. Rôle des cathepsines dans le cytosol .....	60
c. Rôle des cathepsines dans le milieu extracellulaire .....	60
2. Rôles des cathepsines dans les pathologies cardiovasculaires.....	61
A. Rôle des cathepsines dans le remodelage vasculaire .....	61
B. Rôle des cathepsines dans l'AIC.....	62
3. CTSO .....	62
<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>65</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>69</b>
I. PROJET ANGPTL6 .....	71
1. Introduction.....	71
2. Matériels et méthodes .....	72
A. Modèle animal.....	72
a. Modèle d'HTA .....	72
b. Modèle chirurgical d'induction des AIC .....	72
B. Perfusions intracardiaques .....	72
C. Immunofluorescence / Transparisation.....	73
D. Imagerie.....	74
a. Tomodensitométrie .....	74
b. Imagerie confocale .....	74
c. Microscopie à feuille de lumière.....	75
E. Artériographie pressurisée .....	75
F. Culture cellulaire.....	75
a. Test d'adhésion cellulaire par mesure d'impédance .....	76
b. Evaluation de la migration .....	76
c. RT-qPCR .....	77
d. Western blot .....	77
e. Contraction sur gel de collagène .....	78
G. Analyses statistiques.....	78

3.	<i>Résultats</i> .....	79
A.	Les souris Angptl6-KI présentent un défaut de couverture en CMLV lors de l'angiogenèse rétinienne.....	79
B.	ANGPTL6 favorise l'adhésion des CMLV et diminue leur migration .....	80
C.	ANGPTL6 n'affecte pas le phénotype des CMLV mais augmente leur contractilité .....	82
D.	Les souris Angptl6-KI présentent un défaut de compliance et une dysfonction endothéliale des artères cérébrales.....	84
E.	Les souris Angptl6-KI présentent une augmentation de diamètre des artères cérébrales et des déformations localisées .....	87
F.	Les souris Angptl6-KI semblent avoir une susceptibilité aux déformations de la paroi au niveau des bifurcations des artères cérébrales.....	89
4.	<i>Discussion</i> .....	91
II.	PROJET CTSO.....	95
1.	<i>Préambule</i> .....	95
2.	<i>Manuscrit</i> .....	97
	<b>CONCLUSION – DISCUSSION</b> .....	<b>137</b>
I.	CONCLUSION .....	139
II.	DISCUSSION GENERALE .....	144
	<b>REFERENCES</b> .....	<b>147</b>
	<b>ANNEXES</b> .....	<b>167</b>

## Liste des abréviations

**$\alpha$ -SMA** :  $\alpha$ -actine musculaire lisse

**ADAMTS15** : désintégrine et métalloprotéinase avec un motif thrombospondine 15

**ADPKD** : polykystose rénale autosomique dominante

**AIC** : anévrisme intracrânien

**AMPK** : protéine kinase AMP-dépendante

**ANGPTL6** : angiopoiétine-like 6

**ARHGEF17** : facteur d'échange nucléotidique de Rho 17

**CFD** : modélisation numérique de la dynamique des fluides

**CMLV** : cellule musculaire lisse vasculaire

**COX-2** : cyclooxygénase de type 2

**CTSO** : cathepsine O

**EDHF** : endothelium-derived hyperpolarizing factor

**eNOS** : NO synthase endothéliale

**ERK 1/2** : kinases régulées par un signal extracellulaire 1 et 2

**FAK** : kinase d'adhésion focale

**GWAS** : étude d'association pangénomique

**HSA** : hémorragie sous-arachnoïdienne

**HTA** : hypertension artérielle

**ICAM-1** : molécule d'adhésion intracellulaire-1

**IL-1 $\beta$**  : interleukine-1 $\beta$

**iNOS** : NO synthase inductible

**JMJD6** : Jumonji domain-containing 6

**JNK** : c-Jun N-terminal kinase

**KD** : knockdown

**KI** : knock-in

**KLF** : Kruppel-like factor

**LEI** : limitante élastique interne

**L-NAME** : chlorhydrate d'ester méthylique de N-Nitro-L-Arginine

**LOXL2** : lysyl oxydase like 2

**MCP-1** : protéine chimioattractante monocytaire 1  
**MEC** : matrice extracellulaire  
**microCT** : *micro computed tomography*  
**MMP** : métalloprotéinases matricielles  
**NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit  
**NF-κB** : facteur nucléaire κB  
**NO** : *nitric oxide* (monoxyde d'azote)  
**PBS** : solution saline tamponnée au phosphate  
**PGI2** : prostacycline  
**PKC** : protéine kinase C  
**PPIL4** : peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 4  
**RGD** : Arginine, Glycine, Aspartate  
**SM22α** : transgeline  
**SM-MHC** : chaîne lourde de la myosine spécifique du muscle lisse  
**SOX17** : SRY-box 17  
**SVF** : sérum de veau fœtal  
**TGF-β** : facteur de croissance transformant β  
**TNF-α** : facteur de nécrose tumorale α  
**THSD1** : thrombospondine de type 1 domain-containing 1  
**TIMP** : inhibiteurs des MMP  
**VCAM-1** : molécule d'adhésion cellulaire vasculaire 1  
**VE-cadhérine** : cadhérine endothéliale vasculaire  
**WSS** : *wall shear stress* (contraintes de cisaillement pariétales)  
**ZO-1** : zonula occludens 1





## Liste des figures

FIGURE 1 : LOCALISATION DES AIC ET TRAITEMENTS PREVENTIFS A LA RUPTURE D'AIC.....	18
FIGURE 2 : PAROI DES ARTERES CEREBRALES .....	21
FIGURE 3 : FLUX ET WSS DANS UNE PORTION LINEAIRE ET AU NIVEAU D'UNE BIFURCATION ARTERIELLE .....	22
FIGURE 4 : EXEMPLES DE BIFURCATION DE L'ARTERE CEREBRALE MOYENNE HUMAINE ET MODELISATION DU WSS .....	23
FIGURE 5 : MODELISATION DU PROFIL DE PRESSION DANS UNE BIFURCATION D'ARTERE CEREBRALE.....	23
FIGURE 6 : LOCALISATION ET MODIFICATIONS PARIETALES TYPIQUES DES AIC .....	24
FIGURE 7 : VOIES IMPLIQUEES DANS LA REGULATION DE LA RELAXATION DES CMLV PAR L'ENDOTHELIUM .....	27
FIGURE 8 : LES JONCTIONS INTERCELLULAIRES DES CELLULES ENDOTHELIALES .....	28
FIGURE 9 : LES POINTS FOCALUX D'ADHESION A LA MEC .....	29
FIGURE 10 : VOIES DE SIGNALISATION ENDOTHELIALES POTENTIALISEES PAR DES VALEURS PATHOLOGIQUES DE WSS .....	30
FIGURE 11 : CONVERSION PHENOTYPIQUE DES CMLV LORS DE LA FORMATION D'UN AIC .....	33
FIGURE 12 : ACTIVATION ET FONCTIONS DES MACROPHAGES DANS LES AIC .....	35
FIGURE 13 : PRINCIPAUX MODELES D'INDUCTION D'AIC CHEZ LE PETIT ANIMAL .....	38
FIGURE 14 : RELATION ENTRE LA FREQUENCE DES VARIANTS GENETIQUES ET LEURS EFFETS SUR LA PATHOLOGIE .....	44
FIGURE 15 : STRUCTURE PROTEIQUE D'ANGPTL6 .....	52
FIGURE 16 : STRUCTURE PROTEIQUE DE CTSO.....	57
FIGURE 17 : LOCALISATION ET ROLE DES CATHEPSINES EN INTRA ET EN EXTRACELLULAIRE .....	59
FIGURE 18 : ACTIVITE DES CATHEPSINES DANS LA PAROI ARTERIELLE LESEE .....	61
FIGURE 19 : ANGIOGENESE RETINIENNE CHEZ LES NOUVEAU-NES ANGPTL6 <sup>WT/WT</sup> ET ANGPTL6 <sup>Δ/Δ</sup> .....	80
FIGURE 20 : ROLE D'ANGPTL6 DANS L'ADHESION ET LA MIGRATION DES CMLV IN VITRO .....	81
FIGURE 21 : ROLE ANGPTL6 SUR LE PHENOTYPE ET LA CONTRACTILITE DES CMLV IN VITRO .....	83
FIGURE 23 : TONUS MYOGENIQUE ET COMPLIANCE DES ARTERES CEREBRALES DES SOURIS ANGPTL6-KI .....	85
FIGURE 24 : DILATATION MEDIEE PAR LE FLUX DES ARTERES CEREBRALES DES SOURIS ANGPTL6-KI .....	86
FIGURE 22 : MORPHOLOGIES DES ARTERES CEREBRALES CHEZ LES SOURIS ANGPTL6-KI .....	88
FIGURE 25 : MODELE D'INDUCTION D'AIC CHEZ LES SOURIS ANGPTL6-KI .....	90

## Listes des tableaux

TABLEAU 1 : AVANTAGES, INCONVENIENTS ET LIMITES DES PRINCIPAUX MODELES ANIMAUX D'AIC.....	39
TABLEAU 2 : CAUSES D'AIC SYNDROMIQUES .....	42
TABLEAU 3 : LOCI IDENTIFIES COMME ASSOCIES AUX AIC GRACE AUX PLUS LARGES GWAS .....	46
TABLEAU 4 : VARIANTS RARES IDENTIFIES PAR SEQUENÇAGE D'EXOME ENTIER DANS DES FORMES FAMILIALES D'AIC .....	48
TABLEAU 5 : RECEPTEURS CONNUS DES DIFFERENTES ANGIOPOIETINES-LIKE ET LEUR EXPRESSION .....	53
TABLEAU 6 : LISTE DES CATHEPSINES ET LEURS TYPES D'ACTIVITE .....	56
TABLEAU 7 : LISTE DES AMORCES UTILISEES POUR LES RT-QPCR.....	77



## Avant-propos

Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein de l'équipe III de l'institut du thorax dirigée par Gervaise Loirand. Ils s'inscrivent dans le cadre d'un grand projet translationnel ayant pour but de développer des outils diagnostics et de prédiction pour la formation, l'évolution et la rupture d'anévrisme<sup>1,2</sup>. Ce projet regroupe plusieurs composantes de l'institut du thorax : le service de neuroradiologie du CHU de Nantes accompagné du centre d'investigation clinique ainsi que l'équipe I (Génétique humaine) et l'équipe III (Maladies vasculaires et pulmonaires) de l'unité de recherche.

D'abord partis du recrutement de quelques formes familiales d'anévrismes grâce au projet GAIA (Genetics of intracranial aneurysm), les neuroradiologues du CHU de Nantes ont pu étendre, en intégrant les cas sporadiques, cette cohorte grâce au projet ICAN (IntraCranial ANeurysm)<sup>1</sup>. Cette biocollection comprend maintenant plus de 3000 patients, avec pour chaque individu des données cliniques, biologiques et d'imagerie. Cette cohorte ne cesse de s'agrandir avec notamment le projet UCAN (Unruptured Cerebral ANeurysm) visant à acquérir les données précédemment listées, mais cette fois-ci dans le cadre du suivi du patient<sup>2</sup>. Grâce à une étroite collaboration entre toutes les parties prenantes, nous avons pu mettre en évidence des gènes d'intérêt dans des formes familiales d'anévrisme et explorer leurs fonctions.

Arrivée au sein de l'équipe III en 2018 lors de mon stage de master 1, dans le cadre d'un double parcours médecine-sciences, j'ai pu apprécier l'évolution de ce projet depuis ce moment. Mon travail durant ce doctorat a été de déterminer, par des techniques *in vitro* et *in vivo*, le rôle des protéines codées par les gènes *ANGPTL6* et *CTSO* et de caractériser l'impact de leurs variants rares, identifiés dans des formes familiales d'anévrismes.



# *INTRODUCTION*





## I. Les anévrismes intracrâniens

L'anévrisme intracrânien (AIC) est défini comme une déformation, le plus souvent de forme sacculaire, associée à un amincissement de la paroi des artères cérébrales. Il se développe préférentiellement au niveau des bifurcations du cercle artériel de la base du cerveau, appelé polygone de Willis (Figure 1A)<sup>3</sup>. Environ un tiers des AIC sont localisés sur l'artère cérébrale antérieure, notamment sur la communicante antérieure. L'artère cérébrale moyenne est le siège de 26% des AIC et l'artère carotide interne de 25%, dont la plupart se situent à la naissance de l'artère ophtalmique. La circulation postérieure dans sa globalité rassemble 19% des AIC<sup>4,5</sup>.

### 1. *Données cliniques*

#### A. *Epidémiologie*

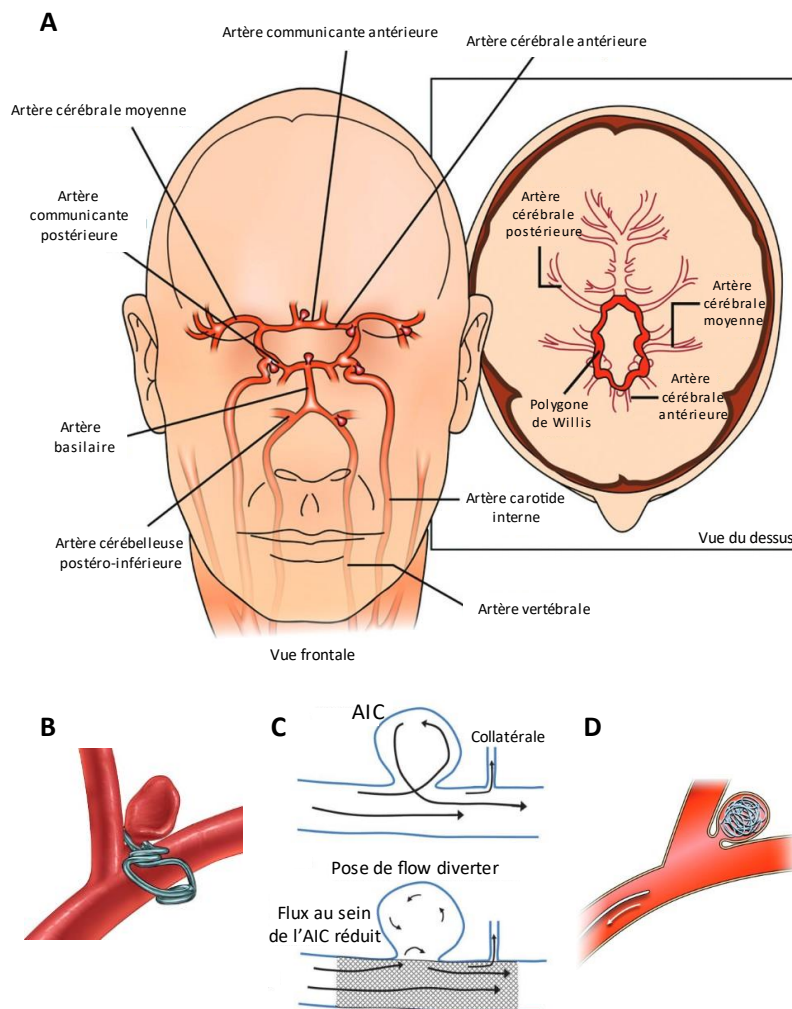
La prévalence des AIC dans la population générale est évaluée à 3,2%<sup>6</sup>. Il ne s'agit que d'une estimation puisque, la plupart des AIC sont asymptomatiques et sont souvent découverts de façon fortuite lors d'une imagerie cérébrale. Seulement 3% des patients porteurs d'AIC présentent des symptômes tels que des céphalées, des nausées et/ou des troubles neurologiques (visuels, sensitifs, etc) dus à la compression exercée par la déformation vasculaire sur différentes zones du cerveau<sup>7,8</sup>.

L'AIC devient inévitablement symptomatique quand il se rompt. La rupture d'un AIC provoque une hémorragie sous-arachnoïdienne (HSA), qui constitue une urgence vitale. La survenue d'une HSA entraîne le décès du patient dans 30 à 40% des cas, et la moitié des survivants présentent de graves séquelles, telles que des troubles moteurs et/ou cognitifs<sup>9</sup>. Quarante-cinq pour cent des HSA ont pour origine la rupture d'un AIC<sup>3,10,11</sup>.

#### B. *Traitements préventifs de la rupture d'AIC*

Dans la plupart des cas, le ou les AIC sont simplement surveillés par imagerie cérébrale régulière et ce n'est que selon les caractéristiques et/ou l'évolution du ou des AIC qu'une intervention est envisagée. La décision de traiter de façon préventive afin d'éviter la rupture d'un AIC appartient à l'équipe médicale, puisqu'aucune recommandation officielle n'existe à l'heure actuelle<sup>7</sup>. Le traitement actuel des AIC non rompus est invasif, neurochirurgical ou endovasculaire. La neurochirurgie consiste en l'occlusion de l'AIC par la pose d'un « clip »

pour fermer le collet anévrismal (Figure 1B). La neuroradiologie interventionnelle utilise la voie endovasculaire. Il existe deux types de traitement endovasculaire : la diversion de flux et l'embolisation. La diversion de flux est réalisée grâce à la mise en place d'un « flow diverter », une endoprothèse vasculaire en forme de tube (stent) qui canalise le flux sanguin dans l'artère porteuse (Figure 1C). La diversion du flux ainsi produite peut même, dans certains cas, permettre la régression de l'AIC. L'embolisation consiste en l'introduction de spires de platine, appelées « coils » ou d'un « plug » pour boucher le sac anévrismal (Figure 1D)<sup>4,12</sup>. Une récente méta-analyse ayant pour but de comparer ces deux techniques endovasculaires, a mis en évidence que la diversion de flux entraîne moins de nécessité de traiter une nouvelle fois le patient mais que l'embolisation par coil présente moins de risques d'incidents peropératoires (hémorragies, ischémies, etc.)<sup>13</sup>.



**Figure 1 : Localisation des AIC et traitements préventifs à la rupture d'AIC**

A : Le polygone de Willis humain et les localisations préférentielles des AIC . B-D : Les traitements des AIC non rompus : par abord externe en clippant le collet de l'AIC (B) ou par voie endovasculaire avec le « flow diverter » (C) avant (en haut) et après (en bas) sa mise en place et l'embolisation par coiling (D) de l'AIC.

A-B-D d'après Brown and Broderick, 2014<sup>7</sup> et C d'après Dholakia et al, 2017<sup>14</sup>.

C. Facteurs de risque d'AIC

a. Facteurs de risque de survenue d'AIC

Bien que l'origine des AIC ne soit pas clairement établie, elle est vraisemblablement multifactorielle et des facteurs de risque ont clairement été identifiés : le sexe féminin (avec un rapport d'environ 3 femmes pour 2 hommes<sup>6</sup>), le vieillissement, l'antécédent familial, qui sont des facteurs de risque non modifiables mais aussi la consommation de tabac et l'hypertension artérielle (HTA) qui sont, eux, modifiables<sup>6,15</sup>.

Comme toute pathologie cardiovasculaire, le vieillissement est un facteur de risque de présence d'AIC. Plus le patient est âgé, plus son risque d'avoir un AIC est élevé<sup>16</sup>. Cependant, cette augmentation de prévalence des AIC avec l'âge n'est significative qu'en comparaison avec les groupes de personnes très jeunes. En effet, même après ajustement du sexe et des comorbidités la prévalence des AIC reste stable chez les patients de plus de 50 ans (de 0,4 à 3 %). Ce n'est que chez ceux de moins de 30 ans qu'elle est significativement plus faible (0,01 %)<sup>6</sup>.

La consommation de tabac augmente aussi le risque de formation d'AIC<sup>17</sup>. Une étude récente rapporte une proportion de fumeurs actifs de 44,3 % dans une cohorte de 7992 patients porteurs d'AIC, soit plus du double de celle de la population de référence (19,8 %)<sup>18</sup>.

L'identification de l'HTA comme facteur de risque d'AIC est basée sur l'augmentation de sa prévalence chez les patients porteurs d'AIC que dans la population générale (environ 43% contre 25%)<sup>19</sup>. L'HTA est également associée à une augmentation du risque de multiplicité des AIC, avec une prévalence de l'HTA qui atteint 61% chez les patients porteurs de plusieurs AIC. Des études expérimentales ont confirmé ces données cliniques en montrant l'impact d'une pression artérielle systolique élevée sur la formation des AIC chez les rongeurs et les primates<sup>20,21</sup>.

Le principal facteur de risque d'être porteur d'AIC reste l'antécédent familial avec un risque relatif multiplié par 4. Il s'agit d'une forme familiale lorsque deux apparentés au premier degré sont atteints. Ces formes représentent 10 % des AIC<sup>22-24</sup>.

## b. Facteurs de risque de rupture d'AIC

Aujourd'hui, aucun moyen fiable ne permet de prédire l'évolution d'un AIC, ni son risque de rupture<sup>5</sup>. L'évaluation du risque de rupture se fait au cas par cas en se basant sur des données cliniques et d'imagerie.

La grande taille des AIC, et par extension la symptomatologie, ont longtemps été décrites comme des facteurs de risque de rupture de l'AIC<sup>24</sup>. Ce paramètre est aujourd'hui de plus en plus contesté. La croissance et l'évolution d'un AIC apparaissent maintenant comme des paramètres plus importants à prendre en compte afin d'évaluer le risque de rupture<sup>25</sup>. En effet, indépendamment de sa taille, un AIC qui croît a un risque de rupture de 3,1 % alors qu'il est de 0,1 % pour un AIC dont la taille reste stable dans le temps<sup>26</sup>.

Outre l'évolution de la taille, les AIC de forme irrégulière ont plus de risque de se rompre que les AIC avec une paroi lisse et régulière<sup>27</sup>. Actuellement des études portent sur l'utilisation du gadolinium en prise de contraste en imagerie par résonance magnétique donnant accès à l'instabilité structurelle de la paroi<sup>28</sup>. Cette technique prometteuse pourrait ainsi permettre de repérer les AIC à haut risque de rupture.

La localisation des AIC est également un facteur influençant le risque de rupture. Les AIC présents dans la circulation postérieure ont notamment un risque de rupture plus élevé que ceux de la circulation antérieure (1,80 % contre 0,75 % de risque)<sup>5,27</sup>.

Le statut tabagique du patient est aussi à prendre en compte lors de l'évaluation du risque de rupture. En effet, les AIC ont un risque augmenté de rupture chez les fumeurs actifs<sup>29</sup>. L'âge médian de rupture est également plus précoce chez les fumeurs (50 ans) que chez les non-fumeurs (55 ans) ou les anciens fumeurs (54 ans), ce qui suggère une réversibilité de l'effet du tabac sur le risque de rupture<sup>18</sup>. La consommation d'autres substances telles que l'alcool, la cocaïne ou la caféine peuvent également favoriser la rupture d'un AIC, probablement à cause de l'augmentation transitoire de la pression artérielle au moment de la consommation<sup>6,30,31</sup>. De même, l'HTA, si elle n'est pas contrôlée, reste aussi un facteur de risque important de rupture d'AIC<sup>32</sup>.

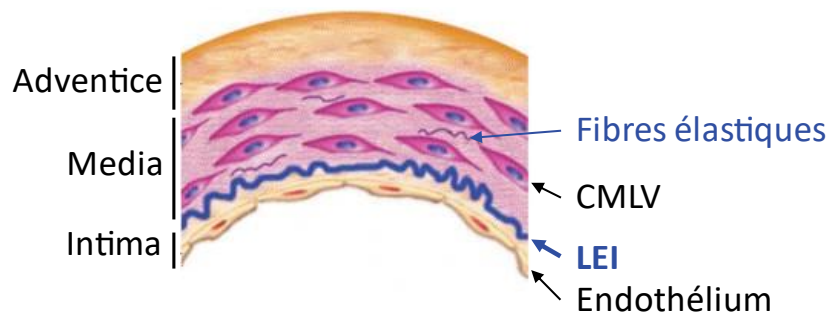
D'autres facteurs sont associés à un risque accru de rupture tels que la multiplicité des AIC, l'âge élevé du patient et le sexe féminin<sup>4,33</sup>. Les antécédents familiaux d'HSA entraînent également une augmentation du risque de rupture d'AIC.

## 2. Physiopathologie des AIC

### A. Spécificité des artères cérébrales

#### a. Histologie

Les artères cérébrales sont des artères de résistance. La paroi de ce type d'artères est riche en cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), réparties en une ou plusieurs couches qui constituent la media, et dont l'activité contractile est responsable du tonus artériel et de la résistance vasculaire périphérique<sup>34</sup>. L'endothélium vasculaire est constitué d'une monocouche de cellules endothéliales. La paroi des artères de résistance présente, en général, deux limitantes élastiques : la limitante élastique interne (LEI) entre l'intima et la media et la limitante élastique externe entre la media et l'adventice. Cependant, les artères cérébrales ne sont dotées que d'une seule limitante élastique, la LEI (Figure 2). La perte de la limitante élastique externe se fait progressivement, le long de l'artère carotide interne dans sa portion intra-caverneuse<sup>34</sup>. Au niveau de la circulation postérieure, c'est dans l'artère basilaire que la perte progressive de la limitante élastique externe est observée<sup>35</sup>. Les circulations, antérieure et postérieure, s'anastomosent pour former le polygone de Willis.

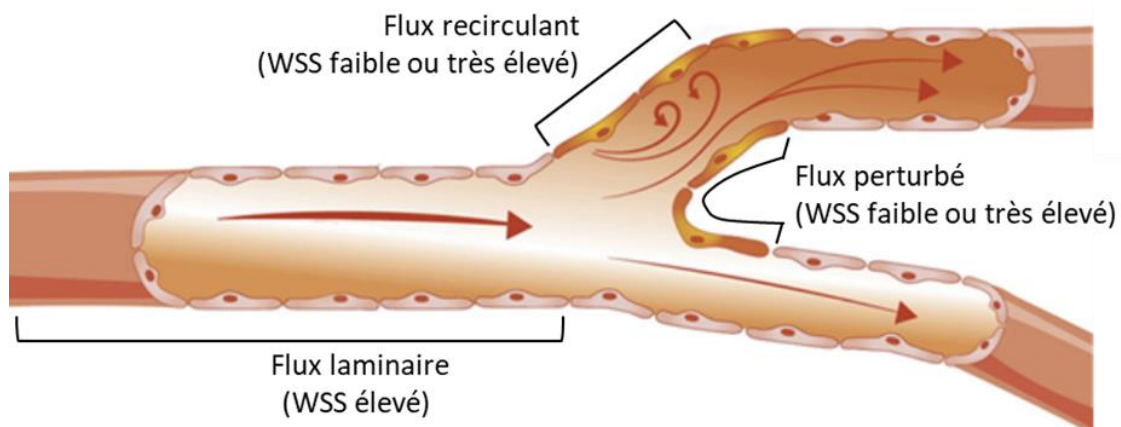


*Figure 2 : Paroi des artères cérébrales*

*Structure de la paroi d'une artère cérébrale saine en coupe transversale. D'après Yang et al, 2017<sup>36</sup>.*

## b. Hémodynamique

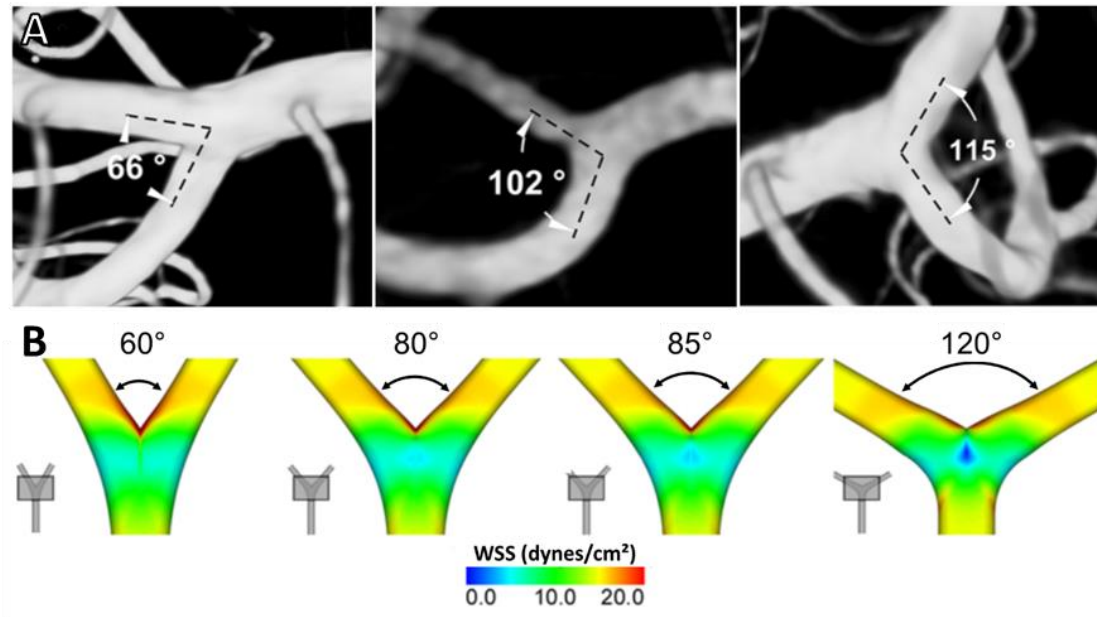
Les artères cérébrales, comme tout type de vaisseau, subissent des contraintes hémodynamiques : la pression et les contraintes de cisaillement pariétales (ou *wall shear stress*, WSS). La pression sanguine engendre un étirement cyclique ressenti par toutes les cellules de la paroi artérielle et en particulier les CMLV<sup>37</sup>. Le WSS, généré par le flux sanguin, provient du frottement du sang, fluide visqueux, contre les cellules endothéliales. Dans les portions linéaires des artères, le flux sanguin est laminaire et génère un WSS élevé et unidirectionnel tangentiel à la surface endothéliale. Les bifurcations artérielles induisent une altération de ce flux, avec des phénomènes de recirculation, et qui devient alors oscillant ou turbulent, générant un WSS soit faible, soit très élevé (Figure 3). Ces perturbations du WSS sont accentuées par l'élévation de la pression artérielle, l'augmentation du débit sanguin et dépendent également de la géométrie, en particulier l'angle des bifurcations<sup>38</sup>.



*Figure 3 : Flux et WSS dans une portion linéaire et au niveau d'une bifurcation artérielle*  
*Les cellules endothéliales sont schématisées au niveau de la lumière de l'artère. D'après Bibli al, 2020<sup>39</sup>*

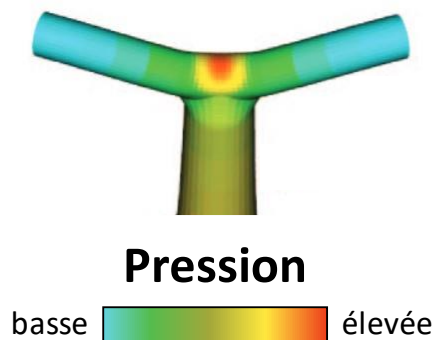
Au niveau du polygone de Willis, la géométrie des bifurcations artérielles est particulière, en comparaison aux autres artères de résistance. Alors que les angles de bifurcation sont plutôt fermés pour les artères de la circulation générale ( $<30^\circ$ ), les angles observés au niveau des bifurcations des artères cérébrales sont très ouverts, souvent obtus (Figure 4A).

Ces bifurcations très ouvertes donnent lieu à des variations importantes des contraintes hémodynamiques, avec des profils particuliers au niveau de l'apex et de ses parties adjacentes<sup>38</sup>. La modélisation numérique de la dynamique des fluides (CFD) révèle notamment une zone étendue de WSS élevé dans la région apicale de la bifurcation (Figure 4B).



*Figure 4 : Exemples de bifurcation de l'artère cérébrale moyenne humaine et modélisation du WSS*  
 A : Les angles sont indiqués pour les trois bifurcations (angiographie 3D). B : CFD de l'influence de l'angle d'une bifurcation symétrique sur les valeurs du WSS. La valeur du WSS est représentée par une échelle de couleur allant du bleu (faible) au rouge (élevée). D'après Lauric al., 2018<sup>38</sup>.

Ce profil particulier de WSS dans les bifurcations ouvertes est associé à des valeurs de pression élevée au niveau de l'apex et des segments adjacents (Figure 5).



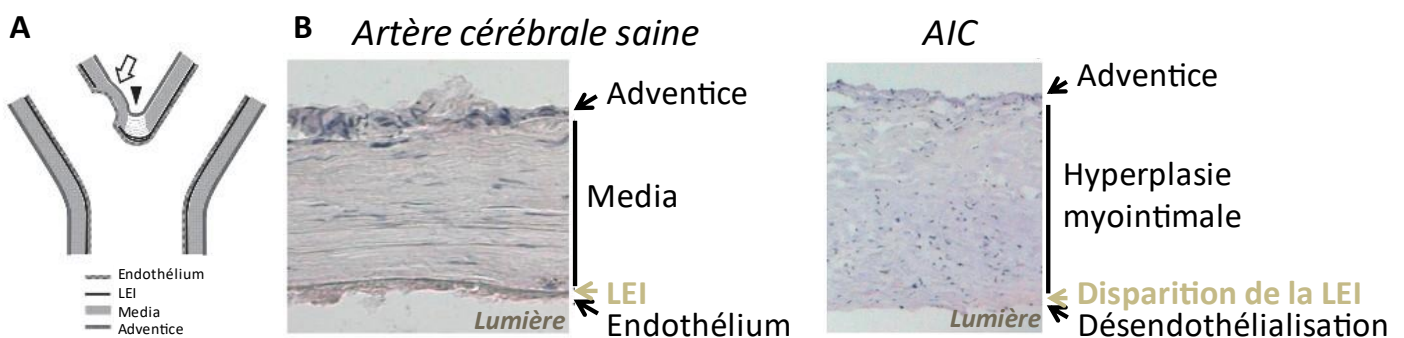
*Figure 5 : Modélisation du profil de pression dans une bifurcation d'artère cérébrale*  
 La valeur de la pression, ici modélisée dans une bifurcation symétrique, est représentée par une échelle de couleur allant du bleu (faible) au rouge (élevée). D'après Alnæs et al, 2007<sup>40</sup>.



## B. Remodelage de la paroi au niveau de l'AIC

### a. Description générale de la paroi de l'AIC

La formation d'un AIC découle d'un remodelage de la paroi des artères cérébrales localisée à proximité immédiate de l'apex d'une bifurcation qui peut s'accompagner d'un remaniement de la paroi au niveau de l'apex, notamment une duplication de la LEI (Figure 6A)<sup>41</sup>. La fragmentation de cette LEI, puis à sa disparition au niveau du dôme signe la formation de l'AIC (Figure 6)<sup>31</sup>. Les cellules endothéliales normalement jointives et adhérentes à leur lame basale, présentent une perméabilité intercellulaire et certaines zones de la paroi présentent même une disparition de ces cellules endothéliales. Structuellement, la surface en contact avec la lumière du vaisseau apparaît irrégulière et désordonnée<sup>31</sup>. Avec la perte de la LEI, des CMLV sont retrouvées dans l'intima (probablement suite à leur migration depuis la media et leur prolifération), formant une hyperplasie myointimale avec un épaissement globale de la paroi lors des étapes précoces de la formation de l'AIC (Figure 6B)<sup>42</sup>. Dans des AIC plus évolués, les observations ont relevé que les CMLV ne présentaient plus un phénotype contractile mais un phénotype sécrétant<sup>43</sup>. Ce changement phénotypique et morphologique est associé à la présence d'un remodelage de la matrice extracellulaire (MEC). Dans les AIC au plus proche de la rupture voire rompus, une apoptose des CMLV a été observée, associé à un amincissement de la paroi<sup>44</sup>. A chaque étape de l'évolution du dôme anévrismal un infiltrat inflammatoire a pu être identifié, en particulier des macrophages. Ces macrophages sont associés à la présence d'enzymes qui dégradent la MEC, les métalloprotéinases matricielles (MMP), notamment les MMP2 et 9, et donc au remodelage matricielle<sup>41,45</sup>.



**Figure 6 : Localisation et modifications pariétales typiques des AIC**

A : Localisation de l'initiation de la formation d'un AIC. Site d'initiation d'un AIC (flèche blanche) entraînant la disparition de la LEI et un remaniement de la media au niveau de l'apex de la bifurcation et une duplication de la LEI. (pointe de flèche noire). B : Histologie d'une artère cérébrale saine humaine à gauche et de la paroi d'un AIC à droite. Remodelage de la paroi d'une artère cérébrale lors de la formation d'un AIC. Modifié, d'après Tulamo et al, 2018<sup>41</sup>

b. Rôle des contraintes hémodynamiques et de l'endothélium dans la formation des AIC

i. Contraintes hémodynamiques et formation des AIC

Les AIC se forment dans les zones adjacentes à l'apex des bifurcations (Figure 6A), là où le WSS est élevé (Figure 4B), suggérant qu'il pourrait exister une relation entre WSS élevé et initiation des AIC<sup>46,47</sup>. Expérimentalement, il a été montré que la création d'une bifurcation sur l'artère carotide par chirurgie chez le chien permet de reproduire, là où le WSS est élevé, un remodelage de la paroi similaire à celle observée lors de la formation d'un AIC, avec une hyperplasie myointimale au niveau de l'apex de la bifurcation et une destruction de la LEI dans les zones adjacentes<sup>48</sup>. *In vitro*, les cellules endothéliales cultivées dans un système mimant une bifurcation migrent du WSS le plus faible vers le WSS le plus élevé et s'accumulent en aval de la zone où le WSS est maximal<sup>49</sup>. Ce phénomène suggère qu'*in vivo* les cellules endothéliales vont avoir tendance à s'éloigner des zones où le WSS est faible, ce qui favoriserait un remodelage pariétal au niveau de cette zone.

Ainsi, il est actuellement admis qu'un défaut d'adaptation aux contraintes hémodynamiques ou à leur variation au niveau des bifurcations des artères cérébrales pourrait être à l'origine du remodelage subit de la paroi initiant la formation d'un AIC, mais les mécanismes qui en sont responsables ne sont pas identifiés<sup>37,48,50</sup>.

## ii. Cellules endothéliales et WSS

L'endothélium vasculaire joue un rôle majeur dans l'homéostasie et la physiologie vasculaire en formant une barrière physique entre le sang et la paroi, en contrôlant la contraction des CMLV sous-jacentes et ainsi le tonus vasculaire, et en exerçant une fonction anti-agrégante et antithrombotique. La structure de l'endothélium et les fonctions des cellules endothéliales sont fortement dépendantes du WSS.

Les cellules endothéliales disposent, en effet, de mécano-senseurs qui leur permettent de ressentir les forces mécaniques auxquelles elles sont soumises<sup>51</sup>. Ces mécano-senseurs peuvent être des protéines membranaires telles que des récepteurs couplés aux protéines G ou des canaux ioniques mais aussi des structures de la membrane elle-même comme notamment le cil primaire, qui est une extension de la membrane plasmique soutenue par des microtubules<sup>37,52</sup>. Un des phénomènes illustrant la mécanotransduction, c'est-à-dire la traduction de stimuli mécaniques en signaux biologiques intracellulaires, est l'alignement des cellules endothéliales dans le sens du flux dans les portions linéaires des artères soumises à des conditions physiologiques de flux laminaire qui génèrent un WSS unidirectionnel élevé<sup>53</sup>.

Ces conditions de flux laminaire sont déterminantes dans la régulation du tonus vasculaire via la stimulation de la NO synthase endothéliale (eNOS) et la production du monoxyde d'azote (ou *nitric oxide*, NO). Le NO, en agissant sur les CMLV, favorise leur relaxation. La voie du NO est la principale composante de la vasodilatation médiée par le flux<sup>54</sup>. Il existe cependant d'autres voies indépendantes du NO menant à la relaxation des CMLV comme par exemple celle des prostaglandines (prostacycline, PGI<sub>2</sub>) ou celle de l'endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) (Figure 7).

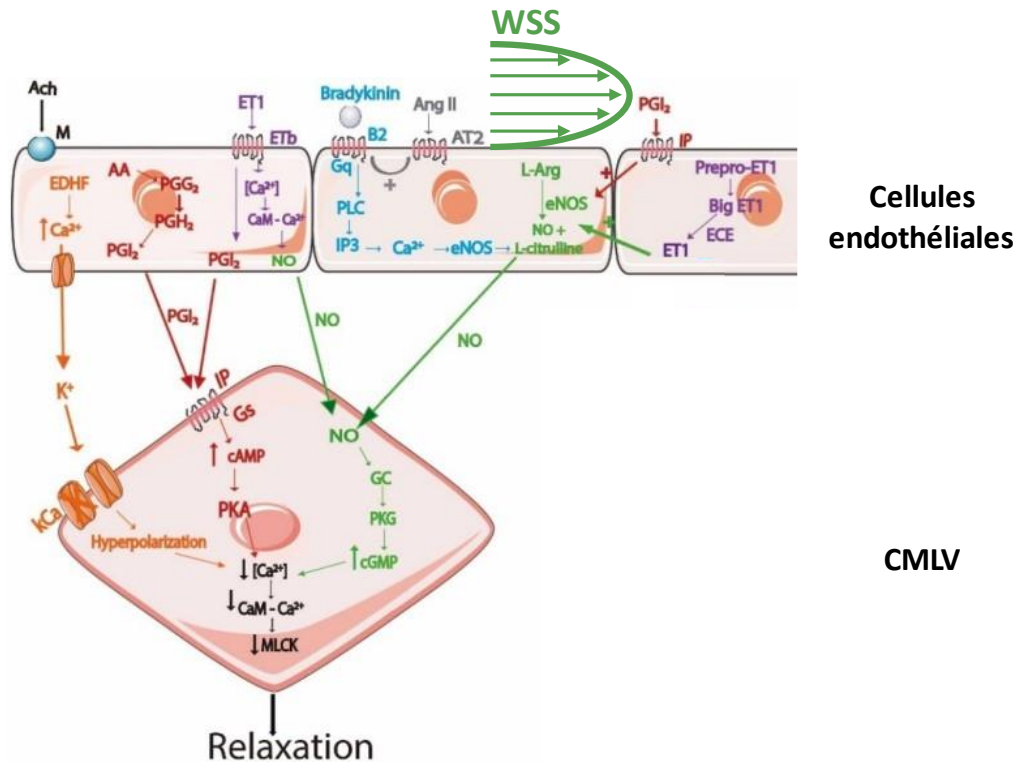


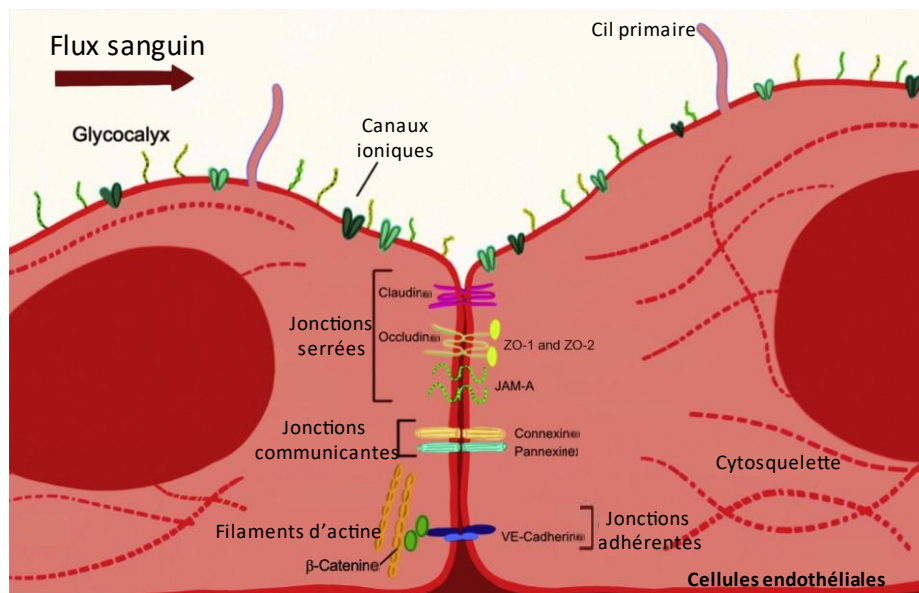
Figure 7 : Voies impliquées dans la régulation de la relaxation des CMLV par l'endothélium

Plusieurs voies endothéliales permettent la relaxation des CMLV. L'EDHF (en orange) par augmentation du calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracellulaire permet la libération de l'ion potassium ( $\text{K}^+$ ) par les CMLV ce qui hyperpolarise leur membrane et donc mène à l'inactivation des leurs canaux calciques voltage-dépendants. L'acide arachidonique (AA, en rouge) est transformé en prostaglandine G2 (PGG2) puis en prostaglandine H2 (PGH2) qui elle-même est transformée en prostacycline (PGI2). La PGI2 active, via un récepteur couplé aux protéines G (IP, Gs), l'adénylate cyclase membranaire qui contribue à l'augmentation de l'AMP cyclique (cAMP) dans les CMLV, ce qui entraîne l'activation de la protéine kinase A (PKA). IP est également présent sur la membrane des cellules endothéliales et lorsque la PGI2 l'active, cela a pour effet d'activer la eNOS. L'endothéline 1 (ET1, en violet), lorsqu'elle agit sur son récepteur B (ETb), a pour effet d'augmenter le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Celui-ci s'associe à la calmoduline (CaM), ce qui augmente l'activité de la eNOS. L'ET1 produite directement par les cellules endothéliales va avoir ce même rôle. Lorsque la bradykinine (en bleu) et l'angiotensine II (AngII, en gris) se lie respectivement à leurs récepteurs couplés aux protéines G (B2, Gq et AT2), la phospholipase C s'active et clive le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate en diacylglycérol et en inositol trisphosphate (IP3), ce qui a pour effet d'activer le relargage de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol puis d'activer la eNOS. Le WSS (en vert) ressenti par les cellules endothéliales active également eNOS. L'acétylcholine (en noir), en agissant sur ses récepteurs muscariniques (M), augmente aussi l'activité de la eNOS. Activée par ces différentes voies, la eNOS catalyse la réaction de la transformation de la L-arginine (L-Arg) en NO + L-citrulline et induit donc la libération du NO par les cellules endothéliales. Ce NO a pour effet d'activer la guanylate cyclase cytosolique des CMLV, ce qui augmente la production de GMP cyclique (cGMP) et donc l'activation de la protéine kinase G (PKG). La PKA et la PKG accélèrent la recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  par le réticulum sarcoplasmique. La concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique diminue, ce qui entraîne la relaxation des CMLV par baisse d'activité de la kinase des chaînes légères de myosine (MLCK). Modifié, d'après Mangana et al, 2021<sup>54</sup>.

Ces conditions de flux laminaire permettent également de maintenir le phénotype quiescent, anti-thrombotique et anti-inflammatoire des cellules endothéliales par la mise en jeu de différentes voies de signalisation<sup>55</sup>. Une famille de facteur de transcription, les Kruppel-like factor (KLF), notamment KLF2, apparaît comme prépondérante dans cette régulation. En effet, KLF2, dont l'expression augmente avec l'intensité du WSS, entraîne la transcription de la eNOS et l'inhibition de la transcription de gènes pro-inflammatoires tels que la molécule d'adhésion intracellulaire-1 (ICAM-1) ou la MMP9<sup>56,57</sup>. La régulation négative exercée par le

WSS élevé sur l'activation du facteur de transcription nucléaire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) joue également un rôle dans l'effet anti-inflammatoire du flux laminaire<sup>58</sup>. Le flux laminaire active les voies prolifératives d'AKT, de la protéine kinase C (PKC) et des kinases régulées par un signal extracellulaire 1 et 2 (ERK 1/2) et la voie antimitotique de la protéine kinase AMP-dépendante (AMPK). Cette activation simultanée participe à la quiescence des cellules endothéliales grâce au maintien de l'équilibre entre ces deux types de voies opposées. Cet équilibre est rompu dans des régimes de flux turbulents<sup>59</sup>.

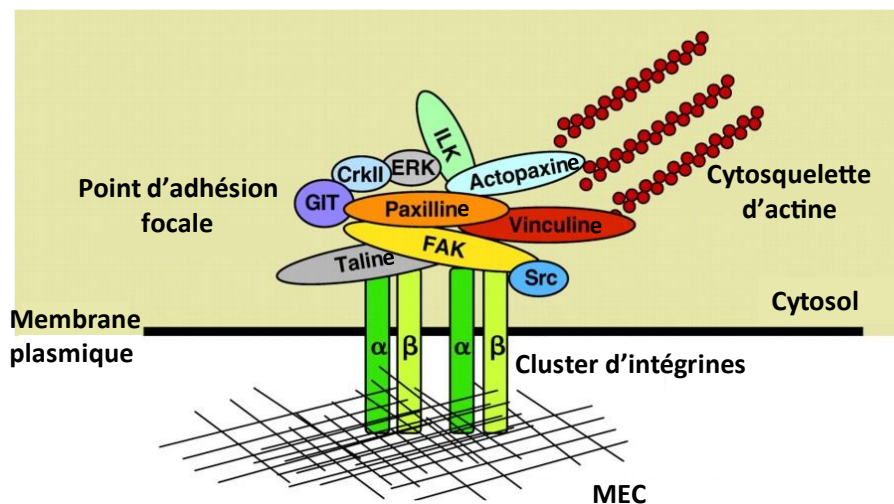
Dans un régime de WSS unidirectionnel élevé, les cellules endothéliales sont jointives et alignées pour assurer une fonction de barrière entre le sang circulant, la paroi et les tissus sous-jacents grâce à l'établissement de jonctions intercellulaires, serrées et adhérentes (Figure 8). Les jonctions serrées mettent en jeu les occludines et les claudines, protéines membranaires mais aussi des protéines intracellulaires, telles que zonula occludens-1 (ZO-1), assurant leur liaison avec les filaments d'actine. Les jonctions adhérentes comprennent notamment la cadhérine endothéliale vasculaire (VE-cadhérine) transmembranaire, liée à la  $\beta$ -caténine par sa partie intracellulaire<sup>60</sup>. Il existe également des jonctions communicantes qui permettent les échanges entre le cytoplasme de deux cellules adjacentes<sup>61</sup>.



**Figure 8 : Les jonctions intercellulaires des cellules endothéliales**

Les cellules endothéliales sont sensibles au flux sanguin grâce à différentes structures présentes sur leur côté apical, notamment le glycocalyx, le cil primaire et des canaux ioniques. Les jonctions intercellulaires permettent, grâce aux interactions homophiliques, à deux cellules adjacentes de communiquer, physiquement ou chimiquement. Les jonctions serrées mettent en jeu des protéines transmembranaires : la claudine, l'occludine ou la junctional adhesion molecule A (JAM-A) et des protéines intracellulaires participent au complexe, notamment ZO-1 et ZO-2. Les jonctions communicantes ou GAP font intervenir la connexine ou la pannexine. Les jonctions adhérentes sont constituées de la VE-cadhérine en transmembranaire et de la  $\beta$ -caténine en intracellulaire qui permet la liaison avec le cytosquelette d'actine. D'après Ashby et Mack, 2021<sup>62</sup>

En plus des adhésions intercellulaires, les cellules endothéliales sont attachées à leur lame basale via des points d'adhésion focaux mettant en jeu des protéines transmembranaires dimériques, les intégrines, qui se lient aux protéines de la MEC. De leur côté intracellulaire, les intégrines sont liées à un complexe rassemblant la taline, la kinase d'adhésion focale (FAK), la paxilline et la vinculine<sup>63</sup>. C'est via ce complexe que les intégrines sont reliées au cytosquelette d'actine (Figure 9). Ces points d'ancrage sont nécessaires pour le maintien de l'intégrité vasculaire<sup>64</sup>. Les intégrines peuvent générer des signaux extérieur-intérieur, lorsqu'un ligand extracellulaire ou la MEC se lie à l'intégrine, cela déclenche des modifications intracellulaires, notamment du cytosquelette. Elles peuvent aussi générer des signaux intérieur-extérieur, la liaison de la taline leur permettant de se regrouper sous forme de cluster afin de promouvoir l'adhésion à la MEC ou la migration cellulaire par exemple<sup>65</sup>.



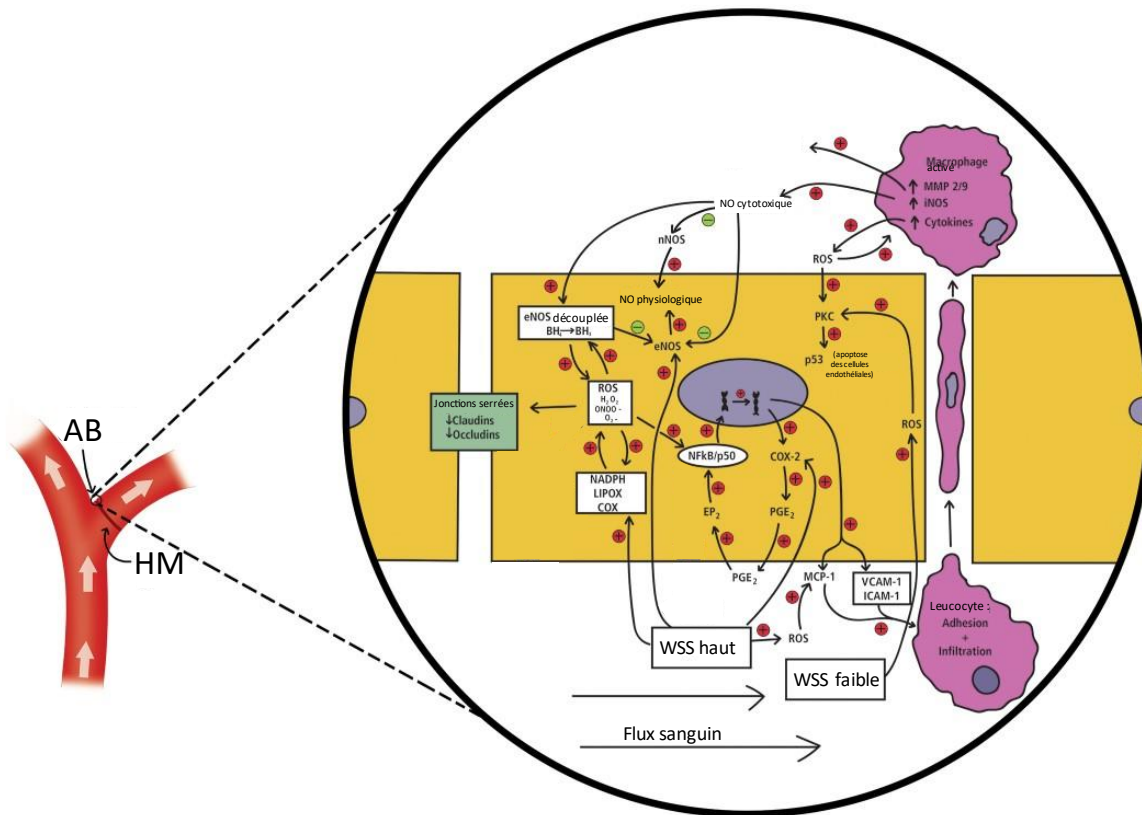
*Figure 9 : Les points focaux d'adhésion à la MEC*

*Les points focaux d'adhésion permettent l'attachement de la cellule à la MEC. Les intégrines sont constituées de deux sous-unités :  $\alpha$  et  $\beta$ . De leur côté extracellulaire, elles effectuent des liaisons hétérophiliques avec des protéines de la MEC comme la fibronectine ou la vitronectine. Du côté intracellulaire, tout un complexe leur est lié, il est composé de la taline, FAK, Src, la vinculine, la paxilline, ERK, etc... Ce complexe permet la liaison avec le cytosquelette d'actine. D'après Deakin et Turner, 2008<sup>66</sup>*

A l'inverse du rôle protecteur du flux laminaire et du WSS unidirectionnel élevé sur l'intégrité fonctionnelle et structurale de l'endothélium, les flux turbulents et les valeurs de WSS faibles ou supra-physiologiques ont un effet délétère sur l'endothélium. Ces flux et WSS anormaux et perturbés, qui sont typiquement trouvés au niveau des bifurcations des artères cérébrales (Figure 4B) participent au développement d'une « dysfonction endothéliale » (Figure 10)<sup>67</sup>. Cette dysfonction endothéliale, qui résulte de l'activation de mécanismes multiples, est caractérisée par un déséquilibre de la production de molécules vasoactives par les cellules endothéliales en faveur des vasoconstricteurs, d'une inflammation et d'un état pro-



thrombotique. Elle participe systématiquement à la phase précoce de tout remodelage vasculaire, et son rôle dans la formation des AIC a été proposé (Figure 10)<sup>58</sup>.



**Figure 10 : Voies de signalisation endothéliales potentialisées par des valeurs pathologiques de WSS**  
 A gauche, une bifurcation d'artères cérébrales avec une hyperplasie myointimale (HM) au niveau des parties adjacentes de l'apex de la bifurcation (AB). A droite, l'endothélium à l'échelle cellulaire. Le WSS trop élevé provoque la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui vont induire le relargage de cytokines pro-inflammatoires telles que la protéine chimioattractante monocytaire 1 (MCP-1). Ce type de WSS entraîne une augmentation de l'expression des enzymes du stress oxydant telles que la NADPH oxydase ou la cyclooxygénase de type 2 (COX-2) qui vont entretenir l'élévation des ROS. Les ROS vont contribuer à une régulation négative des jonctions serrées et donc à une perméabilité accrue de l'endothélium. Ajouté à cela, les trop faibles valeurs de WSS, entraînant également une augmentation des ROS, facilitent le passage en transendothélial de leucocytes circulants qui vont, une fois résidents dans la paroi, sécréter des facteurs pro-inflammatoires tels que les MMP2 et 9, la NOS inductible (iNOS) et d'autres cytokines. Le NO devient cytotoxique car il est produit en trop grande quantité, il va participer au découplage de la eNOS qui produit normalement le NO physiologique. Modifié, d'après Sheinberg et al, 2019<sup>58</sup>

L'endothélium dysfonctionnel et inflammatoire présente une diminution de l'expression et de l'activité de la eNOS, conduisant à une réduction du NO endothélial. A l'inverse, une grande quantité de NO « inflammatoire » et cytotoxique pour les cellules endothéliales est produite par la NOS inductible (iNOS) exprimée par les cellules inflammatoires qui sont recrutées à la surface de l'endothélium dysfonctionnel<sup>58</sup>. Les perturbations du WSS induisent également une augmentation du stress oxydant, en particulier via la NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit) oxydase. L'augmentation du stress oxydant favorise la rupture des jonctions intercellulaires qui facilite la diapédèse des cellules immunitaires et



inflammatoires et contribue à entretenir, voire amplifier, l'inflammation<sup>58</sup>. La rupture des jonctions est caractérisée par la disparition de protéines telles que ZO-1 ou occludine, observée dès les phases précoces de formation de l'AIC dans un modèle d'induction d'AIC chez le rat<sup>68</sup>. L'expression de facteurs de transcription pro-inflammatoires tels que NF- $\kappa$ B qui induit l'expression de protéines d'adhésion comme la molécule d'adhésion cellulaire vasculaire-1 (VCAM-1), ICAM-1 ou la E-sélectine, est également augmentée, que ce soit chez l'Homme ou dans des modèles animaux, ce qui participe au maintien de l'inflammation de la paroi<sup>69</sup>.

La dysfonction endothéliale participe à la formation des AIC mais les évidences sont surtout indirectes, notamment par des études de modélisation de flux<sup>38,40</sup>. Il est donc nécessaire d'améliorer la connaissance des mécanismes qui lient la dysfonction endothéliale à la formation des AIC afin de mieux comprendre la pathogénèse des AIC<sup>58</sup>.

#### c. Rôle des CMLV dans la formation des AIC

Les CMLV présentes dans la media des artères cérébrales sont disposées en une ou plusieurs couches orientées de façon orthogonale au sens du flux sanguin. Ce sont des cellules quiescentes et contractiles, responsables du tonus vasculaire et de la résistance périphérique. Leur phénotype contractile est caractérisé par l'expression de marqueurs de différenciation spécifiques tels que l' $\alpha$ -actine musculaire lisse ( $\alpha$ -SMA), la chaîne lourde de la myosine spécifique du muscle lisse (SM-MHC), la transgeline (SM22 $\alpha$ ) et la calponine.

Cependant, ces cellules sont capables d'une grande plasticité phénotypique et de se différencier, en particulier, pour acquérir un phénotype sécrétant (ou synthétique) par la diminution d'expression des marqueurs contractiles et l'augmentation d'expression des MMP et leurs inhibiteurs (TIMP) et des modifications d'expression de constituants de la MEC comme des collagènes, des protéoglycans<sup>70</sup>. Cette transition phénotypique s'accompagne de la perte de la quiescence des CMLV, qui retrouvent une capacité à proliférer et à migrer. Par ces mécanismes, les CMLV jouent un rôle essentiel dans le remodelage physiologique (cicatrisation, réparation tissulaire) et pathologique (hypertension, athérosclérose) de la paroi artérielle.

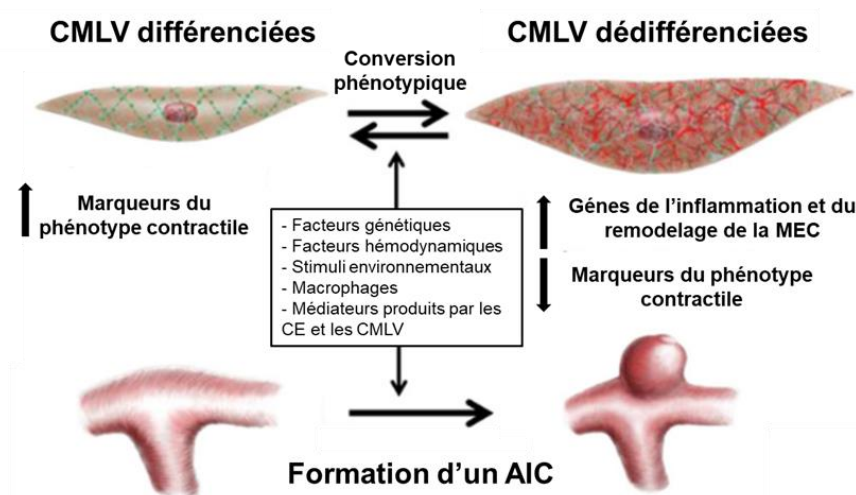
Dans une paroi artérielle saine, les CMLV sont la principale source de collagène (collagène I et III) de la paroi vasculaire<sup>71</sup>. De plus, la tension mécanique générée par leur activité

contractile est essentielle à la polymérisation du collagène et son organisation en fibrilles<sup>72</sup>, de même qu'à la polymérisation de la fibronectine<sup>73</sup> via un mécanisme dépendant des intégrines ( $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ). Les CMLV jouent ainsi un rôle majeur dans l'organisation et la composition de la média et, en conséquence, dans l'intégrité structurale de la paroi artérielle. La dédifférenciation des CMLV constitue donc un évènement crucial qui compromet l'organisation de la MEC et l'intégrité de la paroi artérielle.

Dans les parois anévrismales de pièces anatomiques humaines, l'expression des marqueurs du phénotype contractile des CMLV ( $\alpha$ -SMA, SM-MHC, ...) est diminuée<sup>74</sup>. Cette observation suggère la transition phénotypique des CMLV lors de la formation d'un AIC<sup>75-77</sup>. La perte d'expression des marqueurs phénotypiques semble s'accroître avec l'évolution vers la rupture des AIC. Elle s'associe à une désorganisation des CMLV, qui perdent leur caractère fusiforme et leur disposition parallèle les unes aux autres, et à une dégradation de la LEI, suggérant un rôle des CMLV dédifférenciées dans la disparition de cette LEI<sup>77</sup>.

Des travaux *in vitro* et *in vivo* dans des modèles expérimentaux d'AIC montrent que la perte d'expression des marqueurs de différenciation contractile des CMLV s'accompagne d'une augmentation d'expression de gènes pro-inflammatoires et impliqués dans le remodelage de la MEC, en particulier de chimiokines (protéine chimioattractante monocyttaire 1, MCP-1), des cytokines (interleukine-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ), de molécules d'adhésion (VCAM-1), de facteurs de transcription (NF- $\kappa$ B et KLF4), de protéases matricielles (MMP2, 3, 9) ainsi que de la iNOS<sup>77,78</sup> (Figure 11). Un modèle d'induction d'AIC chez le lapin a mis en évidence que les MMP2 et 9 produites par les CMLV apparaissent dans la paroi artérielle à un stade extrêmement précoce de l'initiation de l'AIC, bien avant l'infiltration de la paroi par les cellules inflammatoires<sup>79</sup>. Dans ce même modèle, l'inhibition non spécifique des MMP bloque le développement des AIC alors que la déplétion en monocytes circulants ne le bloque pas. Ce modèle suggère un rôle essentiel des CMLV dédifférenciées et de leur production de MMP dans l'initiation des AIC<sup>79</sup>. Les CMLV dédifférenciées produisent aussi des inhibiteurs des MMP, TIMP-1 et TIMP-2, mis en évidence dans un modèle d'induction d'AIC chez le rat<sup>80</sup>. Dans cette étude, des souris déficientes en TIMP-1 ou en TIMP-2 ont également été soumises à ce protocole et semblent développer des AIC plus précocement proche de la rupture que les souris sauvages. Cette étude évoque un rôle des TIMP qui pourrait être bénéfique sur la progression des AIC par un maintien de la quantité de collagène, ce qui stabiliserait la paroi<sup>80</sup>. A l'inverse, si le

déséquilibre entre MMP et TIMP est en faveur des protéases, et donc en faveur de la dégradation de la MEC, l'AIC aurait tendance à évoluer vers la rupture. En effet, si la dégradation de la MEC la paroi s'amincit et s'affaiblit ce qui la rend plus susceptible de rompre.



*Figure 11 : Conversion phénotypique des CMLV lors de la formation d'un AIC*

*Lors de la formation de l'AIC, les CMLV subissent un changement phénotypique, passant d'un phénotype contractile à un phénotype sécrétant, pro-inflammatoire et pro-remodelage. D'après Starke et al, 2014<sup>77</sup>*

D'autres facteurs et molécules produits par les CMLV dédifférenciés participent à la mise en place d'un contexte inflammatoire qui va contribuer ultérieurement à l'apoptose des CMLV et à la progression de l'AIC<sup>77</sup>. Par exemple, l'IL-1 $\beta$  est produite très précocement par les CMLV lors du développement de l'AIC dans un modèle de souris<sup>81</sup>. La production de cette cytokine apparaît comme délétère dans l'évolution des AIC. En effet, dans cette étude, les souris déficientes en IL-1 $\beta$  forment autant d'AIC que les souris sauvages mais ces AIC ont une paroi plus mince et les CMLV y sont moins nombreuses et plus éparses. L'analyse de ces AIC développés en l'absence d'IL-1 $\beta$  suggère une apoptose plus importante des CMLV et une susceptibilité accrue à la rupture<sup>81</sup>. La dédifférenciation des CMLV apparaît ainsi comme un mécanisme initiateur de la dégénérescence de la paroi artérielle et de l'inflammation qui conduisent à la formation, à la progression puis à la rupture des AIC<sup>77</sup>.

Les mécanismes de la transition phénotypique des CMLV au cours de la formation d'un AIC sont encore mal compris mais sont probablement multiples et dépendants de facteurs génétiques, inflammatoires ou environnementaux comme, par exemple, l'exposition à la fumée de cigarette<sup>82</sup>.

Quelques données expérimentales suggèrent un rôle du facteur de nécrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) dont l'expression est augmentée dans la paroi d'AIC humain<sup>83</sup>. L'inhibition du TNF $\alpha$  dans un modèle d'AIC chez le rat prévient la conversion des CMLV et réduit l'expression des marqueurs d'inflammation<sup>78</sup>.

La dédifférenciation des CMLV et la destruction de la LEI conduisent, dans un premier temps, à la migration des CMLV de la media vers l'intima<sup>43</sup>. La progression de l'AIC s'accompagne ensuite de la perte des CMLV par apoptose. L'analyse de pièces anatomiques humaines montre que les CMLV sont plus apoptotiques dans la paroi d'AIC rompus que dans la paroi d'AIC non rompus, avec un maximum d'apoptose à proximité du point de rupture au niveau du dôme de l'anévrisme<sup>44,77</sup>.

Il existe tout de même une ambivalence par rapport au phénotype des CMLV. En effet, lors de la formation de l'AIC, le phénotype sécrétant des CMLV apparaît bénéfique du point de vue de la stabilité de la paroi. L'ostéoprotégérine est une molécule soluble qui, via la voie du facteur de croissance transformant  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), augmente la synthèse de collagène et la prolifération des CMLV. Son utilisation dans un modèle d'induction d'AIC chez le rat permet de ralentir l'évolution des AIC. En effet, la paroi des AIC provenant des animaux traités à l'ostéoprotégérine, apparaissait plus stable car moins amincie et moins apoptotique<sup>84</sup>.

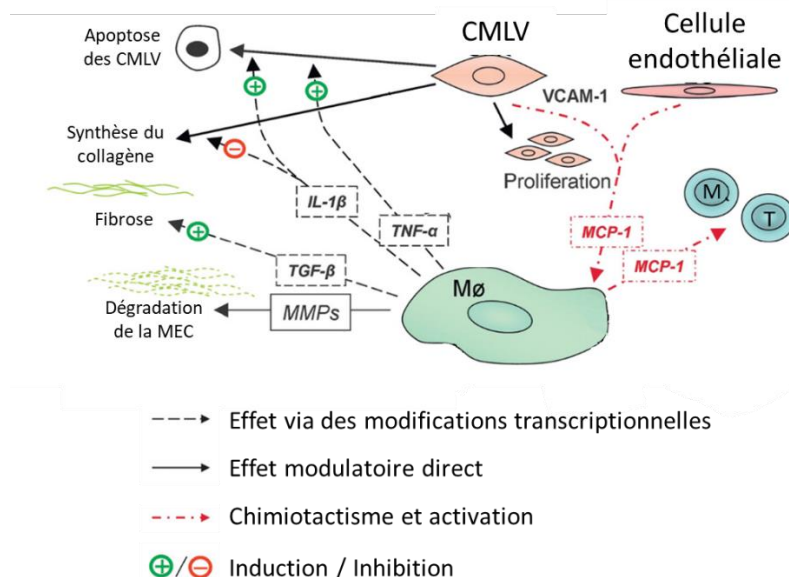
Une étude a modélisé les conditions de flux dans des AIC humains et a ensuite pu accéder aux données histologiques de ces mêmes AIC. Cette méthode a permis de mettre en évidence que le remodelage de type prolifératif était associé à un flux stable, générant un WSS uniforme. Par contre, le remodelage dégénératif de la paroi des AIC avec une perte en CMLV et une MEC désorganisée était plutôt associé à des faibles flux et à des reflux<sup>85</sup>. Cette association suggère que la modélisation du flux au sein de l'AIC pourrait nous renseigner sur l'état de la paroi des AIC, et donc sur le risque de rupture.

#### d. Rôle des cellules inflammatoires dans la formation des AIC

L'infiltration des cellules inflammatoires, en particulier des macrophages participe au développement des AIC. Des analyses histologiques de dômes anévrismaux humains ont mis en évidence que la paroi des AIC contient plus de macrophages que celle des artères saines<sup>44,86,87</sup>. De plus, des souris déplétées en macrophages développent moins d'AIC que les souris contrôles dans un modèle d'induction d'AIC par injection d'élastase (10 % contre 60 %,

respectivement) suggérant un rôle des macrophages dans la formation des AIC dans un modèle<sup>88</sup>. Comme dans d'autres pathologies cardiovasculaires, ces monocytes / macrophages pourraient être recrutés par des chimiokines libérées par les cellules de la paroi artérielle lésée. L'induction d'AIC par surcharge hémodynamique chez des souris déficientes en MCP-1 indique que cette chimiokine contribuerait au recrutement des macrophages puisque ces souris développent des AIC de taille réduite, avec une infiltration macrophagique et une expression de marqueurs pro-inflammatoires tels que MMP2, 9 et iNOS diminuées<sup>89</sup>.

Une fois recruté au sein du tissu vasculaire, il a été montré que les macrophages vont libérer majoritairement deux cytokines au sein de la paroi des AIC : le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ <sup>45</sup>. Dans cette même paroi, une étude a également montré que l'IL-1 $\beta$  augmentait la production des MMP donc la dégradation de la MEC, ce qui contribuerait à la fragilisation de la paroi de l'AIC<sup>90</sup>. Le TNF- $\alpha$  va, quant à lui, activer NF- $\kappa$ B, permettant ainsi l'expression des gènes pro-inflammatoires codant notamment pour VCAM-1, ICAM-1, MCP-1 et la cyclooxygénase de type 2 (COX-2)<sup>91</sup>. Dans des modèles murins, la déficience en TNF- $\alpha$  d'une part<sup>92</sup> et l'inhibition de NF- $\kappa$ B d'autre part<sup>93</sup> préviennent toutes les deux la formation des AIC. L'infiltration de la paroi des AIC par les macrophages apparaît donc comme délétère en favorisant la déstructuration de la MEC et en amplifiant l'inflammation locale (Figure 12).



**Figure 12 : Activation et fonctions des macrophages dans les AIC**

Les macrophages ( $M\phi$ ) transmigrent au sein de la paroi artérielle car ils sont attirés par MCP-1 relargué par les CMLV et les cellules endothéliales. Eux-mêmes en produisent afin de recruter d'autres cellules inflammatoires telles que des mastocytes (M) ou des lymphocytes T (T). Une fois dans la paroi, les facteurs produits par les macrophages sont délétères pour la paroi de l'AIC : le TNF- $\alpha$  favorise l'apoptose des CMLV, l'IL-1 $\beta$  entraîne l'apoptose des CMLV et diminue la synthèse de collagène, le relargage du TGF- $\beta$  conduit à une augmentation de la fibrose et les MMP dégradent la MEC. Modifié, d'après Tulamo et al, 2018<sup>41</sup>.

La présence de lymphocytes T dans la paroi anévrismale est également associée à un risque accru de rupture<sup>45</sup>. Une analyse histologique des dômes d'AIC de patients rompus ou non rompus a montré que l'infiltration de la paroi par les cellules T était augmentée dans les parois des AIC rompus en comparaison aux AIC non-rompus<sup>44</sup>. De plus, chez la souris, l'inactivation de *Rag1*, gène nécessaire à la maturation des lymphocytes T, prévient la formation et la rupture des AIC. L'absence de lymphocytes T dans ce modèle permet d'enrayer la transition phénotypique des CMLV qui maintiennent alors leur phénotype contractile. Ceci concourt à prévenir l'accumulation de MMP et autres enzymes protéolytiques et donc limite le remodelage de la MEC<sup>94</sup>.

Les mastocytes sont des leucocytes qui agissent principalement par la libération de médiateurs et de cytokines et leur rôle dans la pathogenèse de l'athérosclérose et des anévrismes de l'aorte abdominale a été relativement bien décrit<sup>95</sup>. Comme pour les lymphocytes T, l'infiltrat intra-pariétal de mastocytes a été décrit pour être associé à la formation et la rupture d'AIC. Une première étude, menée dans un modèle d'AIC chez le rat, a ainsi constaté une augmentation du nombre de mastocytes lors de la formation de l'AIC associée à une production de MMP par les CMLV après la dégranulation des mastocytes<sup>96</sup>. Une seconde étude, chez la souris, a mis en évidence que l'inhibition de la dégranulation des mastocytes n'avait pas d'effet sur l'évolution des stades précoces de formation d'AIC<sup>97</sup>. Par contre, une fois l'AIC formé, l'inhibition de la dégranulation des mastocytes prévient leur rupture. Inversement, un agent pharmacologique activant les mastocytes a pour effet d'augmenter le risque de rupture. De plus, dans cette même étude, la déficience génétique en mastocytes n'affecte pas le taux de formation d'AIC mais entraîne une diminution de leur taux de rupture<sup>97</sup>. Ces données suggèrent un rôle important des cellules inflammatoires dans la pathologie anévrismale, notamment dans le phénomène de rupture.

En conclusion, il est intéressant de noter qu'une modulation phénotypique des trois types cellulaires ; endothéliales, musculaires lisses et inflammatoires ; concourt à la survenue des AIC et à leur évolution vers la rupture. Ces trois modulations phénotypiques n'agissent pas séparément mais en synergie, conduisant à des phénomènes d'amplification locale au sein de la paroi. Ainsi un endothélium lésé participera activement au recrutement inflammatoire et à la différenciation monocyte/macrophage, tout comme les cellules inflammatoires activées contribueront à la transition phénotypique des CMLV<sup>98</sup>.

C. Intérêt des modèles animaux dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques des AIC

Les mécanismes physiopathologiques précédemment proposés ont principalement été obtenus à l'aide de modèles animaux. Ces différents modèles reproduisent plus ou moins fidèlement les conditions dans lesquelles se forment les AIC pour en étudier les mécanismes mis en jeu.


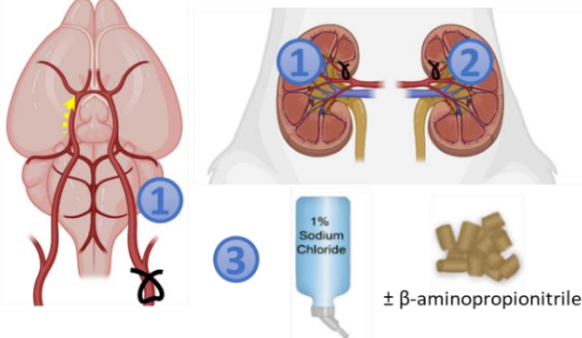
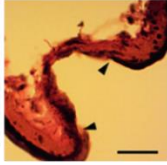

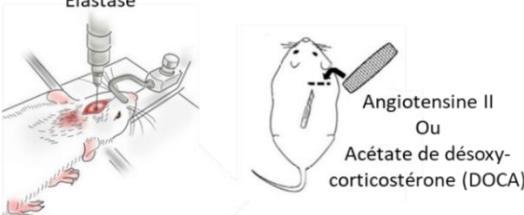
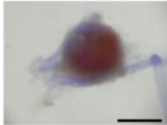

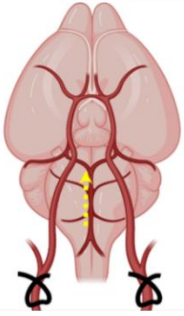

Ces modèles pré-cliniques sont, pour la plupart, basés sur la modulation de deux éléments clés dans la formation des AIC : le stress hémodynamique et la structure de la paroi vasculaire. Ils reposent donc sur des modifications hémodynamiques visant à augmenter les contraintes associées ou non à une détérioration chimique locale des composants extracellulaires de la paroi des artères cérébrales<sup>99,100</sup>.

Le premier modèle, mis au point par Hashimoto à la fin des années 1970 chez le rat<sup>101</sup>. Ce modèle a été créé afin d'évaluer le rôle causal d'un stress hémodynamique, associé à une paroi fragile, dans la formation des AIC. Il consiste en la ligature des deux artères rénales postérieures et de l'artère carotide commune gauche, suivie, une semaine plus tard, par la mise en place d'un traitement avec 1 % de chlorure de sodium dans l'eau de boisson. Cette surcharge en sel, combinée à l'insuffisance rénale créée par les ligatures, augmente la pression artérielle des animaux de façon modérée (Figure 13)<sup>102</sup>. Le  $\beta$ -aminopropionitrile, un inhibiteur de la lysyl oxydase, enzyme permettant la réticulation du collagène et de l'élastine, est également administré *per os*, pour fragiliser la paroi<sup>101</sup>.

Ce protocole a été adapté chez la souris en divisant les deux chirurgies en deux opérations, la première consiste en la ligature de l'artère rénale postérieure droite et de l'artère carotide commune gauche et la deuxième en la ligature de l'artère rénale postérieure gauche<sup>103</sup>. L'adaptation de ce protocole a été indispensable du fait de nombreux modèles transgéniques disponibles chez la souris et non chez le rat.

Ce protocole est assez long puisqu'il permet d'obtenir des dilatations focales au niveau de la bifurcation artère cérébrale antérieure / artère olfactive quatre à cinq mois après la première opération mais a l'avantage de provoquer une altération de la paroi uniquement liée à la surcharge hémodynamique (Tableau 1)<sup>89</sup>.



Animal le plus utilisé	Protocole	AIC / Durée
	 <p>1% Sodium Chloride ± <math>\beta</math>-aminopropionitrile</p>	 <p>4 mois</p>
	 <p>Elastase Angiotensine II Ou Acétate de désoxy-corticostérone (DOCA)</p>	 <p>2 semaines</p>
		 <p>6 mois</p>

**Figure 13 : Principaux modèles d'induction d'AIC chez le petit animal**

Le modèle d'Hashimoto<sup>101</sup> a été mis au point chez le rat et consiste en la ligature de l'artère carotide commune gauche et des artères rénales postérieures poursuivies par l'ajout de chlorure de sodium dans l'eau de boisson afin d'induire une hypertension modérée. Selon les études l'alimentation est supplémentée ou non en  $\beta$ -aminopropionitrile. Après 4 mois de traitement, l'AIC est formé au niveau de la bifurcation artère olfactive / artère cérébrale antérieure du côté controlatéral à la ligature carotidienne<sup>104</sup>. Le modèle suivant est principalement utilisé chez la souris et se compose d'une injection d'élastase dans le liquide cérébro-spinal contenu dans la citerne basale combinée à une hypertension induite par une pompe osmotique délivrant de l'angiotensine II ou la pose sous-cutanée d'une pastille d'acétate de désoxycortisone. Les AIC sont sacculaires et se forment très rapidement au niveau de la circulation postérieure ou antérieure<sup>105</sup>. Le dernier modèle, utilisé surtout chez le lapin, permet, par une ligature bilatérale des artères carotides communes, d'induire la formation d'AIC au niveau de la bifurcation du tronc basilaire en 6 mois<sup>79</sup>.



Modèle	Avantages	Inconvénients	Limites
<b>Hashimoto</b> <sup>101</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Robuste</li> <li>- Reproduction fidèle des conditions chez l'Homme</li> <li>- Etude à court terme possible</li> <li>- AIC de bifurcation</li> <li>- Transposable rat/souris/lapin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Protocole long</li> <li>- Chirurgie difficile, notamment si adapté chez la souris<sup>103</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- AIC à large collet</li> </ul>
<b>Elastase</b> <sup>106</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Protocole court</li> <li>- AIC sacculaire</li> <li>- Etudes de la rupture</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Parfois + de HSA que de réels AIC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reproduit des conditions éloignées de l'Homme</li> <li>- Pas d'étude possible des temps précoces</li> </ul>
<b>Ligature carotidienne bilatérale</b> <sup>79</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pas d'induction d'hypertension</li> <li>- Reproduction fidèle des conditions chez l'Homme</li> <li>- Etude à court terme possible</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Protocole long</li> <li>- AIC de la circulation postérieure (pas représentatif de l'Homme)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- AIC large collet</li> <li>- Pas transposable à la souris</li> </ul>

*Tableau 1 : Avantages, inconvénients et limites des principaux modèles animaux d'AIC  
Les modèles d'induction d'AIC chez l'animal présentent des avantages, des inconvénients et des limites qui sont répertoriés dans le tableau ci-dessus<sup>99,104,107</sup>.*

Chez la souris, un autre modèle répandu consiste en l'injection d'élastase dans le liquide cérébro-spinal de la citerne basale en combinaison à une hypertension induite par l'angiotensine II ou l'acétate de désoxycortisone (Figure 13)<sup>107</sup>. Ce modèle est basé sur des observations histologiques de perte de LEI faites chez l'Homme, ici reproduit par l'injection d'élastase. De plus, il est basé sur des observations cliniques avec la prévalence plus élevée d'HTA chez les patients porteurs d'AIC, ici reproduit par le traitement à l'angiotensine II ou acétate de désoxycortisone<sup>106</sup>. Ce protocole permet d'induire la formation d'AIC chez la souris en deux semaines seulement avec une incidence d'environ 70 %<sup>106</sup>. Ce modèle est plutôt un modèle pour étudier la rupture d'AIC (Tableau 1). En effet, après trois semaines de traitement à l'angiotensine II suite à l'injection d'élastase, le pourcentage d'AIC atteint chez la souris est de 90 %, mais surtout des HSA sont présentes dans 70 % des cas<sup>108,109</sup>.

Chez le lapin, la ligature carotidienne bilatérale permet la formation d'AIC au niveau de la circulation postérieure du polygone de Willis (Figure 13)<sup>107</sup>. Ce long protocole induit des AIC en 6 mois ce qui permet de suivre l'évolution de la pathologie (Tableau 1)<sup>79,110</sup>. Certaines études induisent, en plus, une hypertension afin d'accélérer l'évolution du dôme anévrysmal<sup>110</sup>. Cependant, chez le lapin, suite à la ligature bilatérale des artères carotides communes, il n'est pas nécessaire d'augmenter la pression artérielle ou de détériorer

chimiquement la paroi artérielle pour induire des dilatations focales au niveau de la bifurcation du tronc basilaire. Par contre, chez le rat, l'injection d'élastase est combinée à la chirurgie et chez la souris, ce type de modèle n'est pas utilisé<sup>107</sup>. En effet, la morphologie de des animaux étant différente, la dynamique des fluides au sein de polygone de Willis est différente.

Il est important de noter que, contrairement à l'Homme, les rongeurs ne présentent pas spontanément d'AIC et il n'existe à ce jour aucun modèle de souris ou de rat prédisposé à leur formation. Cette absence d'AIC peut être associée à plusieurs phénomènes. En premier lieu, l'Homme étant bipède, le polygone de Willis se trouve anatomiquement au-dessus du cœur. Chez la souris, quadripède, celui-ci se trouve au même niveau que le cœur. Cet orthostatisme rend la variation et l'intensité des contraintes hémodynamiques plus importantes chez l'Homme, notamment au niveau des bifurcations des artères cérébrales<sup>111</sup>. Ce serait pour cette raison-là, que le lapin serait plus enclin que la souris au développement d'AIC. De plus, le passage à l'orthostatisme au cours de l'évolution humaine, a induit un changement de conformation des bifurcations carotidiennes du polygone de Willis, qui forment souvent un angle très obtus, contribuant, là encore, à la modification des contraintes hémodynamiques très localement au niveau des premières bifurcations<sup>112</sup>.

D'autres modèles d'induction d'AIC, moins répandus, existent. Certains associent les méthodes décrites précédemment entre-elles<sup>113</sup>. Il existe également des modèles animaux d'AIC conçus afin d'étudier un point précis de la physiopathologie. Par exemple, nous pouvons citer un modèle consistant à recréer, par chirurgie, une bifurcation *de novo* chez le chien<sup>48</sup> ou le modèle appelé « rat d'Helsinki » où une veine est prélevée et transformée en pseudo dôme anévrysmal<sup>114</sup>. Leurs objectifs étaient respectivement d'étudier l'effet de la morphologie de la bifurcation sur le flux et le comportement des cellules endothéliales qui en résulte et d'étudier la dynamique des fluides dans un AIC déjà formé.

Les études mécanistiques chez l'animal ont permis d'aborder les mécanismes physiopathologiques et chronologiques de la formation des AIC. Ce type de modèle est aussi très utile pour l'évaluation de stratégies thérapeutiques pour empêcher ou ralentir la formation des AIC, ou limiter leur progression et leur évolution vers la rupture.

### 3. Prédispositions génétiques aux AIC

De nombreuses études se sont intéressées à la génétique de l'AIC au cours des dernières années et ont permis d'identifier des gènes et des mutations associés à un risque accru d'AIC. Ces travaux comprennent à la fois des études pangénomiques, des stratégies basées sur des gènes candidats, et des études familiales. Ces études génétiques, en partie sans *a priori*, sont complémentaires des approches physiopathologiques, et peuvent aider à comprendre les causes et la biologie de l'AIC et à identifier des cibles pour des interventions thérapeutiques.

#### A. AIC syndromiques

Dans certaines maladies génétiques monogéniques, les AIC font partie des signes de la maladie. Ces AIC syndromiques représentent moins de 1 % de tous les AIC<sup>23</sup>. Les principaux syndromes d'origine génétique prédisposant aux AIC sont listés dans le Tableau 2. D'autres maladies affectant notamment les tissus conjonctifs parmi lesquelles le pseudoxanthoma elasticum<sup>115</sup> mais aussi la néoplasie endocrinienne multiple de type 1<sup>116</sup> qui sont également décrites pour augmenter la susceptibilité aux AIC ne seront pas développées ici car le tableau clinique est assez similaire aux autres pathologies exposées.

Pathologie	Symptômes	Gènes	Protéines	Rôles	Prévalence des AIC
<b>Polykystose rénale autosomique dominante</b> <sup>117</sup>	Insuffisance rénale Atteintes cardiaques Atteintes vasculaires	<i>PKD1</i> <i>PKD2</i> <i>GANAB</i>  <i>DNAJB11</i>	Polycystine 1 Polycystine 2 Sous unité $\alpha$ de la glucosidase II DnaJ homolog subfamily B member 11	Polycystines : Formation des points focaux d'adhésion des cellules épithéliales à la MEC Glucosidase : adressage des polycystines à la membrane	9 à 12 % <sup>118</sup>
<b>Nanisme microcéphalique ostéodysplasique primordial de type II</b> <sup>119</sup>	Nanisme Microcéphalie Anomalies cérébrovasculaires	<i>PCNT</i>	Péricentrine	Maturation du centrosome lors de la mitose	25 à 50 % <sup>119</sup>
<b>Syndrome d'Ehlers-Danlos</b> <sup>120</sup>	Hyperextension cutanée, hypermobilité articulaire Anomalies de la cicatrisation	<i>COL1A1</i> <i>COL3A1</i> <i>COL5A1</i> <i>COL5A2</i>	Collagène I Collagène III Collagène V	Composants de la MEC	12 % <sup>121</sup>
<b>Syndrome de Marfan</b> <sup>122</sup>	Atteintes squelettiques Atteinte ophtalmique Dilatation aortique Insuffisance mitrale	<i>FBN1</i>	Fibrilline 1	Formation des fibres élastiques dans la MEC Séquestration du TGF- $\beta$	14 % <sup>121</sup>
<b>Syndrome de Loeys-Dietz</b> <sup>123</sup>	Fente labio-palatine, hypoplasie malaire Anévrismes aortiques Tortuosité artérielle généralisée	<i>TGFBR1</i> <i>TGFBR2</i>	Récepteurs au TGF- $\beta$	Phosphorylation de Smad2/3 ou 1/5/8 en réponse à la liaison du TGF- $\beta$	28 % <sup>121</sup>
<b>Télangiectasie hémorragique familiale</b> <sup>124</sup>	Lésions muqueuses et cutanées Malformations artério-veineuses	<i>ENG</i> <i>ACVRL1</i>			15 % <sup>124</sup>
<b>Neurofibromatose de type 1</b> <sup>125</sup>	Macules café-au-lait Tumeurs bénignes et malignes du système nerveux central	<i>NF1</i>	Neurofibromine	Inactivation de l'oncoprotéine Ras	11 % <sup>121</sup>

**Tableau 2 : Causes d'AIC syndromiques**

Les principaux syndromes menant à la formation d'AIC sont listés ci-dessus

La polykystose rénale autosomique dominante (ADPKD) est le syndrome qui favorise le plus le développement d'AIC. Il s'agit de la maladie génétique rénale la plus fréquente et qui touche 12,5 millions de personnes à travers le monde. L'ADPKD est due à des mutations perte de fonction dans les gènes *PKD1* dans 80% des cas, *PKD2* dans 15% des cas, les 5% restants étant dus à des mutations perte de fonction d'autres gènes tels que *GANAB* et *DNAJB11*. Les gènes *PKD1* et *PKD2* codent respectivement pour les polycystines 1 et 2 qui sont nécessaires à la conformation des tubules rénaux. Au niveau clinique, les patients déclarent, à l'âge adulte, une insuffisance rénale<sup>126</sup>. Les patients présentent également des atteintes vasculaires et/ou cardiaques<sup>118</sup>. C'est pourquoi, il est recommandé de faire un dépistage des AIC chez les patients atteints d'ADPKD. Cependant, ces défauts vasculaires n'ont été démontrés ni comme primaires, ni comme secondaires aux problèmes rénaux. Les polycystines sont des protéines mécanosensibles impliquées dans la formation du cil primaire et des points focaux d'adhésion des cellules épithéliales à la MEC<sup>117</sup>. Il a récemment été

montré que la déficience en cil primaire dans les cellules endothéliales était associée à une perte des jonctions serrées intercellulaires, qui entraîne une augmentation de la perméabilité endothéliale<sup>127</sup>. Dans le cas où les atteintes vasculaires ne seraient pas secondaires à la pathologie rénale, la déficience ou la dysfonction du cil primaire des cellules endothéliales chez les patients atteints d'ADPKD pourrait donc être impliquée dans la prédisposition aux AIC chez ces patients<sup>127</sup>.

Le nanisme microcéphalique ostéodysplasique primordial de type II est une maladie qui entraîne également des malformations vasculaires intracrâniennes telles que des AIC. La péricentrine, mutée dans cette maladie, est responsable de l'agencement des microtubules lors de la mitose cellulaire mais aussi lors de la formation du cil primaire<sup>119</sup>. Une altération du cil primaire pourrait là encore jouer un rôle clé dans la prédisposition à la formation des AIC chez ces patients.

Les maladies du tissu conjonctif ont fait l'objet d'une étude rétrospective de 2016 qui a montré que les patients atteints du syndrome d'Ehlers-Danlos, du syndrome de Marfan, du syndrome de Loeys-Dietz ou de la neurofibromatose de type 1 ont respectivement une prévalence de présence d'AIC de 12, 14, 28 et 11 %<sup>121</sup>.

Différents gènes codant pour des collagènes sont mutés dans le syndrome d'Ehlers-Danlos<sup>120,121</sup>. Les mutations, notamment celles du collagène V, entraînent une perte de fonction de la protéine. Les AIC que développent ces patients pourraient donc être dus à un défaut d'organisation de la MEC entraînant une faiblesse de la paroi vasculaire.

Même si le tableau clinique est relativement similaire à celui du syndrome d'Ehlers-Danlos, les syndromes de Marfan et de Loeys-Dietz ne présentent certainement pas les mêmes mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine des AIC. Chez ces patients, la perturbation de la voie du TGF- $\beta$  pourrait être mise en cause. La fibrilline 1, mutée dans le syndrome de Marfan<sup>122</sup> régule la biodisponibilité du TGF- $\beta$  et donc sa capacité à activer son récepteur, lui-même muté dans le syndrome de Loeys-Dietz<sup>123</sup>. La cascade de signalisation résultant de l'activation des récepteurs au TGF- $\beta$  favorise la synthèse de la MEC par les CMLV et leur prolifération<sup>84</sup>. Un défaut dans cette voie pourrait donc entraîner une mauvaise adaptation des CMLV à une modification des contraintes hémodynamiques par exemple.

La télangiectasie hémorragique familiale est une pathologie vasculaire, également due à des mutations sur des récepteurs au TGF- $\beta$ <sup>124,128</sup>. L'endogline, pouvant être mutée dans cette maladie est exprimée par les cellules endothéliales et est nécessaire à l'activation flux-dépendante des effecteurs SMAD1/5<sup>129</sup>. Ces patients présentent des shunts artérioveineux modifiant ces contraintes hémodynamiques physiologiques.

La neurofibromatose de type 1 est due à une mutation de la neurofibromine qui perd alors son action physiologique d'inactivation de l'oncoprotéine Ras. Cela entraîne une augmentation de la prolifération, notamment des neurones et des cellules gliales<sup>125,130</sup>. La prédisposition aux AIC dans cette pathologie pourrait provenir d'une intensification de la part inflammatoire et du stress oxydatif due à la déficience en neurofibromine dans les cellules myéloïdes<sup>131</sup>.

### B. AIC non syndromiques

Une mutation *de novo* ou une mutation héritée peut prédisposer aux AIC, sans que le patient ne souffre d'autres pathologies, il s'agit alors d'une forme isolée.

Les variants génétiques fréquents associés à ce type de pathologie multifactorielle, vont avoir un effet causal faible alors que des variants rares auront, eux, un effet fort sur la survenue de la pathologie (Figure 14).

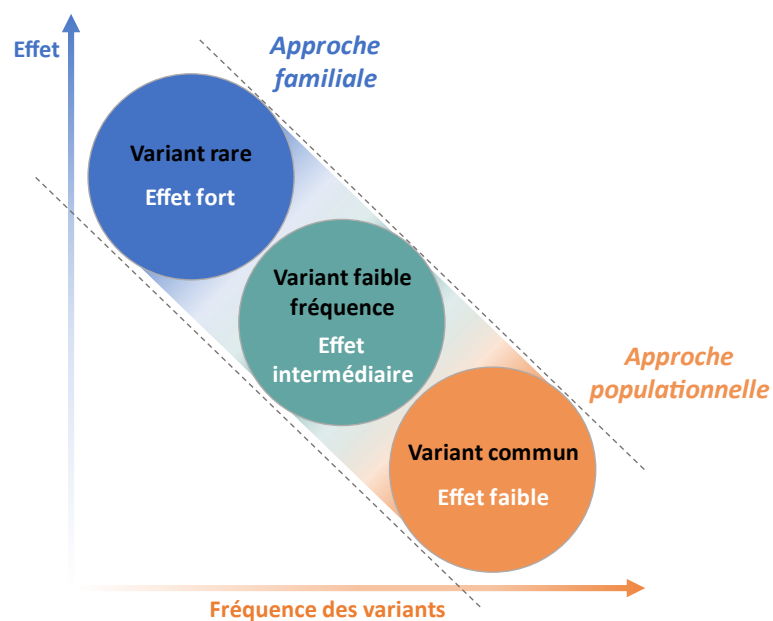


Figure 14 : Relation entre la fréquence des variants génétiques et leurs effets sur la pathologie

En abscisse, la fréquence des variant et en ordonnée, l'effet sur une pathologie donnée.

Reproduit d'après Manolio et al, 2009<sup>132</sup>

## a. Analyses de liaison

Les analyses de liaison sur génome entier se basent sur des cas familiaux pour identifier des régions chromosomiques qui comprennent des polymorphismes. Cette méthode a permis, en 2001, d'identifier le locus 7q11 comme associé à la présence d'AIC<sup>133</sup>. Ce locus contient le gène *ELN* qui code pour l'élastine, principale constituante des lames élastiques dans la paroi artérielle.

Une autre analyse de liaison a permis de déterminer le locus 1p34.3-p36.13 comme lié à l'AIC. Ce locus contient notamment le gène codant pour le perlécan, un protéoglycan de la lame basale. Bien que le rôle du perlécan n'ait pas été identifié dans la formation des AIC à ce jour, cette protéine extracellulaire est connue pour jouer un rôle dans l'angiogenèse et dans l'autophagie de la cellule endothéliale<sup>134</sup>.

Une revue de la littérature des études de liaison dans les AIC et d'autres type d'anévrismes a mis en évidence le locus 4q32, identifié d'abord comme associé aux anévrismes de l'aorte abdominale et qui apparaît comme également lié aux AIC<sup>135</sup>. Ce locus contient des nombreux gènes parmi lesquels certains codent pour des protéines impliquées dans la régulation de l'homéostasie de la MEC dont *CTSO*, gène codant pour une protéase méconnue.

## b. Approche gène candidat

Un autre moyen d'identifier des mutations en lien avec la présence d'AIC est de cibler des gènes d'intérêt *a priori*. Ces gènes font notamment partie de loci identifiés par des analyses de liaison et leur fonction connue les désignent comme gènes candidats. Par simple technique de séquençage, des études ont donc permis d'identifier des polymorphismes dans les gènes *COL1A2*<sup>136</sup>, *LOXL2*<sup>137</sup> et *MYH11*<sup>138</sup>. *COL1A2* code pour la chaîne  $\alpha 2$  du collagène de type 1. La lysyl oxydase like 2 (*LOXL2*) est nécessaire à l'agencement et à la réticulation des protéines de la MEC entre-elles. *MYH11* est le gène qui code pour la SM-MHC, nécessaire à la contraction et marqueur du phénotype contractile des CMLV.

L'identification de variants de ces trois gènes suggère un rôle important de la MEC et le phénotype des CMLV dans la survenue de la pathologie.

## c. Etudes d'association pangénomiques

Depuis 2008, les études d'association pangénomiques (GWAS) ont permis d'identifier des variants génétiques communs, avec une fréquence allélique de plus de 5%<sup>139</sup>, significativement enrichis dans une population atteinte d'AIC par rapport à une population contrôle (Tableau 3).

Locus	Gènes	Rôles
2q23.3 <sup>140</sup>	<i>LYPD6</i>	Modulation l'activité des récepteurs nicotiques
2q33.1 <sup>140,141</sup>	<i>ANKRD44</i>	Phosphatase
	<i>PLCL1</i>	Régule l'expression des récepteurs au GABA
3p14.2 <sup>142</sup>	<i>FHIT</i>	Clivage de l'ATP en ADP ou AMP
<b>4q31.22-q31.23<sup>143-145</sup></b>	<b><i>EDNRA</i></b>	<b>Récepteur à l'endothéline 1 (puissant vasoconstricteur) sur la membrane des CMLV</b>
5q31.1 <sup>140,144</sup>	<i>SLC22A5/SLC22A4</i>	Transporteur de sodium
	<i>P4HA2</i>	Implication dans la formation du collagène <sup>146</sup>
	<i>FSTL4</i>	-
6q16.1 <sup>144</sup>	<i>FHL5</i>	Implication dans la spermatogénèse ?
6q24.2 <sup>140</sup>	<i>EPM2A</i>	Favorise la dégradation des protéines mal repliées
7p21.1-q22.1 <sup>140,147</sup>	<i>RADIL</i>	Effecteur de Rap (GTPase monomérique)
	<i>HDAC9</i>	Déacétylation des histone
<b>8q11.23-q12.1<sup>141,144,148,149</sup></b>	<b><i>SOX17</i></b>	<b>Angiogenèse développementale Maintien de l'intégrité vasculaire</b>
<b>9p21.3<sup>140,141,143,144,147-149</sup></b>	<b><i>CDKN2A</i></b>	<b>Gènes suppresseurs de tumeurs en inhibant la kinase cycline-dépendante 4 ou en stabilisant P53</b>
	<b><i>CDKN2B</i></b>	
	<b><i>CDKN2BAS</i></b>	
10q23.33 <sup>144</sup>	<i>PLCE1</i>	Facteur d'échange de Ras (GTPase monomérique)
10q24.32 <sup>144,148</sup>	<i>NT5C2</i>	Déphosphorylation des purines
	<i>MARCKSL1P1</i>	Pseudogène
	<i>CNNM2</i>	Transporteur de cation divalent (Mg <sup>2+</sup> )
11p15.5 <sup>144</sup>	<i>BET1L</i>	Transport rétrograde vers le Golgi
12p12.2 <sup>144</sup>	<i>RP11-664H17.1</i>	-
12q21.33 <sup>144</sup>	<i>ATP2B1</i>	Régulation du calcium intracellulaire
12q22 <sup>144,145</sup>	<i>NDUFA12</i>	Molécule chaperonne du complexe 1 de la chaîne respiratoire
	<i>NR2C1</i>	Récepteur nucléaire
	<i>FGD6</i>	Activation de CDC42 ? (GTPase monomérique)
	<i>VEZT</i>	Formation et maintien des jonctions adhérentes
13q13.1 <sup>144,148</sup>	<i>STARD13</i>	Activation de RhoA (GTPase monomérique)
	<i>KL</i>	Activité glycosidase ?
15q25.1 <sup>144</sup>	<i>PSMA4</i>	Sous-unité du protéasome
16q23.1 <sup>144</sup>	<i>BCAR1</i>	Migration et adhésion cellulaire
	<i>RP11-252K23.2</i>	-
18q11.2 <sup>142,144,148</sup>	<i>RBBP8</i>	Réparation de l'ADN
20p11.23 <sup>144</sup>	<i>SLC24A3</i>	Transporteur de calcium, potassium et sodium
20q12.1 <sup>145</sup>	<i>RRBP1</i>	Médiation de l'interaction entre ribosome et réticulum endoplasmique
22q12.1 <sup>141,144</sup>	<i>SLC25A17</i>	Transporteur de cofacteurs libres vers le péroxysome
	<i>MTMR3</i>	Phosphatase

**Tableau 3 : Loci identifiés comme associés aux AIC grâce aux plus larges GWAS**

Les loci identifiés dans des GWAS sont listés ci-dessus. Les loci les plus répliqués sont en gras : 9q21.3 (7 GWAS), puis 8q11.23-12.1 (4 GWAS) et enfin 4q31.22-q31.23 (3 GWAS).



Le gène *EDNRA* code pour le récepteur à l'endothéline 1 de type A. Les intervalles de confiance des odds ratio de la présence des polymorphismes identifiés chez les patients atteints d'AIC montrent bien que l'expression de certains allèles est significativement associée à la pathologie (1,22 [1,14-1,31]<sup>145</sup> ; 1,25 [1,16-1,34]<sup>143</sup> ; 0,80 [0,77-0,84]<sup>144</sup>). L'identification de son locus, 4q31.22-q31.23, a été répliquée dans 3 GWAS. Ce récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G est responsable, dans les CMLV, de la vasoconstriction induite par l'endothéline 1. Les polymorphismes identifiés semblent réguler négativement la transcription du gène *EDNRA*<sup>143</sup>.

Le locus 9p21.3, le plus répliqué (7 fois), contenant les gènes *CDKN2A/B/BAS*, a également été décrit, avec des odds ratio montrant l'association significative avec les AIC (1,29 [1,19-1,40]<sup>141</sup> ; 1,32 [1,25-1,39]<sup>148</sup> ; 1,35<sup>149</sup> ; 1,31<sup>147</sup> ; 1,34 [1,23-1,45]<sup>140</sup> ; 0,84 [0,81-0,86]<sup>144</sup>). Des mutations perte de fonction de ces trois gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire ont été associées à plusieurs types de cancers<sup>150</sup>. Dans les CMLV spécifiquement, la perte de fonction de *CDKN2B* entraîne la surexpression de voies pro-apoptotiques<sup>151</sup>. La délétion de la région intergénique contenant l'ARN non codant *Cdkn2bas* (aussi appelé *Anril*) entraîne une perte d'expression des gènes *Cdkn2a* et *Cdkn2b*, chez la souris. Une fois isolées, les CMLV provenant de ces souris voient leur prolifération augmentée drastiquement, suggérant un rôle de cette région dans la régulation du phénotype des CMLV<sup>149</sup>.

SRY-box 17 (*SOX17*) est un facteur de transcription indispensable à l'angiogenèse développementale. Outre les évidences génétiques associant des polymorphismes du gène *SOX17* aux AIC (Odds ratio : 1,36 [1,24–1,49]<sup>141</sup> ; 1,28 [1,20-1,38]<sup>148</sup> ; 1,17 [1,12-1,22]<sup>144</sup>, locus 8q11.23-q12.1 répliqué 4 fois) des études fonctionnelles ont montré que, chez la souris, la déficience en *Sox17* spécifiquement dans l'endothélium, entraîne un risque accru de formation d'AIC<sup>152</sup>. Dans ce modèle animal, les AIC observés semblent être causés par une perte de l'intégrité vasculaire, probablement dû à la perte des jonctions adhérentes endothéliales puisque la VE-cadhérine est un des gènes régulés par *SOX17*<sup>153</sup>.

De très nombreux autres loci ont été identifiés comme associés aux AIC. La plupart de ces loci sont situés dans des régions non codantes du génome<sup>154</sup>. Ces régions intergéniques et introniques doivent être explorées afin de comprendre leur éventuelle implication dans la formation des AIC<sup>23,139,144,155–157</sup>. Ces régions non codantes sont complexes à étudier car elles

peuvent réguler l'expression de nombreux gènes, de différentes manières, en modifiant l'ouverture de la chromatine ou se liant à un facteur de transcription par exemple.

Hormis *SOX17*, très peu de gènes ont fait l'objet d'analyses fonctionnelles permettant d'établir un mécanisme physiopathologique liant des variants génétiques à la formation d'AIC<sup>152</sup>. Pour la plupart des loci identifiés, la preuve ainsi que les mécanismes d'une relation de cause à effet entre des polymorphismes de gènes présents dans ces loci et les AIC ne sont pas établis.

d. Séquençage d'exome entier dans des formes familiales

Une autre stratégie vise à identifier des variants génétiques rares, qui ségrègent avec la maladie, par séquençage d'exome dans les formes familiales d'AIC (Figure 14). Par ce type d'approche, de nombreux variants rares, définis par une fréquence allélique de moins de 1%<sup>139</sup>, ont été identifiés (Tableau 4).

Gène	Protéine	Rôle	Nombre de familles
<b>ADAMTS15</b> <sup>158</sup>	Désintégrine et métalloprotéinase avec un motif thrombospondine 15 (ADAMTS15)	Régule négativement l'expression des intégrines à la membrane des cellules endothéliales	1
<b>TMEM132B</b> <sup>159</sup>	Protéine transmembranaire 132B	-	1
<b>RNF213</b> <sup>160</sup>	Protéine ring finger 213 (RNF213)	ATPase et ubiquitine-ligase Angiogenèse	5
<b>THSD1</b> <sup>161</sup>	Thrombospondine de type 1 domain-containing 1 (THSD1)	Maintien des points d'ancrages des cellules endothéliales à la MEC <sup>162</sup>	2
<b>LOXL2</b> <sup>163</sup>	Lysil oxidase like 2 (LOXL2)	Agencement et à la réticulation des protéines de la MEC	1
<b>ANGPTL6</b> <sup>164</sup>	Angiopoïétine-like 6 (ANGPTL6)	Angiogenèse Métabolisme lipidique	6
<b>ARHGEF17</b> <sup>165</sup>	Facteur d'échange nucléotidique des protéines Rho 17 (ARHGEF17)	Formation des fibres de stress d'actine	7
<b>PCNT</b> <sup>166</sup>	Péricentrine	Maturation du centrosome lors de la mitose	6
<b>NFX1</b> <sup>167</sup>	Facteur de transcription nucléaire liant X-box (NF-X1).	Régulation de la durée de la réponse inflammatoire <sup>168</sup>	1
<b>EDIL3</b> <sup>169</sup>	EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3	Adhésion des cellules vasculaires	1
<b>ANK3</b> <sup>170</sup>	Ankyrine 3	Liaison du cytosquelette à la membrane plasmique	2
<b>PPIL4</b> <sup>171</sup>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 4 (PPIL4).	Activation de la voie Wnt	1
<b>CTSO</b>	Cathepsine O (CTSO)	Protéase	2

*Tableau 4 : Variants rares identifiés par séquençage d'exome entier dans des formes familiales d'AIC*  
Les gènes dont des variants génétiques rares ont été identifiés dans des formes familiales d'AIC sont listés ci-dessus, par ordre de découverte, du premier découvert au plus récent.

Le premier variant identifié de cette manière est un variant rare d'*ADAMTS15* qui entraîne une perte de fonction de la protéine et favorise la migration des cellules endothéliales, *in vitro*<sup>158</sup>. L'expression de la désintégrine et métalloprotéinase avec un motif thrombospondine 15 (*ADAMTS15*) codée par ce gène est induite par des conditions de flux physiologique afin de favoriser la survie de cellules endothéliales et de réguler de façon négative l'expression des intégrines, en les dégradant<sup>172</sup>. La migration des cellules endothéliales est un phénomène associé à une augmentation de l'expression des intégrines. La perte de fonction d'*ADAMTS15* conduirait donc à un défaut de dégradation des intégrines ce qui pourrait entraîner une migration endothéliale trop importante<sup>158</sup>.

Des mutations du gène *RNF213* étaient déjà connues comme étant en cause dans la maladie de Moyamoya, dans une population d'Asie de l'est<sup>173</sup>. Les patients atteints affichent une sténose progressive de l'artère carotide interne ce qui contribue au développement d'une néovascularisation. Ces sujets sont plus à risque de développer des accidents vasculaires cérébraux ischémiques mais aussi des HSA<sup>173</sup>. D'autres variations rares de ce même gène ont été identifiées dans des formes familiales d'AIC sans signe de maladie de Moyamoya. Ces variants potentialisent la fonction ATPase de la protéine, à l'origine de son rôle angiogénique<sup>160</sup>.

La thrombospondine de type 1 domain-containing 1 (*THSD1*) est une protéine transmembranaire impliquée dans la stabilisation des points focaux d'adhésion mettant en jeu les intégrines. Les variants rares identifiés affectent la capacité des cellules endothéliales à adhérer à leur lame basale. La prédisposition au AIC associée à ces variant pourraient donc provenir d'un déstabilisation de l'endothélium<sup>161</sup>.

*LOXL2*, dont des variants fréquents ont déjà été identifiés par des approches gènes candidats dans le contexte des AIC (p.45), est une enzyme responsable de la réticulation entre le collagène et l'élastine. Il a également été montré que *LOXL2* est impliqué dans l'angiogenèse, en modulant la transition endothélio-mésenchymateuse par un effet indépendant de son activité enzymatique<sup>174</sup>. Cependant, *in silico*, le variant rare familial identifié n'est pas prédit comme dommageable et aucune étude fonctionnelle n'a été réalisée<sup>163</sup>.

Des variants rares du gène codant pour la péricentrine, précédemment décrit dans le cas du nanisme microcéphalique ostéodysplasique primordial de type II, ont été identifiés dans des AIC non syndromiques. Aucune donnée de l'impact fonctionnel de ces variants n'est présenté

mais ils sont prédits comme dommageables<sup>166</sup>. C'est le cas également pour les variants rares identifiés sur le gène *NFX1*<sup>168</sup>.

Le gène *EDIL3* code pour une protéine qui favorise l'adhésion des cellules vasculaires en interagissant avec l'intégrine  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ <sup>169</sup>. Même si le variant détecté par séquençage d'exome est prédit comme pathogénique, celui-ci n'a pas fait l'objet d'étude fonctionnelle. Dans la même lignée, *ANK3* code pour l'ankyrine 3 qui est connue pour participer à la liaison du cytosquelette à la membrane plasmique, notamment dans les cellules musculaires striées squelettiques<sup>170</sup>. Le variant identifié affecte une région hautement conservée de la protéine et pourrait modifier sa structure tridimensionnelle. Cependant, là encore, aucune analyse fonctionnelle n'a été réalisée<sup>170</sup>.

Un variant génétique rare du gène *ARHGEF17* a été identifié dans une famille atteinte d'AIC<sup>165</sup>. *ARHGEF17* est un facteur d'échange nucléotidique qui contrôle l'activité de RhoA<sup>175</sup>, essentielle à la dynamique de l'organisation du cytosquelette et en conséquence, au contrôle de la contraction, la migration, les interactions cellules-cellules ou cellules-MEC<sup>176</sup>. La délétion d'*arhgef17* dans le poisson zèbre a permis de mettre en évidence un lien fonctionnel entre les variants d'*ARHGEF17* et des défauts de la paroi artérielle cérébrale. Les embryons de poisson zèbre déficients en *arhgef17* présentent des hémorragies intracrâniennes corrigées par la réexpression de la séquence sauvage d'*ARHGEF17* mais pas par celle de la séquence mutée<sup>165</sup>. Précédemment, *ARHGEF17* avait été montré comme nécessaire à l'activation de RhoA au niveau des jonctions intercellulaires des cellules endothéliales<sup>177</sup>.

Un des gènes les plus récemment associés aux AIC est *PPIL4*. Fonctionnellement, la déficience en *ppil4* chez le poisson zèbre entraîne des défauts dans la morphologie de l'arbre vasculaire cérébral. De plus, *in vitro*, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 4 (PPIL4) est impliqué dans l'activation de la voie de signalisation Wnt par une liaison à la protéine Jumonji domain-containing 6 (JMJD6). La voie Wnt est impliquée dans la stabilisation des jonctions adhérentes des cellules endothéliales grâce à l'inhibition de la dégradation de la  $\beta$ -caténine. Elle est nécessaire au développement cérébrovasculaire et à l'intégrité de la paroi des vaisseaux sanguins<sup>178</sup>. L'activation de la voie Wnt par PPIL4 est compromise quand PPIL4 contient la mutation identifiée chez les patients porteurs d'AIC<sup>171</sup>.

Une récente étude coréenne recensant plusieurs formes familiales d'AIC a pu identifier 3 variants génétiques rares et probablement délétères des gènes : *PLOD3*, *NTM*, *CHST14*<sup>179</sup>.

*PLOD3* code pour la lysyl hydroxylase 3, impliquée dans la modification post-traductionnelle du collagène. La délétion de ce gène chez la souris entraîne une létalité des embryons et ces derniers présentent des hémorragies intracrâniennes<sup>180</sup>. *NTM* code pour la neurotrimine, une molécule d'adhésion cellulaire ancrée à la membrane grâce au glycosylphosphatidylinositol, principalement présente dans les neurones<sup>179</sup>. Sur son locus, 11q25, une translocation provoquant l'épissage alternatif de *NTM* avait auparavant été identifiée comme associée aux AIC et aux anévrismes de l'aorte abdominale<sup>181</sup>. *CHST14* code pour la carbohydate sulfotransférase 14, participant à la maturation du dermatane-sulfate qui est impliqué dans la formation des fibrilles de collagène. Ce gène est également muté dans un type de syndrome d'Ehlers-Danlos<sup>179</sup>. L'ensemble de ces variants identifiés n'ont fait l'objet d'aucune étude fonctionnelle spécifique.

Les gènes identifiés par ces analyses génétiques ont, pour la plupart, une implication dans l'angiogenèse, l'intégrité de la barrière endothéliale et/ou l'organisation de la MEC.

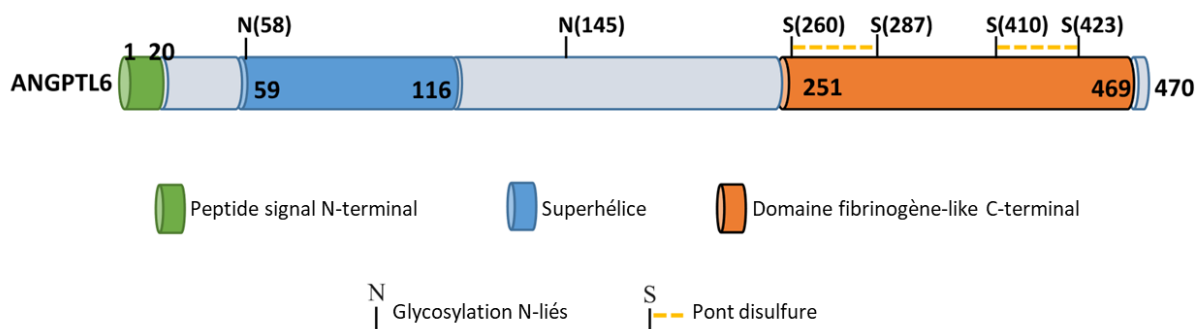
Mon laboratoire a également utilisé le séquençage d'exome entier dans des formes familiales d'AIC. Par cette approche, l'équipe de génétique, en collaboration avec le service de neuroradiologie, a identifié, des variants rares du gène *ANGPTL6*<sup>164</sup>. La protéine codée par ce gène, angiopoïétine-like 6 (*ANGPTL6*) est une glycoprotéine circulante, sécrétée par le foie, connue pour avoir un rôle dans l'angiogenèse développementale<sup>182</sup>. Dans la plus large des familles étudiées, le présence du variant rare identifié entraîne la formation d'une protéine tronquée, p.Lys460Ter-*ANGPTL6*, non sécrétée. D'autres variants rares du gène *ANGPTL6* ont été identifiés par un autre laboratoire dans des cas familiaux et sporadiques d'AIC, ce qui renforce l'association entre ce gène et la pathologie<sup>183</sup>. Plus récemment, mon laboratoire a aussi identifié des variants rares du gène *CTSO* dans des cas familiaux. La cathepsine O (*CTSO*), codée par ce gène, étant très peu étudiée, seuls son gène et sa séquence sont connus. Ces deux protéines faisant l'objet de cette thèse, elles seront détaillées plus amplement dans des paragraphes dédiés à suivre.

L'ensemble des données génétiques permettent d'identifier des gènes d'intérêt. Cependant, les études fonctionnelles sont indispensables afin de mettre en évidence la relation génotype/phénotype, pour, à terme, améliorer la compréhension des mécanismes physiopathologiques des AIC, voire identifier des cibles pharmacologiques potentielles.

## II. ANGPTL6

### 1. *Structure protéique des angiopoïétines-like*

Les angiopoïétines-like protéines sont des glycoprotéines décrites récemment par similarité de structure avec les angiopoïétines<sup>184</sup>. Il existe 8 angiopoïétines-like protéines<sup>185</sup>. Elles contiennent toutes un peptide signal de nature hydrophobe qui leur permet, après adressage à la membrane, d'être sécrétées dans le milieu extracellulaire<sup>184</sup>. Leur structure est également être composée d'une superhélice côté amino-terminal et d'un domaine fibrinogène-like côté carboxy-terminal comme c'est le cas pour ANGPTL6 (Figure 15).



*Figure 15 : Structure protéique d'ANGPTL6*

*Les angiopoïétines-like portent un peptide signal à leur extrémité N-terminale. Elles sont composées d'une superhélice du côté N-terminal et d'un domaine fibrinogène-like du côté C-terminal. D'après Carbone et al, 2018<sup>185</sup>*

Le domaine fibrinogène-like est également présent dans la structure des angiopoïétines et permet leur liaison au récepteur Tie2, responsable de leurs effets sur la survie et la migration des cellules endothéliales, l'angiogenèse et le maintien de l'intégrité vasculaire<sup>184</sup>. Malgré la présence de ce domaine, les angiopoïétines-like protéines, ne sont pas des ligands de Tie2<sup>184</sup>. Leur ligands ne sont pas clairement identifiés, cependant, certaines angiopoïétines-like protéines comme ANGPTL2, ANGPTL4 et ANGPTL6 contiennent un motif RGD (Arginine, Glycine, Aspartate) dans le domaine fibrinogène-like qui leur permet de se lier aux intégrines<sup>186-189</sup>.

## 2. Rôle vasculaire des angiopoïétines-like

Les angiopoïétines-like ne sont pas ubiquitaires, leur expression est tissu-spécifique (Tableau 5)<sup>184,185</sup>. Elles sont sécrétées dans la circulation sanguine mais peuvent également avoir une action autocrine et/ou paracrine<sup>185</sup>.

Protéine	Récepteur	Expression	Rôle principal
<b>ANGPTL1</b>	Intégrine $\alpha 1\beta 1$ , LILRB2	tube digestif, thyroïde, vessie, tissu adipeux, organes reproducteurs féminins	Anti-angiogénique
<b>ANGPTL2</b>	Intégrines $\alpha 4, \beta 2$ et $\alpha 5\beta 1$ , TLR4, LILRB2	tissu adipeux, cœur, ovaires	Pro-inflammatoire
<b>ANGPTL3</b>	Intégrine $\alpha 5\beta 3$ , LILRB2	foie	Inhibition la lipoprotéine lipase
<b>ANGPTL4</b>	Intégrines $\beta 1, \beta 5, \alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ , Fibronectine, Vitronectine, Neuropiline	foie, tissu adipeux, cerveau, tube digestif	Régulation de la perméabilité vasculaire
<b>ANGPTL5</b>	LILRB2	tissu adipeux, peau	-
<b>ANGPTL6</b>	Intégrine $\alpha 6$ ?	foie	Augmentation des dépenses énergétiques
<b>ANGPTL7</b>	LILRB2	yeux	Pro-angiogénique
<b>ANGPTL8</b>	-	foie, tissu adipeux	Pro-inflammatoire

*Tableau 5 : Récepteurs connus des différentes angiopoïétines-like et leur expression*

Le tableau ci-dessus récapitule les angiopoïétines-like, leurs récepteurs connus, leur expression et leur rôle principal. D'après Carbone et al, 2018<sup>185</sup> et Yang et al, 2022<sup>190</sup>

ANGPTL1, également connu sous le nom d'angioarrestine, a été le premier membre découvert de la famille angiopoïétines-like. Il a été identifié comme un facteur anti-angiogénique qui inhibe la prolifération, la migration et l'adhésion des cellules endothéliales<sup>185,191</sup>. ANGPTL1 exerce également une activité anti-apoptotique en activant ERK 1/2 et AKT1<sup>190,192</sup>. ANGPTL2, quant à elle, a un rôle pro-angiogénique et un rôle pro-inflammatoire, en se liant à son récepteur, l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ <sup>187,193</sup>. Lors du développement, notamment de la valve aortique, la liaison d'ANGPTL2 à cette intégrine inhibe la prolifération cellulaire et en augmente l'apoptose<sup>187</sup>.

ANGPTL3, ANGPTL4 et ANGPTL8 sont, elles, capables d'inhiber l'activité de la lipoprotéine lipase, protéine permettant d'hydrolyser les triglycérides contenus dans les lipoprotéines<sup>194</sup>.

Un traitement contre l'hypercholestérolémie a d'ailleurs été mis au point récemment, l'évinacumab, qui vise à inhiber ANGPTL3 afin de lever l'inhibition de la lipoprotéine lipase<sup>195</sup>.

En plus de leur rôle métabolique, ces 3 angiopoïétines-like agissent également sur les cellules endothéliales. Ainsi, en se liant à l'intégrine  $\alpha 5\beta 3$ , ANGPTL3 est capable d'induire l'adhésion et la migration des cellules endothéliales *in vitro* et l'angiogenèse *in vivo*<sup>196</sup>.

ANGPTL4 est produite par les cellules endothéliale en réponse à l'hypoxie<sup>186</sup>. Elle exerce un double rôle, régulant positivement ou négativement la perméabilité. Par sa liaison à l'intégrine  $\alpha \beta 3$  et au recrutement de la kinase Src qui stabilise les jonctions intercellulaires, ANGPTL4, s'oppose au effet du VEGF sur la perméabilité endothéliale<sup>186</sup>. Ce mécanisme a été confirmé *in vivo* ou des animaux déficients en ANGPTL4 présente des fuites vasculaires, dans un contexte d'hypoxie<sup>186</sup>. A l'inverse, ANGPTL4 peut également favoriser la perméabilité vasculaire par sa liaison aux neuropilines 1 et 2 qui induit l'activation de la voie de RhoA-Rho kinase et la contraction des cellules endothéliales entraînant la rupture des jonctions intercellulaires<sup>197</sup>. ANGPTL4 interagit aussi fortement avec la MEC par le biais des protéoglycanes à héparane sulfate, et ANGPTL4 lié à la matrice inhibe l'adhésion et la migration des cellules endothéliales, via le désassemblage des adhésions focales et la désorganisation du cytosquelette d'actine<sup>198</sup>.

ANGPTL7 est aussi un facteur pro-angiogénique puisqu'il favorise la migration et la formation de tubules par les cellules endothéliales, probablement via une activation des kinases ERK 1/2, AKT1 et FAK<sup>199</sup>.

ANGPTL8 agit directement sur la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  permettant la translocation de NF- $\kappa$ B dans le noyau<sup>190</sup>.

Toutes les angiopoïétines-like présentent également des propriétés pro-inflammatoires. En effet, dans plusieurs types de cancers, notamment le cancer colo-rectal, les angiopoïétines-like contribuent à entretenir l'inflammation chronique<sup>185</sup>.

### 3. ANGPTL6

ANGPTL6, initialement appelée facteur de croissance apparenté aux angiopoïétines (AGF), est principalement sécrétée par le foie. Son ou ses récepteurs restent encore inconnus à ce jour<sup>200</sup>.



Même si ANGPTL6 ne contient pas de domaine spécifique de la lipoprotéine lipase (comme possède ANGPTL3, 4 et 8), elle est néanmoins impliquée dans la régulation du métabolisme lipidique et glucidique via un rôle autocrine au niveau du foie<sup>201</sup>. Elle semble contrer l'obésité, et s'opposer à l'insulino-résistance, l'intolérance au glucose et au diabète de type 2 via une augmentation des dépenses énergétiques<sup>191,202</sup>. Son invalidation chez la souris conduit à une mortalité *in utero* de 80% mais les souris qui survivent développent une obésité et un diabète<sup>203</sup>. Chez l'Homme, les taux sériques d'ANGPTL6 sont élevés chez les patients atteints de prééclampsie<sup>204</sup>, de syndrome des ovaires polykystiques<sup>205</sup>, de diabète de type 2<sup>206</sup>, et de syndrome métabolique<sup>207</sup>. Cette augmentation peut même être détectée avant les premiers symptômes<sup>208,209</sup>.

ANGPTL6 est décrit comme un facteur pro-angiogénique<sup>182</sup>. Chez la souris, dans un modèle d'angiogenèse induite par ligature de l'artère fémorale, la surexpression adénovirale d'ANGPTL6 stimule l'angiogenèse et l'artériogénèse. Cet effet est attribué à la stimulation de la production de NO par la eNOS consécutive à l'activation de ERK 1/2 par ANGPTL6<sup>200</sup>. La mortalité *in utero* des souris déficientes en ANGPTL6, attribuée à des défauts cardiovasculaires, notamment des malformations des vaisseaux vitellins, suggère également un rôle potentiel d'ANGPTL6 dans l'angiogenèse développementale<sup>203</sup>.

ANGPTL6 a aussi un rôle dans la formation des métastases hépatiques en permettant l'attraction et la rétention des cellules cancéreuses au niveau du foie. ANGPTL6 présente dans les vaisseaux hépatiques lie l'intégrine  $\alpha 6$  et la E-cadhérine des cellules cancéreuses colorectales circulantes<sup>210</sup>.

Aucune maladie humaine n'a jusqu'à présent été associée à des mutations d'ANGPTL6.

Le variant rare, c.1378A>T du gène *ANGPTL6*, identifié par séquençage d'exome au laboratoire, dans une forme familiale d'AIC, entraîne l'apparition d'un codon STOP prématuré dans le dernier exon. Ce variant conduit ainsi à la production de la protéine p.Lys460Ter-ANGPTL6 tronquée des 11 derniers acides aminés. Contrairement à la protéine sauvage, la protéine mutée est retenue dans le cytoplasme et n'est pas sécrétée. En accord avec cette observation faite *in vitro*, la concentration plasmatique d'ANGPTL6 chez les patients hétérozygotes pour ce variant est diminuée de moitié par rapport aux apparentés non porteurs de la mutation<sup>164</sup>.

### III. CTSO

#### 1. Généralités sur les cathepsines

##### A. Structure protéique et classification

Les cathepsines sont des protéases, lysosomales et/ou extracellulaires. Il existe 15 cathepsines différentes (Tableau 6)<sup>211,212</sup>.

Cathepsine	Protéase	Activité	pH optimal
<b>A</b>	à sérine	Carboxypeptidase	5.5 <sup>213</sup>
<b>B</b>	à cystéine	Carboxypeptidase/Endopeptidase	6.0
<b>C</b>		Aminopeptidase	6.0 <sup>214</sup>
<b>D</b>	à aspartate	Endopeptidase	4.0
<b>E</b>			7.4 <sup>215</sup>
<b>F</b>			6.0 <sup>216</sup>
<b>G</b>	à sérine		7.5 <sup>217</sup>
<b>H</b>	à cystéine	Aminopeptidase/Endopeptidase	6.8
<b>K</b>		Endopeptidase	7.0
<b>L</b>			5.5
<b>O</b>			-
<b>S</b>			6.5
<b>V (ou L2)</b>			5.7 <sup>218</sup>
<b>W</b>			5.5 <sup>219</sup>
<b>X (ou Z, ou P)</b>			Carboxypeptidase

*Tableau 6 : Liste des cathepsines et leurs types d'activité*

Le tableau ci-dessus récapitule le type de protéase, le type d'activité et le pH optimal expérimental de chaque cathepsine. D'après Yadati et al, 2020<sup>212</sup> et Barret et Kirschke, 1981<sup>221</sup>

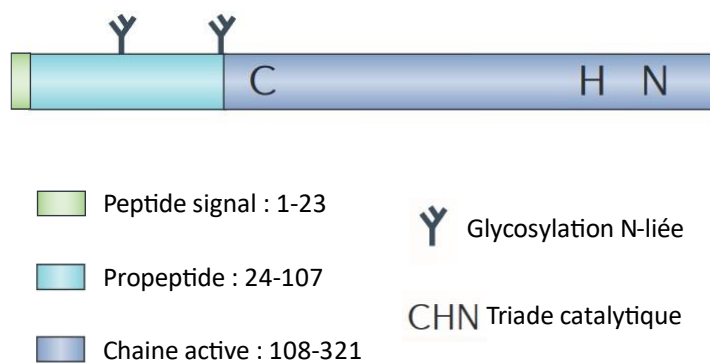
Les cathepsines A et G sont des protéases à sérine, les cathepsines D et E, des protéases à aspartate, et les 11 restantes sont des protéases à cystéine<sup>211,222</sup>. Cette classification dépend de la nature du site actif responsable de l'hydrolyse de la protéine cible.

Le site actif comprend trois résidus : une histidine qui vient, avec sa chaîne latérale basique, déprotoner le groupement thiol d'une cystéine<sup>223</sup>, puis une asparagine est nécessaire pour maintenir l'histidine dans la bonne position, grâce à une liaison hydrogène<sup>224</sup>. L'attaque nucléophile par l'ion sulfure de liaison peptidique de la protéine cible permet son hydrolyse<sup>225</sup>.

Toutes les cathepsines à cystéine font partie de la famille de la papaine<sup>226</sup> et ont donc la même structure protéique et le même mécanisme d'action<sup>227</sup>.

La plupart des cathepsines à cystéine sont des endopeptidases, c'est-à-dire que les peptides libérés suite à l'hydrolyse sont composés d'au moins 2 acides aminés. Les cathepsines C et X sont, par contre, exclusivement des exopeptidases et les cathepsines B et H ont à la fois une activité endopeptidase et exopeptidase. Les aminopeptidases (C et H) hydrolysent leur cible du côté N-terminal et les carboxypeptidases (B et X) hydrolysent le substrat du côté C-terminal<sup>228</sup>.

La séquence protéique des cathepsines à cystéine dont fait partie CTSO, contient un peptide signal, un propeptide et une chaîne active (Figure 16)<sup>212</sup>.



*Figure 16 : Structure protéique de CTSO*

*Les cathepsines à cystéine monomériques portent un peptide signal à leur extrémité N-terminale, puis un propeptide, contenant des sites de glycosylation, qui sera clivé pour ne laisser que la chaîne active qui porte les trois acides aminés du site actif. Modifié, d'après Olson et Joyce, 2015<sup>211</sup>*

Les cathepsines sont généralement exprimées de façon ubiquitaire, mais quelques-unes sont spécifiquement retrouvées dans certains tissus. Par exemple, la cathepsine K est principalement exprimée dans les ostéoclastes et dans l'appareil reproducteur féminin et les cathepsines S, V et W sont surtout exprimées dans les organes lymphoïdes<sup>222</sup>.

Elles sont, en général, actives à pH légèrement acide mais peuvent avoir une activité stable à pH neutre<sup>212</sup>.

### *B. Activation des cathepsines*

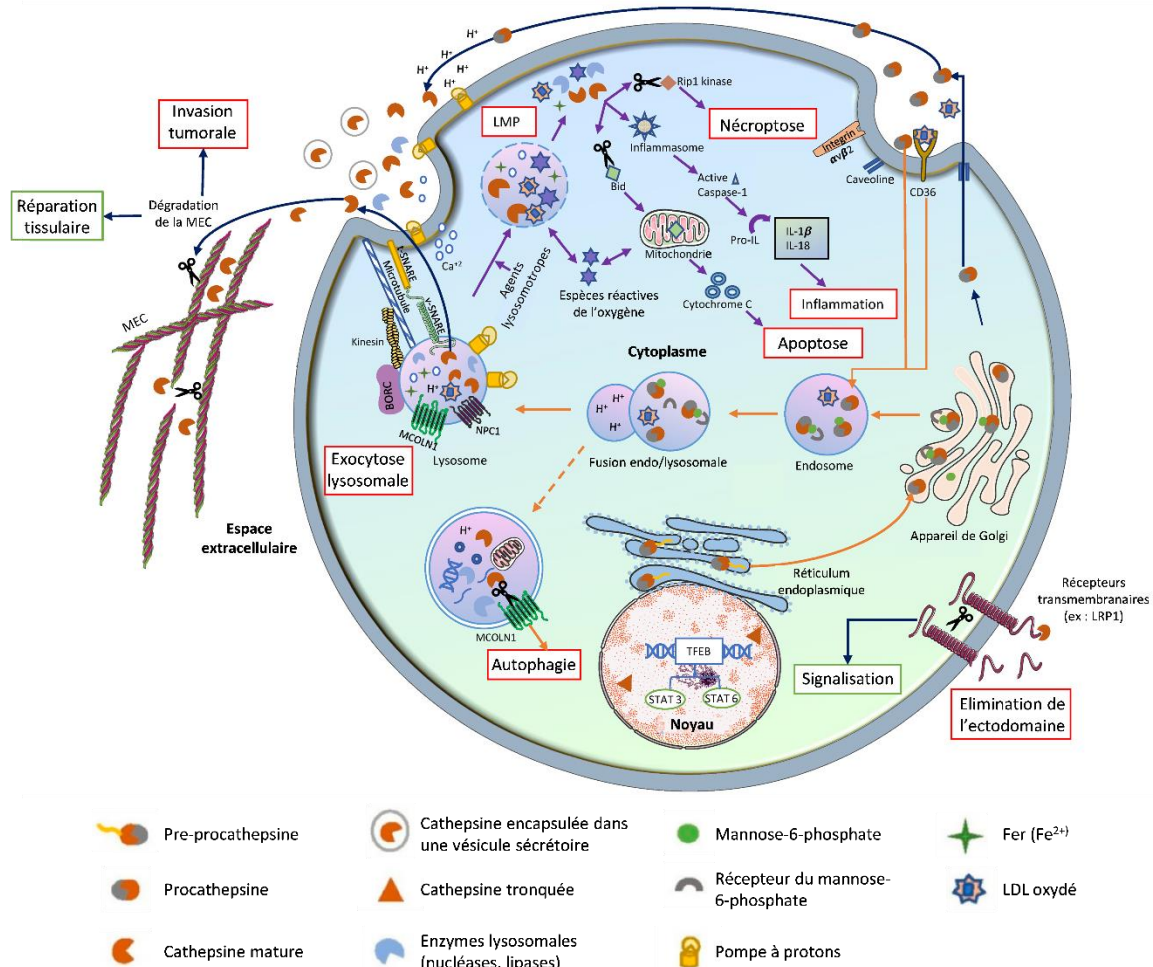
Comme les autres protéases, les cathepsines sont synthétisées sous forme de proenzymes inactives et sont activées par élimination protéolytique du propeptide N-terminal. La protéine immature possède un prodomaine N-terminal, qui est clivé pour activer l'enzyme.

Les cathepsines sont synthétisées sous forme de pré-procathepsines dans le réticulum endoplasmique, puis transformées en procathepsines par élimination du peptide signal dans la lumière du réticulum. La plupart des procathepsines sont ensuite adressées au lysosome via l'appareil de Golgi par la voie du mannose-6-phosphate<sup>223</sup>.

L'activation des cathepsines, c'est-à-dire le clivage entre le prodomaine et la chaîne active, a lieu majoritairement dans le lysosome<sup>229</sup>. En effet, certaines cathepsines ne sont pas prises en charge par les endosomes ou les lysosomes pour leur maturation mais sont plutôt sécrétées dans le milieu extracellulaire en tant que proenzymes<sup>230</sup>. La plupart des cathepsines sont capables d'auto-activation et de trans-activation, notamment les cathepsines L, S, K, V, F, B et H. Ainsi, la présence de polysaccharides tels que des glycosaminoglycanes entraîne le changement de conformation de la cathepsine B qui démasque son site actif et lui permet de cliver son propeptide et donc de conserver uniquement sa chaîne active. La trans-activation consiste en l'activation par une autre molécule, souvent une autre cathepsine. Les cathepsines C et X ont besoin d'endopeptidases comme les cathepsines L ou S pour dégrader leur prodomaine<sup>229</sup>.

### *C. Rôles physiologiques des cathepsines*

Les cathepsines peuvent être localisées dans des vésicules endosomales ou lysosomales, sur les membranes cellulaires ou sécrétées ce qui suggère que leurs substrats enzymatiques et leurs fonctions peuvent varier en fonction de leur localisation (Figure 17).



**Figure 17 : Localisation et rôle des cathepsines en intra et en extracellulaire**

Les cathepsines sont synthétisées sous forme de pré-procathepsines dans le réticulum endoplasmique et transportées (flèches orange) vers les endo/lysosomes via le réseau Trans-Golgi où le pH acide permet leur maturation, grâce au mannose-6-phosphate. Les cathepsines dans les lysosomes sont principalement impliquées dans la dégradation des protéines et participent à l'autophagie. Les cathepsines dans le cytoplasme (flèches violettes) sont libérées dans le cytoplasme suite à la perméabilisation de la membrane lysosomale (LMP) provoquée par des agents lysosomotropes, les espèces réactives de l'oxygène ou l'accumulation de lipides modifiés (LDL oxydé). Les cathepsines cytosoliques participent à plusieurs processus : elles activent l'inflammasome, favorisent l'apoptose et la nécroptose en clivant diverses protéines. L'exocytose lysosomale permet la sécrétion du contenu lysosomal et donc des cathepsines dans l'espace extracellulaire (flèches bleues). Ce phénomène a lieu grâce à plusieurs interactions protéine-récepteur (SNARE notamment) et d'un gradient ionique  $Ca^{2+}$ . Les cathepsines sont libérées soit sous forme de procathepsines, soit encapsulées dans des vésicules sécrétoires, soit sous forme de cathepsines actives. Les cathepsines sécrétées restent attachées à la membrane plasmique ou sont libérées dans l'espace extracellulaire. Les cathepsines sur la membrane plasmique clivent des protéines comme les intégrines. Les cathepsines sécrétées participent principalement à la dégradation de la MEC et contribuent ainsi à la réparation tissulaire. Cependant, une dégradation excessive de la MEC facilite l'invasion tumorale et favorise le cancer. Dans l'espace extracellulaire, les cathepsines peuvent également cliver les ectodomains de récepteurs transmembranaires, ce qui entraîne l'activation ou l'inhibition de la signalisation intracellulaire. Modifié, d'après Yadati et al, 2020<sup>212</sup>

a. Rôles des cathepsines dans le lysosome

Les cathepsines B, D et L sont les protéases ubiquitaires les plus abondantes dans le lysosome. La cathepsine B, par exemple, dégrade les dépôts amyloïdes dans le cerveau et active certaines pro-hormones et pro-enzymes, notamment dans le pancréas. La cathepsine D joue

un rôle important dans le développement neuronal, en dégradant des protéines telles que  $\alpha$ -synucléine ou la protéine Tau<sup>212</sup>.

Les cathepsines participent à l'autophagie, un phénomène indispensable pour maintenir l'homéostasie cellulaire. Les cathepsines D, L et S participent, en particulier, à la dégradation du contenu de l'autophagosome lorsque celui-ci fusionne avec le lysosome<sup>212</sup>.

#### b. Rôle des cathepsines dans le cytosol

Un des rôles cytosoliques de certaines cathepsines est également de promouvoir l'inflammation, en particulier via l'activation de l'inflammasome. Par exemple, les cathepsines B, C, S, L et Z ont été montrées comme nécessaires à la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  mais le mécanisme exacte reste inconnu<sup>212</sup>.

Les cathepsines sont également retrouvées dans le noyau où elles sont connues pour jouer un rôle dans la régulation du cycle cellulaire, notamment la cathepsine L, en clivant des facteurs de transcription favorisant la prolifération cellulaire. Les cathepsines B, K, L et S sont aussi connues pour contrôler la translocation nucléaire des effecteurs du TGF- $\beta$ , les facteurs de transcriptions SMAD2/3<sup>212</sup>.

#### c. Rôle des cathepsines dans le milieu extracellulaire

Les cathepsines peuvent être sécrétées dans le milieu extracellulaire via l'exocytose lysosomale le plus souvent. Elles sont impliquées dans la dégradation des certains composant de la matrice extracellulaire. Par exemple, la cathepsine K, produit par les ostéoclastes, hydrolyse le collagène de type 1 et l'élastine<sup>228</sup>.

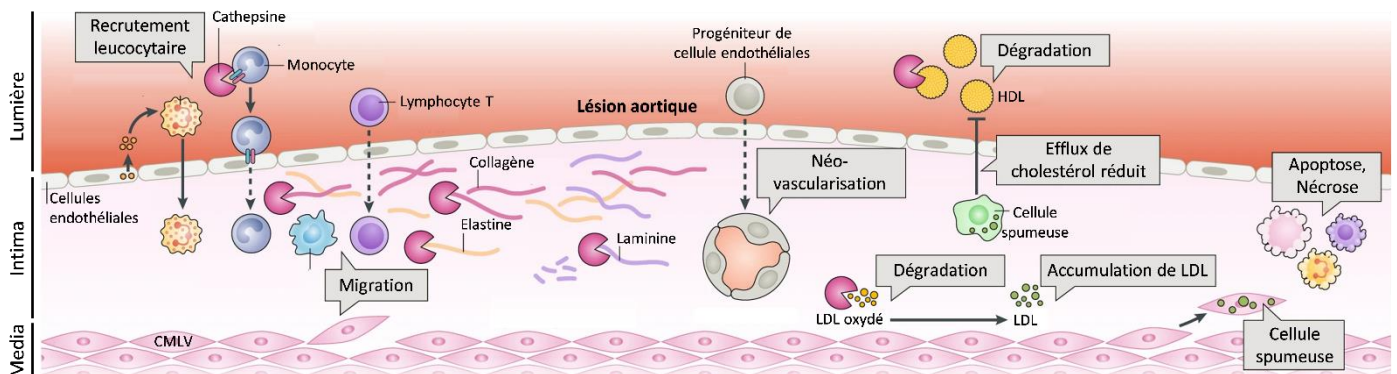
Dans les cellules endothéliales, la cathepsine B interagit avec les hétérotétramères d'annexine II et donc se localiser au niveau des cavéoles où elle exerce son activité protéolytique<sup>231</sup>. De la même manière, la cathepsine S, une fois active, colocalise avec l'intégrine  $\alpha\beta 3$  à la surface des CMLV et semble avoir un rôle dans la dégradation de la MEC environnante<sup>232</sup>. Il est important de noter que les compartiments périmembranaires ou cavéolaires présentent des pH acides localement permettant une activité optimale des cathepsines. Il a été démontré que les cathepsines B, K, L, S, et X actives sont capables de dégrader les composants de la MEC, notamment la laminine, la fibronectine, l'élastine et les collagènes (surtout le collagène IV)<sup>233</sup>.

Les cathepsines peuvent moduler l'adhésion des cellules à la MEC. La cathepsine X a ainsi été décrite pour cliver la sous-unité  $\beta 2$  de certaines intégrines. Une fois clivée, l'intégrine s'active, ce qui favorise l'adhésion des cellules dendritiques et des lymphocytes notamment<sup>233,234</sup>.

## 2. Rôles des cathepsines dans les pathologies cardiovasculaires

### A. Rôle des cathepsines dans le remodelage vasculaire

Les cathepsines S et K ont été les premières décrites à être exprimées dans les cellules de la paroi artérielle suivies par les cathepsines F, L et V<sup>235</sup>. Ces cathepsines ne semblent pas fortement exprimées dans la paroi vasculaire saine mais sont essentiellement retrouvées dans les parties lésionnelles de la paroi (Figure 18). Ainsi les lésions d'athérosclérose contiennent plus de cathepsine S et K que les artères normales<sup>236,237</sup>. La cathepsine K est exprimée dans les CMLV dans les lésions athéromateuses précoces, et dans les macrophages et les CMLV de la chape fibreuse dans les plaques d'athérosclérose avancées<sup>238</sup>. La cathepsine K macrophagique est notamment responsable de la digestion des fibres élastiques au niveau des plaques d'athérosclérose<sup>239</sup>. De plus, l'expression de la cystatine C, principal inhibiteur des cathepsines, est diminuée au niveau de ces lésions athéromateuses<sup>236</sup>.



**Figure 18 : Activité des cathepsines dans la paroi artérielle lésée**

Les cathepsines participent au recrutement des cellules immunitaires, par activation de l'intégrine  $\beta 2$  des monocytes, entraînant une augmentation de leur adhésion, mais également en favorisant la transmigration des lymphocytes T et l'infiltration des macrophages. Les cathepsines ont aussi un rôle dans la dégradation de la MEC (collagène, élastine), ce qui favorise la fibrose interstitielle, et elles ont un rôle dans la néo-vascularisation, avec la digestion de la laminine qui entraîne la formation de fragments pro-angiogéniques. Enfin, les cathepsines contribuent à l'accumulation des lipides en dégradant le LDL oxydé et le HDL ce qui conduit à l'accumulation du LDL d'une part et à la réduction de l'efflux de cholestérol d'autre part. Ces mécanismes aboutissent à la formation et à l'augmentation du nombre de cellules spumeuses au sein de la paroi lésée. Les cathepsines peuvent également induire l'apoptose et la nécrose de tous les types cellulaires en jeu. Modifié, d'après Liu et al, 2018<sup>235</sup>

De manière intéressante, des expériences *in vitro* montrent que la présence d'IL-1 $\beta$  ou d'interféron  $\gamma$  induit significativement l'expression et la sécrétion des cathepsines K, L et S par



les CMLV et les macrophages ainsi que leurs activités collagénases et élastases<sup>232</sup>. Ces mêmes cathepsines sont surexprimées dans les anévrismes de l'aorte abdominale<sup>240</sup>.

L'utilisation de modèles murins délétés des cathepsines K, L ou S (croisés avec des modèles transgéniques *Ldlr*<sup>-/-</sup> ou *ApoE*<sup>-/-</sup>) montre une structure de la paroi vasculaire qui est préservée et la formation de plaques d'athérosclérose y est réduite<sup>238,241,242</sup>. Ces données suggèrent un rôle fondamental des cathepsines à cystéine dans le remodelage de la paroi vasculaire.

### B. Rôle des cathepsines dans l'AIC

Une des premières études transcriptomiques sur AIC humain a mis en évidence la surexpression des cathepsines B et D dans les parois d'AIC par rapport à la paroi d'artère temporale superficielle saine<sup>243</sup>.

Plus récemment, dans un modèle d'AIC induit par surcharge hémodynamique chez le rat, les cathepsines B, K et S sont surexprimées dans la paroi des AIC par rapport aux artères cérébrales des animaux non opérés. Dans cette étude, le traitement des animaux par un inhibiteur de protéase à cystéine a permis de diminuer la sévérité des AIC formés. Chez les animaux traités, le contenu en élastine est préservé, alors qu'il est diminué avec les AIC des animaux non traités. Par contre, ce traitement ne semble pas avoir d'effet sur l'infiltration macrophagique<sup>244</sup>. Ces données suggèrent que le remodelage de la MEC présent dans la paroi de l'AIC est en partie dû à une surexpression de cathepsines à cystéine.

### 3. CTSO

CTSO est la cathepsine la moins connue. Elle a été découverte en 1994 et identifiée comme ubiquitaire<sup>245</sup>. Le gène de la cathepsine K pouvant aussi être nommé *CTSO2*, les études sont longtemps restées confondantes<sup>235,246</sup>.

Les données structurales permettent de proposer que l'activité enzymatique de CTSO serait peu sensible au pH, ce qui suggère qu'en plus du rôle lysosomal qu'ont toutes les cathepsines, CTSO pourrait avoir des rôles dans d'autres compartiments intracellulaires mais aussi extracellulaires<sup>247</sup>.



Des études génétiques ont identifié, à plusieurs reprises, des polymorphismes proches du gène *CTSO* dans des cancers du sein hormono-dépendants<sup>248-251</sup>. Cependant, aucune analyse fonctionnelle n'a été menée dans ce contexte.

Les variants rares, p.Ala43Val-*CTSO* et p.Val316Ile-*CTSO*, identifiés par mon laboratoire sont des variants faux-sens. Chacun d'eux ségrége avec l'AIC dans une forme familiale.

Une analyse de liaison réalisée par Ruigrok *et al.* en 2008 avait identifié le locus de *CTSO* (4q32) comme lié aux AIC et aux anévrismes de l'aorte<sup>135</sup>.



# *OBJECTIFS*

A l'heure actuelle, les AIC, lorsqu'ils sont détectés chez un patient, sont soit surveillés soit traités de façon invasive. Ces traitements entraînent des risques per et post-opératoires importants et la surveillance par imagerie cérébrale régulière reste très angoissante pour le patient. En effet, ce dernier sait qu'il présente une anomalie cérébrovasculaire pouvant rompre et cette rupture est potentiellement fatale. Que le patient se sache ou non porteur d'AIC, la survenue de la rupture est dévastatrice et peut avoir des conséquences dramatiques.

Il est donc nécessaire aujourd'hui d'agir à deux niveaux : le premier est de repérer les patients à risque d'être porteur d'un ou de plusieurs AIC et les AIC à risque de rupture, avec pour objectif de développer de nouveaux biomarqueurs. Le second niveau sur lequel il faut agir c'est sur le traitement dans le but de limiter le recours aux traitement invasifs que sont le traitement endovasculaire ou le clipping et d'aller plutôt vers un traitement pharmacologique empêchant la formation ou l'évolution vers la rupture de l'AIC. Le défi actuel est de mieux comprendre les mécanismes cellulaires en jeu afin de développer ces outils.

L'identification de gènes d'intérêt, notamment grâce aux études des formes familiales comme celles menées par mon laboratoire, peut permettre, lorsqu'elle est associée à des études fonctionnelles, d'améliorer la compréhension de la physiopathologie de l'AIC. En effet, les gènes identifiés dans ces conditions codent pour des protéines qui permettraient de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à l'AIC, mais peuvent aussi faire directement l'objet d'un potentiel biomarqueur ou d'une potentielle cible pharmacologique.

Mon projet s'inscrit dans ce contexte. L'objectif de mon travail a été d'identifier le rôle vasculaire de variants génétiques familiaux prédisposant à la formation des AIC : un variant rare d'*ANGPTL6*, prédit comme perte de fonction, et deux variants rares de *CTSO*, tous deux prédits comme dommageables pour la fonction de la protéine. Notre hypothèse de départ plaçait les protéines codées par ces gènes comme indispensables à la physiologie de la paroi artérielle cérébrale et que la présence des variants les empêchait de jouer ce rôle.

Le projet portant sur *ANGPTL6* est constitué de deux grands objectifs : 1) Caractériser le modèle de souris *Angptl6*-knock-in (*Angptl6*-KI), mis au point par l'équipe et reproduisant la mutation identifiée chez l'Homme, et 2) Comprendre le rôle d'*ANGPTL6* dans les fonctions des cellules vasculaires.

Le projet portant sur *CTSO* s'organise en trois grands objectifs : 1) Analyser l'expression de *CTSO* et sa modulation par les contraintes hémodynamiques, facteur impliqué dans la genèse des AIC ; 2) Définir le rôle de *CTSO* dans les cellules de la paroi artérielle et 3) Identifier les conséquences des variants de *CTSO* sur l'expression et la fonction de la protéine



# *RESULTATS*





## I. Projet ANGPTL6

### 1. *Introduction*

Notre laboratoire, grâce au séquençage d'exome dans des formes familiales d'AIC, a identifié plusieurs variants rares du gène *ANGPTL6*<sup>164</sup>. Parmi ceux-ci, p.Lys460Ter-ANGPTL6 est fortement associé à la pathologie, notamment chez les femmes. Ce variant entraîne la formation d'une protéine tronquée des 11 derniers acides aminés en C-terminal. Des études fonctionnelles *in vitro* ont révélées que la protéine ANGPTL6 mutée n'était pas sécrétée<sup>164</sup>.

ANGPTL6 décrit comme un facteur pro-angiogénique<sup>182</sup>, orphelin de récepteur, et qui joue également un rôle dans le métabolisme lipidique et glucidique<sup>203</sup>.

Le but du projet était donc de comprendre le lien de causalité entre le variant identifié chez l'Homme et la prédisposition à la formation d'AIC. Dans ce but, mon équipe a développé un modèle de souris *Angptl6-KI* qui exprime le même variant que celui identifié chez l'Homme. L'objectif a été de caractériser anatomiquement et fonctionnellement les artères cérébrales de ces souris en conditions basales, d'hypertension ou soumis à un modèle chirurgical d'induction d'AIC. Nous avons également étudié *in vitro* le rôle d'ANGPTL6 dans les cellules de la paroi vasculaire.

Cette étude, encore en cours au sein du laboratoire, a permis d'obtenir les résultats qui sont présentés dans ce manuscrit. Cependant, certains aspects restent à approfondir, en reproduisant les expérimentations afin d'atteindre une puissance statistique suffisante et/ou en utilisant des méthodes et stratégies complémentaires pour confirmer les observations initiales et les hypothèses qu'elles ont engendrées. Au cours de ma thèse, j'ai participé à l'analyse morphologique des artères cérébrales des souris *Angptl6-KI* et mis en évidence la déformation locale de la paroi à l'apex de la bifurcation. J'ai également pris part à l'étude du rôle d'ANGPTL6 *in vitro* sur les CMLV.

## 2. Matériels et méthodes

### A. *Modèle animal*

Le modèle de souris *Angptl6*-KI a été généré par recombinaison homologue, par l'Institut Clinique de la Souris (Illkirch, France), sur un fond génétique C57BL/6J. Grâce à l'homologie de séquence entre la protéine murine et celle humaine, la mutation ponctuelle p.Lys447Ter-ANGPTL6 introduite chez la souris reproduit le variant rare humain p.Lys460Ter-ANGPTL6 prédisposant à l'AIC<sup>164</sup>. Ils conduisent tous deux à une délétion des 11 derniers acides aminés. Nous avons étudié les souris sauvages (*Angptl6*<sup>WT/WT</sup>), hétérozygotes (*Angptl6*<sup>WT/Δ</sup>) et homozygotes (*Angptl6*<sup>Δ/Δ</sup>). Les soins et les expérimentations sur les animaux étaient conformes aux normes communautaires CEEA n°6 sur les soins et l'utilisation des animaux de laboratoire (numéro d'autorisation : 23002).

#### a. *Modèle d'HTA*

Le chlorhydrate d'ester méthylique de N-Nitro-L-Arginine (L-NAME, Sigma-Aldrich) a été utilisé à une concentration de 3 g/L dans l'eau de boisson pendant 21 jours. La surveillance de la pression artérielle systolique a été faite par une méthode non invasive (BP-2000 series II - Visitech systems) 2 à 3 fois par semaine avant et pendant les 21 jours de traitement.

#### b. *Modèle chirurgical d'induction des AIC*

Des souris âgées de 8 à 10 semaines ont subi des ligatures de l'artères carotide commune gauche et de la branche postérieure de l'artère rénale droite sous anesthésie générale à l'isoflurane à 1 % ou 2 %. Nous avons veillé tout particulièrement à maintenir une température corporelle normale et à ne pas induire une anesthésie trop profonde lors de l'opération. Une semaine après la première opération, la branche postérieure de l'artère rénale gauche a été ligaturée. Une semaine après ces procédures, une solution saline à 0,9 % a été substituée à l'eau de boisson<sup>103</sup>. Les souris ont été analysées 4 mois après la procédure chirurgicale. La pression artérielle systolique a été mesurée par méthode non invasive avant et 2 mois après l'intervention et avant le sacrifice.

### B. *Perfusions intracardiaques*

Après une anesthésie profonde à la kétamine (100 mg/kg)/xylazine (10 mg/kg), les souris ont été perfusées avec du solution saline tamponnée au phosphate (PBS) pendant 3 minutes, puis

avec du paraformaldéhyde à 4 % dans du PBS pendant 10 minutes et avec un mélange de gélatine (G1890 ; Sigma, 3 % final) et de sulfate de baryum (Micropaque®, Guerbet ; pour les cerveaux passés au microscanner) ou d'une solution de bleu Evans (pour les coupes vibratome et les cerveaux transparisés). Les cerveaux ont été prélevés et immergés dans le même tampon pour une fixation pendant 24 h.

### *C. Immunofluorescence / Transparisation*

Les parties droite et gauche du cerveau de souris perfusées en conditions basales ont été incluses séparément dans de l'agarose à faible point de fusion (4 % ; Sigma-Aldrich). Chaque côté a été découpé en coupes de 100 µm d'épaisseur à l'aide d'un vibratome (Leica VT1200S, Leica Biosystems®). Les rétines ont été prélevées sur des souris euthanasiées 6 jours après la naissance (P6) et fixées avec du PFA à 4 % dans du PBS pendant une nuit à 4°C. Le blocage et la perméabilisation ont été réalisés à l'aide d'un tampon de blocage/perméabilisation composé de 1 % de sérum de veau fœtal (SVF), 3 % d'albumine de sérum bovin (Sigma-Aldrich), 0,5 % de Triton X-100 (Sigma-Aldrich), 0,01 % de déoxycholate de sodium (Sigma-Aldrich) et 0,02 % d'azide de sodium (Sigma-Aldrich) dans du PBS à pH 7,4 pendant 1 h à température ambiante. Les anticorps primaires (anti-SM22α (14106 ; Abcam, 1/1000) ; anti-VE-cadhérine (AF938 ; RnD, 1/100)) ont été incubé à la concentration souhaitée dans une solution de tampon de blocage/PBS 1:1 pendant une nuit à 4°C et les anticorps secondaires ont été incubé dans une solution de tampon de blocage/PBS 1:1. Le DAPI (Sigma-Aldrich, 1/1000) a été utilisé pour le marquage nucléaire et l'isolectine B4 (life technologies, 1/400) a été utilisée pour marquer les cellules endothéliales des rétines. Les rétines ont été montées entre lame et lamelle dans du Mowiol. Les sections faites au vibratome ont été placées dans le puits µ-Slide 8 (80826 ; IBIDI®).

Les cerveaux de souris perfusées ayant subi le protocole chirurgical d'induction des AIC ont été pris en photo grâce à une caméra ZEISS avant transparisation. Ces photographies ont permis de mesurer le diamètre des artères cérébrales antérieures du côté controlatéral à la ligature de l'artère carotide commune, grâce au logiciel FIJI. Après cela, les héli-cerveaux ont été rendus optiquement transparents en utilisant le protocole CLARITY. En bref, une électrophorèse (3h, 1.2A, 37°C, 100rpm) a été appliquée. Le blocage et la perméabilisation ont été réalisés à l'aide du tampon de blocage/perméabilisation pendant 24 h (température ambiante le jour et 4°C la nuit). L'anticorps primaire, anti-SM22α (14106 ; Abcam, 1/200) a

été incubé dans un tampon de blocage/PBS 1:1 avec agitation à 4°C pendant 3 jours et l'anticorps secondaire, anti-lapin alexa 568 a été incubé à une concentration de 1/400 dans un tampon de blocage/PBS 1:1 pendant 2 jours à 4°C. Le ToPro a été utilisé pour le marquage nucléaire et l'isolectine B4 (Life Technologies, 1/400, 2 jours) pour les cellules endothéliales. Les cerveaux ont été replacés dans la solution de montage X-Clarity avant l'imagerie.

#### *D. Imagerie*

##### *a. Tomodensitométrie*

Les cerveaux de souris perfusées ayant subi le protocole d'HTA ont été inclus en agarose 4 %. Les scans ont été réalisés à la plateforme SC3M (Nantes) à l'aide d'un microtomodensitomètre (microCT) Skyscan 1272 (Bruker, Allemagne) à une résolution de 12 µm. Les reconstructions tridimensionnelles des projections brutes ont été obtenues à l'aide de Nrecon (Bruker). À l'aide de logiciels dédiés (CTvox, CTan, Data Viewer de Bruker), les diamètres internes des artères cérébrales ont été mesurés.

##### *b. Imagerie confocale*

Les images des sections de cerveau faites au vibratome et des rétines marquées par immunofluorescence ont été acquises à l'aide d'un microscope confocal A1 SIM (Nikon) équipé d'un objectif Plan-Apochromat 20x/0,8 NA Ph2 ou d'un objectif Plan-Apochromat 60x/1,4. Le microscope était équipé d'un détecteur à tube multiplicateur de photons. Les images ont été prises à température ambiante en utilisant le logiciel NIS element (Nikon).

Les images obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel FIJI. Sur les images obtenues des sections coupées au vibratome, l'outil « Straighten » nous a permis de linéariser la bifurcation. La longueur de ligne droite théorique ( $L_t$ ), plane, est retranchée de la ligne réelle ( $L_{ex}$ ). Puis, afin de déterminer l'indice de courbure, nous avons calculé le ratio entre cette différence et la longueur de la ligne théorique telle que  $(L_{ex}-L_t)/L_t$ . Sur les rétines, grâce au marquage isolectine B4, nous avons calculé l'expansion radiale qui correspond à la distance entre le front angiogénique et le centre de la rétine (nerf optique). Après application d'un seuil sur ce même canal, nous avons déterminé la densité du réseau vasculaire en mesurant l'air du marquage dans une zone d'une taille définie. Avec l'application d'un seuil, cette fois-ci sur le canal du marquage SM22 $\alpha$ , nous avons quantifié la surface de l'artère couverte par les CMLV.

c. Microscopie à feuille de lumière

Les images des bifurcations des artères cérébrales antérieures-olfactives et antérieures-moyennes ont été acquises sur un ZEISS Lightsheet 7 avec un objectif Clr Plan-Neofluar 20x. Les données ont été traitées avec le logiciel d'imagerie ZEN et FIJI.

*E. Artériographie pressurisée*

Après une injection intrapéritonéale d'Euthazol vet<sup>®</sup>, les souris ont été décapitées et leur cerveau a été prélevé. L'artère cérébrale postérieure a été disséquée puis canulée sur deux micropipettes en verre dans une cuve contenant une solution saline physiologique maintenue à 37°C (pH 7,4), et mise sous pression à l'aide d'un système artériographique (Living Systems Instrumentation, Inc., St. Albans, VT) comme décrit précédemment<sup>252</sup>. Une fois mise en place, l'artère se stabilise pendant au moins 60 minutes à une pression de 50 mmHg jusqu'au développement du tonus basal. La viabilité des artères a été testée en utilisant une solution riche en KCl (80 mmol/L) et en phényléphrine (PhE ; 10 µmol/L). Afin d'évaluer la dilatation induite par le flux, le débit a été augmenté de 3 à 10 µl/min. Pour quantifier la part dépendante du NO dans la dilatation au flux, l'artère est incubée en L-NAME, inhibiteur de la eNOS (10<sup>-4</sup> M), puis le débit est de nouveau augmenté. Sur l'artère cérébrale postérieure controlatérale, le tonus myogénique a été quantifié par mesure du diamètre actif en augmentant la pression de 20 à 100 mmHg. À la fin de chaque expérience, le diamètre passif a été obtenu dans une solution physiologique exempt de Ca<sup>2+</sup> et contenant de l'EGTA (2-5 mmol/l ; Sigma), en augmentant la pression de 20 à 100 mmHg. Le diamètre interne des vaisseaux a été enregistré en continu à l'aide d'une caméra CCD et d'un logiciel de détection des bords. Les diamètres des artères sont indiqués en µm.

*F. Culture cellulaire*

Les CMLV aortiques primaires ont été isolées à partir de l'aorte de rats Wistar Han. Les explants ont été nettoyés et digérés pendant 2 h avec de la collagénase II (1 mg/mL, Worthington Bio-chemical) à 37°C sous agitation. Les cellules ont été cultivées dans du milieu Dulbecco modified Eagle (DMEM, Gibco ; Invitrogen) contenant 10 % de SVF, 4,5 g/L de glucose, 100 unités/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub>. Toutes les expériences ont été réalisées entre les passages 2 et 4.

## a. Test d'adhésion cellulaire par mesure d'impédance

Les plaques ont été recouvertes avec de la gélatine à 0,2% avec ou sans ANGPTL6 (LS-G16246 ; LSBio) à 1, 2 ou 4 ng/ml avant l'expérience. Les CMLV ont étéensemencées dans une plaque de 96 puits de microtitration xCELLigence (E-Plate, ACEA Biosciences Inc.) et placées sur la plateforme de l'analyseur cellulaire xCELLigence en temps réel (Roche Applied Science) à 37°C pour mesurer l'« indice cellulaire » (changement d'impédance par rapport au point de référence) toutes les 5 min pendant une période de 12 h. La vitesse d'adhésion a été évaluée par la pente de l'indice cellulaire entre 30 min et 2 h .

## b. Evaluation de la migration

## i. Chimiotactisme par Transwell

Les CMLV ont été ajoutées à la chambre supérieure d'une chambre de Boyden, (membrane en polycarbonate, pores de 8 µm et 0,47cm<sup>2</sup> de surface de culture (140629, Nunc™)) recouverte de gélatine à 0,2% avec ou sans ANGPTL6 à 5 ng/mL. Le chimioattractant présent dans le compartiment inférieur était du SVF à 10%. Vingt-deux heures après l'ensemencement, les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde à 4% et colorées avec du bleu de Coomassie 0,1 %. Les cellules qui sont restées dans la chambre supérieure ont été grattées et les cellules de la face inférieure ont été observées par microscopie à lumière blanche. La quantification de la surface couverte par les cellules a été effectuée avec FIJI.

## ii. Chimiotactisme par mesure d'impédance

Les CMLV ont étéensemencées dans les chambres supérieures de plaques CIM 16 puits (ACEA Biosciences Inc.) recouvertes de gélatine à 0,2 % avec ou sans ANGPTL6 (LS-G16246 ; LSBio) avant l'expérience. Nous avons laissé les CMLV adhérer au fond des puits dans l'incubateur pendant 30 minutes. La plaque a ensuite été placée sur la plateforme de l'analyseur cellulaire xCELLigence en temps réel (Roche Applied Science) à 37°C pour mesurer l'« indice cellulaire » (changement d'impédance par rapport au point de référence) toutes les 5 min pendant une période de 15 h. La vitesse de migration a été mesurée comme la pente de l'indice cellulaire entre 2 et 10 h.

## c. RT-qPCR

Les CMLV ont été ensemencées sur une matrice sans et avec ANGPTL6 (5ng/ml). Le lendemain de l'ensemencement, l'ARN total a été purifié à partir des cellules en utilisant le kit RNA plus (Macherey Nagel) selon les instructions du fabricant. L'ARN (500 ng) a été soumis à une transcription inverse avec l'enzyme M-MLV (28025021, Thermo Fisher Scientific). La PCR en temps réel a été réalisée sur un système 7900HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems) en utilisant le SYBR Green Master Mix (4367659, Applied Biosystems) et les amorces listées dans le Tableau 7. Chaque échantillon a été analysé en triplicat. La GAPDH a été utilisée comme gène de référence et les résultats sont exprimés selon la méthode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Gène	Amorce sens	Amorce anti-sens
<b>Gapdh</b>	5'-AACCCATCACCATCTTCCAG-3'	5'-CCAGTAGACTCCACGACATAC-3'
<b>Acta2</b>	5'-ACGCGAAGCTCGTTATAGAAG-3'	5'-GACCCTGAAGTATCCGATAGAAC-3'
<b>Cnn1</b>	5'-GATCCACTCTCTCAGCTCCT-3'	5'-CTTCCGCACACTTTAACCGA-3'
<b>Myh11</b>	5'-CTTTCCAGCTCCAGACTCAC-3'	5'-CGCCTCACATCTATGCCATT-3'
<b>Myocd</b>	5'-CTGAGCAGTTGGAATGGATCT-3'	5'-CAAGGTCAGAAACAGATCGGA-3'
<b>Tagln</b>	5'-GCTCCTCATCACTTCTTCTCA-3'	5'-AACGCTACTCTCCTTCCAG-3'
<b>Mmp3</b>	5'-CTGTGGAGGACTTGACTG-3'	5'-CTATTCCTGGTTGCTGCTCAT-3'
<b>Mmp9</b>	5'-GGAGGTCATAGGTCACGTAGG-3'	5'-GAACTCACACAACGTCTTTCAC-3'
<b>Fn1</b>	5'-CGAGGTGACAGAGACCACAA-3'	5'-CTGGAGTCAAGCCAGACACA-3'
<b>Col1a</b>	5'-TACAGCACGCTTGTGGATGG-3'	5'-CAGATTGGGATGGAGGGAGTT-3'

*Tableau 7 : Liste des amorces utilisées pour les RT-qPCR*

## d. Western blot

Les CMLV ont été ensemencées sur une matrice sans et avec ANGPTL6 (5ng/ml). Le lendemain de l'ensemencement, les CMLV ont été placées sur glace avec un tampon de lyse complété par des cocktails d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Sigma-Aldrich) et de l'orthovanadate de sodium. Les lysats ont été soumis à une électrophorèse en conditions dénaturantes, transférés sur des membranes de nitrocellulose et incubés avec des anticorps spécifiques : P-MYPT (1/1000 ; 3040, Cell Signalling Technology) et MYPT (1/1000 ; 2634, Cell Signalling Technology), SM22 $\alpha$  (1/1000 ; 14106, abcam). La charge égale a été vérifiée en réincubant la membrane avec un anticorps anti-tubuline (T9026, Sigma-Aldrich). Les complexes immuns ont été détectés avec des anticorps secondaires appropriés et un réactif

de chimiluminescence améliorée (Clarity ECL BioRad). L'intensité des bandes de protéines a été quantifiée à l'aide de FIJI.

e. Contraction sur gel de collagène

Les CMLV ont été mélangées à une solution de collagène (CBA-201, Cell Biolabs) avec ou sans ANGPTL6 à 10 ng/mL. Le mélange cellules-collagène a été déposé dans les puits d'une plaque 24 puits et incubé à 37°C pendant 1 h pour permettre la polymérisation du collagène. Du milieu de culture sans sérum a été ajouté au gel, un fois celui-ci polymérisé. Deux jours après l'ensemencement, les cellules ont été traitées ou non avec du SVF (10%) ou du BDM (du kit CBA-201 ; inhibiteur de la contraction), puis les gels de collagène ont été libérés à l'aide d'une pointe stérile. La taille de chaque gel a été mesurée 48 h après libération. La contraction a été quantifiée en pourcentage telle que  $(Aire_{BDM} - Aire_{SVF/NonSVF}) / Aire_{BDM}$ .

*G. Analyses statistiques*

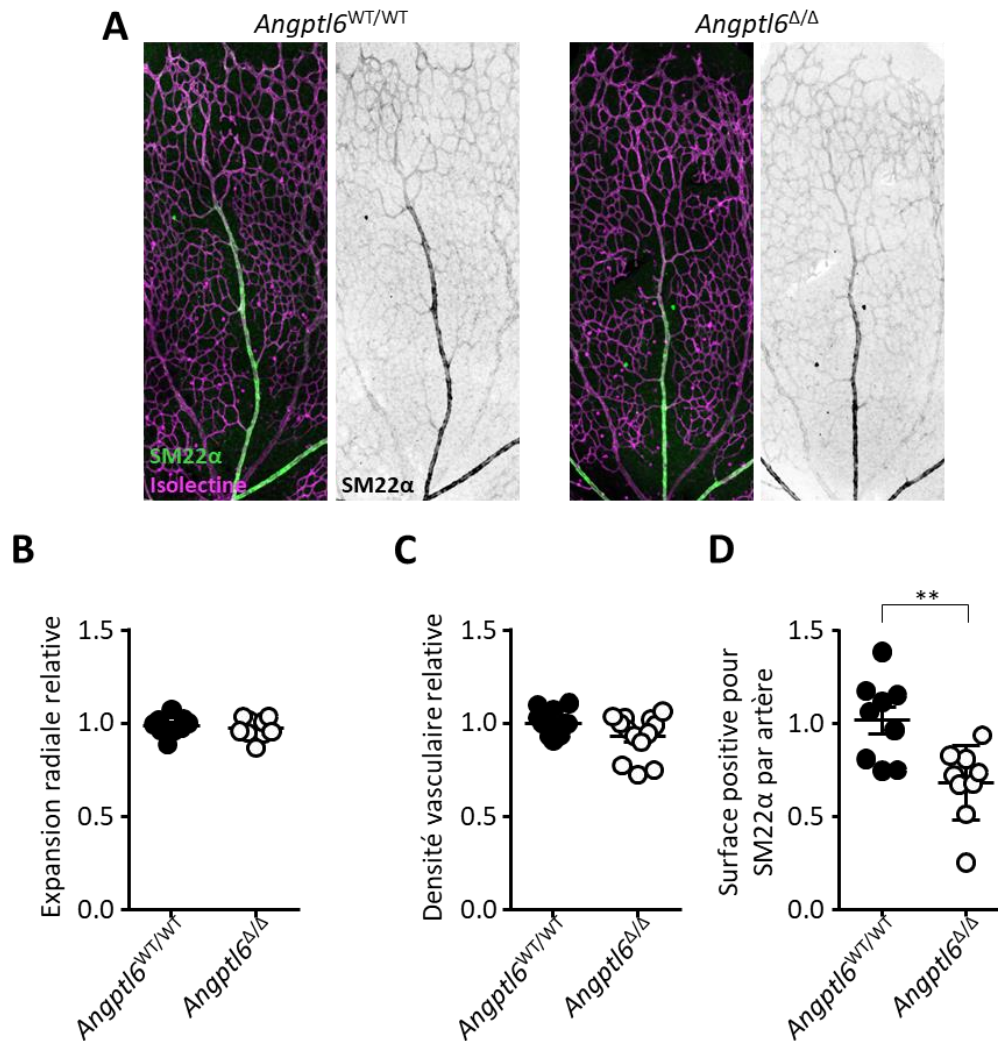
Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Les données sont représentées en moyenne  $\pm$  écart-moyen. Les tests statistiques utilisés sont indiqués dans les légendes des figures.



### 3. Résultats

#### A. Les souris *Angptl6-KI* présentent un retard de couverture en CMLV lors de l'angiogenèse rétinienne

Les souris *Angptl6-KI* naissent et se développent normalement. Nous n'avons pas observé de mortalité précoce, ni de signe évident d'atteinte physique ou comportemental. Le seul rôle connu d'ANGPTL6 au niveau vasculaire est la promotion de l'angiogenèse<sup>182</sup>. De ce fait, nous avons utilisé le développement vasculaire rétinien chez des souris nouveau-nés (P6) comme modèle pour étudier l'effet de la mutation d'ANGPTL6 sur l'angiogenèse (Figure 19A). L'imagerie du réseau vasculaire par marquage endothélial n'a pas révélé de différence dans la densité ainsi que dans l'expansion radiale du réseau vasculaire rétinien entre les souris *Angptl6<sup>WT/WT</sup>* et *Angptl6<sup>Δ/Δ</sup>* (Figure 19B et C). Ceci suggère que la mutation d'ANGPTL6 n'affecte ni la migration, ni la prolifération des cellules endothéliales lors de l'angiogenèse développementale, ni le remodelage vasculaire développemental. Le marquage des CMLV a permis d'évaluer leur recrutement le long des artères et leur incorporation autour des vaisseaux rétiens, ce qui en temps normal contribue à la stabilité des vaisseaux<sup>203</sup>. Nous avons observé une réduction significative de la couverture en CMLV des artères rétiennes chez les nouveau-nés *Angptl6<sup>Δ/Δ</sup>* par rapport aux nouveau-nés *Angptl6<sup>WT/WT</sup>*, ce qui suggère qu'ANGPTL6 pourrait affecter la migration et l'adhésion des CMLV soit de manière directe en agissant directement sur les CMLV soit de manière indirecte en agissant sur les cellules endothéliales (Figure 19D).



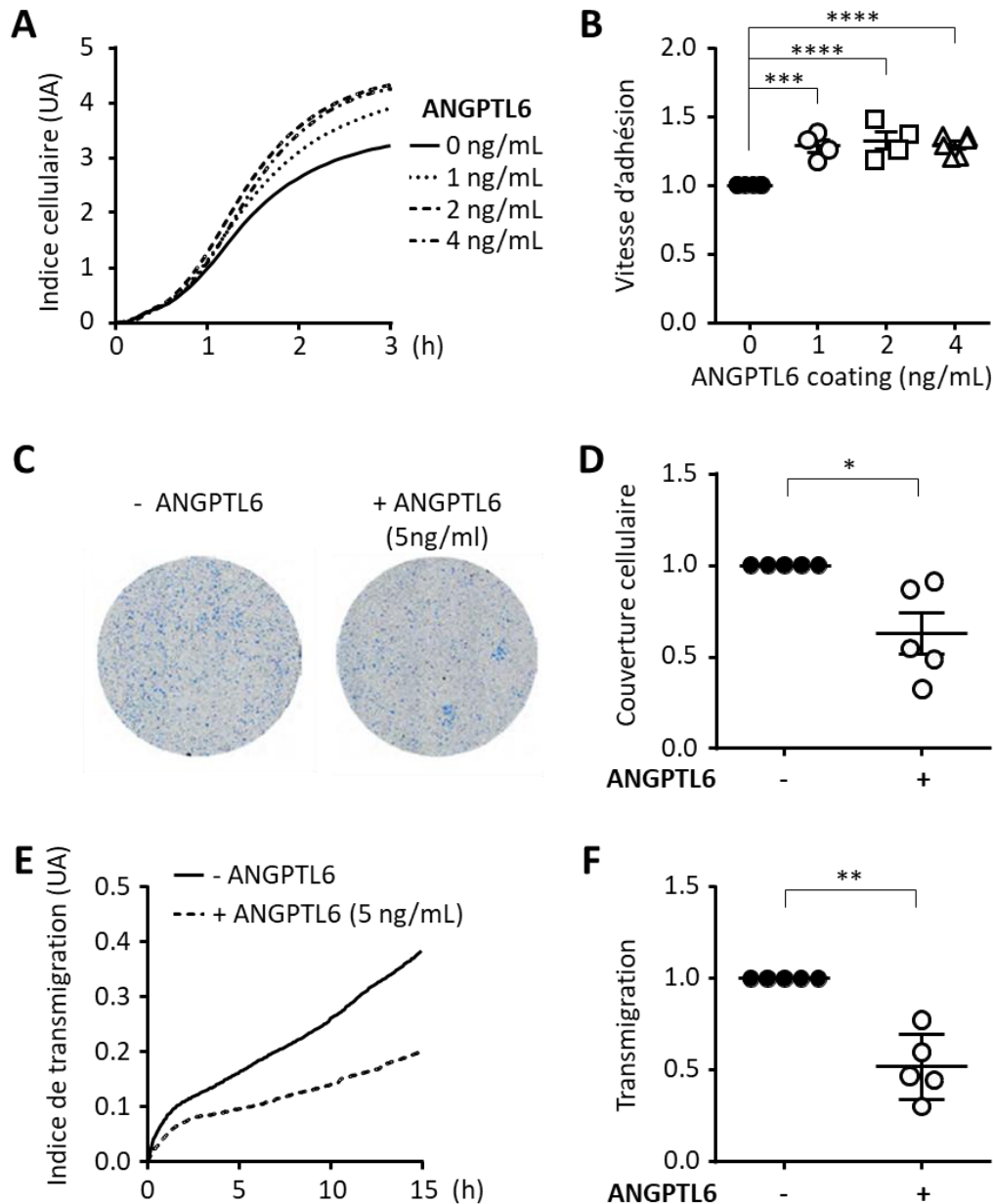
**Figure 19 : Angiogenèse rétinienne chez les nouveau-nés *Angptl6*<sup>WT/WT</sup> et *Angptl6*<sup>Δ/Δ</sup>**

A : Images représentatives de la vascularisation rétinienne après marquage par immunofluorescence des CMLV (SM22α, en vert) et des cellules endothéliales (isolectine B4, en magenta) de souris nouveau-nés P6 *Angptl6*<sup>WT/WT</sup> et *Angptl6*<sup>Δ/Δ</sup>. B : Quantification de l'expansion radiale. C : Quantification de la densité vasculaire. D : Quantification de la couverture en CMLV. (Test de Mann-Whitney ; \*\*p < 0,01).

*B. ANGPTL6 favorise l'adhésion des CMLV et diminue leur migration*

Suite aux observations dans les rétines de nouveau-nés nous avons souhaité évaluer le rôle d'ANGPTL6 dans l'adhésion et la migration des CMLV notamment pour comprendre si ANGPTL6 agissait directement sur les CMLV. Nous avons donc étudié l'effet de l'ajout d'ANGPTL6 dans la matrice de gélatine sur les CMLV. La prolifération des CMLV est similaire qu'ANGPTL6 soit présente ou non (non montré). Par contre, l'ajout d'ANGPTL6 à la matrice augmente la vitesse d'adhésion des CMLV, avec un effet similaire pour des concentrations allant de 1 à 4 ng/mL (Figure 20A et B). La présence d'ANGPTL6 dans la matrice réduit la migration des CMLV (Figure 20C à F). ANGPTL6 apparaît donc comme un facteur qui augmente

l'adhésion des CMLV et limite leur migration. Ceci suggère, dans le sens inverse, que l'absence d'ANGPTL6 dans les tissus pourrait conduire à des CMLV moins adhérentes, ce qui favoriserait leur migration.

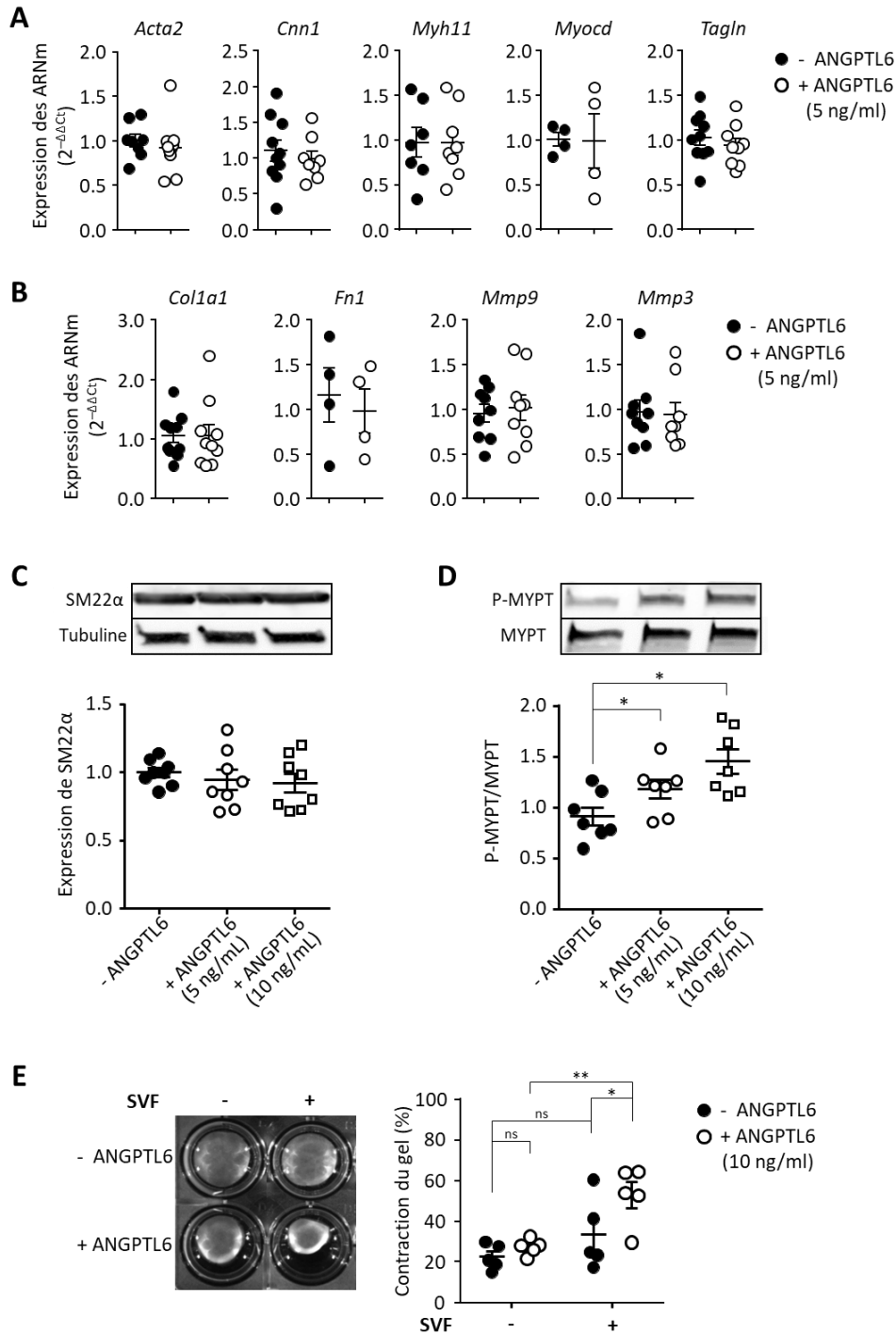


**Figure 20 : Rôle d'ANGPTL6 dans l'adhésion et la migration des CMLV in vitro**

A : Courbes représentatives de la mesure de l'indice cellulaire pour les CMLV adhérant sur un revêtement de gélatine sans (trait plein) et avec ANGPTL6 (pointillés à 1-4 ng/ml). B : Quantification de la vitesse d'adhésion CMLV sur le revêtement de gélatine sans ou avec ANGPTL6 (1-4 ng/ml) en utilisant la pente de la courbe de l'indice cellulaire dans sa partie linéaire (One-way ANOVA – Bonferroni post-test ; \*\*\*p < 0,001 ; \*\*\*\*p < 0,0001). C : Images représentatives de la coloration au bleu de Coomassie des CMLV ayant transmigré à travers une membrane poreuse recouverte de gélatine contenant ou non ANGPTL6 (5 ng/ml) après 24 h. D : Quantification correspondante de la surface couverte par les CMLV (normalisée par rapport à la condition gélatine seule ; Test de Wilcoxon ; \*p < 0,05). E : Courbes représentatives de la mesure de l'indice cellulaire pour les CMLV transmigrent à travers une membrane poreuse recouverte de gélatine sans (trait plein) ou avec ANGPTL6 (pointillés, 5 ng/ml). F : Quantification correspondante à la vitesse de transmigration en utilisant la pente de la courbe d'indice cellulaire dans sa partie linéaire (Test de Wilcoxon ; \*\* p < 0,01).

*C. ANGPTL6 n'affecte pas le phénotype des CMLV mais augmente leur contractilité*

Les CMLV disposent d'une importante plasticité, et la modulation phénotypique des CMLV joue un rôle fondamental dans la formation et la rupture des AIC<sup>77</sup>. Cette plasticité cellulaire étant directement lié au contact des CMLV avec leur environnement matriciel, nous avons donc évalué le rôle potentiel d'ANGPTL6 sur le phénotype des CMLV en mesurant l'expression des transcrits des marqueurs des phénotypes contractile et sécrétoire (Figure 21A et B). L'expression de tous les marqueurs phénotypiques des CMLV reste similaire que les CMLV soient cultivées sur gélatine seule ou sur gélatine contenant ANGPTL6. Au niveau protéique, l'expression inchangée de SM22 $\alpha$  dans les CMLV, qu'elle soient cultivées sur gélatine seule ou sur gélatine contenant ANGPTL6, confirmant qu'ANGPTL6 n'a aucun effet sur le phénotype contractile des CMLV (Figure 21C). Cependant, le niveau de phosphorylation de MYPT est augmenté dans les CMLV cultivées sur une matrice contenant ANGPTL6, suggérant qu'ANGPTL6 stimulerait la contractilité dépendante de RhoA-Rho kinase (Figure 21D). Ceci a été confirmé par un test de contraction sur gel montrant que les CMLV se contractaient plus fortement dans un gel de collagène contenant ANGPTL6 que dans un gel de collagène seul (Figure 21E).

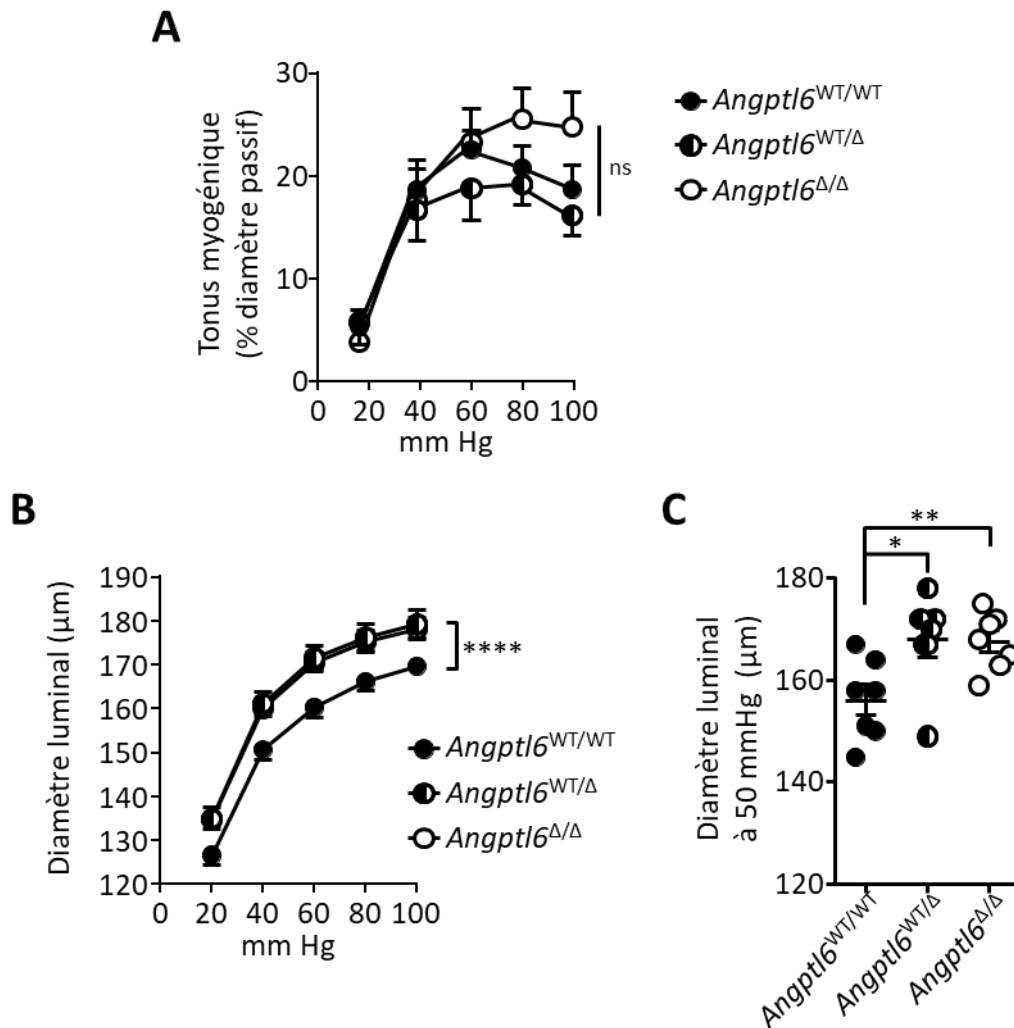


**Figure 21 : Rôle ANGPTL6 sur le phénotype et la contractilité des CMLV in vitro**

A-B : Analyse par RT-qPCR des niveaux d'ARNm des marqueurs du phénotype contractile (A) et sécrétant (B) dans des CMLV cultivées sur de la gélatine sans ou avec ANGPTL6 (5 ng/ml) (Test de Wilcoxon, ns). C : Images représentatives obtenues par western blot de l'expression du marqueur contractile SM22α dans des CMLV cultivées sur de la gélatine sans ou avec ANGPTL6 (5-10 ng/ml) et quantification correspondante par analyse densitométrique des bandes SM22α par rapport à la tubuline et normalisées à la condition gélatine seule (Test de Mann-Whitney, ns). D : Images représentative obtenues par western blot de l'expression de MYPT et de MYPT phosphorylée (P-MYPT) dans des CMLV cultivées sur de la gélatine sans ou avec ANGPTL6 (5-10 ng/ml) et quantification correspondante par analyse densitométrique des bandes P-MYPT par rapport à MYPT et normalisées à la condition gélatine seule (Test de Mann-Whitney ; \* $p < 0,05$ ). E : Images représentatives de la contraction du gel induite par les CMLV ensemencées dans des gels de collagène sans ou avec ANGPTL6 (10 ng/ml) 48 h après la libération avec et sans sérum (à gauche) et quantification correspondante (à droite) (One-way ANOVA – Bonferroni post-test ; ns : non significatif ; \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ ).

*D. Les souris Angptl6-KI présentent un défaut de compliance et une dysfonction endothéliale des artères cérébrales*

Sachant que la couverture en CMLV des artères rétiniennes de nouveaux nés est réduite chez les animaux *Angptl6-KI* par rapport aux sauvages et qu'ANGPTL6 semble participer à la fonction contractile des CMLV nous avons étudié, grâce à l'artériographie pressurisée, le tonus myogénique des artères cérébrales de nos souris. De manière surprenante, nous n'avons pas observé de différence significative de la réponse myogénique des trois génotypes de souris (Figure 22A). Nous avons ensuite analysé les propriétés passives des artères cérébrales de nos souris. L'augmentation de la pression de perfusion de 20 à 100 mmHg en l'absence de calcium externe induit une augmentation progressive du diamètre passif des artères des souris *Angptl6*<sup>WT/WT</sup>, *Angptl6*<sup>WT/Δ</sup> et *Angptl6*<sup>Δ/Δ</sup>. Pour toutes les valeurs de pression, le diamètre des artères des souris *Angptl6*<sup>WT/Δ</sup> et *Angptl6*<sup>Δ/Δ</sup> est significativement plus grand que celui des souris *Angptl6*<sup>WT/WT</sup> (Figure 22B). Comme illustré pour les mesures effectuées à 50 mmHg, cette augmentation du diamètre passif a été observée de façon similaire dans les artères des souris *Angptl6*<sup>WT/Δ</sup> et *Angptl6*<sup>Δ/Δ</sup> par rapport aux souris *Angptl6*<sup>WT/WT</sup> (Figure 22C). Cette augmentation de diamètre en conditions passives suggère une compliance accrue de la paroi artérielle chez les souris mutantes par rapport aux souris sauvages.

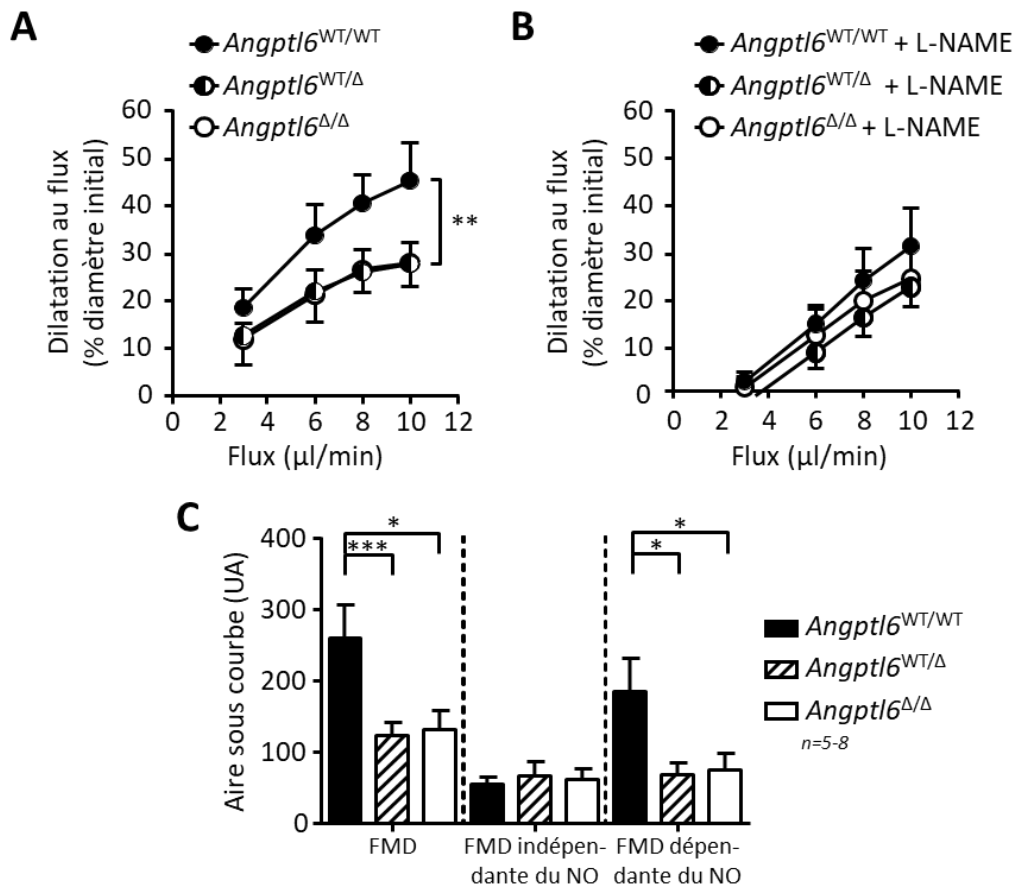


**Figure 22 : Tonus myogénique et compliance des artères cérébrales des souris Angptl6-KI**

A : Tonus myogénique fonction de la pression de perfusion expérimentale de l'artère cérébrale postérieure des souris Angptl6<sup>WT/WT</sup>, Angptl6<sup>WT/Δ</sup> et Angptl6<sup>Δ/Δ</sup> en conditions actives (n=3-7; Two-way ANOVA; ns). B : Diamètre passif en fonction de la pression de perfusion expérimentale de l'artère cérébrale postérieure des souris Angptl6<sup>WT/WT</sup>, Angptl6<sup>WT/Δ</sup> et Angptl6<sup>Δ/Δ</sup> en l'absence de calcium externe (n=7; Two-way ANOVA; \*\*\*\*p < 0,0001). C : Diamètre interne passif des souris Angptl6<sup>WT/WT</sup>, Angptl6<sup>WT/Δ</sup> et Angptl6<sup>Δ/Δ</sup> à une pression intraluminaire de 50 mmHg (Test de Mann-Whitney; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01).

Nous nous sommes alors intéressés au second élément permettant de contrôler de manière active le calibre de l'artère, la dilatation induite par le flux. L'augmentation graduelle du flux intraluminal induit la vasodilatation de l'artère cérébrale postérieure (Figure 23A). Cette dilatation au flux est significativement réduite dans les artères cérébrales provenant de souris Angptl6<sup>WT/Δ</sup> et Angptl6<sup>Δ/Δ</sup> par rapport aux souris Angptl6<sup>WT/WT</sup>. Pour mieux caractériser cette modification de réponse flux associée à la mutation d'ANGPTL6, cette dernière a été mesurée en présence de L-NAME (10<sup>-4</sup> M) afin d'abolir la composante dépendante du NO. Comme attendu, la dilatation induite par le flux est réduite en présence de L-NAME, mais devient similaire dans les artères provenant des trois génotypes (Figure 23B). Ce résultat indique que

la composante indépendante du NO de la dilatation au flux est similaire chez les souris sauvages et chez les souris mutantes. Ainsi, la réduction de la dilatation médiée par le flux chez les souris mutantes était due à une diminution de la composante dépendante du NO (Figure 23C), et suggère donc que les cellules endothéliales des artères des souris *Angptl6*<sup>WT/Δ</sup> et *Angptl6*<sup>Δ/Δ</sup> produisent moins de NO, ou qu'il est moins accessible aux CMLV.



**Figure 23 : Dilatation médiée par le flux des artères cérébrales des souris *Angptl6*-KI**

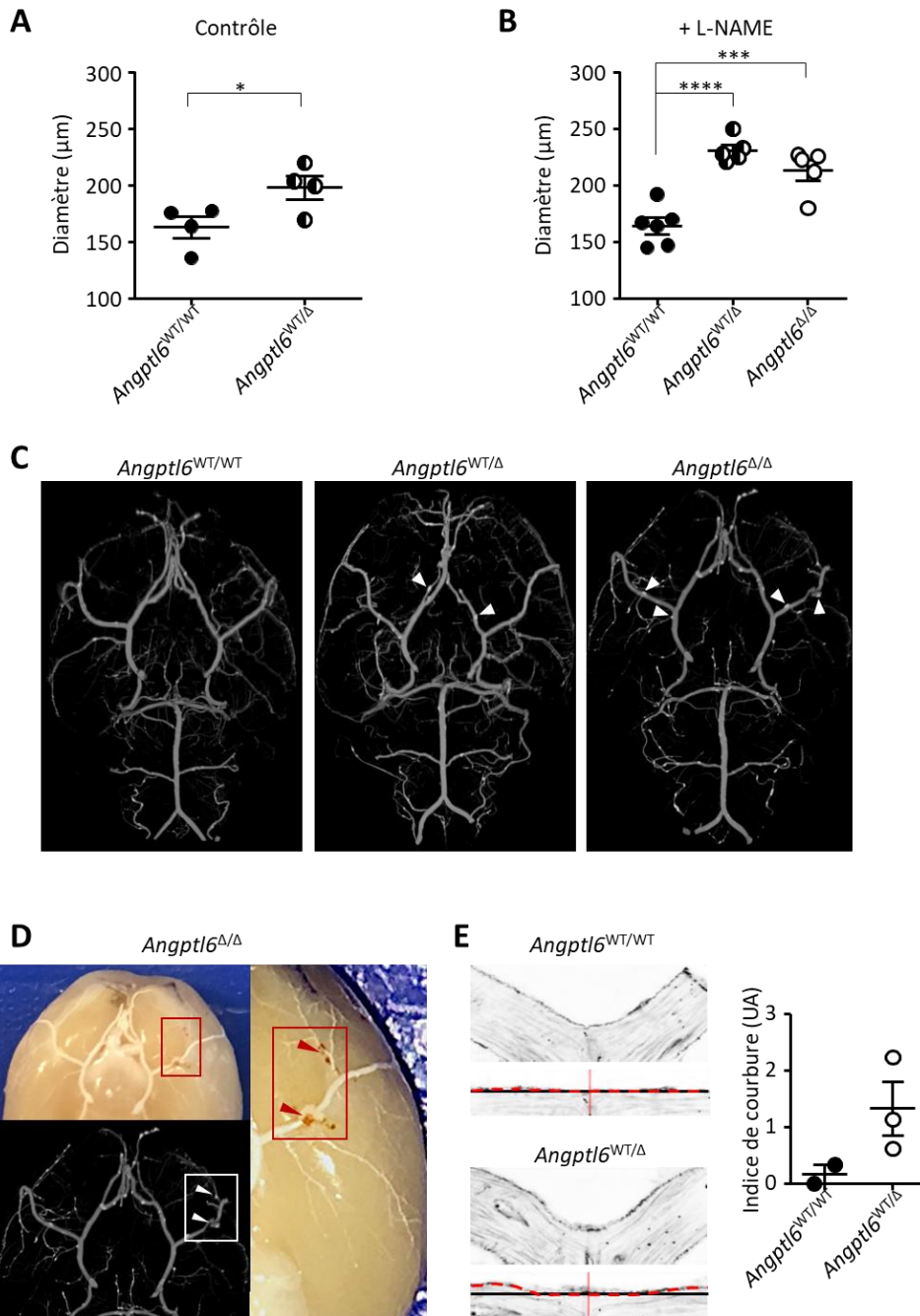
A-B : Dilatation médiée par le flux (FMD) de l'artère cérébrale postérieure des souris *Angptl6*<sup>WT/WT</sup>, *Angptl6*<sup>WT/Δ</sup> et *Angptl6*<sup>Δ/Δ</sup> en l'absence (A) et en présence (B) de L-NAME (Two-way ANOVA ; \*\* $p < 0,01$ ). C : Quantification de la FMD par l'aire sous courbe de dilatation au flux en condition basale, en présence de L-NAME (FMD indépendante du NO) et la soustraction de l'aire sous courbe en présence de L-NAME de l'aire sous courbe en condition basale (FMD dépendante du NO) chez les souris *Angptl6*<sup>WT/WT</sup>, *Angptl6*<sup>WT/Δ</sup> et *Angptl6*<sup>Δ/Δ</sup> ( $n=5-8$ ; Test de Mann-Whitney ; \* $p < 0,05$  ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Dans l'ensemble, l'augmentation du diamètre interne passif des artères cérébrales des souris mutantes, qui a confirmé les observations faites sur les images microCT, suggère que la mutation d'ANGPTL6 a induit une modification de la structure de la paroi artérielle, associée à une dysfonction endothéliale caractérisée par une diminution de la production de NO en réponse au flux. Bien qu'un rôle direct d'ANGPTL6 sur les CMLV ait pu être mis en évidence *in vitro*, il n'a pas été retrouvé *ex vivo* sur la capacité de contraction des artères.



*E. Les souris Angptl6-KI présentent une augmentation de diamètre des artères cérébrales et des déformations localisées*

Les éléments précédents suggèrent que la paroi des artères cérébrales des souris *Angptl6-KI* auraient une compliance plus importante que les souris sauvages. Ces modifications fonctionnelles pouvant entraîner des modifications morphologiques, nous nous sommes donc concentrés sur la morphologie du polygone de Willis de nos souris à l'âge adulte et nous l'avons d'abord analysé par microCT en condition basale. Nous n'avons pas détecté de différences anatomiques majeurs (images non montrées) mais nous avons observé une augmentation significative des diamètres des artères des souris *Angptl6<sup>WT/Δ</sup>* par rapport aux souris sauvages (Figure 24A) qui rappelle les données *ex vivo*. Sachant que, dans la famille où la mutation a été détecté, les personnes souffrant d'AIC sont porteurs du variant rare d'*ANGPTL6* mais souffrent aussi d'une HTA<sup>164</sup>, nous avons induit une légère hypertension dans notre modèle de souris. L'administration de L-NAME, un inhibiteur de la NO synthase, pendant 3 semaines a induit une augmentation d'environ 15 mmHg similaire dans les trois groupes de souris (non montré). Cette augmentation de pression n'a pas entraîné de modification du diamètre du tronc basilaire chez les souris *Angptl6<sup>WT/WT</sup>* alors qu'elle a induit une augmentation significative du diamètre du tronc basilaire chez les souris *Angptl6<sup>WT/Δ</sup>* et *Angptl6<sup>Δ/Δ</sup>* accentuant ainsi la différence de diamètre des artères cérébrales entre les souris sauvages et mutantes (Figure 24B). De plus, l'analyse des images de microCT a révélé la présence d'hyperdensités dans les artères du polygone de Willis des souris *Angptl6<sup>WT/Δ</sup>* et *Angptl6<sup>Δ/Δ</sup>*, de telles hyperdensités n'ont pas été observées chez les souris *Angptl6<sup>WT/WT</sup>* (Figure 24C). Ces hyperdensités correspondent à une accumulation locale de baryum et pourraient donc être dues à des dilatations focales de la paroi artérielle. Certaines de ces hyperdensités, notamment chez les femelles mutantes, étaient colocalisées avec des fuites vasculaires locales observées à la surface du cerveau (Figure 24D). Une analyse plus fine des bifurcations des artères du polygone de Willis par microscopie confocale a également permis d'observer une déformation de la paroi artérielle sur la partie adjacente de l'apex chez les souris mutantes, à l'endroit où les AIC se développent (Figure 24E). Ces résultats montrent donc que les artères cérébrales des souris mutantes ont un diamètre basal supérieur à celui des souris contrôles et que, contrairement aux souris sauvages, elles se dilatent davantage en condition d'HTA, suggérant un défaut dans leur capacité d'adaptation à la pression.

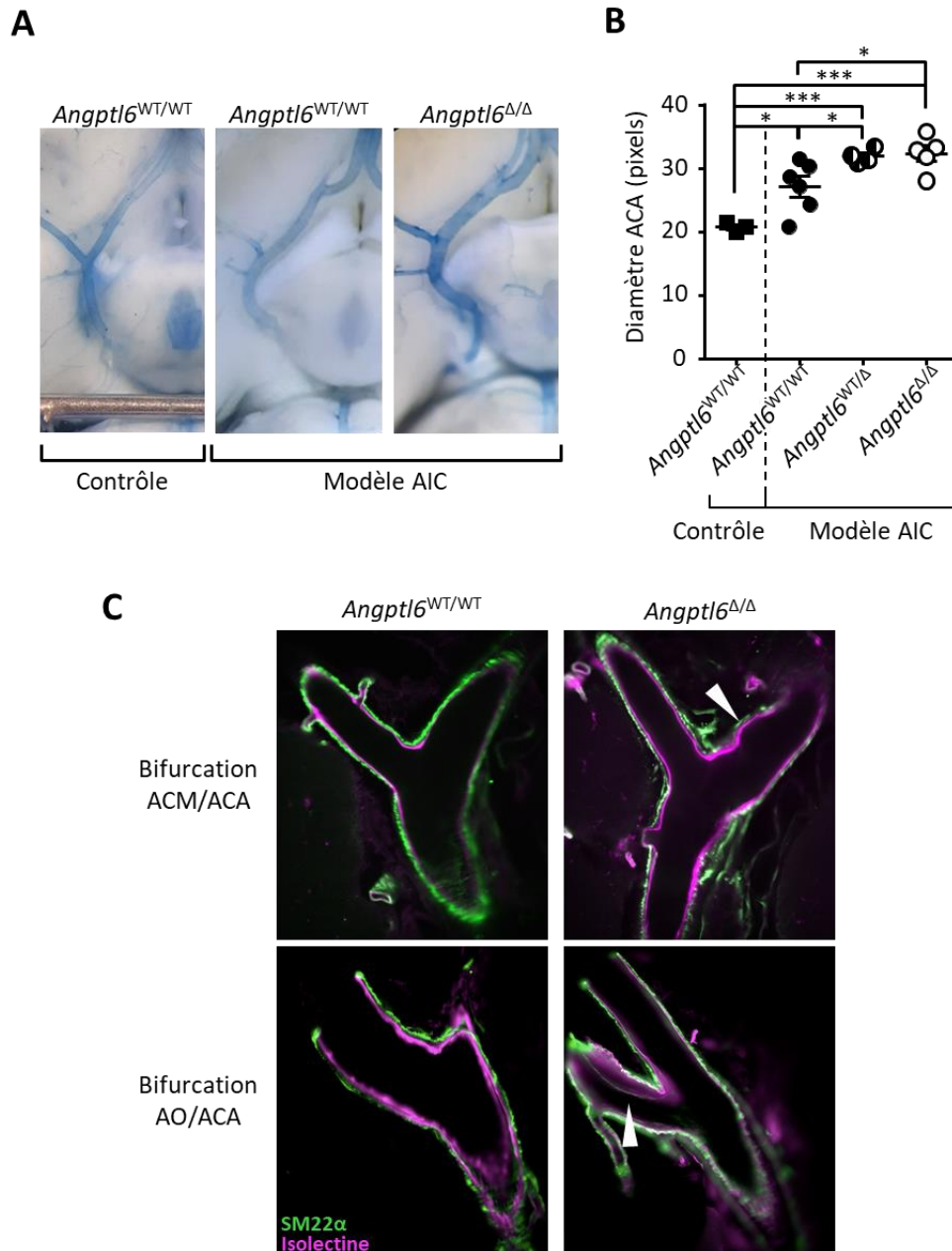


**Figure 24 : Morphologies des artères cérébrales chez les souris Angptl6-KI**

A : Diamètre de l'artère basilaire de souris Angptl6<sup>WT/WT</sup> et Angptl6<sup>WT/Δ</sup> normotendues (âgées de 6 à 8 mois).  
 B : Diamètre de l'artère basilaire de souris Angptl6<sup>WT/WT</sup>, Angptl6<sup>WT/Δ</sup> et Angptl6<sup>Δ/Δ</sup> rendues hypertendues par un traitement au L-NAME (3 g/l, pendant 3 semaines). A-B : Les diamètres ont été mesurés sur des images de microCT (One-way ANOVA – Bonferroni post-test ; \**p* < 0,05 ; \*\*\**p* < 0,001, \*\*\*\**p* < 0,0001 par rapport aux souris Angptl6<sup>WT/WT</sup> dans chaque conditions). C : Images de microCT du polygone de Willis des souris Angptl6<sup>WT/WT</sup>, Angptl6<sup>WT/Δ</sup> et Angptl6<sup>Δ/Δ</sup> après 3 semaines de traitement au L-NAME. Les flèches blanches indiquent les hyperdensités pouvant être le reflet d'ectasies. D : Photographies et image de microCT du cerveau d'une souris femelle Angptl6<sup>Δ/Δ</sup> après 3 semaines de traitement au L-NAME montrant la colocalisation des hyperdensités (flèches blanches) avec l'hémorragie sanguine (flèches rouges). E : Images confocales (marquage SM22α) de sections faites au vibratome de la bifurcation artère cérébrale antérieure/ artère cérébrale moyenne de souris Angptl6<sup>WT/WT</sup> et Angptl6<sup>WT/Δ</sup> normotendues (âgées de 10-12 mois). Les images sous les bifurcations les représentent après linéarisation numérique. L'apex de la bifurcation est indiqué par la ligne rouge verticale. La ligne noire montre la ligne droite théorique (Lt) et la ligne pointillée rouge suit la véritable délimitation de la bifurcation (Lex). A droite, la quantification de la déformation locale est déterminé par le calcul d'un indice de courbure tel que (Lex-Lt)/Lt).

*F. Les souris Angptl6-KI semblent avoir une susceptibilité aux déformations de la paroi au niveau des bifurcations des artères cérébrales*

Après avoir observé des déformations pariétales localisées en conditions basales et sous hypertension chez les souris *Angptl6-KI*, nous avons cherché à évaluer si la mutation, prédisposant aux AIC chez l'Homme, pouvait potentialiser la formation d'AIC chez la souris. Dans ce but, nous avons utilisé le modèle précédemment décrit (p.37) d'induction d'AIC par augmentation du stress hémodynamique aux sites de bifurcations des artères cérébrales chez la souris<sup>103</sup>. Comme attendu, l'examen du polygone de Willis 4 mois après la chirurgie montre un élargissement et une tortuosité des artères cérébrales chez les animaux contrôles, preuve de l'efficacité du protocole (Figure 25A). La quantification du diamètre de l'artère cérébrale antérieure montre une augmentation du diamètre de l'artère induite par la surcharge hémodynamique (Figure 25B). Cependant, cette différence est plus importante chez les souris *Angptl6*<sup>WT/ $\Delta$</sup>  et *Angptl6* <sup>$\Delta$ / $\Delta$</sup>  par rapport aux souris *Angptl6*<sup>WT/WT</sup> (Figure 25B). Une évaluation détaillée des bifurcations artérielles par microscopie à feuille de lumière après marquage des cellules endothéliales et des CMLV a révélé, uniquement chez les souris mutantes, des modifications structurelles similaires à celles décrites au stade précoce de la formation de l'AIC chez l'homme. Nous avons observé sur certaines bifurcations cérébrale antérieure / cérébrale moyenne un élargissement et une déformation de la paroi près de l'apex de la bifurcation. Au niveau de la bifurcation olfactive, nous n'avons pas observé de déformation mais une hyperplasie intimale associée à une désorganisation de la média (Figure 25C). Cette technique a été réalisée sur un petit nombre d'animaux et ces observations seront complétées par de la microscopie électronique dans le but d'observer plus finement les modifications pariétales, notamment la structure de la LEI. Ces résultats préliminaires suggèrent donc que la mutation d'ANGPTL6 pourrait favoriser la formation d'AIC en prédisposant la paroi artérielle aux déformations au niveau des bifurcations du polygone de Willis en condition de surcharge hémodynamique.



**Figure 25 : Modèle d'induction d'AIC chez les souris *Angptl6-KI***

A : Photographies représentatives du polygone de Willis dans des conditions contrôles (souris *Angptl6<sup>WT/WT</sup>*) et 4 mois après la chirurgie d'induction d'AIC (souris *Angptl6<sup>WT/WT</sup>* et *Angptl6<sup>Δ/Δ</sup>*). B : Mesure du diamètre de l'artère cérébrale antérieure dans les conditions de contrôle (souris *Angptl6<sup>WT/WT</sup>*) et 4 mois après la chirurgie pour induire l'IA (souris *Angptl6<sup>WT/WT</sup>*, *Angptl6<sup>WT/Δ</sup>* et *Angptl6<sup>Δ/Δ</sup>*) (One-way ANOVA – Holm-Sidak post-test ; \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$ ). C : Images représentatives des bifurcations cérébrales des souris *Angptl6<sup>WT/WT</sup>* et *Angptl6<sup>Δ/Δ</sup>* 4 mois après la chirurgie d'induction d'AIC, après marquage par fluorescence des CMLV (SM22 $\alpha$ , vert) et des cellules endothéliales (isolectine B4, magenta).

#### 4. Discussion

Ce travail a permis de montrer que la mutation d'ANGPTL6 prédisposant aux AIC chez l'Homme<sup>164</sup> entraîne, chez la souris, des modifications vasculaires caractérisées par un défaut de couverture en CMLV lors de l'angiogenèse, une dysfonction endothéliale, une dilatation et des déformations pariétales des artères cérébrales, à l'âge adulte. *In vitro*, nous avons montré qu'ANGPTL6 favorisait l'adhésion et la contractilité des CMLV et réduisait leur migration.

ANGPTL6 est protéine circulante, normalement sécrétée par le foie. La protéine mutée n'est pas sécrétée. En conséquence, les sujets hétérozygotes pour la forme mutée ont une concentration plasmatique d'ANGPTL6 réduite de moitié comparée à celle d'un individu qui ne porte pas la mutation<sup>164</sup>. Afin d'étudier l'impact fonctionnel de la présence du variant sur la survenue des AIC, il apparaissait intéressant de construire un modèle murin.

L'intérêt d'un modèle transgénique de souris est d'étudier l'effet du variant dans un système intégré. Aujourd'hui il n'existe pas de modèle *in vitro* permettant de reproduire les conditions de formation d'un AIC. De plus, dans notre modèle reproduisant la mutation humaine au niveau germinale, que la pathogénicité du variant soit liée à la réduction du taux circulant d'ANGPTL6, à une modification intrinsèque aux cellules de la paroi artérielle ou à un défaut au niveau développemental, nous serons en mesure d'apprécier sa contribution au développement de l'AIC.

Afin de s'assurer que notre modèle récapitulait la physiopathologie chez le patient, nous avons cherché à savoir si la concentration plasmatique d'ANGPTL6 était différente entre nos trois groupes de souris. Malheureusement, pour des causes techniques, nous n'avons pas pu quantifier la concentration plasmatique d'ANGPTL6 chez nos souris, aussi bien sauvages que mutantes. Nous ne pouvons donc pas affirmer que, dans notre modèle, la concentration d'ANGPTL6 circulante est réduite en présence du variant. Cependant, nos souris mutantes présentent une atteinte vasculaire semblant favoriser la survenue d'AIC.

Une étude *in vivo* et *in vitro* montre qu'ANGPTL6 favorise l'angiogenèse et participe au chimiotactisme des cellules endothéliales<sup>182</sup>. De plus, l'inactivation du gène d'ANGPTL6 chez la souris entraîne une mortalité embryonnaire importante (>80%) due à des défauts de formation des vaisseaux vitellins<sup>203</sup>. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence, dans notre modèle de souris transgéniques, de défaut d'angiogenèse développementale. La mutation

n'impacterait donc pas le rôle d'ANGPTL6 dans son rôle angiogénique, en tout cas pour ce qui est de la progression des cellules endothéliales. La seule modification visible au moment du développement vasculaire est un défaut de couverture en CMLV chez nos souris *Angptl6-KI*, ce qui suggère qu'ANGPTL6 favoriserait l'adhésion des CMLV, et qu'elle agirait comme un chémoattractant. Ce rôle a déjà été rapporté *in vitro* pour plusieurs autres types cellulaires (kératinocytes, fibroblastes, cellules endothéliales)<sup>253</sup>.

ANGPTL6 est une protéine circulante. Les CMLV n'expriment pas ANGPTL6 de façon endogène. Donc, cette protéine, pour avoir un effet direct sur les CMLV, pourrait subir un phénomène de convection externe en provenant de la lumière du vaisseau jusqu'à être complexée à la MEC produite par le CMLV<sup>254</sup>. En étant présente dans la matrice, ANGPTL6, par son domaine RGD, pourrait ainsi interagir avec des intégrines notamment  $\alpha 5$  ou  $\alpha V$ . En effet, ces deux types d'intégrines interagissent avec des ligands contenant le motif RGD et leurs délétions entraînent des défauts dans le développement vasculaire<sup>255</sup>. Comme d'autres angiopoïétines-like qui se lient à des intégrines<sup>187,188</sup>, c'est par ce biais qu'ANGPTL6 pourrait être utile à la progression des CMLV au moment de la formation des artères.

Les données *in vitro* de notre étude permettent d'analyser ce rôle direct que pourrait avoir ANGPTL6 sur les CMLV. Lorsqu'elle est présente dans la matrice, ANGPTL6 semble participer à des fonctions primordiales des CMLV telles que l'adhésion et la contractilité. Cette promotion de l'adhésion des CMLV par ANGPTL6 corrobore le défaut de couverture en CMLV dans les rétines des nouveaux-nés *Angptl6-KI*. En effet, si ANGPTL6 est moins présente dans les tissus chez les animaux mutants, puisque moins sécrétée dans le plasma, l'adhésion des CMLV va être altérée. Par conséquent, elles coloniseraient moins rapidement l'artère lors de sa maturation, ce qui correspond à notre observation *in vivo*. Ce rôle d'ANGPTL6 dans la promotion de l'adhésion pourrait être dû à une interaction avec des intégrines, comme c'est le cas pour d'autres angiopoïétines-like<sup>186</sup>. Ce type d'interaction permettrait d'expliquer une autre de nos observations *in vitro*, le fait qu'ANGPTL6 diminue la migration des CMLV.

De manière surprenante, nous avons mis en évidence, *in vitro*, que la présence d'ANGPTL6 augmente la capacité contractile des CMLV et le taux de phosphorylation de MYPT alors qu'elle ne modifie pas l'expression des marqueurs phénotypiques. Le site de phosphorylation étudié ici, la sérine 507, est spécifique des Rho-kinases<sup>256</sup>. Lorsque MYPT, sous-unité régulatrice de la myosine phosphatase, est phosphorylée, cela montre une activité accrue des

effecteurs de RhoA, les Rho-Kinases. Lorsque la voie RhoA/Rho-kinase est activée, cela entraîne la polymérisation de l'actine permettant le relargage de nombreuses protéines séquestrées par l'actine globulaire. Parmi elles, se trouvent des facteurs de transcription permettant d'exprimer de nombreux marqueurs contractiles<sup>257</sup>. Dans un contexte métastatique, il a été montré que l'inhibition de certaines intégrines, notamment  $\beta 1$ , peut empêcher la dissémination cellulaire par un mécanisme diminuant l'activité de RhoA<sup>258</sup>. Dans notre cas, ANGPTL6 pourrait être à l'origine d'une activation des intégrines ainsi potentialiser l'activité de RhoA. Pour confirmer ces hypothèses, nous devons, par la suite, identifier les partenaires d'ANGPTL6 et vérifier si l'activité des RhoA est modifiée par la présence d'ANGPTL6. *Ex vivo*, nous n'avons pas mis en évidence de différences dans le tonus myogénique des artères cérébrales provenant de notre modèle de souris. Cependant, ces expérimentations nécessitent d'être réitérées afin de confirmer notre observation.

Dans les cellules endothéliales, il avait été démontré *in vitro* qu'ANGPTL6 pouvait activer la voie ERK 1/2 et par ce biais stimuler la production de NO<sup>200</sup>. Dans notre modèle, son absence dans le plasma et donc son absence de contact avec l'endothélium pourrait affecter cette voie et concourir à la dysfonction endothéliale que nous observons *ex vivo*. En ce sens, cet effet d'ANGPTL6 serait dû à sa présence, cette fois-ci, dans la lumière du vaisseau.

Dans un contexte de maladie coronarienne, une corrélation positive a été mise en évidence entre le taux d'ANGPTL3 circulant et la rigidité artérielle. Les auteurs émettent l'hypothèse que les mécanismes à l'origine de cette association proviennent de la capacité d'ANGPTL3 à activer l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  ce qui favorise l'hyperplasie myointimale<sup>259</sup>. *Ex vivo*, nous avons retrouvé une augmentation de la compliance des artères cérébrales suggérant une distensibilité de la paroi plus importante chez les souris *Angptl6*-KI. Le potentiel manque d'ANGPTL6 dans le plasma de nos souris mutantes entraînerait un défaut de prolifération des CMLV et donc de production de MEC dans la couche médiale de la paroi artérielle, ce qui favoriserait la distensibilité. Cependant, cette hypothèse rentre en contradiction avec certains de nos résultats comme le tonus myogénique et le phénotype des CMLV *in vitro*, tous deux, inchangés. D'autres investigations restent donc à mener.

L'HTA est un facteur de risque de l'AIC. Parmi les patients porteurs des variants rares du gène *ANGPTL6*, la prévalence de l'HTA était plus importante chez ceux atteints d'AIC (50 %) par rapport aux non atteints (9 %)<sup>164</sup>. De plus, concernant les membres de la famille porteurs du



variant rare p.Lys460Ter-ANGPTL6 et atteints d'AIC, nous pouvons remarquer que ce sont toutes des femmes et qu'elles affichent toutes une HTA. Les porteurs sains du variant p.Lys460Ter-ANGPTL6 ne présentent pas d'HTA primaire<sup>164</sup>. La présence de ce facteur de risque apparaît donc comme requise à la formation des AIC chez les patients porteurs du variant p.Lys460Ter-ANGPTL6. A l'état basal, les souris porteuses du variant n'affichent pas d'HTA. Afin de mimer les conditions d'apparition de la pathologie chez l'Homme, nous avons donc soumis notre modèle murin à un protocole d'HTA grâce au L-NAME. Le défaut d'adaptation du diamètre des artères cérébrales à l'augmentation de pression chez nos souris mutantes suggère des modifications biologiques et/ou structurales en présence du variant d'ANGPTL6.

Comme cité précédemment, les membres de la famille porteurs du variant rare p.Lys460Ter-ANGPTL6 et atteints d'AIC sont toutes des femmes<sup>164</sup>. Notre modèle semble reproduire cette spécificité de sexe car nous avons constaté que les animaux présentant ces hyperdensités étaient surtout des femelles. Les hyperdensités vues sur les images microCT n'ont tout de même pas été quantifiées puisque ces accumulations de sulfate de baryum, qui pourraient être dues à des dilatations focales de la paroi artérielle, pourraient également être des artéfacts expérimentaux.

Le modèle chirurgical d'induction des AIC utilisé ici, basé principalement sur une modification hémodynamique, nous a permis de mettre en évidence que certaines souris mutantes développaient des dilatations pariétales et formaient une néo-intima. Cette observation était absente chez les souris contrôles qui ne présentaient qu'un élargissement et une augmentation de la tortuosité des artères, effet classiquement observé dans ce modèle d'induction d'AIC<sup>103</sup>. Dans l'article princeps du modèle utilisé, il est également retrouvé des déformations pariétales même chez des souris non-transgéniques<sup>103</sup>. Cependant, l'augmentation de pression artérielle chez ces animaux (+30mmHg) était supérieure à celle que nous avons obtenue sur nos animaux (+15mmHg) ce qui pourrait expliquer cette différence.

Dans l'ensemble, ces résultats prometteurs fixent les bases de la compréhension des mécanismes sous-jacents à la prédisposition aux AIC due à la présence du variant p.Lys460Ter-ANGPTL6. D'autres expérimentations sont à venir afin d'affiner et compléter ces premiers résultats.



## II. Projet CTSO

### 1. *Préambule*

En utilisant une approche similaire au projet précédent, notre laboratoire a identifié deux variants génétiques rares du gène *CTSO* dans deux familles différentes : p.Ala43Val-*CTSO* et p.Val316Ile-*CTSO*, prédits comme délétères pour la fonction de la protéine. L'objectif de mon projet de thèse principal était donc d'identifier le rôle de *CTSO* dans les cellules vasculaires et de comprendre pourquoi les deux variants génétiques rares identifiés prédisposent aux AIC. Pour cela, nous avons analysé l'expression de *CTSO* et sa modulation par les contraintes hémodynamiques *in vivo* et *in vitro*. Nous avons également étudié son rôle dans les cellules de la paroi artérielle, puis analysé l'effet des variants identifiés.

Ce travail a fait l'objet d'un article publié au format preprint sur MedRxiv sous la DOI <https://doi.org/10.1101/2023.01.31.23285168> dont je suis co-première auteure. Ma contribution a permis d'acquérir l'ensemble des données fonctionnelles.



2. *Manuscrit*

**Rare coding variants in *CTSO*, a potential new actor of arterial remodeling, are associated to familial intracranial aneurysm**

Milène Freneau<sup>1,5</sup>, Raphael Blanchet<sup>1,5</sup>, Sandro Benichi<sup>1</sup>, Mary-Adel Mrad<sup>1</sup>, Surya Prakash Rao Batta<sup>1</sup>, Marc Rio<sup>1</sup>, Stéphanie Bonnaud<sup>1</sup>, Pierre Lindenbaum<sup>1</sup>, Fabien Laporte<sup>1</sup>, Stéphane Cuénot<sup>2</sup>, Jean-François Deleuze<sup>3</sup>, Christian Dina<sup>1</sup>, Stéphanie Chatel<sup>1</sup>, Emmanuelle Bourcereau<sup>4</sup>, Solène Jouan<sup>4</sup>, ICAN Study Group, Hubert Desal<sup>1,4</sup>, Anne-Clémence Vion<sup>1</sup>, Romain Bourcier<sup>1,4,5</sup>, Gervaise Loirand<sup>1,5</sup>, Richard Redon<sup>1,5</sup>.

<sup>1</sup> Nantes Université, CHU Nantes, CNRS, INSERM, l'institut du thorax, F-44000 Nantes, France

<sup>2</sup> Nantes Université, CNRS, Institut des Matériaux Jean Rouxel, IMN, F-44000 Nantes, France

<sup>3</sup> Université Paris-Saclay, CEA, Centre National de Recherche en Génomique Humaine (CNRGH), F-91057 Evry, France

<sup>4</sup> Department of Neuroradiology, CHU Nantes, F-44000 Nantes, France

<sup>5</sup> These authors contributed equally to this work as first and last authors

\*Correspondence: Gervaise Loirand ([gervaise.loirand@univ-nantes.fr](mailto:gervaise.loirand@univ-nantes.fr)) & Richard Redon ([richard.redon@univ-nantes.fr](mailto:richard.redon@univ-nantes.fr))

**Running title:** *CTSO* and intracranial aneurysm

**Key words:** Genetics, intracranial aneurysm, cathepsin, cerebral artery, smooth muscle, extracellular matrix, fibronectin, stiffness

## Abstract

**Background:** Intracranial aneurysm (IA) is a common cerebrovascular abnormality characterized by localized dilation and wall thinning in intracranial arteries, that frequently leads to fatal vascular rupture. The mechanisms underlying IA formation, growth and rupture are mostly unknown, and while increasing evidence suggest a genetic component of IA, identification of specific genes or causal molecular pathways remains largely inconclusive and only a small fraction of the risk attributable to genetics for IA in the general population.

**Methods:** Here, we combined whole exome sequencing and identity-by -descent analyses with functional investigations to identify rare IA predisposing variants in familial forms of IA and understand their contribution to the pathophysiology of IA.

**Results:** We identified two rare missense variants in the *CTSO* gene shared by all the affected relatives in two large pedigrees with multiple IA-affected relative. *CTSO* encodes for the cysteine-type papain-like cathepsin CTSO. Functional analyses revealed that CTSO acts as an extracellular protease controlling vascular smooth muscle cell migration and adhesion to the extracellular matrix. CTSO depletion, as well as expression of the two CTSO variants, which were poorly secreted, led to increase the amount of fibronectin. This effect is associated with a marked increase in VSMC stiffness which was rescued by exogenous CTSO.

**Conclusions:** This report identifies rare CTSO variants in familial IA patients and suggests that the increased susceptibility to IA induced by these variants is likely related to their primary effects on the vascular tissue, and more particularly on the media layer of the wall of cerebral arteries.

## Introduction

Intracranial aneurysm (IA) is a generally asymptomatic localized dilation associated with thinning and structural defects of intracranial arterial wall affecting 1-5% of the general population.<sup>1</sup> The devastating complication of IA is its unpredictable rupture, responsible for ~36,000 cases of subarachnoid hemorrhage in Europe and a major cause of sudden death in "young healthy" subjects, in particular in woman (peak of age: 50-60 years).<sup>2, 3</sup> Although hypertension, ageing, female gender, smoking, excessive alcohol consumption and family history of IA have been identified as risk factors predisposing to IA, the mechanisms underlying IA formation, growth and rupture are mostly unknown, although the local hemodynamic constraints of shear stress and pressure are assumed to play a key role.<sup>4</sup> The aggregation of patients in IA families suggests that genetic factors contribute to disease susceptibility, and identifying these factors might be beneficial for at-risk patients before IA rupture.<sup>5, 6</sup> Genome-wide association studies have identified several common risk loci associated with IA.<sup>7-10</sup> However, identification of specific genes or causal molecular pathways remains largely inconclusive and these common alleles together explain only a small fraction of the risk attributable to genetics for IA in the general population. On the other hand, whole-exome sequencing (WES) has the potential to detect rare coding variants that have large effect and induce a high risk of developing IA. Identifying such variants also could provide valuable insights into the pathophysiology of IA and pave the way for new diagnostic or therapeutic strategies. Indeed, recent studies have demonstrated the usefulness of familial approaches based on WES to improve knowledge on the molecular mechanisms underlying IA formation and rupture from the discovery of rare predisposing variants such as *RNF213*,<sup>11</sup> *THSD1*,<sup>12</sup> *LOXL2*,<sup>13</sup> *PCNT*,<sup>14</sup> *ARHGEF17*,<sup>15</sup> *ANGPTL6*,<sup>16</sup> and *PPILA*.<sup>17</sup>

In the present study, by combining WES and identity-by-descent (IBD) analysis, we identified rare coding variants in the Cathepsin O gene (*CTSO* [MIM: 600550]) as causally related to

familial forms of IA. CTSO is one of the 11 cysteine-type papain-like cathepsins identified in human about almost nothing is known.<sup>18</sup> Functional analysis revealed that CTSO controls vascular smooth muscle cell (VSMC) migration and adhesion to the extracellular matrix (ECM). Furthermore, CTSO depletion leads to increase VSMC stiffness. These findings suggest that the increased susceptibility to IA induced by *CTSO* variants is likely related to their primary effects on the vascular tissue, and more particularly on the media layer of the wall of cerebral arteries.

## Results

### Identification of one rare coding variant affecting *CTSO* in a familial case of IA

We first recruited a large family (Figure 1A) with 6 definite carriers of IA in two generations, among whom two had a history of IA rupture. In this family, there were also 4 relatives with suspected IA (3 because of unexplained sudden death and 1 with a doubtful ectasia on MRI (III-14)), 4 individuals with unknown phenotypes that have not been screened by MRI and 19 subjects without IA detected on MRI. Among the definite carriers of IA, all were females and 3 were carriers of multiples IA. The median maximal diameter of IA was 4 mm (min 3 mm, max 8 mm). Of the twelve IAs detected in the family, 6 were located in the MCA territory (50%), 3 in the ACA (25%), 2 in the PCA (16%), and 1 in the ICA territory (9%). We applied whole-exome sequencing to 3 affected members of the family (II9, III2, III4; Figure 1A). Out of the 153 to 179 rare non-synonymous or splicing variants detected in each 3 whole exomes, we found that only 16 were shared between the 3 affected relatives (Table 1). We then performed IBD analysis of the complete pedigree to test whether each variant resides within one haplotype shared by the 6 affected relatives. We found that only one of the 16 variants is located in one shared haplotype at 4q32, then confirmed by capillary sequencing its presence for all affected relatives. This missense variant in the *CTSO* gene - *CTSO* c.946G>A

(p.Val316Ile) - is reported with a Genomic Evolutionary Rate Profiling (GERP) score of 5.68 and predicted as damaging *in silico* by both PolyPhen-2 and SIFT (Table 2).

### **A second familial case of IA associated with rare coding variant in *CTSO***

To further investigate the putative involvement of *CTSO* in IA susceptibility, we then screened for rare coding variants within this gene among 93 additional index cases with familial forms of IA (with at least two affected first-degree relatives), for which WES data were available in-house. We found one rare missense variant, *CTSO* c.128C>T (p.Ala43Val) (Table 2). The corresponding family (Figure 1B) comprises 5 IA carriers (3 females and 2 males), among whom one carries multiple IAs. The median maximal diameter of IA was 5 mm (min 4 mm, max 9 mm). Three IAs are located in the MCA territory, one in the ACA and one in the ICA territory, while one is of unknown location. By capillary sequencing, we tested the *CTSO* c.128C>T variant among family members and detected it in the 3 tested IA carriers but in none of their 5 unaffected relatives (with available DNA). This variant, reported with a GERP score of 3.67, is predicted as damaging *in silico* by PolyPhen-2 but not by SIFT (Table 2).

### **Clinical characteristics and exposition to risk factors according to *CTSO* status**

When comparing subgroups of individuals without or with *CTSO* variant and carrying or not IA among the members of the two families, we observed a higher proportion of subjects with history of high blood pressure among the IA carriers ( $p < 0.01$ ) while we found no significant differences regarding age, proportion of women, smoking habits, history of ischaemic stroke, level of alcohol consumption, history of diabetes or dyslipidaemia, treatment with statin, antiplatelet, oral anticoagulant and anti-inflammatory medication (Table 3).

**CTSO is expressed in cerebral arteries**

To explore the putative implication of CTSO in IA pathophysiology, we first sought to investigate the expression of CTSO in cerebral arteries. *Ctso* mRNA was indeed found in cerebral arteries of WKY rats, and at a similar level, in artery from spontaneously hypertensive rat (SHR) and stroke prone SHR (SPSHR), suggesting that *Ctso* mRNA expression was not modulated by high blood pressure (Figure 2A). At cell level, *Ctso* mRNA was expressed in VSMC and, at weaker levels, in endothelial cells, where it was not modulated by shear stress (SS) (Figure 2B, Figure S1). In smooth muscle cell cultures, CTSO was found in cell lysates but also in the culture medium, indicating the secretion of the protein (Figure 2C). Moreover, CTSO secretion was potentiated by stretch, without any change in mRNA level (Figure 2B and C).

***Ctso* silencing does not affect VSMC proliferation and apoptosis**

We next aimed to elucidate the role of CTSO in the arterial wall by focusing on VSMC in which it is predominantly expressed and modulated by stretch. To this end, we evaluated the consequences of siRNA-mediated depletion of endogenous CTSO in vascular smooth muscle cells (KD-SMC) in comparison with a control siRNA pool. Silencing of *Ctso* did not affect VSMC proliferation (Figure 2D), nor apoptosis as measured by TUNEL and caspase 3 cleavage in basal condition (no apoptosis, data not shown) and after induction of apoptosis by staurosporine (Figure 2E and F). These results indicate that CTSO did not affect VSMC proliferation and viability.

***Ctso* silencing modifies VSMC migration and adhesion**

We next tested whether CTSO regulates the migratory and adhesive properties of VSMC by using Boyden chambers and adhesion assays, respectively. CTSO depletion in VSMC (KD-



SMC) led to a significant decrease in transmigration (Figure 3A) but accelerated the adhesion speed of VSMC on fibronectin (FN) matrix (Figure 3B). This effect was associated with an increased phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) in KD-SMC compared to control SMC (Cont-SMC), both at 2 h and 24 h after seeding on FN matrix (Figure 3C). When VSMC were plated on plastic, without FN coating, a significant increase in FAK phosphorylation was also observed at 24 h but not at 2 h post-seeding (Figure 3D). It is known that SMC produced and released FN which, in turn, can modulate VSMC phenotype and functions.<sup>19</sup> The observed differences in FAK phosphorylation induced by CTSO depletion may result from an effect on the endogenous FN. To test this hypothesis, we thus analyzed the effect of *Ctso* silencing on FN expression in Cont- and KD-SMC culture. An increased level of FN was observed in KD-SMC compared to Cont-SMC, while there was no difference in the Collagen I (COL-I) expression (Figure 3E). This rise in FN expression was not associated with a change in mRNA-Fn1 level which, like mRNA-*Colla* expression, remains the same in Cont- and KD-SMC (Figure 4A). All together, these data show that CTSO controls VSMC migration and adhesion, and suggest that it could result from an effect on the amount of FN released by VSMC.

### ***Ctso* silencing affects contractile phenotype marker gene expression**

We next assessed the potential role of CTSO on VSMC phenotype by measuring the expression of contractile marker gene expression (Figure 4B). The expression of all tested VSMC marker genes, namely *Acta2*, *Myh11*, *Tagln* and *Cnn1* were significantly up-regulated by *Ctso* silencing, which was also checked (Figure 4C). By contrast, the expression of *Bmp4*, a known marker of osteogenic differentiation of VSMC<sup>20</sup> differentiation was reduced in KD-SMC compared to Cont-SMC (Figure 4C). These results suggest that *Ctso* silencing positively modulated VSMC differentiation. However, measurement of contractility showed

that KD-SMC contracted collagen gel less strongly than Cont-SMC in response to the thromboxane A2 analog U46619 (Figure 4D).

### ***Ctso* silencing induces stiffening of VSMC**

We then used atomic force microscopy (AFM) to assess the effect of CTSO depletion on the stiffness of VSMC and VSMC-derived extracellular matrix (ECM) as arterial stiffening is known to be a risk factor for IA.<sup>21</sup> Elastic modulus determined by AFM nanoindentation showed that KD-SMC were significantly stiffer than Cont-SMC, while the corresponding ECM produced by KD- and Cont-SMC displayed a similar stiffness (Figure 4E and S2).

### **CTSO variants**

To assess the impact of c.128C>T *CTSO* and c.946G>A *CTSO* variants on CTSO protein we established stable cell lines expressing the wild-type (WT-CTSO), and the two mutated proteins, p.Val316Ile-CTSO and p.Ala43Val-CTSO. Western blot analysis shows that expression level in cell lysates was similar for WT-CTSO and the two mutated proteins (Figure 5A). In contrast, the amount of p.Val316Ile-CTSO and p.Ala43Val-CTSO in the culture medium was strongly reduced compared to WT-CTSO (Figure 5A). Since we observed an increase in the amount of FN after CTSO depletion in VSMC (Figure 3E), we investigated the effect of p.Val316Ile-CTSO and p.Ala43Val-CTSO expression on FN level. Western-blot results show that CTSO mutants mimicked the effect of CTSO depletion on the increase of FN level, without effect on COL-I expression (Figure 5B).

## **Discussion**

We have identified two rare missense variants in the *CTSO* gene shared by all the affected relatives in two large pedigrees with multiple IA-affected relative. Of note, we observed a few

individuals (n=6) carrying possibly deleterious *CTSO* variations but without IA at the time of the study. In addition, we found a significant increase in the proportion of subjects with history of high blood pressure among IA careers compared to unaffected individuals. High blood pressure history is a well-established environmental factor associated with the development of IA.<sup>22</sup> Our results suggest, as described previously in familial cases with rare coding variants in *ANGPTL6*,<sup>16</sup> that rare coding variants in *CTSO* could thus promote IA formation in combination with other deleterious genetic or environmental factors such as high blood pressure, which would act either directly by mechanical effects on the vessel walls or indirectly by triggering inflammation.<sup>23</sup>

*CTSO* is one of the 11 cathepsins encoded in the human genome which constitute an important group of proteases that regulate numerous processes.<sup>18</sup> They are highly expressed in intracellular acidic compartments such as endosomes and lysosomes, and loss of function mutations in cathepsin genes cause very different syndromes in terms of clinical symptoms and disease progression, corresponding to either typical lysosomal storage diseases, or resulting from defective cleavage of specific protein substrates.<sup>24</sup> Cathepsins are also found in the cytoplasm, cell nucleus, cell membrane and the extracellular space.<sup>25, 26</sup> Extracellular cathepsins mediate extracellular matrix (ECM) protein degradation (collagen, elastin, fibronectin, laminin) and release of ECM-bound factors, but also shed various membrane proteins including receptors, growth factors, cytokines, and adhesion proteins thereby influencing important cellular processes such as proliferation and differentiation, motility, cell-cell interaction, adhesion, inflammatory and immune responses. Indeed, extracellular cathepsins are majorly upregulated in pathological states and are implicated in a wide range of disorders including vascular remodeling and atherosclerotic diseases.<sup>27, 28</sup> Cathepsin B, K and S have been found to be upregulated in the wall of IA.<sup>29</sup> *CTSO* is defined as a ubiquitous protein but neither its peptidase behavior nor its functions have been characterized. We

observed CTSO expression in cerebral artery wall, endothelial cells, and more strongly in VSMC. In these cells, CTSO was found both in intra- and extracellular compartments, and its extracellular release, probably through lysosomal exocytosis, is stimulated by cell stretching, suggesting that its role as an extracellular protease in the arterial wall could be potentiated by high blood pressure and participated to the arterial remodeling induced by hypertension. Although we did not analyze the enzymatic activity of CTSO *in vitro* to directly demonstrate its ability to degrade FN, there is a strong body of experimental evidence to support this hypothesis. Adhesion and FAK activation are potentiated by depletion of CTSO, both rapidly and late after VSMC seeding on exogenous FN coating, while only delayed stimulation of FAK activation was observed in CTSO-depleted VSMC seeded on plastic. These observations are consistent with a degradation of pericellular FN by CTSO, which instantaneously impaired cell-FN coating interaction in VSMC producing extracellular CTSO. When VSMC are seeded on plastic, the effect of CTSO depletion is only visible late, after the time necessary for the cells to self-produce surrounding FN with which they establish adhesions. This hypothesis is supported by the increase in the amount of FN induced by the depletion of CTSO in VSMC and suggests that extracellular CTSO secreted by VSMC degrades FN. This was corroborated by the results obtained by the expression of the two mutated proteins p.Val316Ile-CTSO and p.Ala43Val-CTSO which, being weakly secreted, induce an increase in the amount of FN as does the depletion of CTSO.

It is well established that adhesive properties to ECM drives VSMC stiffness,<sup>30</sup> and the level of activation of FAK signaling is related to VSMC stiffness.<sup>31</sup> In particular, VSMC focal adhesion to FN correlated with VSMC stiffness.<sup>32</sup> The strong stiffening of VSMCs that we observed after CTSO depletion is therefore consistent with an increase in the ability of VSMCs to form adhesions to FN due to the reduced degradation of FN in CTSO-depleted VSMCs.

ECM composition and organization impact the physical interactions with VSMC, which play a major role in regulating their functions including, migration and differentiation. We observed that knocking-down CTSO reduced VSMC migration on FN. This result further supports a role of CTSO in promoting FN degradation, although additional mechanisms such as degradation of other extracellular proteins or lysosomal degradation of FN-bound integrins known to be required for migration,<sup>33</sup> could also be involved. Regarding VSMC differentiation, CTSO depletion led to increase the expression of contractile phenotype marker genes such as *Acta2*. Interestingly, deletion or inhibition of cathepsin B, characterized as a FN-degrading protease<sup>34</sup> which was also up-regulated by cell stretching, also increases ACTA2 expression through mechanisms that have not been identified.<sup>35</sup> Increased ACTA2 expression has been shown to contribute to VSMC stiffening,<sup>36</sup> suggesting that up-regulation of *Acta2* and possibly of the other contractile markers, could participate to the increase in VSMC stiffness induced by CTSO depletion. Although contractile markers were upregulated, collagen gel contraction induced by KD-VSMC was reduced compared to Cont-VSMC. Whether this effect was related to the stiffness of VSMCs induced by the CTSO deletion cannot be determined, however, VSMCs from old animals show a similar association of increased stiffness<sup>30</sup> and reduced collagen gel contraction.<sup>32, 37</sup>

Besides their contractile activity, VSMCs normally produce ECM that allows adaptations to mechanical forces that act on the vessel wall while maintaining adequate wall pressures. Thus, the composition, the organization and the resulting interactions of ECM with VSMC is adjusted to the mechanical demands of the vessel wall thanks to multiple and coordinated mechanisms. Among them, the fine-tuning of the expression and activity of extracellular proteases plays a major role in reshaping the ECM matrix. In this study, we identified CTSO as a potential new actor of arterial remodeling that regulates FN deposition and VSMC functions. This role of CTSO is consistent with an increased susceptibility to IA associated

with c.128C>T *CTSO* and c.946G>A *CTSO* variants. We suggest that by promoting increase in FN deposition, VSMC-FN adhesion and VSMC stiffening, p.Val316Ile-*CTSO* and p.Ala43Val-*CTSO* mutants affect the mechanical properties of the vessel wall that compromise proper adaptation of the arterial wall to local hemodynamics thereby favoring IA formation. It is noteworthy that similar features, namely faster adhesion to FN,<sup>38</sup> up-regulation of contractile marker expression and increased stiffness have been described in Marfan syndrome VSMC,<sup>39</sup> a well-known genetic condition that predisposes to IA.<sup>40</sup>

## **Methods**

### **Clinical recruitment**

Familial cases of IA are defined as at least two first-degree relatives both diagnosed with typical IA (defined as a saccular arterial dilatation of any size occurring at a bifurcation of the intracranial vasculature), without any age limitation. Index case subjects and their relatives were recruited following the French ethical guidelines for genetic research and under approval from the French Ministry of Research (no. DC-2011-1399) and the local ethical committee. Informed written consent was obtained from each individual agreeing to participate in the genetic study, to whom MRI screening and blood sampling were proposed. The full recruiting process has been described previously.<sup>41</sup> Briefly, neuroradiological phenotyping was performed in each recruiting center by interventional neuroradiologists, neurologists, and neurosurgeons in order to recruit only case subjects with typical saccular bifurcation IA. Mycotic, fusiform-shaped, or dissecting IAs were systematically excluded, as well as IA in relation with an arteriovenous malformation and IA resulting from syndromic disorders such as Marfan disease or vascular forms of Ehlers Danlos. For all included patients we recorded the date of birth, if IA, the cases of rupture, the number of IA, the IA larger diameter in mm, the IA locations according to the four following groups internal carotid artery (ICA), posterior cerebral circulation (PCA), Middle cerebral artery (MCA) or anterior cerebral artery (ACA), the smoking habits, the history of high blood pressure and ischemic stroke, the level of alcohol intake per week, the history of diabetes or dyslipidemia, obesity (BMI >30), treatment by statin, antiplatelet, oral anticoagulant and anti-inflammatory drugs.

### **Whole Exome Sequencing (WES)**

Genomic DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes using the NucleoSpin Blood kit XL (Macherey Nagel). Whole-exome fragments were captured with to the SureSelect

Human All Exon V4 kit (Agilent technology), according to manufacturer protocol. Alignment on reference genome (Broad Institute human\_g1k\_v37) was performed using Burrow-Wheeler aligner (Bwa mem v0.7.10).<sup>42</sup> Picard v1.119 was used to flag duplicates and recalibration was achieved through GATK v3.2.2 (broadinstitute, 2023).<sup>43</sup> Variants were called with GATK HaplotypeCaller on all exons hg9 exons (NCBI RefSeq), annotated with SnpEff and vcfGnomad (jvarkit) using gnomad v2.1.<sup>44</sup> Quality filters detailed in the Table S1 were applied. Only variants annotated as non-synonymous or affecting splicing, and reported with a minor allelic frequency (MAF) below 0.1% in the non-Finnish European (NFE) gnomAD population, were subsequently considered.

### **IBD analysis**

Haplotype sharing between affected relatives were identified through IBD analysis based on SNP genotyping data. Fluorescence intensities were obtained from Precision Medicine Research Array (PMRA - Affymetrix) and quantified by Affymetrix GeneTitan Multi-Channel Instrument. Genotypes were merged with PREGO control population<sup>45</sup> and SNPs with MAF<10%, call rate < 95% or  $p < 1.10^{-5}$  when testing for Hardy-Weinberg equilibrium were excluded. IBD regions were then identified using IBDLD v3.34 with noLD method.<sup>46</sup> Familial segregation analysis by capillary sequencing was performed on an Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer, using standard procedures. Sequence analyses were performed with SeqScape v.2.5.

### **Animal model**

All animal care and use procedures of the present study were performed in accordance with the European Community Standards on the Care and Use of Laboratory Animals and were



approved by our institutional ethics committee (authorization D44278). Cerebral arteries from 3 months-old Wistar-Kyoto (WKY), spontaneously hypertensive (SHR) and stroke-prone SHR (SPSHR) rats (300 g) were collected and snap-frozen in liquid nitrogen for RNA extraction.

### **Cell culture**

Primary VSMC were isolated from the aorta of 4-week-old WYK rats. Rats were sacrificed according to institutional animal handling ethics. The aorta was harvested, cleaned, endothelium-denuded, cut into small pieces and digested by collagenase II (1 mg/mL; 2 h at 37°C under agitation; Worthington Bio-chemical). After inactivation of collagenase with serum, the tissue was spun down and plated in a 6-well plate in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM, Gibco; Invitrogen) containing 10% foetal bovine serum (FBS), 4.5 g/L glucose, 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin at 37°C-5% CO<sub>2</sub>. All experiments were performed at passages 2 and 3. For cell stretching, cyclic uniaxial strain was applied at 1 Hz and 10% or 20% strain for 24 hours (MechanoCulture FX, CellScale). HUVEC (passage 2 to 6; PromoCell) were routinely cultured in EBM media supplemented with the provided growth factors kit (Promocell). For flow experiments HUVEC were cultured on 0.2% gelatin-coated 0.4 ibidi slides (IBIDI) and unidirectional laminar shear stress was applied using the pumping system and control unit form IBIDI. Local shear stress was calculated using Poiseuille's law and averaged to 3 dyn/cm<sup>2</sup> (pathological low shear stress: LSS) 16 dyn/cm<sup>2</sup> (physiological shear stress: PSS) or 36 dyn/cm<sup>2</sup> (pathological high shear stress: HSS). NIH3T3 cells were cultured in DMEM containing 1 g/L glucose, 10% FBS, 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin at 37°C-5% CO<sub>2</sub>.

**RT-PCR**

Total RNA was purified from cells using RNA plus kit (Macherey Nagel) or tissue using TRIzol reagent (MAN0001271, Ambion, Thermo Fisher Scientific) and RNA XS Plus kit (Macherey Nagel) according to the manufacturer instructions. RNA (500 ng) was reverse-transcribed with M-MLV enzyme (28025021, Thermo Fisher Scientific). Real-time qPCR was performed on a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using SYBR Green Master Mix (4367659, Applied Biosystems) and primers listed in Table S2. Each sample was analyzed in triplicate. GAPDH was used as the reference gene and results are expressed according to the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method.

**Immunoblotting**

Supernatant from VSMC or NIH3T3 were taken off and concentrated with Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit (UFC5010, Millipore). Cells were lysed on ice in buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktails (Sigma Aldrich) and sodium orthovanadate. Equal amount of proteins of each sample was separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and incubated with specific antibodies: CTSO (for rat form: ab200735, Abcam, for human form: HPA002041, Sigma-Aldrich), cleaved caspase 3 (9664, Cell Signalling Technology), P-FAK (8556, Cell Signalling Technology), FAK (3285, Cell Signalling Technology), Fibronectin (15613-1-AP, Proteintech), type I collagen (14695-1-AP, Proteintech). Equal loading was checked by reprobing of the membrane with an anti-tubulin antibody (T9026, Sigma). Immune complexes were detected with appropriate secondary antibodies and enhanced chemiluminescence reagent (Clarity ECL BioRad). Protein band intensities were quantified using ImageJ Software (NIH software, Bethesda, Md)

***Ctso* silencing**

VSMC were transfected using Lipofectamine RNAiMAX reagent (Invitrogen) according to the manufacturer instructions with a pool of siRNAs targeting rat *Ctso* (ON-TARGETplus siRNA-SMARTpool (Cat# L-110260-00-0005; Horizon Discovery,) and a non-targeting control pool (Pool #1, D-001810-10-05, Horizon Discovery) to generate KD-SMC and Cont-SMC, respectively. The efficiency of *Ctso* mRNA depletion was assessed 72 h post-transfection by RT-qPCR.

**Viability/Proliferation assay**

VSMC viability/proliferation was quantified by MTT (3-[4,5 Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazodium) colorimetric assay according to the manufacturer instructions (M5655; Sigma aldrich). Briefly, VSMC were seeded onto 96-well plates in triplicate for each condition, cultured for 24 h, after which they were serum-starved for 24 h. VSMC were then incubated in DMEM without or with 10% FBS for 24h. The number of viable cells was then determined by incubation in 1 mg/mL MTT for 4 h à 37 °C. The medium was then removed and acidified isopropanol was added to solubilize the MTT reduction product formazan. MTT reduction by viable cells was then quantified by measurement of the absorbance at 590 nm.

**Apoptosis assay**

VSMC apoptosis was determined after incubation in 1 µmol/L staurosporine (S5921, Sigma Aldrich) in serum-free medium for 8 h. Apoptosis was quantified by the measurement of cleaved caspase 3 by western blot and by TUNEL assay. VSMC were fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized. Fragmented DNA was stained with TUNEL Assay Kit - BrdU-Red (ab66110, Abcam) according to manufacturer instructions, and DAPI was used to label all nuclei. Coverslips were mounted on slides with Prolong gold antifade reagent and

observed with a fluorescent microscope. Apoptotic cell number was quantified as the percentage of TUNEL-positive cells.

### **Transwell migration assay**

Boyden chamber assay was performed as previously described.<sup>47</sup> VSMC, transfected with siRNA 48 h before, were trypsinized and washed in serum-free DMEM before plating into transwells (0.47cm<sup>2</sup> of culture area, 8 µm pore size; Nunc™). DMEM containing 10% FCS was placed in the lower chamber and VSMC were allowed to migrate for 10 h at 37 °C. After incubation, the filter was removed and VSMC on the upper side of the filter were scraped off. VSMC that had migrated to the lower side of the filter were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with Coomassie blue 0.1% for observation under a microscope in brightfield mode. Migration to the lower chamber of the transwell was quantified by the area covered by cells measured using ImageJ Software and expressed relative to Cont-SMC set as 1.

### **Cell adhesion assay using impedance technology**

VSMC (10000/well) were seeded in a 96 well plate microtiter xCELLigence assay plate coated with 2 µg/ml fibronectin (E-Plate, ACEA Biosciences Inc.) and placed on the Real-time xCELLigence Cell Analyzer (Roche Applied Science) platform at 37°C. The cell index value, which are proportionate to the area covered by the cells was measured every 5 min for a period of 8 h. Adhesion speed was defined as the slope of the cell index change over time.

### **Collagen gel contraction assay**

VSMC were mixed with collagen gel working solution (CBA-201, Cell Biolabs). The cell-collagen mixture was added into a 24-well plate and incubated at 37°C for 1 h to allow collagen polymerization. Serum-free DMEM was added to the top of the collagen gel lattice.

After 24 h, cells were treated or not with U46619 ( $10^{-6}$  mol/L) and the myosin inhibitor BDM (from CBA-201 kit), and the collagen gels were released by a sterile spatula. Changes in the collagen gel area were measured at 48 h. The percentage of contraction corresponded to  $[(\text{area in BDM condition} - \text{area in the control or U46619 condition}) / \text{area in BDM condition} \times 100]$ ,

### **Atomic force microscopy (AFM) experiments**

AFM experiments have been performed in Cont- and KD-SMC grown on plastic and allowed to produce their own ECM for 5 days. ECM analysis has been performed after decellularization as previously described. All experiments were then performed in Physiological Saline Solutions (PSS) buffered with 20 mM HEPES at 37°C using a NanoWizard® atomic force microscope (JPK Instruments, Germany) equipped with a temperature controller and inverted optical microscope. Indentation experiments were carried out with cantilevers (SQube) having a colloidal glass sphere of 5  $\mu\text{m}$  in diameter. Their spring constant was calibrated using the thermal noise method implemented in the AFM setting (JPK software), with values comprised between 0.12 and 0.15  $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$ . Prior to indentation measurements, the cantilever sensitivity was systematically measured from the slope of force-distance curves performed on glass. The optical microscope was first used to position the AFM tip on ECM or on the cytoplasmic region of the selected cell and several approach-retract force-distance curves were performed to determine the force to be applied corresponding to an indentation depth of  $\sim 500$  nm (a good compromise avoiding the long-range interactions and in the validity domain of the Hertz contact mechanics model). Then, force-distance curves were recorded on cells at a low constant speed of 1  $\mu\text{m}/\text{s}$  to neglect the hydrodynamic drag forces exerted on the cantilever by the liquid medium.<sup>48</sup> These curves were then converted into force-indentation curves, and the approach part was fitted by the Hertz model to determine the apparent elastic modulus of cells.<sup>49</sup>

**Mutagenesis**

CTSO-TurboGFPpPlasmid was purchased from Origene (RG208268). c.128C>T *CTSO* and c.946G>A *CTSO* mutagenesis was performed using Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit Protocol (E0554, NEB) and designed primers: A43V-Fw: 5'-GAA GCCGCCGTCTTCCGGGAAAGTC-3'; A43V-Rv: 5'-ACG CTCGCGGCTCCGCGG-3'; V316I-Fw: 5'-GTTTGTGGTATTGCAGATTCCATTTCTTCTATATTTGTGACGC-3'; V316I-Rv: 5'-GCGTCACAAATATAGAAGAAATGGAATCTGCAATACCACAAAC-3'. Mutations were confirmed by standard sequencing methods using T7 standard primer and designed primer (5'-AAGCCCCTGGAAGACCTAAG-3').

**Generation of lentiviral constructs**

From LT3GEPIR plasmid (#111177, Addgene), was modified to remove miR30 backbone by amplifying and cloning eGFP between XhoI and EcoRI restriction sites using the following primers: Fw 5'-CGGCCGCTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3' and Rv 5' GATCTGAATTCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'. The resulting plasmid was used to clone WT and mutant CTSO in BamHI and XhoI,

**Lentivirus production, transduction and induction of WT-CTSO and CTSO variants**

Lentiviral vector for expressing WT-CTSO, p.Ala43Val-CTSO and p.Val316Ile-CTSO was transfected into HEK293T cells along with packaging vectors psPAX2 and pVSVG2 (provided by Prof. Dr.Utz Fischer's lab) using polyethylenimine (#764965, Sigma-Aldrich) transfection agent. After overnight incubation, the medium was replaced with fresh medium (DMEM+10% serum). Forty-eight hours and 72 h after transfection, viral supernatant was collected, filtered through 0.22 µm filter and used to infect NIH3T3 in the presence of polybrene (8 µg/mL, H9268; Sigma Aldrich). After 48 to 72 h of infection, transduced

NIH3T3 cells were selected with puromycin (2 µg/mL, P8833, Sigma Aldrich) for 48 h and maintained in the presence of puromycin (2 µg/mL). The induction of WT- or mutated CTSO was performed at least 2 days before the experiment by supplementing the medium with doxycycline (1 µg/mL, #D9891, Sigma Aldrich), which was maintained until the completion of the experimental procedure.

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software. Details of the statistical test used for each experiment is indicated in the figure legends.

### **Acknowledgements**

We are grateful to the Genomics and Bioinformatics Core Facilities (GenoA and BiRD) and to the animal house facility (UTE) of Nantes Université for their expert services. We would like to thank the Genome Aggregation Database (gnomAD) and the groups that provided exome and genome variant data to this resource. A full list of contributing groups can be found at <http://gnomad.broadinstitute.org/about>. We acknowledge the Center of Biological Resources (CHU Nantes, Hoôtel-Dieu, CBR, Nantes, France) as well as Martine and Marie-France Le Cunff and the Clinical Investigation Center 1413 of Nantes for their assistance in managing the ICAN and PREGO biobanks.

### **Sources of Funding**

This work was supported by the French national research agency (ANR) (Programme d'Investissements d'Avenir ANR-16-IDEX-0007 [NeXT Initiative], ANR-21-CE17-0006 [to RBo] and ANR-21-CE14-0016 [to A-CV]), Fondation pour la Recherche Médicale

(R22131NN - RAD22168NNA to GL), Institut de France – Académie des Sciences  
(Lamonica Award to GL, supporting M-AM) and the local fund Genavie (to MF and RR).

### **Disclosures**

The authors have reported that they have no relationships with industry relevant to the contents of this paper to disclose.

### **Author contributions**

HD and RBo supervised patient recruitment and DNA biobanking. RBo, CD and RR conceived and directed the genetic investigations. RBl, SBe, SBo, PL, FB, and JFD generated and analyzed the genetic data. MF, M-AR, and MR performed experiments in VSMC, collected the data and analyzed the results. SPRB designed the lentiviral constructs and made the mutant cells. SC performed AFM and analyzed the results. ACV designed the in vitro study, analyzed the results, and reviewed the manuscript. GL conceived and directed the in vitro study. RBo, GL, and RR supervised the work and wrote the manuscript with input from all authors. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript

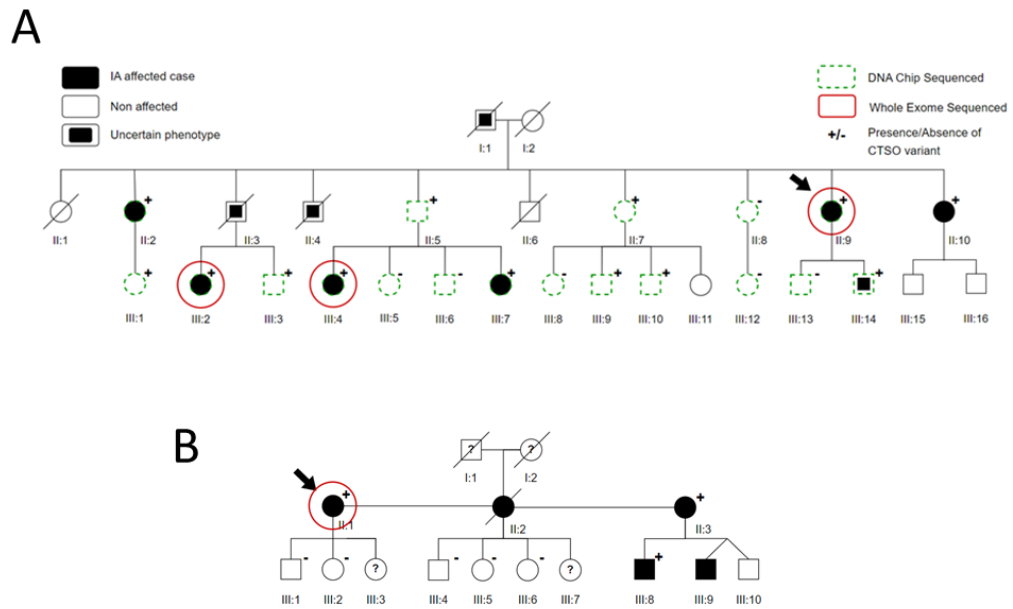


**References**

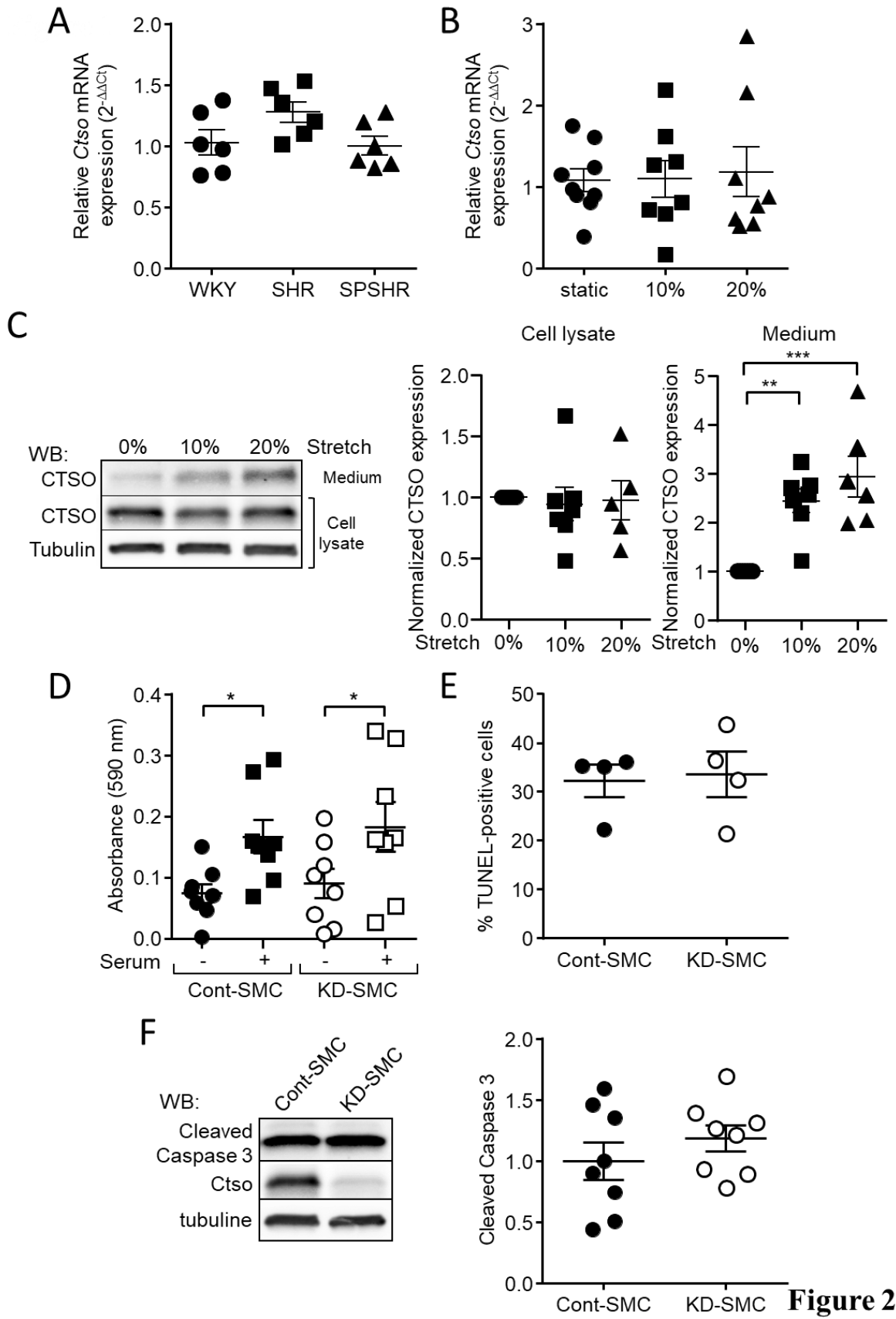
1. Vlak MH, Algra A, Brandenburg R, Rinkel GJ. Prevalence of unruptured intracranial aneurysms, with emphasis on sex, age, comorbidity, country, and time period: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* 2011;10:626-636
2. Nieuwkamp DJ, Setz LE, Algra A, Linn FH, de Rooij NK, Rinkel GJ. Changes in case fatality of aneurysmal subarachnoid haemorrhage over time, according to age, sex, and region: A meta-analysis. *Lancet Neurol.* 2009;8:635-642
3. Steiner T, Juvela S, Unterberg A, Jung C, Forsting M, Rinkel G, et al. European stroke organization guidelines for the management of intracranial aneurysms and subarachnoid haemorrhage. *Cerebrovasc Dis.* 2013;35:93-112
4. Vlak MH, Rinkel GJ, Greebe P, Algra A. Risk of rupture of an intracranial aneurysm based on patient characteristics: A case-control study. *Stroke.* 2013;44:1256-1259
5. Bourcier R, Redon R, Desal H. Genetic investigations on intracranial aneurysm: Update and perspectives. *J Neuroradiology.* 2015;42:67-71
6. Kissela BM, Sauerbeck L, Woo D, Houry J, Carrozzella J, Pancioli A, et al. Subarachnoid hemorrhage - a preventable disease with a heritable component. *Stroke.* 2002;33:1321-1326
7. Bilguvar K, Yasuno K, Niemela M, Ruigrok YM, von Und Zu Fraunberg M, van Duijn CM, et al. Susceptibility loci for intracranial aneurysm in european and japanese populations. *Nat Genet.* 2008;40:1472-1477
8. Yasuno K, Bakircioglu M, Low SK, Bilguvar K, Gaal E, Ruigrok YM, et al. Common variant near the endothelin receptor type a (ednra) gene is associated with intracranial aneurysm risk. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:19707-19712
9. Yasuno K, Bilguvar K, Bijlenga P, Low SK, Kirschke B, Auburger G, et al. Genome-wide association study of intracranial aneurysm identifies three new risk loci. *Nat Genet.* 2010;42:420-425
10. Bakker MK, van der Spek RAA, van Rheenen W, Morel S, Bourcier R, Hostettler IC, et al. Genome-wide association study of intracranial aneurysms identifies 17 risk loci and genetic overlap with clinical risk factors. *Nat Genet.* 2020;52:1303-1313
11. Zhou S, Ambalavanan A, Rochefort D, Xie P, Bourassa CV, Hince P, et al. Rnf213 is associated with intracranial aneurysms in the french-canadian population. *Am J Hum Genet.* 2016;99:1072-1085
12. Santiago-Sim T, Fang X, Hennessy ML, Nalbach SV, DePalma SR, Lee MS, et al. Thsd1 (thrombospondin type 1 domain containing protein 1) mutation in the pathogenesis of intracranial aneurysm and subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 2016;47:3005-3013
13. Wu YQ, Li ZL, Shi Y, Chen LY, Tan HB, Wang ZY, et al. Exome sequencing identifies loxl2 mutation as a cause of familial intracranial aneurysm. *World Neurosurgery.* 2018;109:E812-E818
14. Lorenzo-Betancor O, Blackburn PR, Edwards E, Vazquez-do-Campo R, Klee EW, Labbe C, et al. Pcnt point mutations and familial intracranial aneurysms. *Neurology.* 2018;91:E2170-E2181
15. Yang X, Li J, Fang Y, Zhang Z, Jin D, Chen X, et al. Rho guanine nucleotide exchange factor arhgef17 is a risk gene for intracranial aneurysms. *Circ Genom Precis Med.* 2018;11:e002099
16. Bourcier R, Le Scouarnec S, Bonnaud S, Karakachoff M, Bourcereau E, Heurtebise-Chretien S, et al. Rare coding variants in angptl6 are associated with familial forms of intracranial aneurysm. *Am J Hum Genet.* 2018;102:133-141
17. Barak T, Ristori E, Ercan-Sencicek AG, Miyagishima DF, Nelson-Williams C, Dong W, et al. Ppil4 is essential for brain angiogenesis and implicated in intracranial aneurysms in humans. *Nat Med.* 2021;27:2165-2175
18. Reiser J, Adair B, Reinheckel T. Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *J Clin Invest.* 2010;120:3421-3431

19. Hedin U, Bottger BA, Forsberg E, Johansson S, Thyberg J. Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells. *J Cell Biol.* 1988;107:307-319
20. Yang P, Tronccone L, Augur ZM, Kim SSJ, McNeil ME, Yu PB. The role of bone morphogenetic protein signaling in vascular calcification. *Bone.* 2020;141:115542
21. Matsukawa H, Shinoda M, Fujii M, Uemura A, Takahashi O, Niimi Y. Arterial stiffness as a risk factor for cerebral aneurysm. *Acta Neurol Scand.* 2014;130:394-399
22. Vlak MH, Rinkel GJ, Greebe P, Algra A. Independent risk factors for intracranial aneurysms and their joint effect: A case-control study. *Stroke.* 2013;44:984-987
23. Hudson JS, Hoyne DS, Hasan DM. Inflammation and human cerebral aneurysms: Current and future treatment prospects. *Future Neurol.* 2013;8
24. Ketscher A, Ketterer S, Dollwet-Mack S, Reif U, Reinheckel T. Neuroectoderm-specific deletion of cathepsin d in mice models human inherited neuronal ceroid lipofuscinosis type 10. *Biochimie.* 2016;122:219-226
25. Vidak E, Javorsek U, Vizovisek M, Turk B. Cysteine cathepsins and their extracellular roles: Shaping the microenvironment. *Cells.* 2019;8
26. Yadati T, Houben T, Bitorina A, Shiri-Sverdlov R. The ins and outs of cathepsins: Physiological function and role in disease management. *Cells.* 2020;9
27. Wu H, Du Q, Dai Q, Ge J, Cheng X. Cysteine protease cathepsins in atherosclerotic cardiovascular diseases. *J Atheroscler Thromb.* 2018;25:111-123
28. Liu CL, Guo J, Zhang X, Sukhova GK, Libby P, Shi GP. Cysteine protease cathepsins in cardiovascular disease: From basic research to clinical trials. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15:351-370
29. Aoki T, Kataoka H, Ishibashi R, Nozaki K, Hashimoto N. Cathepsin b, k, and s are expressed in cerebral aneurysms and promote the progression of cerebral aneurysms. *Stroke.* 2008;39:2603-2610
30. Lacolley P, Regnault V, Avolio AP. Smooth muscle cell and arterial aging: Basic and clinical aspects. *Cardiovasc Res.* 2018;114:513-528
31. Saphirstein RJ, Gao YZ, Jensen MH, Gallant CM, Vetterkind S, Moore JR, et al. The focal adhesion: A regulated component of aortic stiffness. *PLoS One.* 2013;8:e62461
32. Sehgel NL, Sun Z, Hong Z, Hunter WC, Hill MA, Vatner DE, et al. Augmented vascular smooth muscle cell stiffness and adhesion when hypertension is superimposed on aging. *Hypertension.* 2015;65:370-377
33. Lobert VH, Brech A, Pedersen NM, Wesche J, Oppelt A, Malerod L, et al. Ubiquitination of alpha 5 beta 1 integrin controls fibroblast migration through lysosomal degradation of fibronectin-integrin complexes. *Dev Cell.* 2010;19:148-159
34. Buck MR, Karustis DG, Day NA, Honn KV, Sloane BF. Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin b from normal and tumour tissues. *Biochem J.* 1992;282 ( Pt 1):273-278
35. Nettesheim A, Shim MS, Dixon A, Raychaudhuri U, Gong H, Liton PB. Cathepsin b localizes in the caveolae and participates in the proteolytic cascade in trabecular meshwork cells. Potential new drug target for the treatment of glaucoma. *J Clin Med.* 2020;10
36. Qiu H, Zhu Y, Sun Z, Trzeciakowski JP, Gansner M, Depre C, et al. Short communication: Vascular smooth muscle cell stiffness as a mechanism for increased aortic stiffness with aging. *Circ Res.* 2010;107:615-619
37. Wheeler JB, Mukherjee R, Stroud RE, Jones JA, Ikonomidis JS. Relation of murine thoracic aortic structural and cellular changes with aging to passive and active mechanical properties. *J Am Heart Assoc.* 2015;4:e001744
38. Nolasco P, Fernandes CG, Ribeiro-Silva JC, Oliveira PVS, Sacrini M, de Brito IV, et al. Impaired vascular smooth muscle cell force-generating capacity and phenotypic deregulation in marfan syndrome mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866:165587

39. Crosas-Molist E, Meirelles T, Lopez-Luque J, Serra-Peinado C, Selva J, Caja L, et al. Vascular smooth muscle cell phenotypic changes in patients with marfan syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35:960-972
40. Kim JH, Kim JW, Song SW, Ahn SJ, Park M, Park SK, et al. Intracranial aneurysms are associated with marfan syndrome: Single cohort retrospective study in 118 patients using brain imaging. *Stroke.* 2021;52:331-334
41. Bourcier R, Chatel S, Bourcereau E, Jouan S, Marec HL, Daumas-Duport B, et al. Understanding the pathophysiology of intracranial aneurysm: The ican project. *Neurosurgery.* 2017;80:621-626
42. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with burrows-wheeler transform. *Bioinformatics.* 2010;26:589-595
43. Poplin R, Ruano-Rubio V, DePristo MA, Fennell TJ, Carneiro MO, Van der Auwera GA, et al. Scaling accurate genetic variant discovery to tens of thousands of samples. *bioRxiv.* 2018:201178
44. Karczewski KJ, Solomonson M, Chao KR, Goodrich JK, Tiao G, Lu W, et al. Systematic single-variant and gene-based association testing of thousands of phenotypes in 394,841 uk biobank exomes. *Cell Genomics.* 2022;2:100168
45. Alves I, Giemza J, Blum M, Bernhardsson C, Chatel S, Karakachoff M, et al. Genetic population structure across brittany and the downstream loire basin provides new insights on the demographic history of western europe. *bioRxiv.* 2022:2022.2002.2003.478491
46. Han L, Abney M. Identity by descent estimation with dense genome-wide genotype data. *Genet Epidemiol.* 2011;35:557-567
47. Goueffic Y, Guilluy C, Guerin P, Patra P, Pacaud P, Loirand G. Hyaluronan induces vascular smooth muscle cell migration through rhamn-mediated pi3k-dependent rac activation. *Cardiovasc Res.* 2006;72:339-348
48. Cuenot S, Gelebart P, Siquin C, Collic-Jouault S, Zykwinska A. Mechanical relaxations of hydrogels governed by their physical or chemical crosslinks. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2022;133:105343
49. Zykwinska A, Makshakova O, Gelebart P, Siquin C, Stephant N, Collic-Jouault S, et al. Interactions between infernan and calcium: From the molecular level to the mechanical properties of microgels. *Carbohydr Polym.* 2022;292:119629



**Figure 1**



**Figure 2**

Figure 3

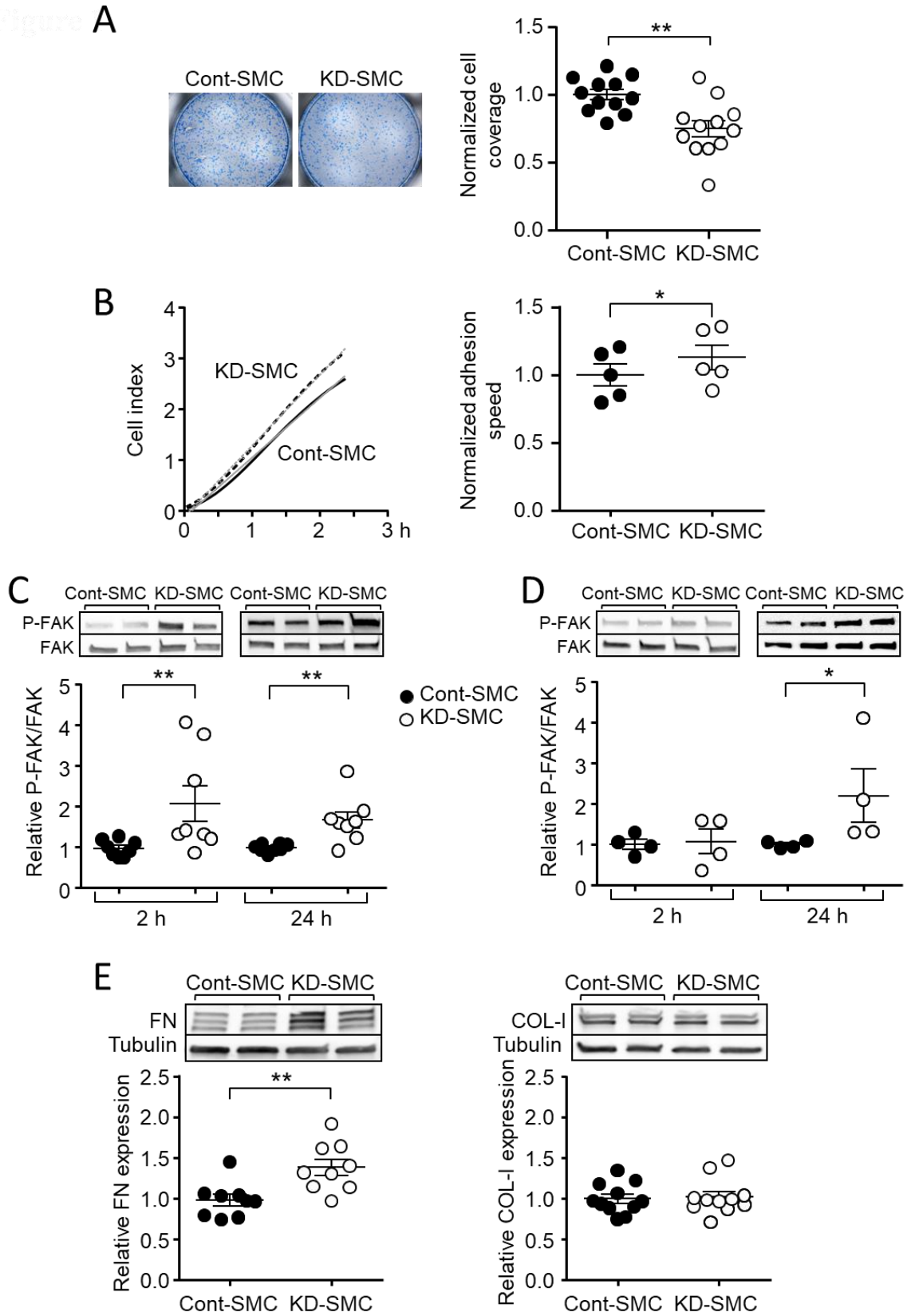
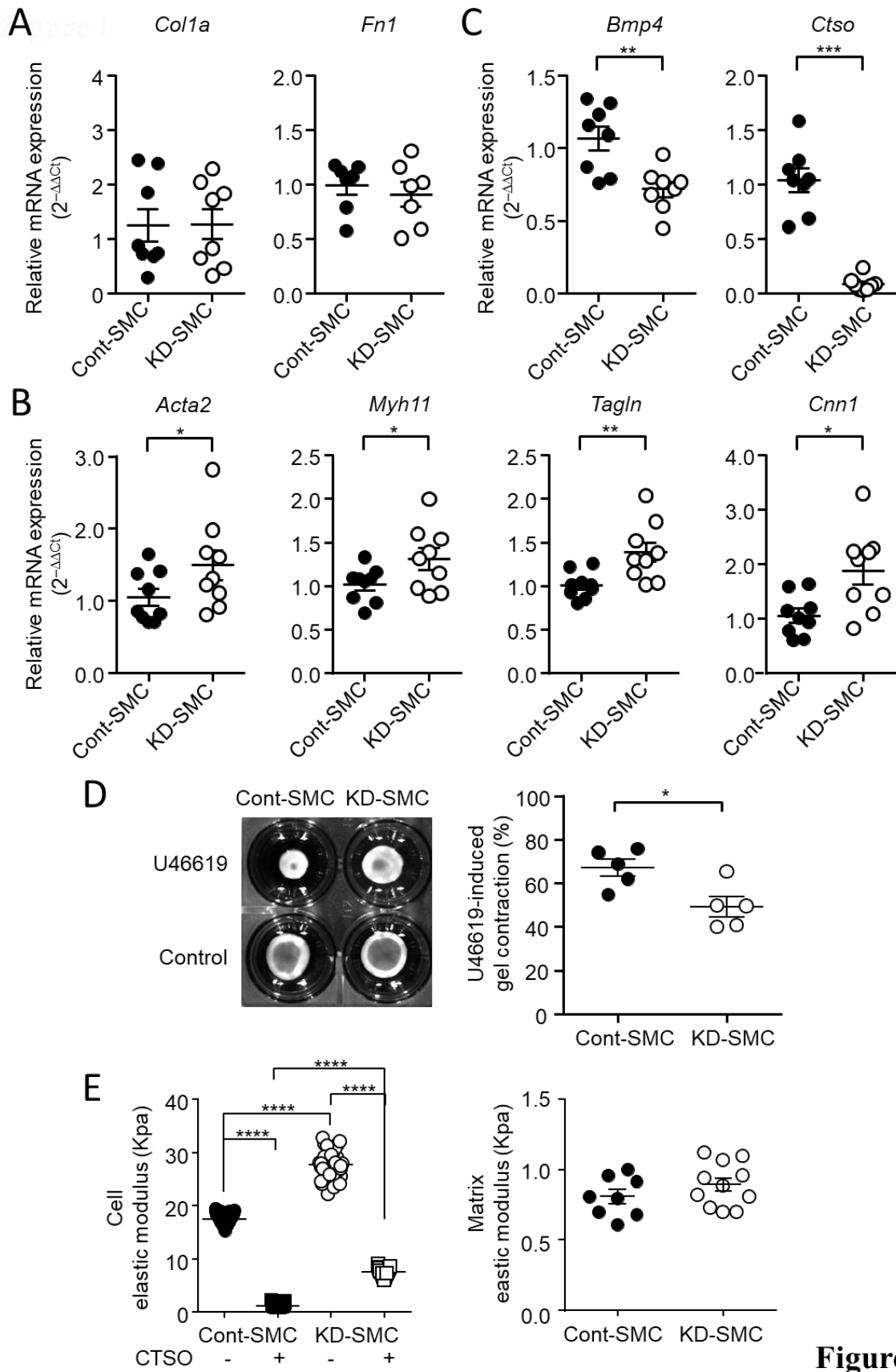
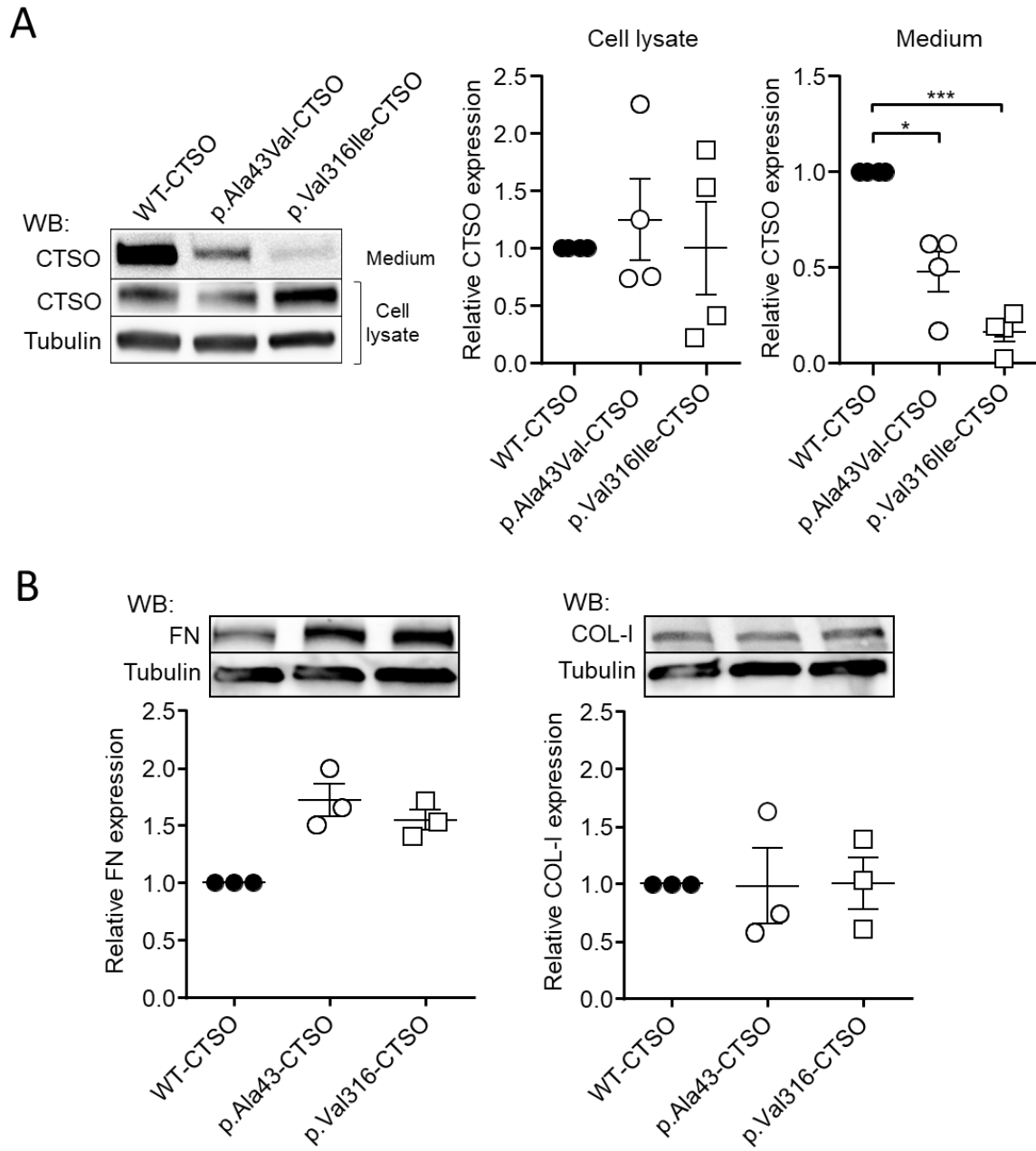


Figure 3



**Figure 4**



**Figure 5**



## Figures Legends

### Figure 1 Pedigree of large family with IA used for genetic investigations

**A** Pedigree of family A showing phenotypic and genetic segregation patterns. WE sequenced and genotyped individuals are respectively indicated with a red circle and a green discontinuous trait. Bold arrow indicates index case. Presence or absence of *CTSO* c.946G>A variant was assessed through capillary sequencing. **B** Pedigree for family B showing phenotypic and genetic segregation patterns. WE sequenced individual is indicated with a red circle. Bold arrow indicates index case. Presence or absence of *CTSO* c.128C>T variant was assessed through capillary sequencing.

### Figure 2 Expression of CTSO and consequence of CTSO depletion on VSMC proliferation and apoptosis

**A** *Ctso* mRNA expression analyzed by quantitative RT-PCR in cerebral arteries of normotensive (WKY), and hypertensive rats (SHR and SHRSP). **B** *Ctso* mRNA expression analyzed by quantitative RT-PCR in VSMC cultured in static condition and subjected to 10% and 20% cyclic stretch. **C** Representative western blots and quantification of CTSO protein expression assessed in cell lysate and culture medium of VSMC cultured in static condition and subjected to 10% and 20% cyclic stretch. **D** Proliferation assessed by the measurement of MTT absorbance in the absence and presence of 10 % serum in VSMC transfected with siRNA targeting *Ctso* (KD-SMC) and control siRNA (Cont-SMC). **E** Number of apoptotic cells in KD-SMC and Cont-SMC culture after stimulation with staurosporine (1  $\mu$ mol/L, 8 h). Values represent the percentage of TUNEL-positive cells relative to total cell population in each group. **F** Typical Western blot of cleaved-caspase 3 in Cont- and KD-SMC and corresponding quantification. CTSO and tubulin have been also blotted to check CTSO silencing and equal

loading. Results are expressed relative to Cont-SMC set as 1. (Data are expressed as mean  $\pm$  SEM; \* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.01 and \*\*\* $p$ <0.01; one-way ANOVA)

**Figure 3 CTSO depletion in VSMC decreases migration, stimulates adhesion, FAK phosphorylation and FN expression**

**A** Representative images of Cont- and KD-SMC which migrated to the underside surface of Transwell membranes and the corresponding quantification. **B** Representative curve showing the cell index representing the adhesion of Cont- and KD-SMC over time and quantification of the adhesion speed. **C** and **D** Representative Western blots showing the phosphorylation of FAK in Cont- and KD-SMC 2 h and 24 h after seeding on FN matrix (C) or directly on plastic (D). Graphs show densitometric analysis of phospho-FAK in blots, relative to FAK expression. **E** Representative western blots showing the amount of FN and Col-I in Cont- and KD-SMC and corresponding quantification. (Results were expressed relative to Cont-SMC and presented as mean  $\pm$  SEM; \* $p$  < 0.05, \* $p$  < 0.01; Mann-Whitney test).

**Figure 4 CTSO depletion in VSMC modulates contractile phenotype marker expression, contraction and cell stiffness**

**A-C** RT-qPCR analysis of mRNA levels of Col1A, Fn1 (A); of the SMC marker gene *Acta2*, *Myh11*, *Talgn*, *Cnn1* (B); and *Bmp4* and *Ctso* (C) in Cont- and KD-SMC. Results were expressed relative to Cont-SMC. **D** Representative images of Cont-SMC- and KD-SMC-seeded collagen gels 48 h after release with and without U46619 and quantification of U46619-induced gel contraction in Cont- and KD-SMC. **E** Atomic force microscopy determination of the elastic modulus of Cont- and KD-SMC (left) and their respective extracellular matrix (right). (Data are expressed as mean  $\pm$  SEM; \* $p$  < 0.05, \* $p$  < 0.01; Mann-Whitney test).

**Figure 5 CTSO variants weakly secreted and induced increase in FN**

**A** Representative western blots and quantification of CTSO protein expression measured in cell lysate and culture medium of NIH3T3 expressing WT-CTSO, p.Ala43Val-CTSO and p.Val316Ile-CTSO. **B** Representative western blots and quantification of FN and Col-1 expression measured in WT-CTSO, p.Ala43Val-CTSO and p.Val316Ile-CTSO. (Data are expressed as mean  $\pm$  SEM; \* $p$ <0.05 and \*\*\* $p$ <0.01; one-way ANOVA)

**Tables**

**Table 1 Genetic finding by whole-exome sequencing in family A**

	II:9	III:4	III:2
<b>Total variants</b>	<b>19583</b>	<b>20220</b>	<b>20081</b>
<b>Functional variants</b>	<b>6378</b>	<b>6566</b>	<b>6417</b>
<b>MAF &lt;0.1% (GnomAD)</b>	<b>177</b>	<b>179</b>	<b>153</b>
<b>Shared by the 3 relatives</b>	<b>16</b>		
<b>Shared by all affected</b>	<b>1 (CTSO)</b>		

**Table 2 Rare coding variants found across families A and B in *CTSO*.**

Family	Genomic position (GRCh37/hg19)	Gene	Nucleotide consequence	Protein consequence	MAF (NFE in gnomAD)	Predicted Functional Impact		Cases / Total	
						SIFT	Polyphen 2	Affected	Unaffected
A	4:156847208	<i>CTSO</i>	c.946G>A	p.Val316Ile	1.7.10 <sup>-5</sup>	Deleterious	Probably damaging	6/6	6/17
B	4:156874872	<i>CTSO</i>	c.128C>T	p.Ala43Val	3.0.10 <sup>-4</sup>	Tolerated	Probably damaging	3/3	0/5

Mutation names are based on Ensembl *CTSO* transcript ENST00000433477.3. MAF: Minor Allele Frequency; NFE: Exome Aggregation Consortium (Non-Finnish Europeans); gnomAD: Genome Aggregation Database; GERP: Genomic Evolutionary Rate Profiling; SIFT: Sorting Intolerant From Tolerant.

**Table 3 Clinical characteristics, treatments and exposition to risk factors for IA cases and unaffected relatives according to *CTSO* status.**

	<b><i>CTSO</i> variants IA</b>	<b><i>CTSO</i> variants no IA</b>	<b>No <i>CTSO</i> variant no IA</b>	<b><i>P</i>-value</b>
n	11	6	18	-
Female	8 (72.73%)	2 (33.33%)	10 (55.56%)	0.32
Age	63.00 (56.00 - 75.50)	63.50 (60.25 - 81.00)	46.50 (38.50 - 53.75)	0.53
Smoker or former Smoker	6 (54.55%)	4 (66.67%)	9 (50.00%)	0.90
Alcohol intake per week > 150g	5 (45.45%)	1 (16.67%)	3 (16.67%)	0.23
<b>High Blood Pressure</b>	<b>5 (45.45%)</b>	<b>2 (33.33%)</b>	<b>1 (5.56%)</b>	<b>0.023</b>
Dyslipemia or diabetes	2 (18.18%)	1 (16.67%)	1 (5.56%)	0.47
Antiplatelet treatment	3 (27.27%)	1 (16.67%)	1 (5.56%)	0.22
Anti-inflammatory Drugs	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (5.56%)	1.0
Statin treatment	2 (18.18%)	1 (16.67%)	1 (5.56%)	0.47
Oral anticoagulant treatment	1 (9.09%)	2 (33.33%)	4 (22.22%)	0.55

Data are expressed as median, (minimum, and maximum) for age and as count (and percentage) for all other categorical variables. Usual bivariate parametric ( $\chi^2$  test or Fisher exact test) statistical tests were used for comparison between groups.

## **Appendices**

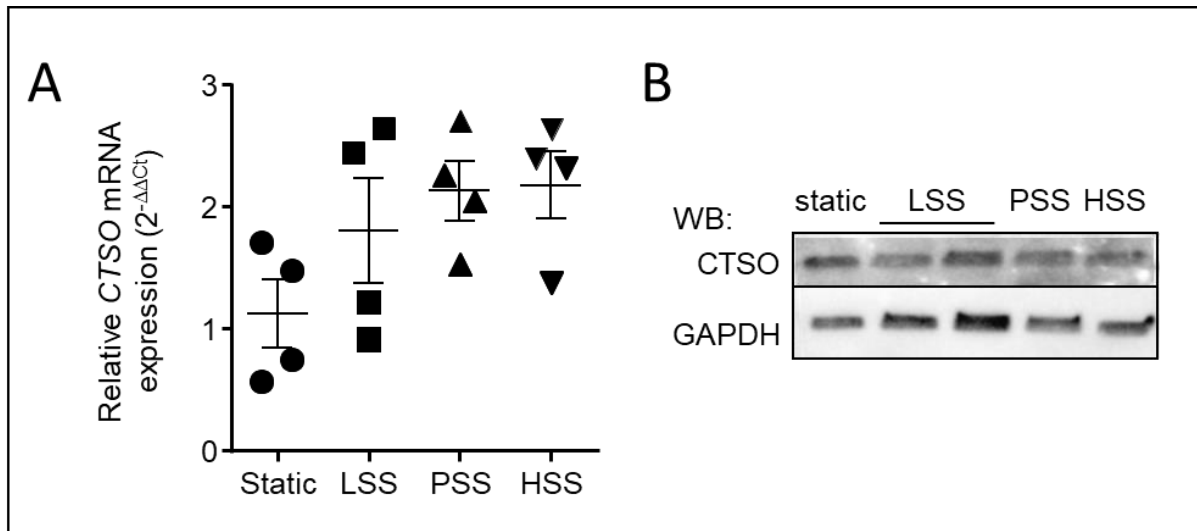
### **Consortia**

The ICAN Study Group includes the following investigators: Hubert Desal, Romain Bourcier, Benjamin Daumas-Duport, Bertrand Isidor, Jérôme Connault, Pierre Lebranchu, Thierry Le Tourneau, Marie Pierre Viarouge, Chrisanthi Papagiannaki, Michel Piotin, Hocine Redjem, Mikael Mazighi, Jean Philippe Desilles, Olivier Naggara, Christine Rodriguez, Waghi Ben Hassen, Suzanna Saleme, Charbel Mounayer, Olivier Levrier, Pierre Aguetaz, Xavier Combaz, Anne Pasco, Emeline Berthier, Marc Bintner, Marc Molho, Pascale Gauthier, Cyril Chivot, Vincent Costalat, Cyril Darganzil, Alain Bonafé, Anne Christine Januel, Caterina Michelozzi, Christophe Cognard, Fabrice Bonneville, Philippe Tall, Jean Darcourt, Alessandra Biondi, Cristina Iosif, Elisa Pomerio, Jean Christophe Ferre, Jean Yves Gauvrit, François Eugene, Hélène Raoult, Jean Christophe Gentric, Julien Ognard, René Anxionnat, Serge Bracard, Anne Laure Derelle, Romain Tonnelet, Laurent Spelle, Léon Ikka, Aymeric Rouchaud, Augustin Ozanne, Gildaz Caroff, Nidal Ben Achour, Jacques Moret, Emmanuel Chabert, Jérôme Berge, Guillaume Marnat, Xavier Barreau, Florent Gariel, Frédéric Clarencon, Mohammed Aggour, Frédéric Ricolfi, Adrien Chavent, Pierre Thoant, Brivael Lemogne, Denis Herbreteau, Richard Bibi, Anna Paula Narata, Pedro Lebedenski, Laurent Pierot, Sébastien Soize, Marc Antoine Labeyrie, Christophe Vandendries, Emmanuel Houdart, Appoline Kazemi, Xavier Leclerc, Jean Pierre Pruvo, Sophie Gallas, Stéphane Velasco.

**Supplemental Materials**

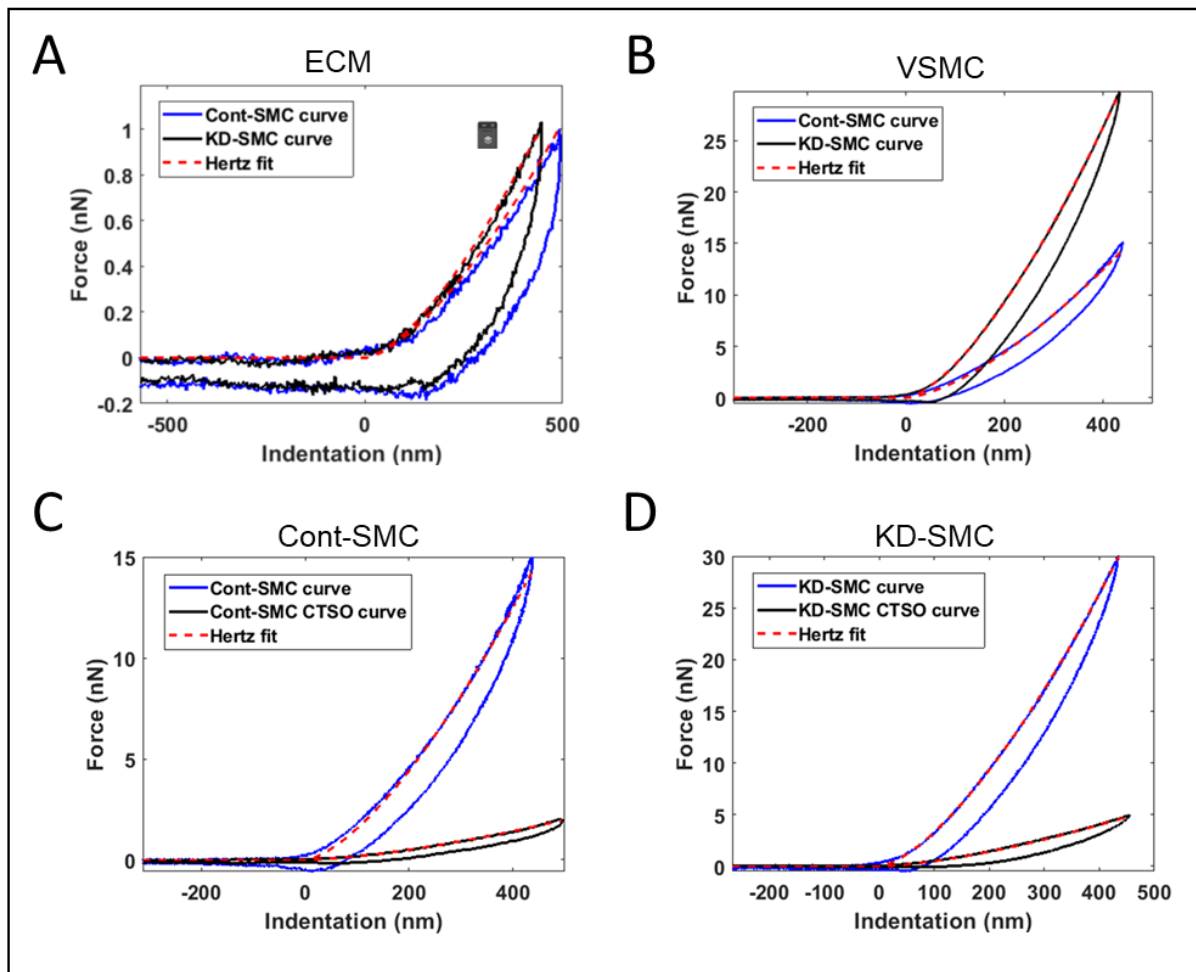
Figure S1 and S2

Table S1 and S2



**Figure S1** *CTSSO* mRNA and protein expression in endothelial cells

*CTSSO* mRNA expression analyzed by quantitative RT-PCR in HUVEC under static condition and under flow generating low (LSS, 3 dyn/cm<sup>2</sup>), physiological (PSS, 16 dyn/cm<sup>2</sup>) and very high (HSS, 36 dyn/cm<sup>2</sup>) shear stress. Means ± SEM are shown. **B** Representative Western blots showing the expression of *CTSSO* in HUVEC under static condition and under flow (LSS, PSS and HSS). Tubulin was also blotted to check equal loading.



**Figure S2 Analysis of VSMC and ECM by atomic force microscopy**

**A** Representative force-indentation curves of decellularized ECM produced by Cont-SMC (blue) and KD-SMC (black). **B** Representative experimental approach-retract force-indentation curves performed on the cytoplasmic region of Cont-SMC (blue) and KD-SMC (black). **C** and **D** Representative experimental approach-retract force-indentation curves performed on the cytoplasmic region of Cont-SMC (**C**) and KD-SMC (**D**) in the absence (blue) and in the presence (black) of CTSO (200 ng/mL added 24 h prior to AFM experiments). The red curves correspond to the Hertz model fit of the approach curve to determine the apparent elastic modulus.



**Supplemental tables**

Filtering Step	Flagged Variants			Threshold
	II:9	III:4	III:2	
Raw data	38939	45611	44131	
Depth	6744	12803	11380	>20X
MQRS	10432	13988	13363	∈[-2.5,2.5]
MQ	5270	6563	6224	>59
Mappability	4819	6340	6135	=1
SOR	2938	3519	3389	<3
GQ	902	1156	1273	>90
LCR	787	1214	1216	
QD	366	460	444	>2
FS	113	146	168	<60
GR	7	10	5	>0.95

**Table S1 Quality filtering of variants found across WES data in individuals II:9, III:2 and III:4.** Abbreviations: MQRS – mapping quality rank sum; MQ – mapping quality; SOR – strand odd ratio; GQ – genotyping quality; LCR – low complexity regions; QD – quality by depth; FS – Fisher strand; GR – Genotyping Rate

Target gene	Forward primer (5'-3' sequence)	Reverse primer (5'-3' sequence)
<i>Gapdh</i>	AACCCATCACCATCTTCCAG	CCAGTAGACTCCACGACATAC
<i>Ctso</i>	CCAGATACCCAGCAAAGGA'	ATCGCACCGCTGACTCTACT
<i>Acta2</i>	ACGCGAAGCTCGTTATAGAAG	GACCCTGAAGTATCCGATAGAAC
<i>Cnn1</i>	GATCCACTCTCTCAGCTCCT	CTTCCGCACACTTTAACCGA
<i>Myh11</i>	CTTTCCAGCTCCAGACTCAC	CGCCTCACATCTATGCCATT
<i>Tagln</i>	GCTCCTCATCATACTTCTTCTCA	AACGCTACTCTCCTTCCAG
<i>Bmp4</i>	ATAAAACGACCATCAGCATTTCG	GCCTTTCCAGCAAGTTTGTTTC
<i>Fn1</i>	CGAGGTGACAGAGACCACAA	CTGGAGTCAAGCCAGACACA
<i>Col1a</i>	TACAGCACGCTTGTGGATGG	CAGATTGGGATGGAGGGAGTT

**Table S2 Sequence of qRT-PCR primers**



# *CONCLUSION – DISCUSSION*



## I. Conclusion

L'AIC, pathologie silencieuse, est présent chez 3% de la population et reste un problème de santé publique majeur<sup>6</sup>. La rupture d'AIC entraîne des effets, le plus souvent, dévastateurs chez les survivants avec des séquelles nécessitant une prise en charge lourde. Le système de santé bénéficierait donc fortement d'une réduction de l'incidence de l'AIC et d'une amélioration de sa prise en charge.

Aujourd'hui, il est impossible d'anticiper, ni la formation d'un AIC, ni sa rupture. La recherche clinique actuelle s'oriente donc vers le développement de nouveaux outils permettant de déterminer quel patient développera, un jour, un AIC afin de potentiellement enrayer son développement. Une fois l'AIC formé, il serait également intéressant d'obtenir des outils qui permettraient, sans risque pour le patient et facile d'usage, de faire régresser l'AIC ou bien de le stabiliser pour en empêcher l'évolution vers la rupture.

Pour développer ces outils, la compréhension des mécanismes physiopathologiques à l'origine de l'AIC doit être améliorée. En effet, cela permettra d'identifier des voies impliquées dans la genèse des AIC et ainsi cibler des protéines ou des molécules pouvant être modulées pharmacologiquement ou être utilisées comme biomarqueurs. Une des stratégies possibles pour mieux comprendre ces mécanismes est la recherche de variants génétiques associés à la pathologie<sup>132</sup>. Les approches populationnelles permettent d'identifier des variants fréquents, mais qui ont des effets faibles sur la pathologie (Figure 14). Les approches familiales permettent, quant à elles, d'identifier des variants génétiques rares ayant un effet sur la pathologie et éclairant des voies de signalisation cellulaire possiblement en action dans la formation de l'AIC ou dans sa rupture. Pour être pertinente et utile, cette identification de variants rares doit être associée à des études fonctionnelles afin de déterminer la manière dont ces variants contribuent ou non à la pathologie. Cela pourrait permettre de mettre en lumière des mécanismes sur lesquels reposeront les outils diagnostiques et les traitements pharmacologiques de demain.

C'est ce que j'ai cherché à faire durant mon doctorat au travers des deux projets que j'ai menés. Le premier concernant ANGPTL6, avait pour but de caractériser les artères cérébrales des souris *Angptl6*-KI et d'identifier le rôle d'ANGPTL6 dans les cellules de la paroi artérielle.

J'ai réalisé ce travail, que j'avais démarré en master, conjointement avec plusieurs membres de mon équipe.

Grâce à notre modèle murin, nous avons pu mettre en évidence, à l'état basal, une dysfonction endothéliale, une compliance pariétale accrue et des déformations au niveau des bifurcations des artères cérébrales chez les souris mutantes. En challengeant les souris à des protocoles d'HTA ou d'induction d'AIC, nous avons exacerbé ces modifications de la paroi. La présence de la mutation, à elle seule, entraîne bien des changements de la paroi des artères cérébrales. Cependant, la présence de facteurs environnementaux, tels que l'HTA, semble être requise pour développer des anomalies menant à la formation d'AIC.

Nous avons également mis en évidence un défaut de couverture en CMLV au cours de l'angiogenèse développementale. Aujourd'hui, nous n'avons pas identifié clairement l'effet de ce défaut sur la fonction vasculaire ou sur le développement des AIC dans notre modèle. Cependant, il est possible que ce défaut développemental puisse, même s'il est minime, avoir des répercussions seulement lors du vieillissement. En effet, un défaut d'angiogenèse peut entraîner une faiblesse de la paroi artérielle et un défaut d'intégrité de celle-ci à l'âge adulte, créant, en y ajoutant des facteurs de risque environnementaux, tels que l'HTA ou le vieillissement vasculaire, un terrain propice pour la formation d'AIC<sup>260</sup>. Ainsi, par des phénomènes d'adaptation, le tissu jeune va pouvoir dans un premier temps compenser un défaut dans la structuration de l'arbre vasculaire mais perdre cette capacité d'adaptation en cas d'agression répétée (comme une HTA ou un tabagisme) ou lors du vieillissement<sup>261,262</sup>.

Fort de ces observations *in vivo* sur la rétine, nous avons exploré *in vitro* les rôles possibles d'ANGPTL6 sur les CMLV. Nous avons mis en évidence qu'ANGPTL6 favorisait l'adhésion des CMLV, suggérant que cette protéine agit sur des récepteurs membranaires tels que des intégrines comme cela a précédemment été montré concernant des cellules cancéreuses<sup>210</sup>. Il serait important d'aller identifier quels partenaires ANGPTL6 pourraient avoir au niveau des CMLV. De par la présence du motif RGD dans sa séquence, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une interaction avec les intégrines  $\alpha 5$  ou  $\alpha v$ <sup>263</sup>. D'après nos résultats, ANGPTL6 aurait également un rôle dans la capacité contractile des CMLV. Notre hypothèse se dirigerait donc, là aussi, vers la liaison à un récepteur membranaire qui favoriserait cette contraction.

Pour mon deuxième projet, qui était le sujet principal de mon doctorat, je me suis concentrée sur l'étude du rôle de CTSO et de ses variants.

Nous avons dans un premier temps quantifié son expression dans deux modèles de rat, spontanément hypertendus et spontanément hypertendus avec hémorragies intracrâniennes en comparaison à des rats normotendus<sup>264</sup>. Pour cela nous avons tiré profit d'expériences réalisées pour un autre projet de l'équipe<sup>265</sup>. En utilisant ces données, nous n'avons pas pu mettre en évidence de modification de l'expression de CTSO. Ces modèles de rat ont l'avantage de présenter des modifications des contraintes hémodynamiques sur la paroi vasculaire sans traitement pharmacologique ou chirurgical. Pour autant, ils ne récapitulent pas l'AIC. Premièrement, les hémorragies observées sont des hémorragies des petits vaisseaux, pathologie très différente de l'AIC. Deuxièmement, lorsque nous avons regardé l'ensemble de nos données de séquençage, nous avons constaté que l'expression des transcrits des cathepsines K et S n'était pas augmentée dans le tissu vasculaire cérébral alors qu'elle l'est dans un modèle chirurgical d'AIC<sup>244</sup>. Nous pouvons donc conclure grâce à ces modèles que l'expression du transcrit de CTSO dans les artères cérébrales n'est pas dépendante des variations hémodynamiques mais nous ne pouvons pas exclure une modulation de son expression au sein de la paroi anévrismale. Ces observations recourent d'ailleurs nos résultats *in vitro*, où l'expression de CTSO n'était ni influencée par le niveau des contraintes de cisaillement ni par le degré d'étirement cyclique. Bien que les niveaux d'expression ne soient pas modulés, nous avons pu mettre en évidence que l'étirement modifiait la sécrétion de CTSO par les CMLV, la protéine étant sécrétée de façon plus importante sous étirement qu'en condition statique. Cet effet de l'étirement sur CTSO n'est pas surprenant. En effet, la sécrétion de nombreuses protéines est dépendante de l'étirement comme par exemple MMP2 ou TGF- $\beta$ <sup>266</sup>. Nous avons alors fait l'hypothèse que CTSO possédait une activité extracellulaire, comme c'est le cas pour d'autres cathepsines<sup>233</sup>.

Nos résultats *in vitro* ont, de plus, montré que CTSO régule négativement l'adhésion des CMLV sur une matrice de fibronectine et favorise leur migration, sans modifier leur prolifération et leur apoptose. Associée à cela, la quantité protéique de fibronectine est plus importante dans les cultures de cellules déficientes en CTSO alors que l'expression de son transcrit reste inchangée. CTSO étant une protéase, ces données suggèrent que CTSO pourrait participer à la dégradation de la fibronectine, rôle qu'elle pourrait exercer lorsqu'elle est sécrétée

notamment suite à un étirement pathologique qui est la condition où nous avons vu une augmentation de sécrétion.

Par microscopie à force atomique, nous avons également montré une rigidité plus importante des CMLV *Ctso*-KD par rapport aux CMLV contrôles, allant là aussi dans le sens d'une présence de fibronectine plus importante dans la matrice<sup>267</sup>. En effet, une présence en plus grande quantité de fibronectine au sein de la MEC entraîne une augmentation de la polymérisation de l'actine par sa liaison aux intégrines<sup>268</sup>. Cette modification du cytosquelette, bien que non visible par simple marquage fluorescent, pourrait entraîner l'augmentation de la rigidité cellulaire observée par force atomique lorsque CTSO est réprimé. Nous pourrions donc émettre l'hypothèse que, l'absence de CTSO entraînerait un défaut d'homéostasie de la MEC qui, par diminution de sa dégradation, contiendrait une quantité trop importante de fibronectine par rapport à une situation physiologique. Cette surexpression activerait alors des voies intracellulaires, notamment via une liaison avec les intégrines, qui, *in fine*, augmenteraient le nombre de fibres de stress d'actine. Le rôle de CTSO serait donc de contribuer au maintien de la balance production / dégradation de la fibronectine.

Nous pouvons également supposer que CTSO puisse cliver les intégrines, comme le font d'autres cathepsines, telles que la cathepsine X par exemple<sup>234</sup>. Par contre, contrairement à la cathepsine X qui clive l'intégrine  $\beta 2$  afin de l'activer, nous pourrions envisager que CTSO hydrolyserait des intégrines afin de les dégrader, ce qui pourrait expliquer la vitesse d'adhésion plus rapide des CMLV en l'absence de CTSO<sup>269</sup>. Nous n'avons, à l'heure actuelle aucun élément permettant de valider ou d'invalider de manière définitive ces hypothèses et mon équipe travaille à y répondre. La fibronectine est plutôt décrite dans la littérature pour moduler le phénotype des CMLV vers un phénotype sécrétant<sup>270</sup>. Cependant, nous avons constaté que les CMLV *Ctso*-KD affichent un phénotype pro-contractile alors que nous supposons qu'elles sont exposées à plus de fibronectine extracellulaire. Dans le même temps, nos analyses fonctionnelles de la contraction nous montrent que, *in vitro*, les CMLV *Ctso*-KD présentent une capacité contractile réduite par rapport aux cellules contrôles. L'expression augmentée des marqueurs contractiles dans les CMLV *Ctso*-KD pourrait résulter d'un rétrocontrôle négatif où la CMLV, en réexprimant ces gènes pro-contractiles, tenterait de prévenir son défaut de capacité contractile<sup>257</sup>.



*In silico* les variants rares identifiés chez les patients, p.Ala43Val-CTSO et p.Val316Ile-CTSO, sont tous deux décrits comme probablement dommageables. Ainsi nous avons fait l'hypothèse que l'expression de ces variants pourrait conduire à un phénotype similaire à la délétion de CTSS. Nos données *in vitro* obtenues, grâce à la surexpression de ces variants, semblent confirmer cette hypothèse et les prédictions *in silico*. En effet, lors de la surexpression des mutants de CTSS, nous avons retrouvé une quantité plus importante de fibronectine dans les cultures cellulaires en comparaison au cultures exprimant la forme sauvage.

Dans ce même modèle, nous avons pu mettre en évidence que les mutants de CTSS étaient moins sécrétés que la forme sauvage. L'effet retrouvé sur la fibronectine dans les cellules surexprimant les formes mutées de CTSS pourrait donc également être dû à une diminution de la présence péricellulaire de la protéase. Actuellement nous ne savons pas si les formes mutées de CTSS sont toujours fonctionnelles en intracellulaire, si tel était le cas, cela confirmerait que l'effet sur la fibronectine est bien dû à la forme sécrétée de CTSS.

Toutefois, il est fort probable que ces mutants aient aussi un effet intracellulaire. En effet, ils touchent pour l'un un acide aminé du propeptide et pour l'autre de la chaîne active peuvent également directement altérer la fonction de la protéase. La mutation p.Ala43Val étant située sur la partie qui doit être clivée afin de rendre l'enzyme active, un encombrement stérique peut affecter ce clivage. Concernant p.Val316Ile-CTSS, la mutation est située après les trois acides aminés composant le site actif et pourrait également entraîner une mauvaise conformation de la protéine et ainsi affecter son activité protéasique<sup>247</sup>.

## II. Discussion générale

Les patients porteurs du variant p.Val316Ile-CTSO et d'AIC sont très majoritairement des femmes (85%). Ces femmes présentent également des facteurs de risque environnementaux, en particulier une HTA et/ou du tabagisme actif, ce qui rappelle les caractéristiques cliniques de la famille porteuse du variant rare d'ANGPTL6. Les patients porteurs du variant p.Ala43Val-CTSO et d'AIC sont, par contre, soit des femmes sans autre facteur de risque (en tout cas pour ceux rapportés), soit des hommes fumeurs. Ces données cliniques permettent de mettre en lumière que suivant le type de variant génétique prédisposant, les facteurs de risque associés conduisant à la formation de l'AIC diffèrent. Plus l'effet du variant seul sera fort, moins le patient ne présentera de facteurs de risques associés. Par exemple, concernant le variant p.Ala43Val-CTSO, seulement un facteur de risque (soit le sexe féminin, soit la consommation de tabac) est présent chez les patients porteurs du variant et d'AIC. De plus, dans cette famille nous n'avons pas détecté de membre porteur sain, ce qui suggère un effet fort du variant. Par contre, les patients porteurs du variant p.Val316Ile-CTSO atteints d'AIC présentent deux facteurs de risques supplémentaires : le sexe féminin, combiné soit à une HTA, soit au tabagisme. De surcroît, les porteurs sains de ce variant sont surtout des hommes fumeurs mais sans HTA. En permanence, nous devons garder ces données cliniques en tête, comme lorsque des GWAS répertorient les caractéristiques associées aux polymorphismes identifiés comme par exemple la présence de maladie coronarienne, d'anévrisme de l'aorte abdominale, etc...<sup>144</sup>. En effet, ces données peuvent nous donner des pistes sur les analyses fonctionnelles à réaliser lors de la caractérisation des variants.

Mis en évidence également grâce à des variants rares identifiés par séquençage d'exome dans des formes familiales d'AIC, les gènes *THSD1*, *ADAMTS15*, *EDIL3*<sup>169</sup> codent pour des protéines qui jouent un rôle au niveau des points focaux d'adhésion. Dans nos travaux, nous émettons aussi l'hypothèse d'une interaction entre ANGPTL6 et certaines intégrines. De la même façon nous supposons que CTSSO, soit en dégradant les intégrines, soit par une action indirecte via la MEC, pourrait réguler indirectement leur activation. Il est à noter que les données fonctionnelles concernant *THSD1* et *ADAMTS15* ont été recueillies à partir d'expérimentations sur les cellules endothéliales<sup>158,161</sup>. Plus que le rôle d'un type cellulaire en particulier, on pourrait ici mettre en avant que la notion d'adhésion des cellules vasculaires en général, et donc indirectement de cohérence du tissu vasculaire, semble un élément clé

dans la survenue de l'AIC. Les intégrines sont utiles à la structure de la paroi artérielle en permettant aux CMLV d'interagir de manière forte avec la MEC. En effet, les intégrines sont des protéines transmembranaires essentielles pour de nombreux processus nécessitant la migration et l'adhésion cellulaire comme par exemple, l'angiogenèse<sup>271</sup>.

Concernant mes travaux de thèse, les observations mettent en évidence des modifications dans l'adhésion et la migration des CMLV. L'adhésion des CMLV est favorisée d'une part, par la présence d'ANGPTL6 et d'autre part, par l'absence de CTSO. Ce phénomène pourrait éventuellement être dû à une action soit directe soit indirecte des deux protéines étudiées sur les intégrines. Par sa présence, ANGPTL6 pourrait se lier aux intégrines et l'activer et ainsi promouvoir l'adhésion cellulaire, comme c'est le cas pour d'autres angiopoïétines-like<sup>186,187</sup>. Dans le cas de CTSO, son absence pourrait entraîner deux phénomènes. Un défaut de dégradation d'un ligand des intégrines, potentiellement un composant de la MEC, qui se retrouverait alors en plus grande quantité et qui, *in fine*, favoriserait l'adhésion cellulaire. Une autre possibilité serait un défaut de dégradation d'un type d'intégrine, ce qui pourrait entraîner sa surexpression à la membrane et contribuerait à favoriser l'adhésion cellulaire de cette manière. Le mécanisme impliqué pourrait se rapprocher de celui étudié par l'équipe ayant identifié le variant génétique d'*ADAMTS15*<sup>158</sup>. En effet, les auteurs ont montré que la perte de fonction d'*ADAMTS15*, ayant un rôle de régulation négative de l'expression des intégrines<sup>172</sup>, pourrait conduire à une migration endothéliale trop importante, ce qui mènerait à la formation des AIC<sup>158</sup>. Cet effet pourrait également être retrouvé dans les CMLV et être tout aussi délétère, puisque lors de la formation de l'AIC, la migration des CMLV contribue à l'hyperplasie myointimale<sup>41</sup>. Les intégrines étant importantes pour la mécanosensibilité des cellules de la paroi vasculaire, un défaut de leur activation pourrait engendrer une réponse anormale de la paroi à un changement des contraintes hémodynamiques et ainsi provoquer la formation d'un AIC<sup>272</sup>.

La présence des variants étudiés dans nos travaux pourrait entraîner un défaut d'ancrage des CMLV à la MEC. En effet, si ANGPTL6 est absent de la matrice, du fait de sa non-sécrétion, la liaison des CMLV à la MEC serait, d'après nos résultats, plus faible. De même, la présence des variants de CTSO entraînerait une modification de la composition de la MEC ce qui modulerait l'attachement de CMLV à celle-ci mais également leur phénotype.

Ces hypothèses ne sont pas exclusives et tous ces phénomènes pourraient se surimposer. Ainsi, ce défaut d'ancrage cellulaire pouvant entraîner une faiblesse pariétale et/ou la modulation du phénotype des CMLV pourraient mener à une mauvaise adaptation de la paroi à des modifications des contraintes hémodynamiques.

De manière générale, ces travaux ont permis de mettre en évidence que le rôle des CMLV et celui de la MEC sont cruciaux dans la formation des AIC. CTSO pourrait modifier la composition de la MEC et donc induire des changements sur différents types cellulaires de la paroi artérielle, notamment les CMLV. ANGPTL6 pourrait induire directement des changements sur ce type cellulaire en agissant sur des récepteurs membranaires, comme exposé dans nos hypothèses.

Ces travaux mettent également en lumière un rôle potentiel d'une protéine de la MEC, la fibronectine dans la formation des AIC. Cette glycoprotéine extracellulaire n'est pas très étudiée dans l'AIC. En effet, lorsque le lien est fait entre MEC et AIC, les études portent plutôt sur le rôle du collagène<sup>273</sup>. Il reste donc encore des mécanismes à investiguer afin d'établir le lien entre la fibronectine et les AIC. Une fois ce rôle établi, il pourrait être intéressant d'utiliser la fibronectine comme élément de radio-traçage, afin de potentiellement anticiper les zones à risque de formation et/ou les AIC déjà en place à risque de rupture. En effet, en oncologie, la fibronectine est déjà utilisée comme un biomarqueur de métastases par imagerie par résonance magnétique<sup>274,275</sup>. De la même façon que l'évolution des AIC pourrait être prédite en évaluant la prise de contraste de la paroi après injection de gadolinium<sup>28</sup>, un changement dans la composition de la MEC des cellules de la paroi artérielle pourrait éventuellement être observé grâce à un agent de contraste ciblant la fibronectine.

Le défi actuel reste d'identifier des outils diagnostiques et préventifs contre la rupture d'AIC. D'après nos travaux, des molécules pharmacologiques mimant le rôle de CTSO ou d'ANGPTL6 pourraient éventuellement être bénéfiques pour des patients dont le risque de développer un AIC est élevé, c'est-à-dire qui présentent plusieurs facteurs de risque, notamment le sexe féminin, les antécédents familiaux et l'HTA.

# *REFERENCES*



1. Bourcier R, Chatel S, Bourcereau E, et al. Understanding the Pathophysiology of Intracranial Aneurysm: The ICAN Project. *Neurosurgery*. 2017;80(4):621. doi:10.1093/neuros/nyw135
2. L'Allinec V, Chatel S, Karakachoff M, et al. Prediction of Unruptured Intracranial Aneurysm Evolution: The UCAN Project. *Neurosurgery*. Published online May 6, 2020. doi:10.1093/neuros/nyaa093
3. Williams LN, Brown RD. Management of unruptured intracranial aneurysms. *Clin Pract*. Published online 2013:10.
4. Wiebers DO. Unruptured intracranial aneurysms: natural history, clinical outcome, and risks of surgical and endovascular treatment. *The Lancet*. 2003;362(9378):103-110. doi:10.1016/S0140-6736(03)13860-3
5. Rousseau O, Karakachoff M, Gaignard A, et al. Location of intracranial aneurysms is the main factor associated with rupture in the ICAN population. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2021;92(2):122-128. doi:10.1136/jnnp-2020-324371
6. Vlak MH, Algra A, Brandenburg R, Rinkel GJ. Prevalence of unruptured intracranial aneurysms, with emphasis on sex, age, comorbidity, country, and time period: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2011;10(7):626-636. doi:10.1016/S1474-4422(11)70109-0
7. Brown RD, Broderick JP. Unruptured intracranial aneurysms: epidemiology, natural history, management options, and familial screening. *Lancet Neurol*. 2014;13(4):393-404. doi:10.1016/S1474-4422(14)70015-8
8. Etminan N, Brown RD, Beseoglu K, et al. The unruptured intracranial aneurysm treatment score: A multidisciplinary consensus. *Neurology*. 2015;85(10):881-889. doi:10.1212/WNL.0000000000001891
9. Frösen J, Tulamo R, Paetau A, et al. Saccular intracranial aneurysm: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2012;123(6):773-786. doi:10.1007/s00401-011-0939-3
10. Ruigrok YM, Buskens E, Rinkel GJE. Attributable Risk of Common and Rare Determinants of Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke*. 2001;32(5):1173-1175. doi:10.1161/01.STR.32.5.1173
11. Mackey J, Brown RD, Moomaw CJ, et al. Unruptured intracranial aneurysms in the Familial Intracranial Aneurysm and International Study of Unruptured Intracranial Aneurysms cohorts: differences in multiplicity and location: Clinical article. *J Neurosurg*. 2012;117(1):60-64. doi:10.3171/2012.4.JNS111822
12. Eker OF, Lubicz B, Cortese M, et al. Effects of the flow diversion technique on nucleotide levels in intracranial aneurysms: A feasibility study providing new research perspectives. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9. Accessed September 14, 2022. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2022.885426>
13. Li W, Xiao Z, Zhao K, et al. Efficacy of pipeline embolization device vs. traditional coils in embolization of intracranial aneurysms: A systematic review and meta-analysis. *Front Neurol*. 2022;13. Accessed November 13, 2022. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2022.978602>
14. Dholakia R, Sadasivan C, Fiorella DJ, Woo HH, Lieber BB. Hemodynamics of Flow Diverters. *J Biomech Eng*. 2017;139(2):021002. doi:10.1115/1.4034932
15. Karhunen V, Bakker MK, Ruigrok YM, Gill D, Larsson SC. Modifiable Risk Factors for Intracranial Aneurysm and Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Mendelian Randomization Study. *J Am Heart Assoc*. 2021;10(22):e022277. doi:10.1161/JAHA.121.022277
16. Ha SW, Choi PK, Oh JE, Park JS, Kang HG. Asymptomatic unruptured intracranial aneurysms in the older people. *Eur Geriatr Med*. 2019;10(1):119-127. doi:10.1007/s41999-018-0122-7
17. Chalouhi N, Ali MS, Starke RM, et al. Cigarette Smoke and Inflammation: Role in Cerebral Aneurysm Formation and Rupture. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:1-12. doi:10.1155/2012/271582

18. Morel S, Hostettler IC, Spinner GR, et al. Intracranial Aneurysm Classifier Using Phenotypic Factors: An International Pooled Analysis. *J Pers Med*. 2022;12(9):1410. doi:10.3390/jpm12091410
19. Inci S, Spetzler RF. Intracranial aneurysms and arterial hypertension: a review and hypothesis. *Surg Neurol*. 2000;53(6):530-542. doi:10.1016/S0090-3019(00)00244-5
20. Handa H, Hashimoto N, Nagata I, Hazama F. Saccular cerebral aneurysms in rats: a newly developed animal model of the disease. *Stroke*. 1983;14(6):857-866. doi:10.1161/01.STR.14.6.857
21. Kim Ch, Kikuchi H, Hashimoto N, Hazama F, Kataoka H. Establishment of the experimental conditions for inducing saccular cerebral aneurysms in primates with special reference to hypertension. *Acta Neurochir (Wien)*. 1989;96(3):132-136. doi:10.1007/BF01456172
22. Bourcier R, Lenoble C, Guyomarch-Delasalle B, et al. Is there an inherited anatomical conformation favoring aneurysmal formation of the anterior communicating artery? *J Neurosurg*. 2017;126(5):1598-1605. doi:10.3171/2016.4.JNS153032
23. Bourcier R, Redon R, Desal H. Genetic investigations on intracranial aneurysm: Update and perspectives. *J Neuroradiol*. 2015;42(2):67-71. doi:10.1016/j.neurad.2015.01.002
24. Rinkel GJE, Djibuti M, Algra A, van Gijn J. Prevalence and Risk of Rupture of Intracranial Aneurysms. *Stroke*. 1998;29(1):251-256. doi:10.1161/01.STR.29.1.251
25. Zanaty M, Daou B, Chalouhi N, Starke RM, Jabbour P, Hasan D. Evidence That a Subset of Aneurysms Less Than 7 mm Warrant Treatment. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(8):e003936. doi:10.1161/JAHA.116.003936
26. Brinjikji W, Zhu YQ, Lanzino G, et al. Risk Factors for Growth of Intracranial Aneurysms: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Neuroradiol*. 2016;37(4):615-620. doi:10.3174/ajnr.A4575
27. UCAS Japan Investigators, Morita A, Kirino T, et al. The natural course of unruptured cerebral aneurysms in a Japanese cohort. *N Engl J Med*. 2012;366(26):2474-2482. doi:10.1056/NEJMoa1113260
28. Edjlali M, Gentric JC, Régent-Rodriguez C, et al. Does Aneurysmal Wall Enhancement on Vessel Wall MRI Help to Distinguish Stable From Unstable Intracranial Aneurysms? *Stroke*. 2014;45(12):3704-3706. doi:10.1161/STROKEAHA.114.006626
29. Juvela S, Poussa K, Lehto H, Porras M. Natural History of Unruptured Intracranial Aneurysms. *Stroke*. 2013;44(9):2414-2421. doi:10.1161/STROKEAHA.113.001838
30. Vannemreddy P, Caldito G, Willis B, Nanda A. Influence of cocaine on ruptured intracranial aneurysms: a case control study of poor prognostic indicators. *J Neurosurg*. 2008;108(3):470-476. doi:10.3171/JNS/2008/108/3/0470
31. Chalouhi N, Hoh BL, Hasan D. Review of Cerebral Aneurysm Formation, Growth, and Rupture. *Stroke*. 2013;44(12):3613-3622. doi:10.1161/STROKEAHA.113.002390
32. Qian Z, Kang H, Tang K, et al. Assessment of Risk of Aneurysmal Rupture in Patients with Normotensives, Controlled Hypertension, and Uncontrolled Hypertension. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2016;25(7):1746-1752. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.03.027
33. Kubo Y, Koji T, Kashimura H, Otawara Y, Ogawa A, Ogasawara K. Female sex as a risk factor for the growth of asymptomatic unruptured cerebral saccular aneurysms in elderly patients: Clinical article. *J Neurosurg*. 2014;121(3):599-604. doi:10.3171/2014.5.JNS132048
34. Masuoka T, Hayashi N, Hori E, Kuwayama N, Ohtani O, Endo S. Distribution of internal elastic lamina and external elastic lamina in the internal carotid artery: possible relationship with atherosclerosis. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2010;50(3):179-182. doi:10.2176/nmc.50.179



35. Qin G, Wang L, Hua Y, et al. Comparative morphology of the internal elastic lamina of cerebral and peripheral arteries. *Int J Clin Exp Pathol*. 2020;13(4):764-770.
36. Yang W jie, Wong K sing, Chen X yan. Intracranial Atherosclerosis: From Microscopy to High-Resolution Magnetic Resonance Imaging. *J Stroke*. 2017;19(3):249-260. doi:10.5853/jos.2016.01956
37. Diabougua MR, Morel S, Bijlenga P, Kwak BR. Role of hemodynamics in initiation/growth of intracranial aneurysms. *Eur J Clin Invest*. 2018;48(9):e12992. doi:10.1111/eci.12992
38. Lauric A, Hippelheuser JE, Malek AM. Induction of aneurysmogenic high positive wall shear stress gradient by wide angle at cerebral bifurcations, independent of flow rate. *J Neurosurg*. 2018;131(2):442-452. doi:10.3171/2018.3.JNS173128
39. Bibli SI, Hu J, Leisegang MS, et al. Shear stress regulates cystathionine  $\gamma$  lyase expression to preserve endothelial redox balance and reduce membrane lipid peroxidation. *Redox Biol*. 2020;28:101379. doi:10.1016/j.redox.2019.101379
40. Alnaes MS, Isaksen J, Mardal KA, Romner B, Morgan MK, Ingebrigtsen T. Computation of hemodynamics in the circle of Willis. *Stroke*. 2007;38(9):2500-2505. doi:10.1161/STROKEAHA.107.482471
41. Tulamo R, Frösen J, Hernesniemi J, Niemelä M. Inflammatory changes in the aneurysm wall: a review. *J NeuroInterventional Surg*. 2018;10(Suppl 1):i58-i67. doi:10.1136/jnis.2009.002055.rep
42. Xu Z, Rui YN, Hagan JP, Kim DH. Intracranial Aneurysms: Pathology, Genetics, and Molecular Mechanisms. *NeuroMolecular Med*. 2019;21(4):325-343. doi:10.1007/s12017-019-08537-7
43. Frösen J, Joutel A. Smooth muscle cells of intracranial vessels: from development to disease. *Cardiovasc Res*. 2018;114(4):501-512. doi:10.1093/cvr/cvy002
44. Frösen J, Piippo A, Paetau A, et al. Remodeling of Saccular Cerebral Artery Aneurysm Wall Is Associated With Rupture: Histological Analysis of 24 Unruptured and 42 Ruptured Cases. *Stroke*. 2004;35(10):2287-2293. doi:10.1161/01.STR.0000140636.30204.da
45. Chalouhi N, Ali MS, Jabbour PM, et al. Biology of intracranial aneurysms: role of inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012;32(9):1659-1676. doi:10.1038/jcbfm.2012.84
46. Can A, Du R. Association of Hemodynamic Factors With Intracranial Aneurysm Formation and Rupture: Systematic Review and Meta-analysis. *Neurosurgery*. 2016;78(4):510-520. doi:10.1227/NEU.0000000000001083
47. Shojima M, Oshima M, Takagi K, et al. Magnitude and Role of Wall Shear Stress on Cerebral Aneurysm: Computational Fluid Dynamic Study of 20 Middle Cerebral Artery Aneurysms. *Stroke*. 2004;35(11):2500-2505. doi:10.1161/01.STR.0000144648.89172.0f
48. Meng H, Wang Z, Hoi Y, et al. Complex Hemodynamics at the Apex of an Arterial Bifurcation Induces Vascular Remodeling Resembling Cerebral Aneurysm Initiation. *Stroke*. 2007;38(6):1924-1931. doi:10.1161/STROKEAHA.106.481234
49. Szymanski MP, Metaxa E, Meng H, Kolega J. Endothelial Cell Layer Subjected to Impinging Flow Mimicking the Apex of an Arterial Bifurcation. *Ann Biomed Eng*. 2008;36(10):1681. doi:10.1007/s10439-008-9540-x
50. Kataoka H, Yagi T, Ikeda T, et al. Hemodynamic and Histopathological Changes in the Early Phase of the Development of an Intracranial Aneurysm. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2020;60(7):319-328. doi:10.2176/nmc.st.2020-0072
51. Tanaka K, Joshi D, Timalisina S, Schwartz MA. Early events in endothelial flow sensing. *Cytoskeleton*. 2021;78(6):217-231. doi:10.1002/cm.21652

52. Vion AC, Alt S, Klaus-Bergmann A, et al. Primary cilia sensitize endothelial cells to BMP and prevent excessive vascular regression. *J Cell Biol.* 2018;217(5):1651-1665. doi:10.1083/jcb.201706151
53. Humphrey JD, Schwartz MA, Tellides G, Milewicz DM. Role of Mechanotransduction in Vascular Biology: Focus on Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections. *Circ Res.* 2015;116(8):1448-1461. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.304936
54. Mangana C, Lorigo M, Cairrao E. Implications of Endothelial Cell-Mediated Dysfunctions in Vasomotor Tone Regulation. *Biologics.* 2021;1(2):231-251. doi:10.3390/biologics1020015
55. Chiu JJ, Chien S. Effects of Disturbed Flow on Vascular Endothelium: Pathophysiological Basis and Clinical Perspectives. *Physiol Rev.* 2011;91(1):327-387. doi:10.1152/physrev.00047.2009
56. Wu X, Zhang JZ, Yang PF, Huang QH, Liu JM. Regulation of Kruppel-like factor 2 (KLF2) in the pathogenesis of intracranial aneurysm induced by hemodynamics. *Am J Transl Res.* 2017;9(12):5452-5460.
57. Boon RA, Leyen TA, Fontijn RD, et al. KLF2-induced actin shear fibers control both alignment to flow and JNK signaling in vascular endothelium. *Blood.* 2010;115(12):2533-2542. doi:10.1182/blood-2009-06-228726
58. Sheinberg DL, McCarthy DJ, Elwardany O, et al. Endothelial dysfunction in cerebral aneurysms. *Neurosurg Focus.* 2019;47(1):E3. doi:10.3171/2019.4.FOCUS19221
59. Guo D, Chien S, Shyy JYJ. Regulation of Endothelial Cell Cycle by Laminar Versus Oscillatory Flow. *Circ Res.* 2007;100(4):564-571. doi:10.1161/01.RES.0000259561.23876.c5
60. Cerutti C, Ridley AJ. Endothelial cell-cell adhesion and signaling. *Exp Cell Res.* 2017;358(1):31-38. doi:10.1016/j.yexcr.2017.06.003
61. Goodenough DA, Paul DL. Gap Junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(1):a002576. doi:10.1101/cshperspect.a002576
62. Ashby JW, Mack JJ. Endothelial Control of Cerebral Blood Flow. *Am J Pathol.* 2021;191(11):1906-1916. doi:10.1016/j.ajpath.2021.02.023
63. Chang SJ, Chen YC, Yang CH, et al. Revealing the three dimensional architecture of focal adhesion components to explain Ca<sup>2+</sup>-mediated turnover of focal adhesions. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 2017;1861(3):624-635. doi:10.1016/j.bbagen.2017.01.002
64. Iida A, Wang Z, Hirata H, Sehara-Fujisawa A. Integrin  $\beta$ 1 activity is required for cardiovascular formation in zebrafish. *Genes Cells.* 2018;23(11):938-951. doi:10.1111/gtc.12641
65. Harburger DS, Calderwood DA. Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci.* 2009;122(2):159-163. doi:10.1242/jcs.018093
66. Deakin NO, Turner CE. Paxillin comes of age. *J Cell Sci.* 2008;121(15):2435-2444. doi:10.1242/jcs.018044
67. Aoki T, Frösen J, Fukuda M, et al. Prostaglandin E<sub>2</sub>-EP2-NF- $\kappa$ B signaling in macrophages as a potential therapeutic target for intracranial aneurysms. *Sci Signal.* 2017;10(465):eaah6037. doi:10.1126/scisignal.aah6037
68. Tada Y, Yagi K, Kitazato KT, et al. Reduction of endothelial tight junction proteins is related to cerebral aneurysm formation in rats. *J Hypertens.* 2010;28(9):1883-1891. doi:10.1097/HJH;0b013e32833c2273
69. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Effects of shear stress on endothelial cells: go with the flow. *Acta Physiol.* 2017;219(2):382-408. doi:10.1111/apha.12725

70. Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev.* 1995;75(3):487-517. doi:10.1152/physrev.1995.75.3.487
71. Lacolley P, Regnault V, Segers P, Laurent S. Vascular Smooth Muscle Cells and Arterial Stiffening: Relevance in Development, Aging, and Disease. *Physiol Rev.* 2017;97(4):1555-1617. doi:10.1152/physrev.00003.2017
72. Li S, Van Den Diepstraten C, D'Souza SJ, Chan BMC, Pickering JG. Vascular Smooth Muscle Cells Orchestrate the Assembly of Type I Collagen via  $\alpha 2\beta 1$  Integrin, RhoA, and Fibronectin Polymerization. *Am J Pathol.* 2003;163(3):1045-1056.
73. Zhong C, Chrzanowska-Wodnicka M, Brown J, Shaub A, Belkin AM, Burridge K. Rho-mediated contractility exposes a cryptic site in fibronectin and induces fibronectin matrix assembly. *J Cell Biol.* 1998;141(2):539-551. doi:10.1083/jcb.141.2.539
74. Zhang M, Ren Y, Wang Y, et al. Regulation of Smooth Muscle Contractility by Competing Endogenous mRNAs in Intracranial Aneurysms. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2015;74(5):411-424. doi:10.1097/NEN.0000000000000185
75. Nakajima N, Nagahiro S, Sano T, Satomi J, Satoh K. Phenotypic modulation of smooth muscle cells in human cerebral aneurysmal walls. *Acta Neuropathol (Berl).* 2000;100(5):475-480. doi:10.1007/s004010000220
76. Pera J, Korostynski M, Krzyzskowski T, et al. Gene Expression Profiles in Human Ruptured and Unruptured Intracranial Aneurysms: What Is the Role of Inflammation? *Stroke.* 2010;41(2):224-231. doi:10.1161/STROKEAHA.109.562009
77. Starke RM, Chalouhi N, Ding D, et al. Vascular Smooth Muscle Cells in Cerebral Aneurysm Pathogenesis. *Transl Stroke Res.* 2014;5(3):338-346. doi:10.1007/s12975-013-0290-1
78. Ali MS, Starke RM, Jabbour PM, et al. TNF- $\alpha$  induces phenotypic modulation in cerebral vascular smooth muscle cells: implications for cerebral aneurysm pathology. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* 2013;33(10):1564-1573. doi:10.1038/jcbfm.2013.109
79. Mandelbaum M, Kolega J, Dolan JM, Siddiqui AH, Meng H. A Critical Role for Proinflammatory Behavior of Smooth Muscle Cells in Hemodynamic Initiation of Intracranial Aneurysm. Yanagisawa H, ed. *PLoS ONE.* 2013;8(9):e74357. doi:10.1371/journal.pone.0074357
80. Aoki T, Kataoka H, Moriwaki T, Nozaki K, Hashimoto N. Role of TIMP-1 and TIMP-2 in the Progression of Cerebral Aneurysms. *Stroke.* 2007;38(8):2337-2345. doi:10.1161/STROKEAHA.107.481838
81. Moriwaki T, Takagi Y, Sadamasa N, Aoki T, Nozaki K, Hashimoto N. Impaired progression of cerebral aneurysms in interleukin-1beta-deficient mice. *Stroke.* 2006;37(3):900-905. doi:10.1161/01.str.0000204028.39783.d9
82. Starke RM, Thompson JW, Ali MS, et al. Cigarette Smoke Initiates Oxidative Stress-Induced Cellular Phenotypic Modulation Leading to Cerebral Aneurysm Pathogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38(3):610-621. doi:10.1161/ATVBAHA.117.310478
83. Jayaraman T. TNF-alpha;-mediated inflammation in cerebral aneurysms: A potential link to growth and rupture. *Vasc Health Risk Manag.* 2008;Volume 4:805-817. doi:10.2147/VHRM.S2700
84. Miyata T, Minami M, Kataoka H, et al. Osteoprotegerin Prevents Intracranial Aneurysm Progression by Promoting Collagen Biosynthesis and Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. *J Am Heart Assoc.* 2020;9(17):e015731. doi:10.1161/JAHA.119.015731
85. Cebra J, Ollikainen E, Chung BJ, et al. Flow Conditions in the Intracranial Aneurysm Lumen Are Associated with Inflammation and Degenerative Changes of the Aneurysm Wall. *Am J Neuroradiol.* 2017;38(1):119-126. doi:10.3174/ajnr.A4951

86. Chyatte D, Bruno G, Desai S, Todor DR. Inflammation and Intracranial Aneurysms. *Neurosurgery*. 1999;45(5):1137-1147. doi:10.1097/00006123-199911000-00024
87. Kataoka K, Taneda M, Asai T, Kinoshita A, Ito M, Kuroda R. Structural Fragility and Inflammatory Response of Ruptured Cerebral Aneurysms: A Comparative Study Between Ruptured and Unruptured Cerebral Aneurysms. *Stroke*. 1999;30(7):1396-1401. doi:10.1161/01.STR.30.7.1396
88. Kanematsu Y, Kanematsu M, Kurihara C, et al. Critical Roles of Macrophages in the Formation of Intracranial Aneurysm. *Stroke*. 2011;42(1):173-178. doi:10.1161/STROKEAHA.110.590976
89. Aoki T, Kataoka H, Ishibashi R, Nozaki K, Egashira K, Hashimoto N. Impact of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Deficiency on Cerebral Aneurysm Formation. *Stroke*. 2009;40(3):942-951. doi:10.1161/STROKEAHA.108.532556
90. Miyamoto T, Kung DK, Kitazato KT, et al. Site-specific elevation of interleukin-1 $\beta$  and matrix metalloproteinase-9 in the Willis circle by hemodynamic changes is associated with rupture in a novel rat cerebral aneurysm model. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. 2017;37(8):2795-2805. doi:10.1177/0271678X16675369
91. Pawlowska E, Szczepanska J, Wisniewski K, Tokarz P, Jaskólski DJ, Blasiak J. NF- $\kappa$ B-Mediated Inflammation in the Pathogenesis of Intracranial Aneurysm and Subarachnoid Hemorrhage. Does Autophagy Play a Role? *Int J Mol Sci*. 2018;19(4):E1245. doi:10.3390/ijms19041245
92. Starke RM, Raper DMS, Ding D, et al. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Modulates Cerebral Aneurysm Formation and Rupture. *Transl Stroke Res*. 2014;5(2):269-277. doi:10.1007/s12975-013-0287-9
93. Aoki T, Kataoka H, Shimamura M, et al. NF- $\kappa$ B Is a Key Mediator of Cerebral Aneurysm Formation. *Circulation*. 2007;116(24):2830-2840. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.728303
94. Sawyer DM, Pace LA, Pascale CL, et al. Lymphocytes influence intracranial aneurysm formation and rupture: role of extracellular matrix remodeling and phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):1-9. doi:10.1186/s12974-016-0654-z
95. Hermans MAW, Roeters van Lennep JE, van Daele PLA, Bot I. Mast Cells in Cardiovascular Disease: From Bench to Bedside. *Int J Mol Sci*. 2019;20(14):3395. doi:10.3390/ijms20143395
96. Ishibashi R, Aoki T, Nishimura M, Hashimoto N, Miyamoto S. Contribution of Mast Cells to Cerebral Aneurysm Formation. *Curr Neurovasc Res*. 2010;7(2):113-124. doi:10.2174/156720210791184916
97. Furukawa H, Wada K, Tada Y, et al. Mast Cell Promotes the Development of Intracranial Aneurysm Rupture. *Stroke*. 2020;51(11):3332-3339. doi:10.1161/STROKEAHA.120.030834
98. Fennell VS, Kalani MYS, Atwal G, Martirosyan NL, Spetzler RF. Biology of Saccular Cerebral Aneurysms: A Review of Current Understanding and Future Directions. *Front Surg*. 2016;3. Accessed January 13, 2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fsurg.2016.00043>
99. Thompson JW, Elwardany O, McCarthy DJ, et al. In vivo cerebral aneurysm models. *Neurosurg Focus*. 2019;47(1):E20. doi:10.3171/2019.4.FOCUS19219
100. Wang Y, Emeto TI, Lee J, et al. Mouse Models of Intracranial Aneurysm: Mouse Models of Intracranial Aneurysm. *Brain Pathol*. 2015;25(3):237-247. doi:10.1111/bpa.12175
101. Hashimoto N, Handa H, Hazama F. Experimentally induced cerebral aneurysms in rats. *Surg Neurol*. 1978;10(1):3-8.

102. Nagata I, Handa H, Hashimoto N, Hazama F. Experimentally induced cerebral aneurysms in rats: VII. Scanning electron microscope study. *Surg Neurol.* 1981;16(4):291-296. doi:10.1016/0090-3019(81)90063-X
103. Morimoto M, Miyamoto S, Mizoguchi A, Kume N, Kita T, Hashimoto N. Mouse Model of Cerebral Aneurysm: Experimental Induction by Renal Hypertension and Local Hemodynamic Changes. *Stroke.* 2002;33(7):1911-1915. doi:10.1161/01.STR.0000021000.19637.3D
104. Aoki T, Miyata H, Abekura Y, Koseki H, Shimizu K. Rat Model of Intracranial Aneurysm: Variations, Usefulness, and Limitations of the Hashimoto Model. In: Martin RD, Boling W, Chen G, Zhang JH, eds. *Subarachnoid Hemorrhage.* Vol 127. Acta Neurochirurgica Supplement. Springer International Publishing; 2020:35-41. doi:10.1007/978-3-030-04615-6\_6
105. Peña Silva RA, Mitchell IJ, Kung DK, et al. Paradoxical Increase in Mortality and Rupture of Intracranial Aneurysms in Microsomal Prostaglandin E2 Synthase Type 1-Deficient Mice. *Neurosurgery.* 2015;77(4):613-620. doi:10.1227/NEU.0000000000000883
106. Nuki Y, Tsou TL, Kurihara C, Kanematsu M, Kanematsu Y, Hashimoto T. Elastase-Induced Intracranial Aneurysms in Hypertensive Mice. *Hypertension.* 2009;54(6):1337-1344. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.138297
107. Strange F, Grüter BE, Fandino J, Marbacher S. Preclinical Intracranial Aneurysm Models: A Systematic Review. *Brain Sci.* 2020;10(3):134. doi:10.3390/brainsci10030134
108. Hasan DM, Starke RM, Gu H, et al. Smooth Muscle Peroxisome Proliferator–Activated Receptor  $\gamma$  Plays a Critical Role in Formation and Rupture of Cerebral Aneurysms in Mice In Vivo. *Hypertension.* 2015;66(1):211-220. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05332
109. Chalouhi N, Starke RM, Correa T, et al. Differential Sex Response to Aspirin in Decreasing Aneurysm Rupture in Humans and Mice. *Hypertension.* 2016;68(2):411-417. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07515
110. Tutino VM, Mandelbaum M, Takahashi A, et al. Hypertension and Estrogen Deficiency Augment Aneurysmal Remodeling in the Rabbit Circle of Willis in Response to Carotid Ligation: De Novo Brain Aneurysm After Carotid Ligation. *Anat Rec.* 2015;298(11):1903-1910. doi:10.1002/ar.23205
111. Falk D. Brain evolution in *Homo*: The “radiator” theory. *Behav Brain Sci.* 1990;13(2):333-344. doi:10.1017/S0140525X00078973
112. Vrselja Z, Brkic H, Mrdenovic S, Radic R, Curic G. Function of circle of Willis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2014;34(4):578-584. doi:10.1038/jcbfm.2014.7
113. Hosaka K, Downes DP, Nowicki KW, Hoh BL. Modified murine intracranial aneurysm model: aneurysm formation and rupture by elastase and hypertension. *J NeuroInterventional Surg.* 2014;6(6):474-479. doi:10.1136/neurintsurg-2013-010788
114. Marbacher S, Marjamaa J, Abdelhameed E, Hernesniemi J, Niemelä M, Frösen J. The Helsinki Rat Microsurgical Sidewall Aneurysm Model. *J Vis Exp.* 2014;(92):51071. doi:10.3791/51071
115. Schievink WI, Michels VV, Piepgras DG. Neurovascular manifestations of heritable connective tissue disorders. A review. *Stroke.* 1994;25(4):889-903. doi:10.1161/01.STR.25.4.889
116. Adachi K, Kudo M, Chen MN, Nakazawa S, Wakabayashi I. Cerebral Aneurysm Associated with Multiple Endocrine Neoplasia, Type 1 —Case Report—. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 1993;33(5):309-311. doi:10.2176/nmc.33.309

117. Hassane S, Claij N, Lantinga-van Leeuwen IS, et al. Pathogenic Sequence for Dissecting Aneurysm Formation in a Hypomorphic Polycystic Kidney Disease 1 Mouse Model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(10):2177-2183. doi:10.1161/ATVBAHA.107.149252
118. Flahault A, Joly D. Screening for Intracranial Aneurysms in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2019;14(8):1242-1244. doi:10.2215/CJN.02100219
119. Teo M, Johnson JN, Bell-Stephens TE, et al. Surgical outcomes of Majewski osteodysplastic primordial dwarfism Type II with intracranial vascular anomalies. *J Neurosurg Pediatr.* 2016;18(6):717-723. doi:10.3171/2016.6.PEDS16243
120. Malfait F, Wenstrup R, De Paepe A. Classic Ehlers-Danlos Syndrome. In: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, et al., eds. *GeneReviews*®. University of Washington, Seattle; 1993. Accessed November 15, 2022. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1244/>
121. Kim ST, Brinjikji W, Kallmes DF. Prevalence of Intracranial Aneurysms in Patients with Connective Tissue Diseases: A Retrospective Study. *Am J Neuroradiol.* 2016;37(8):1422-1426. doi:10.3174/ajnr.A4718
122. Pyeritz RE. Marfan syndrome: improved clinical history results in expanded natural history. *Genet Med.* 2019;21(8):1683-1690. doi:10.1038/s41436-018-0399-4
123. MacCarrick G, Black JH, Bowdin S, et al. Loeys–Dietz syndrome: a primer for diagnosis and management. *Genet Med.* 2014;16(8):576-587. doi:10.1038/gim.2014.11
124. Akly MSP, Vazquez C, Besada CH, et al. Prevalence of Intracranial Aneurysms in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia: Report from a Single Reference Center. *Am J Neuroradiol.* 2022;43(6):844-849. doi:10.3174/ajnr.A7505
125. Hirbe AC, Gutmann DH. Neurofibromatosis type 1: a multidisciplinary approach to care. *Lancet Neurol.* 2014;13(8):834-843. doi:10.1016/S1474-4422(14)70063-8
126. Patil A, Sweeney Jr WE, Pan CG, Avner ED. Novel Treatments for Polycystic Kidney Disease. *Transl Sci Rare Dis.* 2019;4(1-2):77-86. doi:10.3233/TRD-190040
127. Diabougua MR, Morel S, Cayron AF, et al. Primary cilia control endothelial permeability by regulating expression and location of junction proteins. *Cardiovasc Res.* 2022;118(6):1583-1596. doi:10.1093/cvr/cvab165
128. Brinjikji W, Iyer VN, Sorenson T, Lanzino G. Cerebrovascular Manifestations of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Stroke.* 2015;46(11):3329-3337. doi:10.1161/STROKEAHA.115.010984
129. Mendez PL, Obendorf L, Jatzlau J, et al. Atheroprone fluid shear stress-regulated ALK1-Endoglin-SMAD signaling originates from early endosomes. *BMC Biol.* 2022;20(1):210. doi:10.1186/s12915-022-01396-y
130. Takeshima Y, Kaku Y, Nishi T, Mukasa A, Yamashiro S. Multiple Cerebral Aneurysms Associated With Neurofibromatosis Type 1. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2019;28(7):e83-e91. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2019.04.019
131. Li F, Downing BD, Smiley LC, et al. Neurofibromin Deficient Myeloid Cells are Critical Mediators of Aneurysm Formation In Vivo. *Circulation.* 2014;129(11):1213-1224. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.006320
132. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature.* 2009;461(7265):747-753. doi:10.1038/nature08494
133. Onda H, Kasuya H, Yoneyama T, et al. Genomewide-Linkage and Haplotype-Association Studies Map Intracranial Aneurysm to Chromosome 7q11. *Am J Hum Genet.* 2001;69(4):804-819. doi:10.1086/323614



134. Gubbiotti MA, Neill T, Iozzo RV. A current view of perlecan in physiology and pathology: A mosaic of functions. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol.* 2017;57-58:285-298. doi:10.1016/j.matbio.2016.09.003
135. Ruigrok YM, Elias R, Wijmenga C, Rinkel GJE. A comparison of genetic chromosomal loci for intracranial, thoracic aortic, and abdominal aortic aneurysms in search of common genetic risk factors. *Cardiovasc Pathol.* 2008;17(1):40-47. doi:10.1016/j.carpath.2007.06.001
136. Yoneyama T, Kasuya H, Onda H, et al. Collagen type I alpha2 (COL1A2) is the susceptible gene for intracranial aneurysms. *Stroke.* 2004;35(2):443-448. doi:10.1161/01.STR.0000110788.45858.DC
137. Akagawa H, Narita A, Yamada H, et al. Systematic screening of lysyl oxidase-like (LOXL) family genes demonstrates that LOXL2 is a susceptibility gene to intracranial aneurysms. *Hum Genet.* 2007;121(3-4):377-387. doi:10.1007/s00439-007-0333-3
138. Ravindra VM, Karsy M, Schmidt RH, Taussky P, Park MS, Bollo RJ. Rapid de novo aneurysm formation after clipping of a ruptured middle cerebral artery aneurysm in an infant with an MYH11 mutation. *J Neurosurg Pediatr.* 2016;18(4):463-470. doi:10.3171/2016.5.PEDS16115
139. Bakker MK, Ruigrok YM. Genetics of Intracranial Aneurysms. *Stroke.* 2021;52(9):3004-3012. doi:10.1161/STROKEAHA.120.032621
140. Kurki MI, Gaál EI, Kettunen J, et al. High Risk Population Isolate Reveals Low Frequency Variants Predisposing to Intracranial Aneurysms. *PLOS Genet.* 2014;10(1):e1004134. doi:10.1371/journal.pgen.1004134
141. Bilguvar K, Yasuno K, Niemelä M, et al. Susceptibility loci for intracranial aneurysm in European and Japanese populations. *Nat Genet.* 2008;40(12):1472-1477. doi:10.1038/ng.240
142. Zhou S, Gan-Or Z, Ambalavanan A, et al. Genome-wide association analysis identifies new candidate risk loci for familial intracranial aneurysm in the French-Canadian population. *Sci Rep.* 2018;8(1):4356. doi:10.1038/s41598-018-21603-7
143. Low SK, Takahashi A, Cha PC, et al. Genome-wide association study for intracranial aneurysm in the Japanese population identifies three candidate susceptible loci and a functional genetic variant at EDNRA. *Hum Mol Genet.* 2012;21(9):2102-2110. doi:10.1093/hmg/dds020
144. Bakker MK, van der Spek RAA, van Rheenen W, et al. Genome-wide association study of intracranial aneurysms identifies 17 risk loci and genetic overlap with clinical risk factors. *Nat Genet.* 2020;52(12):1303-1313. doi:10.1038/s41588-020-00725-7
145. Yasuno K, Bakircioglu M, Low SK, et al. Common variant near the endothelin receptor type A (EDNRA) gene is associated with intracranial aneurysm risk. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(49):19707-19712. doi:10.1073/pnas.1117137108
146. Annunen P, Helaakoski T, Myllyharju J, Veijola J, Pihlajaniemi T, Kivirikko KI. Cloning of the human prolyl 4-hydroxylase alpha subunit isoform alpha(II) and characterization of the type II enzyme tetramer. The alpha(I) and alpha(II) subunits do not form a mixed alpha(I)alpha(II)beta2 tetramer. *J Biol Chem.* 1997;272(28):17342-17348. doi:10.1074/jbc.272.28.17342
147. Foroud T, Lai D, Koller D, et al. Genome-Wide Association Study of Intracranial Aneurysm Identifies a New Association on Chromosome 7. *Stroke.* 2014;45(11):3194-3199. doi:10.1161/STROKEAHA.114.006096
148. Yasuno K, Bilguvar K, Bijlenga P, et al. Genome-wide association study of intracranial aneurysm identifies three new risk loci. *Nat Genet.* 2010;42(5):420-425. doi:10.1038/ng.563
149. Foroud T, Koller DL, Lai D, et al. Genome-Wide Association Study of Intracranial Aneurysms Confirms Role of ANRIL and SOX17 in Disease Risk. *Stroke.* 2012;43(11):2846-2852. doi:10.1161/STROKEAHA.112.656397

150. Foulkes WD, Flanders TY, Pollock PM, Hayward NK. The CDKN2A (p16) gene and human cancer. *Mol Med Camb Mass*. 1997;3(1):5-20.
151. Leeper NJ, Raiesdana A, Kojima Y, et al. Loss of CDKN2B promotes p53-dependent smooth muscle cell apoptosis and aneurysm formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(1):e1-e10. doi:10.1161/ATVBAHA.112.300399
152. Lee S, Kim IK, Ahn JS, et al. Deficiency of Endothelium-Specific Transcription Factor Sox17 Induces Intracranial Aneurysm. *Circulation*. 2015;131(11):995-1005. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.012568
153. Nakajima-Takagi Y, Osawa M, Oshima M, et al. Role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells. *Blood*. 2013;121(3):447-458. doi:10.1182/blood-2012-05-431403
154. Maurano MT, Humbert R, Rynes E, et al. Systematic Localization of Common Disease-Associated Variation in Regulatory DNA. *Science*. 2012;337(6099):1190-1195. doi:10.1126/science.1222794
155. Hussain I, Duffis EJ, Gandhi CD, Prestigiacomo CJ. Genome-Wide Association Studies of Intracranial Aneurysms: An Update. *Stroke*. 2013;44(9):2670-2675. doi:10.1161/STROKEAHA.113.001753
156. Zhou S, Dion PA, Rouleau GA. Genetics of Intracranial Aneurysms. *Stroke*. 2018;49(3):780-787. doi:10.1161/STROKEAHA.117.018152
157. Tromp G, Weinsheimer S, Ronkainen A, Kuivaniemi H. Molecular basis and genetic predisposition to intracranial aneurysm. *Ann Med*. 2014;46(8):597-606. doi:10.3109/07853890.2014.949299
158. Yan J, Hitomi T, Takenaka K, et al. Genetic Study of Intracranial Aneurysms. *Stroke*. 2015;46(3):620-626. doi:10.1161/STROKEAHA.114.007286
159. Farlow JL, Lin H, Sauerbeck L, et al. Lessons Learned from Whole Exome Sequencing in Multiplex Families Affected by a Complex Genetic Disorder, Intracranial Aneurysm. *PLOS ONE*. 2015;10(3):e0121104. doi:10.1371/journal.pone.0121104
160. Zhou S, Ambalavanan A, Rochefort D, et al. RNF213 Is Associated with Intracranial Aneurysms in the French-Canadian Population. *Am J Hum Genet*. 2016;99(5):1072-1085. doi:10.1016/j.ajhg.2016.09.001
161. Santiago-Sim T, Fang X, Hennessy ML, et al. THSD1 (Thrombospondin Type 1 Domain Containing Protein 1) Mutation in the Pathogenesis of Intracranial Aneurysm and Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke*. 2016;47(12):3005-3013. doi:10.1161/STROKEAHA.116.014161
162. Rui YN, Xu Z, Fang X, et al. The Intracranial Aneurysm Gene THSD1 Connects Endosome Dynamics to Nascent Focal Adhesion Assembly. *Cell Physiol Biochem*. 2017;43(6):2200-2211. doi:10.1159/000484298
163. Wu Y, Li Z, Shi Y, et al. Exome Sequencing Identifies LOXL2 Mutation as a Cause of Familial Intracranial Aneurysm. *World Neurosurg*. 2018;109:812-818. doi:10.1016/j.wneu.2017.10.094
164. Bourcier R, Le Scouarnec S, Bonnaud S, et al. Rare Coding Variants in ANGPTL6 Are Associated with Familial Forms of Intracranial Aneurysm. *Am J Hum Genet*. 2018;102(1):133-141. doi:10.1016/j.ajhg.2017.12.006
165. Yang X, Li J, Fang Y, et al. Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor ARHGEF17 Is a Risk Gene for Intracranial Aneurysms. *Circ Genomic Precis Med*. 2018;11(7). doi:10.1161/CIRCGEN.117.002099
166. Lorenzo-Betancor O, Blackburn PR, Edwards E, et al. PCNT point mutations and familial intracranial aneurysms. *Neurology*. 2018;91(23):e2170-e2181. doi:10.1212/WNL.0000000000006614
167. Ding X, Zhao S, Zhang Q, et al. Exome sequencing reveals a novel variant in NFX1 causing intracranial aneurysm in a Chinese family. *J NeuroInterventional Surg*. 2020;12(2):221-226. doi:10.1136/neurintsurg-2019-014900



168. Minchenko DO. Insulin resistance in obese adolescents affects the expression of genes associated with immune response. *Endocr Regul.* 2019;53(2):71-82. doi:10.2478/enr-2019-0009
169. Sauvigny T, Alawi M, Krause L, et al. Exome sequencing in 38 patients with intracranial aneurysms and subarachnoid hemorrhage. *J Neurol.* 2020;267(9):2533-2545. doi:10.1007/s00415-020-09865-6
170. Liu J, Liao X, Zhou J, et al. A Rare Variant of ANK3 Is Associated With Intracranial Aneurysm. *Front Neurol.* 2021;12. Accessed January 20, 2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2021.672570>
171. Barak T, Ristori E, Ercan-Sencicek AG, et al. PPIL4 is essential for brain angiogenesis and implicated in intracranial aneurysms in humans. *Nat Med.* 2021;27(12):2165-2175. doi:10.1038/s41591-021-01572-7
172. Eliceiri BP. Integrin and growth factor receptor crosstalk. *Circ Res.* 2001;89(12):1104-1110. doi:10.1161/hh2401.101084
173. Kamada F, Aoki Y, Narisawa A, et al. A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene. *J Hum Genet.* 2011;56(1):34-40. doi:10.1038/jhg.2010.132
174. Cuevas EP, Eraso P, Mazón MJ, et al. LOXL2 drives epithelial-mesenchymal transition via activation of IRE1-XBP1 signalling pathway. *Sci Rep.* 2017;7(1):44988. doi:10.1038/srep44988
175. Rümenapp U, Freichel-Blomquist A, Wittinghofer B, Jakobs KH, Wieland T. A mammalian Rho-specific guanine-nucleotide exchange factor (p164-RhoGEF) without a pleckstrin homology domain. *Biochem J.* 2002;366(Pt 3):721-728. doi:10.1042/BJ20020654
176. Loirand G. Rho Kinases in Health and Disease: From Basic Science to Translational Research. Touyz RM, ed. *Pharmacol Rev.* 2015;67(4):1074-1095. doi:10.1124/pr.115.010595
177. Ngok SP, Geyer R, Kourtidis A, et al. TEM4 is a junctional Rho GEF required for cell–cell adhesion, monolayer integrity and barrier function. *J Cell Sci.* 2013;126(15):3271-3277. doi:10.1242/jcs.123869
178. Dejana E, Kühl M. The Role of Wnt Signaling in Physiological and Pathological Angiogenesis. *Circ Res.* 2010;107(8):943-952. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.223750
179. Song Y, Lee JK, Lee JO, Kwon B, Seo EJ, Suh DC. Whole Exome Sequencing in Patients with Phenotypically Associated Familial Intracranial Aneurysm. *Korean J Radiol.* 2022;23(1):101-111. doi:10.3348/kjr.2021.0467
180. Ruotsalainen H, Sipilä L, Vapola M, et al. Glycosylation catalyzed by lysyl hydroxylase 3 is essential for basement membranes. *J Cell Sci.* 2006;119(4):625-635. doi:10.1242/jcs.02780
181. Luukkonen TM, Pöyhönen M, Palotie A, et al. A balanced translocation truncates Neurotrimin in a family with intracranial and thoracic aortic aneurysm. *J Med Genet.* 2012;49(10):621-629. doi:10.1136/jmedgenet-2012-100977
182. Oike Y, Ito Y, Maekawa H, et al. Angiopoietin-related growth factor (AGF) promotes angiogenesis. *Blood.* 2004;103(10):3760-3765. doi:10.1182/blood-2003-04-1272
183. Hostettler IC, O’Callaghan B, Bugiardini E, et al. ANGPTL6 Genetic Variants Are an Underlying Cause of Familial Intracranial Aneurysms. *Neurology.* 2021;96(6):947-955. doi:10.1212/WNL.0000000000011125
184. Morisada T, Kubota Y, Urano T, Suda T, Oike Y. Angiopoietins and angiopoietin-like proteins in angiogenesis. *Endothel J Endothel Cell Res.* 2006;13(2):71-79. doi:10.1080/10623320600697989
185. Carbone C, Piro G, Merz V, et al. Angiopoietin-Like Proteins in Angiogenesis, Inflammation and Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2):431. doi:10.3390/ijms19020431

186. Gomez Perdiguero E, Liabotis-Fontugne A, Durand M, et al. ANGPTL4– $\alpha\beta 3$  interaction counteracts hypoxia-induced vascular permeability by modulating Src signalling downstream of vascular endothelial growth factor receptor 2. *J Pathol.* 2016;240(4):461-471. doi:10.1002/path.4805
187. Labbé P, Munoz Goyette V, Thorin-Trescases N, et al. Angiopoietin-like 2 is essential to aortic valve development in mice. *Commun Biol.* 2022;5(1):1-18. doi:10.1038/s42003-022-04243-6
188. Goh YY, Pal M, Chong HC, et al. Angiopoietin-like 4 interacts with integrins beta1 and beta5 to modulate keratinocyte migration. *Am J Pathol.* 2010;177(6):2791-2803. doi:10.2353/ajpath.2010.100129
189. Huang RL, Teo Z, Chong HC, et al. ANGPTL4 modulates vascular junction integrity by integrin signaling and disruption of intercellular VE-cadherin and claudin-5 clusters. *Blood.* 2011;118(14):3990-4002. doi:10.1182/blood-2011-01-328716
190. Yang J, Song Q yi, Niu S xuan, et al. Emerging roles of angiopoietin-like proteins in inflammation: Mechanisms and potential as pharmacological targets. *J Cell Physiol.* 2022;237(1):98-117. doi:10.1002/jcp.30534
191. Oike Y, Tabata M. Angiopoietin-Like Proteins Potential Therapeutic Targets for Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease: Potential Therapeutic Targets for Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease. *Circ J.* 2009;73(12):2192-2197. doi:10.1253/circj.CJ-09-0710
192. Chang TY, Lan KC, Chiu CY, Sheu ML, Liu SH. ANGPTL1 attenuates cancer migration, invasion, and stemness through regulating FOXO3a-mediated SOX2 expression in colorectal cancer. *Clin Sci.* 2022;136(9):657-673. doi:10.1042/CS20220043
193. Kanda A, Noda K, Oike Y, Ishida S. Angiopoietin-like protein 2 mediates endotoxin-induced acute inflammation in the eye. *Lab Invest.* 2012;92(11):1553-1563. doi:10.1038/labinvest.2012.111
194. Dijk W, Kersten S. Regulation of lipid metabolism by angiopoietin-like proteins. *Curr Opin Lipidol.* 2016;27(3):249-256. doi:10.1097/MOL.0000000000000290
195. Kosmas CE, Bousvarou MD, Sourlas A, et al. Angiopoietin-Like Protein 3 (ANGPTL3) Inhibitors in the Management of Refractory Hypercholesterolemia. *Clin Pharmacol Adv Appl.* 2022;14:49-59. doi:10.2147/CPAA.S345072
196. Mohamed F, Mansfield BS, Raal FJ. ANGPTL3 as a Drug Target in Hyperlipidemia and Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2022;24(12):959-967. doi:10.1007/s11883-022-01071-1
197. Sodhi A, Ma T, Menon D, et al. Angiopoietin-like 4 binds neuropilins and cooperates with VEGF to induce diabetic macular edema. *J Clin Invest.* 2019;129(11):4593-4608. doi:10.1172/JCI120879
198. Cazes A, Galaup A, Chomel C, et al. Extracellular Matrix–Bound Angiopoietin-Like 4 Inhibits Endothelial Cell Adhesion, Migration, and Sprouting and Alters Actin Cytoskeleton. *Circ Res.* 2006;99(11):1207-1215. doi:10.1161/01.RES.0000250758.63358.91
199. Parri M, Pietrovito L, Grandi A, et al. Angiopoietin-like 7, a novel pro-angiogenetic factor over-expressed in cancer. *Angiogenesis.* 2014;17(4):881-896. doi:10.1007/s10456-014-9435-4
200. Urano T, Ito Y, Akao M, et al. Angiopoietin-Related Growth Factor Enhances Blood Flow Via Activation of the ERK1/2-eNOS-NO Pathway in a Mouse Hind-Limb Ischemia Model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(5):827-834. doi:10.1161/ATVBAHA.107.149674
201. Legry V, Goumidi L, Huyvaert M, et al. Association between angiopoietin-like 6 (ANGPTL6) gene polymorphisms and metabolic syndrome-related phenotypes in the French MONICA Study. *Diabetes Metab.* 2009;35(4):287-292. doi:10.1016/j.diabet.2008.12.005

202. Kadomatsu T, Tabata M, Oike Y. Angiopoietin-like proteins: emerging targets for treatment of obesity and related metabolic diseases: ANGPTLs in obesity and related metabolic diseases. *FEBS J.* 2011;278(4):559-564. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07979.x
203. Oike Y, Akao M, Yasunaga K, et al. Angiopoietin-related growth factor antagonizes obesity and insulin resistance. *Nat Med.* 2005;11(4):400-408. doi:10.1038/nm1214
204. Stepan H, Ebert T, Schrey S, et al. Serum Levels of Angiopoietin-Related Growth Factor Are Increased in Preeclampsia. *Am J Hypertens.* 2009;22(3):314-318. doi:10.1038/ajh.2008.340
205. Boztosun A, Deveci K, Klçl F, Söylemez MS, Muhtaroglu S, Müderris II. Serum levels of angiopoietin-related growth factor (AGF) are increased in polycystic ovary syndrome. *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res.* 2012;60(5):813-817. doi:10.2310/JIM.0b013e31824e9900
206. Ebert T, Bachmann A, Lössner U, et al. Serum levels of angiopoietin-related growth factor in diabetes mellitus and chronic hemodialysis. *Metabolism.* 2009;58(4):547-551. doi:10.1016/j.metabol.2008.11.016
207. Namkung J, Koh SB, Kong ID, Choi JW, Yeh BI. Serum levels of angiopoietin-related growth factor are increased in metabolic syndrome. *Metabolism.* 2011;60(4):564-568. doi:10.1016/j.metabol.2010.05.013
208. Tuuri AL, Jauhiainen MS, Ehnholm CP, Tikkanen MJ, Nicholls MG, Kaaja RJ. Elevated serum angiopoietin-like protein 6 in women with subsequent pregnancy-induced hypertension: a preliminary study. *Hypertens Pregnancy.* 2013;32(3):203-213. doi:10.3109/10641955.2013.784783
209. Namkung J, Sohn JH, Chang JS, et al. Increased Serum Angiopoietin-Like 6 Ahead of Metabolic Syndrome in a Prospective Cohort Study. *Diabetes Metab J.* 2019;43(4):521. doi:10.4093/dmj.2018.0080
210. Marchiò S, Soster M, Cardaci S, et al. A complex of  $\alpha_6$  integrin and E-cadherin drives liver metastasis of colorectal cancer cells through hepatic angiopoietin-like 6. *EMBO Mol Med.* 2012;4(11):1156-1175. doi:10.1002/emmm.201101164
211. Olson OC, Joyce JA. Cysteine cathepsin proteases: regulators of cancer progression and therapeutic response. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(12):712-729. doi:10.1038/nrc4027
212. Yadati T, Houben T, Bitorina A, Shiri-Sverdlov R. The Ins and Outs of Cathepsins: Physiological Function and Role in Disease Management. *Cells.* 2020;9(7):1679. doi:10.3390/cells9071679
213. Hiraiwa M. Cathepsin A/protective protein: an unusual lysosomal multifunctional protein. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 1999;56(11):894-907. doi:10.1007/s000180050482
214. Korkmaz B, Caughey GH, Chapple I, et al. Therapeutic targeting of cathepsin C: from pathophysiology to treatment. *Pharmacol Ther.* 2018;190:202-236. doi:10.1016/j.pharmthera.2018.05.011
215. Zaidi N, Kalbacher H. Cathepsin E: A mini review. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;367(3):517-522. doi:10.1016/j.bbrc.2007.12.163
216. Wang B, Shi GP, Yao PM, Li Z, Chapman HA, Brömme D. Human Cathepsin F. *J Biol Chem.* 1998;273(48):32000-32008. doi:10.1074/jbc.273.48.32000
217. Burster T, Macmillan H, Hou T, Boehm BO, Mellins ED. Cathepsin G: roles in antigen presentation and beyond. *Mol Immunol.* 2010;47(4):658-665. doi:10.1016/j.molimm.2009.10.003
218. Lecaille F, Chazeirat T, Saidi A, Lalmanach G. Cathepsin V: Molecular characteristics and significance in health and disease. *Mol Aspects Med.* 2022;88:101086. doi:10.1016/j.mam.2022.101086

219. Wex T, Bühling F, Wex H, et al. Human Cathepsin W, a Cysteine Protease Predominantly Expressed in NK Cells, Is Mainly Localized in the Endoplasmic Reticulum<sup>1</sup>. *J Immunol.* 2001;167(4):2172-2178. doi:10.4049/jimmunol.167.4.2172
220. Jevnikar Z, Obermajer N, Bogyo M, Kos J. The role of cathepsin X in the migration and invasiveness of T lymphocytes. *J Cell Sci.* 2008;121(16):2652-2661. doi:10.1242/jcs.023721
221. Barrett AJ, Kirschke H. Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. In: *Methods in Enzymology*. Vol 80. Elsevier; 1981:535-561. doi:10.1016/S0076-6879(81)80043-2
222. Rossi A, Deveraux Q, Turk B, Sali A. Comprehensive search for cysteine cathepsins in the human genome. *Biol Chem.* 2004;385(5). doi:10.1515/BC.2004.040
223. Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, et al. Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteomics.* 2012;1824(1):68-88. doi:10.1016/j.bbapap.2011.10.002
224. Storer AC, Ménard R. Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. *Methods Enzymol.* 1994;244:486-500. doi:10.1016/0076-6879(94)44035-2
225. Lalmanach G, Saidi A, Bigot P, Chazeirat T, Lecaille F, Wartenberg M. Regulation of the Proteolytic Activity of Cysteine Cathepsins by Oxidants. *Int J Mol Sci.* 2020;21(6):1944. doi:10.3390/ijms21061944
226. Santamaría I, Velasco G, Pendás AM, Fueyo A, López-Otín C. Cathepsin Z, a Novel Human Cysteine Proteinase with a Short Propeptide Domain and a Unique Chromosomal Location\*. *J Biol Chem.* 1998;273(27):16816-16823. doi:10.1074/jbc.273.27.16816
227. Drenth J, Jansonius JN, Koekoek R, Wolthers BG. The Structure of Papain. In: *Advances in Protein Chemistry*. Vol 25. Elsevier; 1971:79-115. doi:10.1016/S0065-3233(08)60279-X
228. Fonović M, Turk B. Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 2014;1840(8):2560-2570. doi:10.1016/j.bbagen.2014.03.017
229. Verma S, Dixit R, Pandey KC. Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. *Front Pharmacol.* 2016;7:107. doi:10.3389/fphar.2016.00107
230. Bojarski KK, Karczyńska AS, Samsonov SA. Role of Glycosaminoglycans in Procathepsin B Maturation: Molecular Mechanism Elucidated by a Computational Study. *J Chem Inf Model.* 2020;60(4):2247-2256. doi:10.1021/acs.jcim.0c00023
231. Cavallo-Medved D, Sloane BF. Cell-surface cathepsin B: Understanding its functional significance. In: *Current Topics in Developmental Biology*. Vol 54. Academic Press; 2003:313-341. doi:10.1016/S0070-2153(03)54013-3
232. Cheng XW, Kuzuya M, Nakamura K, et al. Localization of Cysteine Protease, Cathepsin S, to the Surface of Vascular Smooth Muscle Cells by Association with Integrin  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ . *Am J Pathol.* 2006;168(2):685-694. doi:10.2353/ajpath.2006.050295
233. Vidak E, Javoršek U, Vizovišek M, Turk B. Cysteine Cathepsins and Their Extracellular Roles: Shaping the Microenvironment. *Cells.* 2019;8(3):264. doi:10.3390/cells8030264
234. Kos J, Jevnikar Z, Obermajer N. The role of cathepsin X in cell signaling. *Cell Adhes Migr.* 2009;3(2):164-166. doi:10.4161/cam.3.2.7403
235. Liu CL, Guo J, Zhang X, Sukhova GK, Libby P, Shi GP. Cysteine protease cathepsins in cardiovascular disease: from basic research to clinical trials. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(6):351-370. doi:10.1038/s41569-018-0002-3

236. Wu H, Du Q, Dai Q, Ge J, Cheng X. Cysteine Protease Cathepsins in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. *J Atheroscler Thromb*. 2018;25(2):111-123. doi:10.5551/jat.RV17016
237. Funkelstein L, Toneff T, Mosier C, et al. Major Role of Cathepsin L for Producing the Peptide Hormones ACTH,  $\beta$ -Endorphin, and  $\alpha$ -MSH, Illustrated by Protease Gene Knockout and Expression\*. *J Biol Chem*. 2008;283(51):35652-35659. doi:10.1074/jbc.M709010200
238. Lutgens E, Lutgens S p. m., Faber B c. g., et al. Disruption of the Cathepsin K Gene Reduces Atherosclerosis Progression and Induces Plaque Fibrosis but Accelerates Macrophage Foam Cell Formation. *Circulation*. 2006;113(1):98-107. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.561449
239. Samokhin AO, Wong A, Saftig P, Brömme D. Role of cathepsin K in structural changes in brachiocephalic artery during progression of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2008;200(1):58-68. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.12.047
240. Stepień KL, Bajdak-Rusinek K, Fus-Kujawa A, Kuczmik W, Gawron K. Role of Extracellular Matrix and Inflammation in Abdominal Aortic Aneurysm. *Int J Mol Sci*. 2022;23(19):11078. doi:10.3390/ijms231911078
241. Kitamoto S, Sukhova GK, Sun J, et al. Cathepsin L Deficiency Reduces Diet-Induced Atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor–Knockout Mice. *Circulation*. 2007;115(15):2065-2075. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.688523
242. Sukhova GK, Zhang Y, Pan JH, et al. Deficiency of cathepsin S reduces atherosclerosis in LDL receptor–deficient mice. *J Clin Invest*. 2003;111(6):897-906. doi:10.1172/JCI14915
243. Peters DG, Kassam AB, Feingold E, et al. Molecular anatomy of an intracranial aneurysm: coordinated expression of genes involved in wound healing and tissue remodeling. *Stroke*. 2001;32(4):1036-1042. doi:10.1161/01.str.32.4.1036
244. Aoki T, Kataoka Hiroharu, Ishibashi Ryota, Nozaki Kazuhiko, Hashimoto Nobuo. Cathepsin B, K, and S Are Expressed in Cerebral Aneurysms and Promote the Progression of Cerebral Aneurysms. *Stroke*. 2008;39(9):2603-2610. doi:10.1161/STROKEAHA.107.513648
245. Velasco G, Ferrando AA, Puente XS, Sánchez LM, López-Otín C. Human cathepsin O. Molecular cloning from a breast carcinoma, production of the active enzyme in *Escherichia coli*, and expression analysis in human tissues. *J Biol Chem*. 1994;269(43):27136-27142.
246. Shi GP, Chapman HA, Bhairi SM, DeLeeuw C, Reddy VY, Weiss SJ. Molecular cloning of human cathepsin O, a novel endoproteinase and homologue of rabbit OC2. *FEBS Lett*. 1995;357(2):129-134. doi:10.1016/0014-5793(94)01349-6
247. Reif MM, Mach L, Oostenbrink C. Molecular Insight into Propeptide–Protein Interactions in Cathepsins L and O. *Biochemistry*. 2012;51(43):8636-8653. doi:10.1021/bi300802a
248. Hato Y, Kondo N, Yoshimoto N, et al. Prognostic impact of a single-nucleotide polymorphism near the CTSO gene in hormone receptor-positive breast cancer patients. *Int J Clin Oncol*. 2016;21(3):539-547. doi:10.1007/s10147-015-0913-5
249. Brentnall AR, Cuzick J, Byers H, et al. Relationship of ZNF423 and CTSO with breast cancer risk in two randomised tamoxifen prevention trials. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;158(3):591-596. doi:10.1007/s10549-016-3885-x
250. Cairns J, Ingle JN, Wickerham LD, Weinshilboum R, Liu M, Wang L. SNPs near the cysteine proteinase cathepsin O gene (CTSO) determine tamoxifen sensitivity in ER $\alpha$ -positive breast cancer through regulation of BRCA1. *PLoS Genet*. 2017;13(10):e1007031. doi:10.1371/journal.pgen.1007031

251. Bond HM, Scicchitano S, Chiarella E, et al. ZNF423: A New Player in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Front Endocrinol*. 2018;9:255. doi:10.3389/fendo.2018.00255
252. Joutel A, Monet-Leprêtre M, Gosele C, et al. Cerebrovascular dysfunction and microcirculation rarefaction precede white matter lesions in a mouse genetic model of cerebral ischemic small vessel disease. *J Clin Invest*. 2010;120(2):433-445. doi:10.1172/JCI39733
253. Zhang Y, Hu X, Tian R, et al. Angiopoietin-related growth factor (AGF) supports adhesion, spreading, and migration of keratinocytes, fibroblasts, and endothelial cells through interaction with RGD-binding integrins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;347(1):100-108. doi:10.1016/j.bbrc.2006.06.053
254. Michel JB, Lagrange J, Regnault V, Lacolley P. Conductance Artery Wall Layers and Their Respective Roles in the Clearance Functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2022;42(9):e253-e272. doi:10.1161/ATVBAHA.122.317759
255. Hynes RO. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell*. 2002;110(6):673-687. doi:10.1016/S0092-8674(02)00971-6
256. Álvarez-Santos MD, Álvarez-González M, Estrada-Soto S, Bazán-Perkins B. Regulation of Myosin Light-Chain Phosphatase Activity to Generate Airway Smooth Muscle Hypercontractility. *Front Physiol*. 2020;11. Accessed February 20, 2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2020.00701>
257. Liao KA, Rangarajan KV, Bai X, Taylor JM, Mack CP. The actin depolymerizing factor destrin serves as a negative feedback inhibitor of smooth muscle cell differentiation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2021;321(5):H893-H904. doi:10.1152/ajpheart.00142.2021
258. Costa P, Scales TME, Ivaska J, Parsons M. Integrin-Specific Control of Focal Adhesion Kinase and RhoA Regulates Membrane Protrusion and Invasion. *PLOS ONE*. 2013;8(9):e74659. doi:10.1371/journal.pone.0074659
259. Hsiao CH, Chen YC, Wang JH, Hsu BG. Serum Angiopoietin-like Protein 3 Level Is Associated with Peripheral Arterial Stiffness in Patients with Coronary Artery Disease. *Medicina (Mex)*. 2021;57(10):1011. doi:10.3390/medicina57101011
260. Jung KH. New Pathophysiological Considerations on Cerebral Aneurysms. *Neurointervention*. 2018;13(2):73-83. doi:10.5469/neuroint.2018.01011
261. Lähteenvuo J, Rosenzweig A, Sinclair D, North B. Effects of Aging on Angiogenesis. *Circ Res*. 2012;110(9):1252-1264. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.246116
262. Ungvari Z, Tarantini S, Kiss T, et al. Endothelial dysfunction and angiogenesis impairment in the ageing vasculature. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(9):555-565. doi:10.1038/s41569-018-0030-z
263. Cai WJ, Li MB, Wu X, et al. Activation of the integrins  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha v\beta 3$  and focal adhesion kinase (FAK) during arteriogenesis. *Mol Cell Biochem*. 2009;322(1-2):161-169. doi:10.1007/s11010-008-9953-8
264. Pinto YM, Paul M, Ganten D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc Res*. 1998;39(1):77-88. doi:10.1016/S0008-6363(98)00077-7
265. Batta SPR, Rio M, Lebot C, et al. ARHGEF18 participates in Endothelial Cell Mechano-sensitivity in Response to Flow. Published online September 11, 2022:2022.09.10.507283. doi:10.1101/2022.09.10.507283
266. Mantella LE, Quan A, Verma S. Variability in vascular smooth muscle cell stretch-induced responses in 2D culture. *Vasc Cell*. 2015;7:7. doi:10.1186/s13221-015-0032-0
267. Qiu H, Zhu Y, Sun Z, et al. Short Communication: Vascular Smooth Muscle Cell Stiffness As a Mechanism for Increased Aortic Stiffness With Aging. *Circ Res*. 2010;107(5):615-619. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.221846



268. Singh P, Carraher C, Schwarzbauer JE. Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2010;26:397-419. doi:10.1146/annurev-cellbio-100109-104020
269. Jevnikar Z, Rojnik M, Jamnik P, Doljak B, Fonović UP, Kos J. Cathepsin H Mediates the Processing of Talin and Regulates Migration of Prostate Cancer Cells \*. *J Biol Chem.* 2013;288(4):2201-2209. doi:10.1074/jbc.M112.436394
270. Hedin U, Bottger BA, Forsberg E, Johansson S, Thyberg J. Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells. *J Cell Biol.* 1988;107(1):307-319. doi:10.1083/jcb.107.1.307
271. Abraham S, Kogata N, Fässler R, Adams RH. Integrin  $\beta$ 1 Subunit Controls Mural Cell Adhesion, Spreading, and Blood Vessel Wall Stability. *Circ Res.* 2008;102(5):562-570. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.167908
272. Sun Z, Martinez-Lemus LA, Hill MA, Meininger GA. Extracellular matrix-specific focal adhesions in vascular smooth muscle produce mechanically active adhesion sites. *Am J Physiol-Cell Physiol.* 2008;295(1):C268-C278. doi:10.1152/ajpcell.00516.2007
273. Aoki T, Kataoka H, Ishibashi R, Nozaki K, Morishita R, Hashimoto N. Reduced Collagen Biosynthesis Is the Hallmark of Cerebral Aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(7):1080-1086. doi:10.1161/ATVBAHA.108.180760
274. Qiao PL, Gargasha M, Liu Y, et al. Magnetic resonance molecular imaging of extradomain B fibronectin enables detection of pancreatic ductal adenocarcinoma metastasis. *Magn Reson Imaging.* 2022;86:37-45. doi:10.1016/j.mri.2021.11.008
275. Zhou Z, Qutaish M, Han Z, et al. MRI detection of breast cancer micrometastases with a fibronectin-targeting contrast agent. *Nat Commun.* 2015;6(1):7984. doi:10.1038/ncomms8984





# *ANNEXES*





# Why Are Women Predisposed to Intracranial Aneurysm?

Milène Fréneau, Céline Baron-Menguy, Anne-Clémence Vion and Gervaise Loirand\*

Université de Nantes, CHU Nantes, CNRS, INSERM, l'institut du thorax, Nantes, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Masayo Koide,  
University of Vermont, United States

### Reviewed by:

Junkoh Yamamoto,  
University of Occupational and  
Environmental Health Japan, Japan  
Seana Gall,  
University of Tasmania, Australia

### \*Correspondence:

Gervaise Loirand  
gervaise.loirand@univ-nantes.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Atherosclerosis and Vascular  
Medicine,  
a section of the journal  
Frontiers in Cardiovascular Medicine

**Received:** 15 November 2021

**Accepted:** 11 January 2022

**Published:** 10 February 2022

### Citation:

Fréneau M, Baron-Menguy C,  
Vion A-C and Loirand G (2022) Why  
Are Women Predisposed to  
Intracranial Aneurysm?  
Front. Cardiovasc. Med. 9:815668.  
doi: 10.3389/fcvm.2022.815668

Intracranial aneurysm (IA) is a frequent and generally asymptomatic cerebrovascular abnormality characterized as a localized dilation and wall thinning of intracranial arteries that preferentially arises at the arterial bifurcations of the circle of Willis. The devastating complication of IA is its rupture, which results in subarachnoid hemorrhage that can lead to severe disability and death. IA affects about 3% of the general population with an average age for detection of rupture around 50 years. IAs, whether ruptured or unruptured, are more common in women than in men by about 60% overall, and more especially after the menopause where the risk is double-compared to men. Although these data support a protective role of estrogen, differences in the location and number of IAs observed in women and men under the age of 50 suggest that other underlying mechanisms participate to the greater IA prevalence in women. The aim of this review is to provide a comprehensive overview of the current data from both clinical and basic research and a synthesis of the proposed mechanisms that may explain why women are more prone to develop IA.

**Keywords:** intracranial aneurysm, cerebral artery, circle of Willis, sex difference, gender, endothelium, estrogens

## INTRODUCTION

Intracranial aneurysm (IA) is defined as a localized dilation of cerebral arteries which preferentially forms at arterial bifurcation of the circle of Willis. IAs are thought to result from an abnormal thickening of the artery wall at sites where hemodynamic stress is high (1). Unruptured IAs are generally silent but become symptomatic when they rupture, causing subarachnoid hemorrhage, with mortality rates of about 30–40% and severe neurological dysfunction and disability in a great part of subarachnoid hemorrhage survivors (2–4).

Cellular and molecular mechanisms leading to IA formation and rupture are not fully elucidated, but risk factors such as familial history of IA, high blood pressure, cigarette smoking, alcohol consumption, and female sex have been clearly identified. Indeed, in contrast to most neurocardiovascular diseases, the incidence of IA is higher in women than in men, whereas most of the risk factors that include cigarette smoking, hypertension, atherosclerosis, and alcohol consumption are all more common among men (5–13).

Women are found to suffer two times as often from unruptured IAs as men. Whereas, the overall prevalence of unruptured IAs in study population is reported about 3%–4%, it reaches 6% in women, with a woman-to-man prevalence ratio of 1.57 (14). This woman-to-man prevalence ratio changes with age, from 1.1 in populations with mean age of 50 years to 2.2 for populations over the age of 50 years (14). In addition, the follow-up of a cohort of patients diagnosed with either ruptured or unruptured IAs showed that female gender is an independent risk factors for the formation of new IAs (7).

Despite these clinical data, studies that are specifically designed to explain and understand the reasons for this female predisposition to IA remain few. Clinical analyses primarily addressed the role of sex hormones, and preclinical studies performed in rodent models of IA have mainly focused on the effects of ovariectomy and/or estrogen treatments, and *in vitro* on hormone actions in vascular cell models. The synthesis of published data supports a possible role of sex-specific hormonal mechanisms in the pathogenesis of IA. Nevertheless, the particular features of IA in women suggest that the greater predisposition of women to IA relies on complex and probably multiple mechanisms, including a role for hemodynamic forces.

## GENDER DIFFERENCE IN IA FEATURES

### IA Number and Localization

There is no statistical difference between men and women regarding the size and the laterality of unruptured IAs (15–17). However, together with a higher susceptibility to IA formation compared to men, women are more likely to develop multiple IAs (17–22). Also, women exhibit about two times the rate of bilateral IAs than men (16, 17). In addition, the number of IAs rises in women of increasing age (19). Both female sex and postmenopausal state are found as independent risk factors for the formation of multiple IAs (19).

In women, unruptured IA aspect has been shown to change with age: women of premenopausal age have a higher numbers of aneurysm lobes, whereas those in women of postmenopausal have larger size (23).

A gender difference in the anatomical distribution of IA is also clearly demonstrated. In women, unruptured IA localizes preferentially on the internal carotid artery (ICA; 54% vs. 38% in men), whereas in men, IA affects more frequently the anterior cerebral artery (ACA; 29% vs. 15% in women) and anterior communicating artery (**Figure 1**) (15). No difference according to the gender has been observed in the frequency of IA in the middle cerebral artery and posterior circulation (posterior cerebral, basilar and vertebral, artery) (15).

### IA Growth and Rupture

As for IA formation, women are at increased risk for IA growth (7, 24). More particularly, female sex is shown to be an independent risk factor for the growth of unruptured IA in elderly patients (age  $\geq 70$  years) (25). However, the growth rate of an IA itself does not differ by sex (7).

Once an IA is formed, female sex does not represent a risk factor for its subsequent rupture (7). As a whole, no difference in the size of ruptured aneurysms between women and men has been detected (15, 20, 22, 26). However, some differences exist between ruptured IA in men and women. IA rupture and aneurysmal subarachnoid hemorrhage more frequently affect women than men but the gender distribution varied with age (15, 18, 27–29). Indeed, in young people, incidence of aneurysmal subarachnoid hemorrhage is slightly higher in men, and the increased risk of aneurysmal subarachnoid hemorrhage in women only appears after the fourth and fifth decades (28, 30–32). Accordingly, among patients with ruptured IAs, the mean

age of women is higher (60–70 years) than that of men (50–60 years) (15, 16, 20, 26).

The location of aneurysmal subarachnoid hemorrhage also differs between women and men. According to the preferential location of IA on internal carotid artery in women, the posterior communicating artery is also the most common site of IA rupture in women, whereas anterior communicating artery aneurysm ruptures are overrepresented in men (16, 18, 20, 26, 33–35). This is in agreement with the majority of anterior communicating artery aneurysms in men and their higher risk of rupture than IAs at other locations (18, 36). Regarding this specific IA location, women exhibit a lower rate of ruptured anterior communicating artery aneurysms than men in whom these IAs are larger (16, 33). This greater IA size may thus participate to the higher proportion of men with ruptured anterior communicating artery.

For both women and men, outcomes varied according to the location of aneurysmal subarachnoid hemorrhage but the overall outcomes after IA rupture are similar in women and men (16, 20, 26, 33).

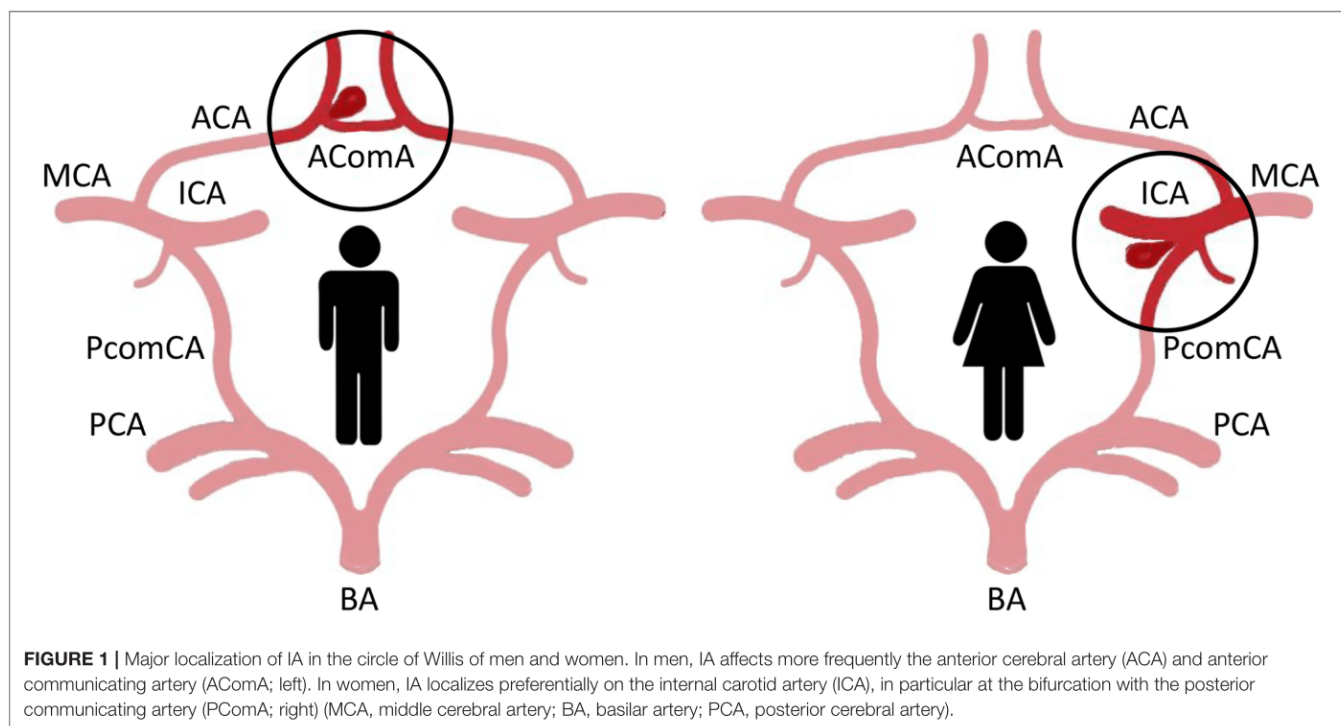
## POSSIBLE CAUSES OF THE GENDER DIFFERENCE IN IA FORMATION AND RUPTURE

### Anatomical and Hemodynamic Parameters

Both IA formation and rupture did not occur on same arteries in women and men. ICA and ACA have been identified as the main sites of IA formation and rupture in women and men, respectively. Indeed, there is a female preponderance of IA in all intracranial arteries except the ACA. It is well admitted that hemodynamic stress, such as high blood pressure or strong wall shear stress, may participate to IA formation and growth (37), which may suggest that gender difference in the arterial geometry and consequent arterial wall shear stress could participate in the different preferential location of IA in women and men.

Analysis of the anatomical variations in the circle of Willis in more than one hundred of patients with IA by magnetic resonance angiography suggested a correlation between the sex-linked difference in IA distribution (preferential ICA aneurysm in women) and a sex-linked difference in anatomical variations of the circle of Willis (38). Beyond these anatomical variations, measurement of the diameter of arteries of the circle of Willis revealed that ICA, ACA, posterior cerebral artery and basilar artery were significantly smaller in women than in men, with the greatest difference found for ICA (39, 40). In contrast, the diameter of posterior communicating artery has been found to be either larger or similar in women compared to men. Since a smaller arterial diameter results in higher blood flow velocity and shear stress, arteries in women are expected to be submitted to stronger wall shear stress and tension than in men. Examination of the dimension and geometry of the terminal bifurcation of the ICA confirmed that the diameter of the parent artery and the branches is smaller in women than in men, but the bifurcation angle is the same in both sexes (41). Modeling of bifurcations and computational fluid dynamic simulations allowed to demonstrate that the maximum wall shear stress in the ICA bifurcation in the





female was 50% higher than in men (41). In addition, the area of increased wall shear stress at the ICA bifurcation is larger in women compared to men (Figure 2). Such differences between men and women, although less pronounced, were also found at the bifurcation of the MCA into two main branches (41).

Regarding the wall tension generated by pressure, blood flow modeling of circle of Willis circulation has demonstrated that peak pressure is higher when artery diameter is smaller and the angle of the bifurcations is asymmetric (42).

All these observations thus support the idea that the gender difference in the diameter and geometry of bifurcations of arteries of the circle of Willis results in higher shear stress and peak pressure in women that may induce more severe endothelial damage and favors IA formation in women, particularly at ICA bifurcation and ICA posterior communicating artery junction. Moreover, it has been described that the larger the diameter of an IA relative to the native artery diameter, the higher the risk of rupture (43). With smaller diameter intracranial arteries in women, it can be thus considered that at equal IA size, the risk of rupture will be higher in women than in men.

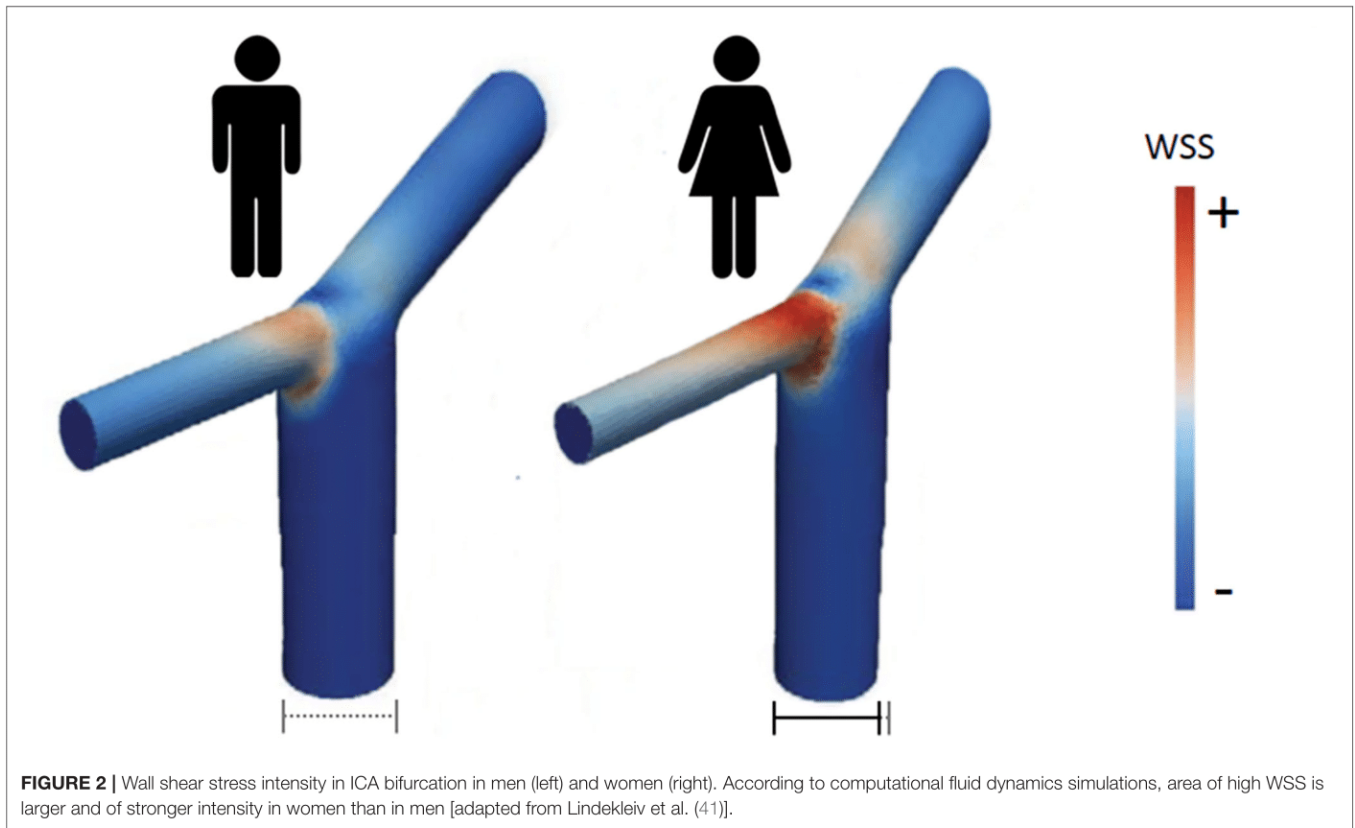
## Hormones

Hormones are a fundamental part of sex differences and hormonal changes in the course of female life participate in sex differences in neurocardiovascular disease prevalence. Although the female preponderance of both unruptured and ruptured IAs in the general population is clear, and even more pronounced in familial forms of IA (44, 45), an important additional factor to be considered is the age. The change in the preponderance of IAs between men and women starts after the first two decades of life and became significant after the age of 55, with the peak in

female prevalence of IA in the sixth decade (5, 14, 20, 28, 30–32). These changes are contemporary with the fall in estrogen levels occurring during and after menopause, which suggests the possible protective effect of estrogens on IA formation and rupture. This hypothesis is further supported by the greater risk of IA in association with earlier age at menopause (46). In contrast, women who used oral contraceptive pills and hormone replacement therapy are less likely to have cerebral aneurysms (47). The decline in estrogen concentration in peri- and post-menopause periods can thus be responsible of changes in cerebral artery structure and functions that favor the formation and/or the rupture of IAs.

Animal models of aneurysm provided a useful way to address the sex difference in IAs, in particular to understand the role of estrogens thanks to the use of ovariectomized females and/or estrogen supplementation. Estrogen effects are mediated by the activation of two nuclear estrogen receptors, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , acting as transcription factors which control gene expression, and through a more recently described membrane G protein-coupled estrogen receptor (GPER) (48). Several studies have demonstrated the presence of functional ER $\alpha$  and ER $\beta$  in human and animal vascular smooth muscle and endothelial cells. However, vascular effects of estrogens are predominantly mediated by ER $\alpha$  (48).

In rodent models of IA, the incidence of IA is higher in female animals than in males and was further significantly increased in ovariectomized females, despite similar or even lower systolic blood pressure in females (6, 49–51). Surgically or pharmacologically induced-estrogen deficiency also aggravated IA lesions and significantly increased rupture of IAs (49, 52). In ovariectomized hypertensive rats, the increased incidence of



carotid ligation-induced IA can be reversed by bazedoxifene, a selective estrogen receptor modulator, without change in blood pressure. This effect is associated with a restoration of ER $\alpha$  and ER $\beta$  expression in cerebral arteries that were downregulated by ovariectomy (53).

Estrogen treatment and specific estrogen ER $\beta$  agonist, but not ER $\alpha$  agonist, reversed the increased incidence of IA in ovariectomized female mice, which suggests that the protective effect of estrogens on IA was mediated by ER $\beta$  activation (50, 54). This role of ER $\beta$  was further confirmed by showing that the effect of the ER $\beta$  agonist was not observed in ER $\beta$  knockout mice and that non-ovariectomized ER $\beta$  knockout mice displayed an increased incidence of IA compared to non-ovariectomized control mice (50). With a protective effect of estrogens on IA mostly attributed to ER $\beta$ , the cerebral circulation stands out from the rest of the arteries in which the protective effect of estrogens is mediated by ER $\alpha$ .

## MOLECULAR MECHANISMS OF ESTROGEN PROTECTION TO IA FORMATION

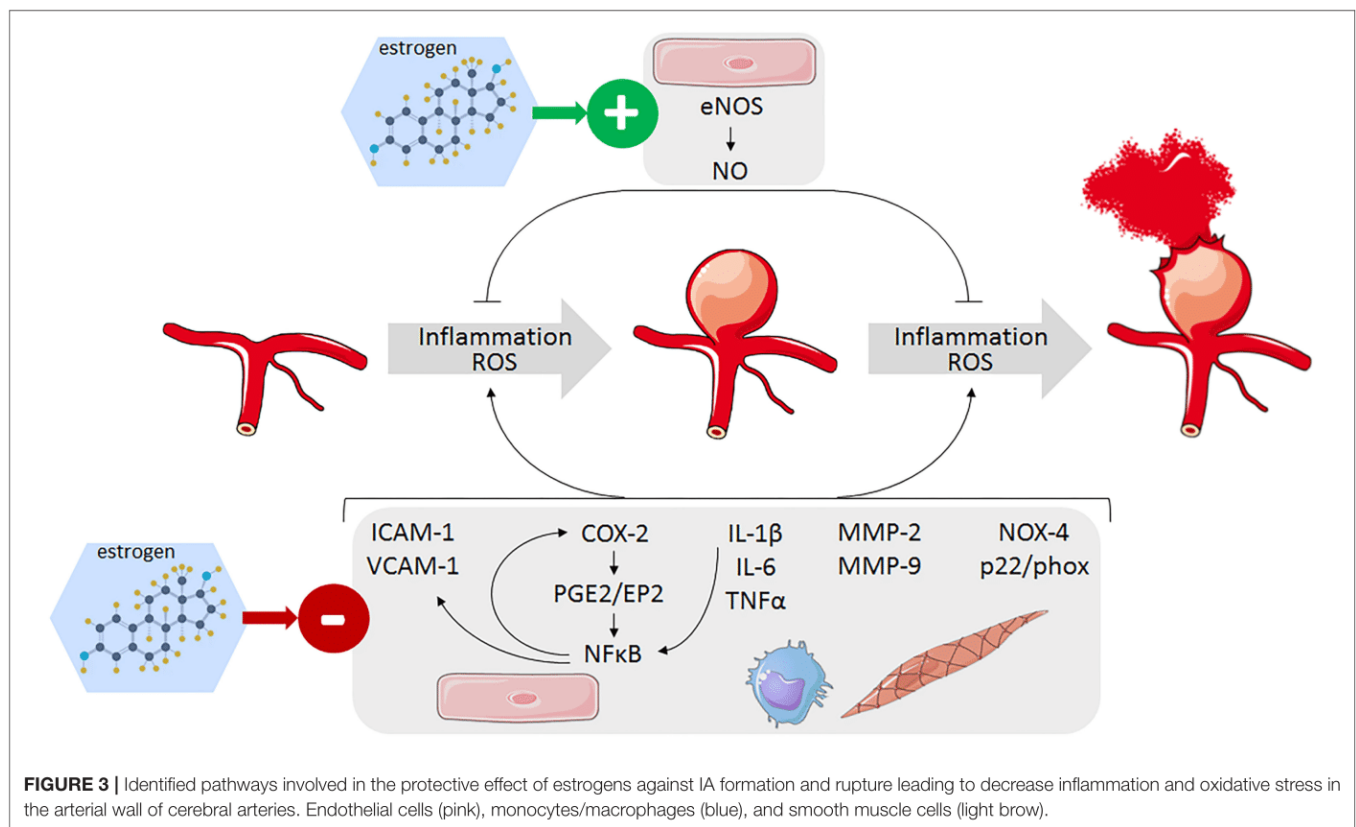
Although the exact pathogenesis of IA formation, growth, and rupture remains to be established, current knowledge suggests that endothelial dysfunction induced by hemodynamic injury at bifurcation of intracranial artery could be the initial step of IA formation (55–58). This first event then

triggers a vascular inflammation process, with neutrophil and macrophage infiltration, oxidative stress, fragmentation of the internal elastic lamina, and degradation of the extracellular matrix by metalloproteinase, endothelial, and smooth muscle cell apoptosis (56, 59). All these interconnected processes lead to the structural degradation and remodeling of the arterial wall responsible for the weakening and fragility of the arterial wall. Protecting effects of estrogens can thus result from an inhibitory action on one or more components involved in IA formation.

## Estrogen Effect on Endothelial NO Synthase and Cerebral Artery Vasoreactivity

Endothelial dysfunction, with abnormal endothelial cell morphology and a loss of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression, is a key early step of IA formation (Figure 3). In a rat model of IA, ovariectomy significantly decreased eNOS mRNA and protein expression, especially in the cerebral vascular wall of animals with saccular aneurysms (51). In contrast, estradiol treatment has been shown to increase the expression of eNOS in endothelial cells *in vitro* (51). Thus, estrogen deficiency promotes endothelial dysfunction whereas conversely, estrogen would protect against endothelial damage in the early phase of IA formation.

The *in vitro* effect of estrogen on eNOS expression in endothelial cell culture is mediated by ER $\alpha$  (51). ER $\alpha$  has



been also shown to induce eNOS phosphorylation through phosphoinositide-3 (PI-3) kinase/Akt cascade leading to a rapid NO production in intact cerebral arteries from ovariectomized rats *ex vivo* and causing a long-term increase in NO production in the cerebral circulation of ovariectomized rats chronically treated with estrogen *in vivo* (60). This effect of ER $\alpha$  therefore seems to contradict the causal link established between the rise in NO production mediated by ER $\beta$  and the beneficial effect of estrogen on IA (50). Indeed, the protective effect of ER $\beta$  agonist on IA incidence in ovariectomized mice is completely abolished by the inhibition of eNOS by L-NAME treatment, which supports the fact that ER $\beta$ -induced NO production by eNOS mediates the beneficial effect of estrogens against IA formation (50). The *in vivo* role of ER $\alpha$  thus remains to be clarified but it has been shown that ovariectomy induces a loss of ER $\alpha$  expression in the vascular wall of mouse cerebral arteries with in contrast, an increase in ER $\beta$  expression (51), which may contribute to the discrepancy in the respective role of these two receptors in estrogen effects on NO production.

With regard to vasoreactivity, *ex vivo*, 17 $\beta$ -estradiol and agonists of ER $\alpha$  relax pressurized rat middle cerebral arteries from both male and female animals through a direct effect on smooth muscle cells (61). A relaxing effect of ER $\beta$  agonists was observed only in female rat arteries and was also due to an action on smooth muscle cells. ER $\beta$  agonists also induce relaxation of human cerebral artery in a NO-independent manner likely through an action on smooth muscle, whereas ER $\alpha$  receptor agonists have only a minimal effect (61).

In agreement with this relaxing effect of estrogens, ovariectomy enhanced the contractile response of rat cerebral arteries to vasoconstrictors, in association with an alteration of NO-dependent relaxing effect (62, 63). Tamoxifen or 17 $\beta$ -estradiol treatment, presumably through ER $\alpha$ , normalized cerebral artery reactivity to phenylephrine in ovariectomized rats (62, 63).

In summary, estrogens preserve normal endothelial function and have a limiting action on cerebral artery contraction and cerebrovascular tone through both endothelial-mediated NO dependent-relaxing effect and a direct relaxing action on smooth muscle, which participate to their protective effect on IA. Whereas, studies in ovariectomized rodent models of IA support a major role of ER $\beta$ , the observed changes in ER $\alpha$  and ER $\beta$  expression in cerebral artery wall of ovariectomized animals support a differential role of these receptors in the modulation of eNOS expression and activity, with a major of ER $\alpha$  before menopause and of ER $\beta$  after menopause.

### Estrogen Effect on Cerebral Artery Inflammation

The mechanisms linking high wall shear stress to the activation of proinflammatory signaling pathway at arterial bifurcation are not fully elucidated, but the transcription factor nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) is shown to play a critical role in IA formation and rupture (Figure 3). Its activation leads to an increase in



the expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), which are responsible for the recruitment and adhesion of inflammatory cells to the endothelium where they produce proinflammatory cytokines such as tumor necrotizing factor alpha (TNF $\alpha$ ), interleukin (IL)-1 $\beta$ , and IL-6 (56, 64–67). These cytokines then perpetuate local inflammation and neutrophil and macrophage infiltration in the cerebral artery wall, which produced damaging matrix metalloproteinases (MMP-2/9), and reactive oxygen species (ROS) (55). Whereas, the general vasculo-protector effects of estrogens are quite well documented, only a limited number of studies specifically addressed the anti-inflammatory action of estrogens on cerebral arteries and on IA.

Estrogens have been shown to limit proinflammatory cytokine expression and effects in cerebral arteries (Figure 3). Ovariectomy in female animals increased expression of TNF $\alpha$  and accumulation of neutrophils and macrophages in the arterial wall (49). Estrogen deficiency was also shown to upregulate IL-17A, which in turn downregulates E-cadherin and favors macrophage infiltration in the IA wall (52). Bazedoxifene decreases IL-1 $\beta$  mRNA expression in cerebral arteries which was upregulated by ovariectomy (53). Recently, a bioactive phytoestrogen daidzein, which reverses the increased IA incidence in ovariectomized mice via ER $\beta$ , was shown to decrease IL-6 mRNA level in cerebral arteries and, to a lesser extent, IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  mRNAs (68). IL-6 level in the serum is increased and involved in the formation and rupture of IA in estrogen-deficient mice but not in control mice, which suggests that estrogen-induced repression of IL-6 expression participates to the beneficial effect of estrogen on IA (67).

Estrogen not only reduces IL-1 $\beta$  expression, but also suppresses exogenous IL-1 $\beta$ -mediated induction of cyclooxygenase 2 (COX-2)/prostaglandin E2 (PGE2) pathway in cerebral blood vessels of ovariectomized rats (69). IL-1 $\beta$  induces COX-2 expression through the activation of NF- $\kappa$ B, and the observed inhibitory effect of estrogen has been ascribed to an inhibition of NF- $\kappa$ B activity (70). This result is particularly interesting as it has been proposed that COX-2/PGE2/NF- $\kappa$ B pathway in cerebral artery endothelium is responsible for high wall shear stress-induced endothelial cell damage and may be the link between hemodynamic stress and IA formation (71). The inflammatory PGE2 formation is catalyzed from arachidonic acid by the sequential action of COX-2 and prostaglandin synthase-1 (PGES-1). COX-2 and prostaglandin E receptor 2 (EP2) mRNA expression was induced *in vitro* in endothelial cell cultures exposed to shear stress. In a mouse model of IA induced by elevated hemodynamic stress, expression of COX2 and EP2 is increased in the endothelial cell layer at early stage of IA formation. Inhibition or knockout of COX-2 or EP2 resulted in decreased NF- $\kappa$ B expression and a reduction of incidence of IA formation (71, 72). The induction of COX-2/PGE2/EP2 signaling activates NF- $\kappa$ B, thus creating a self-amplified feedback loop that prevents the resolution of this initial process and contributes to generate the chronic inflammation in the cerebral arterial wall enabling for IA formation and progression. The observed inhibitory action of estrogen on NF- $\kappa$ B (69) might thus

limit the shear stress-induced amplification loop of the COX-2/PGE2/NF- $\kappa$ B pathway and the perpetuation of inflammation in cerebral artery wall.

## Estrogen Effect on Cerebral Artery Oxidative Stress

Vascular oxidative stress and increased production of reactive oxygen species (ROS) are considered as the common mechanisms of vascular dysfunction and arterial disease, including IA (73) (Figure 3). Oxidative stress is mainly caused by an imbalance of ROS production by prooxidative enzymes (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase, xanthine oxidase or the mitochondrial respiratory chain) and antioxidant mechanisms (superoxide dismutase, glutathione peroxidase, heme oxygenase, catalase, and so on.). The resulting rise in ROS concentration reduces bioactive endothelial NO and inhibits eNOs, which favors monocyte and macrophage recruitment creating a proinflammatory environment which leads to the activation of MMPs, phenotypic conversion of vascular smooth muscle cells and apoptosis, and finally a harmful arterial wall remodeling.

Excessive production of ROS has been demonstrated in aneurysmal walls in rodent models of IA, in association with an increased expression of heme oxygenase-1 and NADPH oxidase subunits (NOX4, p22phox, p47phox), mainly in macrophages and smooth muscle cells, whereas superoxide dismutase 1 was downregulated (51, 74). Free radical scavenger treatment or p47phox deletion markedly reduced IA formation and inhibited enlargement and medial degradation of IA (74). Estrogen deficiency in a rat model of IA increased the expression of NOX4 and p22phox in IA walls, and in contrast, 17 $\beta$ -estradiol inhibited NOX4 and p22phox expression in cerebral endothelial cell culture, suggesting that NADPH oxidase regulation by estrogen might participate to the gender difference in IA prevalence (51).

Additional indirect evidence supporting a role of ROS in the sex difference in IA has been provided by the differential effect of cigarette smoking on IA in men and women. Smoking is a well-known risk factor of IA formation and rupture, which mainly acts by inducing ROS accumulation (75). However, cigarette smoking has a more severe impact on IA, particularly on IA rupture, in smoking women than in men (76, 77). A recent study showed that relatively young women (between 30 and 60 years) with a positive smoking history have a four-fold increased risk for having an incidental unruptured IA (78). These results are consistent with an antiestrogenic effect of cigarette smoking (20), which should become even more apparent after the menopause when endogenous estrogen production is decreased and thus have a greater impact on the risk of postmenopausal IA.

## Estrogen Effect on Cerebral Artery Matrix and Elastic Mechanical Properties

Vascular remodeling is an important process in the pathogenesis of IA characterized by the degradation of the internal elastic lamina of aneurysmal walls and dynamic modification of extracellular matrix components such as elastin, collagens, and proteoglycan leading to weakening of the arterial wall (79, 80).



Arterial wall undergoes postmenopausal extracellular matrix changes similar to those occurring in the skin and bones, including a decrease in collagen and water content that leads to thinning and loss of elasticity offering a favorable ground to IA (81, 82). These changes particularly affect the media, which is the layer richest in collagen and elastin of the arterial wall. In contrast, thanks to the positive effect of estrogens on connective tissue and its turnover, hormone replacement has morphological effect on the carotid arteries in postmenopausal women, preserving the thickness of the arterial media layer (83).

In rats with IA, an imbalance between MMP-9 and MMP-2 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 is responsible for extracellular matrix degradation in the arterial walls leading to the progression and rupture of IA (84, 85) (Figure 3). In the same experimental model, the reduction in the incidence of IA rupture produced by treatment with the ER modulator bazedoxifene is associated with a significant decrease of MMP-9 expression that, on the contrary, was upregulated by ovariectomy (53). Estradiol administration has been also shown to inhibit the formation of lipid peroxidation products and restore middle cerebral arterial viscoelasticity and compliance in aged female rats (86, 87). In a rabbit model of IA induced by carotid ligation, estrogen deficiency, in combination with hypertension, increases vessel length and tortuosity in the circle of Willis, probably by lowering the tolerance of vascular tissue to hemodynamic stresses caused by carotid ligation, making it more vulnerable to flow-induced aneurysmal remodeling (88).

## POTENTIAL ROLE OF 15-HYDROXYPROSTAGLANDIN DEHYDROGENASE (15-PGDH)

The key role of COX-2/PGE2/NF- $\kappa$ B pathway in IA pathogenesis and its participation in the sex difference of the disease was further supported by the sex difference in the effect of aspirin on IA and the potential role of the PGE2 degrading enzyme 15-PGDH. Interestingly, frequent use of aspirin decreased the risk of IA rupture more significantly in men than in women (89, 90). This difference in aspirin effect was reproduced in male and female mice in an experimental model of IA (89). The beneficial effect of aspirin in mice is associated with a decreased expression of inflammatory molecules in cerebral arteries, which has been ascribed to its inhibitory action of COX-2 (89). In an attempt to identify the mechanisms involved in the differential effect of aspirin on IA in male and female, gene expression analysis in cerebral arteries has revealed a lower expression of 15-PGDH and higher levels of proinflammatory molecules (COX-2, CD-68, MMP-9, MCP-1, and NF- $\kappa$ B) in treated females than in treated males. 15-PGDH is the main enzyme of prostaglandin degradation that stops the biological activity of PGE2 by converting it to 15-keto-PGE2, an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) agonist. Thus, even if the activity of COX-2 is reduced by aspirin, the low level of 15-PGDH in female could contribute to maintaining, at least in part the activity of the PGE2/NF- $\kappa$ B

pathway. Indeed, expression of COX-2, CD-68, MMP-9, MCP-1, and NF- $\kappa$ B was higher in cerebral arteries of aspirin-treated female mice than in treated males, and this difference and also the increased risk of IA rupture between males and females were completely equalized by treatment a 15-PGDH activator (89). This observation further supports the essential role of 15-PGDH-mediated PGE2 degradation in the protective effect of aspirin. It also suggests that the low expression of 15-PGDH in cerebral artery in female might favor high shear stress-induced COX-2/PGE2/NF- $\kappa$ B pathway activation and the resulting maintained inflammation in arterial wall, thus participating to the increased propensity to IA rupture. Moreover, the low catalytic activity of 15-PGDH also limits the activation of PPAR $\gamma$  shown to decrease IA formation and rupture (91, 92).

## CONCLUSION

Experimental works driven over the past decades to understand the well-known higher prevalence of IA women compared with men have gathered knowledge that allows us to propose different mechanisms that would be involved. One of them lies in the anatomic difference of the circle of Willis between men and women, with diameters and geometry of bifurcation of the arteries leading to higher hemodynamic stresses in women, driving more severe endothelial damage which favors IA formation. In addition, cigarette smoking appears to have a greater impact on IA in women than in men, an effect that could be related to the low level of 15-PGDH described in cerebral artery in female, and as a consequence, a stronger prooxidative damaging action of smoking in women. However, although these unmodifiable and modifiable risk factors predispose women to IA, they are counteracted by the protective effects of estrogens, acting on multiple steps of IA formation including, endothelial dysfunction, inflammation, and oxidative stress. The loss of these estrogen-mediated protecting mechanisms at menopause thus plays a major role in the critical increase in IA prevalence in women over the age of 50 years.

It is obvious that multiple combined mechanisms are responsible for the gender differences of IA disease. As in any disease, sex differences in IA may be linked to sex hormones but also to nonhormonal factors dependent of the genes present in the X and Y chromosomes. Currently, the vast majority of studies, in humans and animal models, have focused on the role of sex hormones, more particularly of estrogens, and further research is needed to determine the part of each of these mechanisms in the female susceptibility to IA. Moreover, beside biological sex influences on IA pathophysiology, the psycho-sociocultural construct of gender can further participate to the difference between men and women. Societal, cultural, behavioral, and psychological factors may add to or modulate the biological factors involved in men and women differences toward IA formation and rupture.

Regarding IA patient care, despite the significant data that demonstrate the negative impact of female sex on IA incidence and rupture, this important variable is surprisingly largely neglected in clinical practice. However, even if the

mechanisms involved are not elucidated, the current data would nevertheless make it possible to propose ways to improve the management of women suspected or diagnosed with IA. First, it would be relevant to consider women as a high-risk group. Second, given the strong impact of hemodynamic and oxidative stress on IA in women, the implementation of intensive strategies to lower blood pressure and promote cigarette smoking cessation seems to be strongly warranted in women.

There is no doubt that our understanding of the mechanisms underlying sex differences in IA will improve further in the coming years and contribute to a better understanding of the pathophysiology of IA. The challenge will then be to transform this knowledge into means to improve the prevention of IA formation, progression, and rupture, and more globally for a better care of IA patients, both women and men.

## REFERENCES

- Alfano JM, Kolega J, Natarajan SK, Xiang J, Paluch RA, Levy EI, et al. Intracranial aneurysms occur more frequently at bifurcation sites that typically experience higher hemodynamic stresses. *Neurosurgery*. (2013) 73:497–505. doi: 10.1227/NEU.0000000000000016
- Frosen J, Tulamo R, Paetau A, Laaksamo E, Korja M, Laakso A, et al. Saccular intracranial aneurysm: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol*. (2012) 123:773–86. doi: 10.1007/s00401-011-0939-3
- Suarez JI, Tarr RW, Selman WR. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *N Engl J Med*. (2006) 354:387–96. doi: 10.1056/NEJMra052732
- Van Gijn J, Kerr RS, Rinkel GJ. Subarachnoid hemorrhage. *Lancet*. (2007) 369:306–18. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60153-6
- Harrod CG, Batjer HH, Bendok BR. Deficiencies in estrogen-mediated regulation of cerebrovascular homeostasis may contribute to an increased risk of cerebral aneurysm pathogenesis and rupture in menopausal and postmenopausal women. *Med Hypotheses*. (2006) 66:736–56. doi: 10.1016/j.mehy.2005.09.051
- Jamous MA, Nagahiro S, Kitazato KT, Satomi J, Satoh K. Role of estrogen deficiency in the formation and progression of cerebral aneurysms. Part I: experimental study of the effect of oophorectomy in rats. *J Neurosurg*. (2005) 103:1046–51. doi: 10.3171/jns.2005.103.6.1046
- Juvela S. Risk of subarachnoid hemorrhage from a de novo aneurysm. *Stroke*. (2001) 32:1933–4. doi: 10.1161/01.STR.32.8.1933
- Juvela S, Porras M, Heiskanen O. Natural history of unruptured intracranial aneurysms: a long-term follow-up study. *J Neurosurg*. (1993) 79:174–82. doi: 10.3171/jns.1993.79.2.0174
- Longstreth WT, Jr., Koepsell TD, Yerby MS, Van Belle G. Risk factors for subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. (1985) 16:377–85. doi: 10.1161/01.STR.16.3.377
- Longstreth WT, Nelson LM, Koepsell TD, Van Belle G. Subarachnoid hemorrhage and hormonal factors in women. A population-based case-control study. *Ann Intern Med*. (1994) 121:168–73. doi: 10.7326/0003-4819-121-3-199408010-00002
- Mhurchu, C.N., Anderson, C., Jamrozik, K., Hankey, G., Dunbabin, D., Australasian Cooperative Research on Subarachnoid Hemorrhage Study, G. Hormonal factors and risk of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: an international population-based, case-control study. *Stroke*. (2001) 32:606–12. doi: 10.1161/01.STR.32.3.606
- Stirone C, Duckles SP, Krause DN. Multiple forms of estrogen receptor-alpha in cerebral blood vessels: regulation by estrogen. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. (2003) 284:E184–92. doi: 10.1152/ajpendo.00165.2002
- Stober T, Sen S, Anstatt T, Freier G, Schimrigk K. Direct evidence of hypertension and the possible role of post-menopause oestrogen deficiency in the pathogenesis of berry aneurysms. *J Neurol*. (1985) 232:67–72. doi: 10.1007/BF00313903
- Vlak MH, Algra A, Brandenburg R, Rinkel GJ. Prevalence of unruptured intracranial aneurysms, with emphasis on sex, age, comorbidity, country, and time period: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. (2011) 10:626–36. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70109-0
- Ghods AJ, Lopes D, Chen M. Gender differences in cerebral aneurysm location. *Front Neurol*. (2012) 3:78. doi: 10.3389/fneur.2012.00078
- Hamdan A, Barnes J, Mitchell P. Subarachnoid hemorrhage and the female sex: analysis of risk factors, aneurysm characteristics, and outcomes. *J Neurosurg*. (2014) 121:1367–73. doi: 10.3171/2014.7.JNS132318
- Krzyzewski RM, Klis KM, Kucala R, Polak J, Kwinta BM, Starowicz-Filip A, et al. Intracranial aneurysm distribution and characteristics according to gender. *Br J Neurosurg*. (2018) 32:541–3. doi: 10.1080/02688697.2018.1518514
- Aarhus M, Helland CA, Wester K. Differences in anatomical distribution, gender, and sidedness between ruptured and unruptured intracranial aneurysms in a defined patient population. *Acta Neurochir (Wien)*. (2009) 151:1569–74. doi: 10.1007/s00701-009-0316-3
- Ellamushi HE, Grieve JP, Jager HR, Kitchen ND. Risk factors for the formation of multiple intracranial aneurysms. *J Neurosurg*. (2001) 94:728–32. doi: 10.3171/jns.2001.94.5.0728
- Kongable GL, Lanzino G, Germanson TP, Truskowski LL, Alves WM, Torner JC, et al. Gender-related differences in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. (1996) 84:43–8. doi: 10.3171/jns.1996.84.1.0043
- Ostergaard JR, Hog E. Incidence of multiple intracranial aneurysms. Influence of arterial hypertension and gender. *J Neurosurg*. (1985) 63:49–55. doi: 10.3171/jns.1985.63.1.0049
- Park SK, Kim JM, Kim JH, Cheong JH, Bak KH, Kim CH. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage in young adults: a gender comparison study. *J Clin Neurosci*. (2008) 15:389–92. doi: 10.1016/j.jocn.2007.04.007
- Dharmadhikari S, Atchaneeyasakul K, Ambekar S, Saini V, Hauszen DC, Yavagal D. Association of Menopausal Age with Unruptured Intracranial Aneurysm Morphology. *Interv Neurol*. (2020) 8:109–15. doi: 10.1159/000496701
- Backes D, Rinkel GJ, Laban KG, Algra A, Vergouwen MD. Patient- and Aneurysm-Specific Risk Factors for Intracranial Aneurysm Growth: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Stroke*. (2016) 47:951–7. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.012162
- Kubo Y, Koji T, Kashimura H, Otawara Y, Ogawa A, Ogasawara K. Female sex as a risk factor for the growth of asymptomatic unruptured cerebral saccular aneurysms in elderly patients. *J Neurosurg*. (2014) 121:599–604. doi: 10.3171/2014.5.JNS132048
- Horiuchi T, Tanaka Y, Hongo K. Sex-related differences in patients treated surgically for aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurol Med Chir*. (2006) 46:328–32; discussion 32. doi: 10.2176/nmc.46.328



27. De Marchis GM, Schaad C, Fung C, Beck J, Gralla J, Takala J, et al. Gender-related differences in aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a hospital based study. *Clin Neurol Neurosurg.* (2017) 157:82–7. doi: 10.1016/j.clineuro.2017.04.009
28. De Rooij NK, Linn FH, Van Der Plas JA, Algra A, Rinkel GJ. Incidence of subarachnoid haemorrhage: a systematic review with emphasis on region, age, gender and time trends. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* (2007) 78:1365–72. doi: 10.1136/jnnp.2007.116755
29. Eden SV, Meurer WJ, Sanchez BN, Lisabeth LD, Smith MA, Brown DL, et al. Gender and ethnic differences in subarachnoid hemorrhage. *Neurology.* (2008) 71:731–5. doi: 10.1212/01.wnl.0000319690.82357.44
30. Bonita R, Thomson S. Subarachnoid hemorrhage: epidemiology, diagnosis, management, and outcome. *Stroke.* (1985) 16:591–4. doi: 10.1161/01.STR.16.4.591
31. Risselada R, De Vries LM, Dippel DW, Van Kooten F, Van Der Lugt A, Niessen WJ, et al. Incidence, treatment, and case-fatality of non-traumatic subarachnoid haemorrhage in the Netherlands. *Clin Neurol Neurosurg.* (2011) 113:483–7. doi: 10.1016/j.clineuro.2011.02.015
32. Turan N, Heider RA, Zaharieva D, Ahmad FU, Barrow DL, Pradilla G. Sex differences in the formation of intracranial aneurysms and incidence and outcome of subarachnoid hemorrhage: review of experimental and human studies. *Transl Stroke Res.* (2016) 7:12–9. doi: 10.1007/s12975-015-0434-6
33. Lin B, Chen W, Ruan L, Chen Y, Zhong M, Zhuge Q, et al. Sex differences in aneurysm morphologies and clinical outcomes in ruptured anterior communicating artery aneurysms: a retrospective study. *BMJ Open.* (2016) 6:e009920. doi: 10.1136/bmjopen-2015-009920
34. Lindner SH, Bor AS, Rinkel GJ. Differences in risk factors according to the site of intracranial aneurysms. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* (2010) 81:116–8. doi: 10.1136/jnnp.2008.163063
35. Rehman S, Chandra RV, Zhou K, Tan D, Lai L, Asadi H, et al. Sex differences in aneurysmal subarachnoid haemorrhage (sSAH): aneurysm characteristics, neurological complications, and outcome. *Acta Neurochir (Wien).* (2020) 162:2271–82. doi: 10.1007/s00701-020-04469-5
36. Forget TR, Benitez R, Veznedaroglu E, Sharan A, Mitchell W, Silva M, et al. A review of size and location of ruptured intracranial aneurysms. *Neurosurgery.* (2001) 49:1322–5; discussion 5–6. doi: 10.1097/00006123-200112000-00006
37. Diabougua MR, Morel S, Bijlenga P, Kwak BR. Role of hemodynamics in initiation/growth of intracranial aneurysms. *Eur J Clin Invest.* (2018) 48:e12992. doi: 10.1111/eci.12992
38. Horikoshi T, Akiyama I, Yamagata Z, Sugita M, Nukui H. Magnetic resonance angiographic evidence of sex-linked variations in the circle of willis and the occurrence of cerebral aneurysms. *J Neurosurg.* (2002) 96:697–703. doi: 10.3171/jns.2002.96.4.0697
39. Mujagic S, Moranjkic M, Mesanovic N, Osmanovic S. The inner diameter of arteries of the Circle of Willis regarding gender and age on magnetic resonance angiography. *Acta Medica Saliniana.* (2013) 42:6–12. doi: 10.5457/342
40. Shatri J, Bexheti D, Bexheti S, Kabashi S, Krasniqi S, Ahmetgjakaj I, et al. Influence of gender and age on average dimensions of arteries forming the circle of Willis study by magnetic resonance angiography on Kosovo's population. *Open Access Maced J Med Sci.* (2017) 5:714–9. doi: 10.3889/oamjms.2017.160
41. Lindeklev HM, Valen-Sendstad K, Morgan MK, Mardal KA, Faulder K, Magnus JH, et al. Sex differences in intracranial arterial bifurcations. *Genet Med.* (2010) 7:149–55. doi: 10.1016/j.genm.2010.03.003
42. Alnaes MS, Isaksen J, Mardal KA, Romner B, Morgan MK, Ingebrigtsen T. Computation of hemodynamics in the circle of Willis. *Stroke.* (2007) 38:2500–5. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.482471
43. Rahman M, Smietana J, Hauck E, Hoh B, Hopkins N, Siddiqui A, et al. Size ratio correlates with intracranial aneurysm rupture status: a prospective study. *Stroke.* (2010) 41:916–20. doi: 10.1161/STROKEAHA.109.574244
44. Leblanc R. Familial cerebral aneurysms. A bias for women. *Stroke.* (1996) 27:1050–4. doi: 10.1161/01.STR.27.6.1050
45. Sijtsma LC, Rinkel GJ, Ruijgrok YM. Sex-related clustering of intracranial aneurysms within families. *Stroke.* (2015) 46:1107–9. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.008798
46. Ding C, Toll V, Ouyang B, Chen M. Younger age of menopause in women with cerebral aneurysms. *J Neurointerv Surg.* (2013) 5:327–31. doi: 10.1136/neurintsurg-2012-010364
47. Chen M, Ouyang B, Goldstein-Smith L, Feldman L. Oral contraceptive and hormone replacement therapy in women with cerebral aneurysms. *J Neurointerv Surg.* (2011) 3:163–6. doi: 10.1136/jnis.2010.003855
48. Fontaine C, Morfoisse F, Tatin F, Zamora A, Zahreddine R, Henrion D, et al. The impact of estrogen receptor in arterial and lymphatic vascular diseases. *Int J Mol Sci.* (2020) 21. doi: 10.3390/ijms21093244
49. Oka M, Ono I, Shimizu K, Kushamae M, Miyata H, Kawamata T, et al. The bilateral ovariectomy in a female animal exacerbates the pathogenesis of an intracranial aneurysm. *Brain Sci.* (2020) 10. doi: 10.3390/brainsci10060335
50. Tada Y, Makino H, Furukawa H, Shimada K, Wada K, Liang EI, et al. Roles of estrogen in the formation of intracranial aneurysms in ovariectomized female mice. *Neurosurgery.* (2014) 75:690–5; discussion 5. doi: 10.1227/NEU.0000000000000528
51. Tamura T, Jamous MA, Kitazato KT, Yagi K, Tada Y, Uno M, et al. Endothelial damage due to impaired nitric oxide bioavailability triggers cerebral aneurysm formation in female rats. *J Hypertens.* (2009) 27:1284–92. doi: 10.1097/HJH.0b013e328329d1a7
52. Hoh BL, Rojas K, Lin L, Fazal HZ, Hourani S, Nowicki KW, et al. Estrogen deficiency promotes cerebral aneurysm rupture by up regulation of Th17 cells and interleukin-17A which downregulates E-cadherin. *J Am Heart Assoc.* (2018) 7. doi: 10.1161/JAHA.118.008863
53. Maekawa H, Tada Y, Yagi K, Miyamoto T, Kitazato KT, Korai M, et al. Bazedoxifene, a selective estrogen receptor modulator, reduces cerebral aneurysm rupture in Ovariectomized rats. *J Neuroinflammation.* (2017) 14:197. doi: 10.1186/s12974-017-0966-7
54. Jamous MA, Nagahiro S, Kitazato KT, Tamura T, Kuwayama K, Satoh K. Role of estrogen deficiency in the formation and progression of cerebral aneurysms. Part II: experimental study of the effects of hormone replacement therapy in rats. *J Neurosurg.* (2005) 103:1052–7. doi: 10.3171/jns.2005.103.6.1052
55. Chalouhi N, Hoh BL, Hasan D. Review of cerebral aneurysm formation, growth, and rupture. *Stroke.* (2013) 44:3613–22. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.002390
56. Frosen J, Cebral J, Robertson AM, Aoki T. Flow-induced, inflammation-mediated arterial wall remodeling in the formation and progression of intracranial aneurysms. *Neurosurg Focus.* (2019) 47:E21. doi: 10.3171/2019.5.FOCUS19234
57. Hashimoto T, Meng H, Young WL. Intracranial aneurysms: links among inflammation, hemodynamics and vascular remodeling. *Neurol Res.* (2006) 28:372–80. doi: 10.1179/016164106X14973
58. Jamous MA, Nagahiro S, Kitazato KT, Tamura T, Aziz HA, Shono M, et al. Endothelial injury and inflammatory response induced by hemodynamic changes preceding intracranial aneurysm formation: experimental study in rats. *J Neurosurg.* (2007) 107:405–11. doi: 10.3171/JNS-07/08/0405
59. Aoki T, Nishimura M. Targeting chronic inflammation in cerebral aneurysms: focusing on NF-kappaB as a putative target of medical therapy. *Expert Opin Ther Targets.* (2010) 14:265–73. doi: 10.1517/14728221003586836
60. Stirone C, Boroujerdi A, Duckles SP, Krause DN. Estrogen receptor activation of phosphoinositide-3 kinase, akt, and nitric oxide signaling in cerebral blood vessels: rapid and long-term effects. *Mol Pharmacol.* (2005) 67:105–13. doi: 10.1124/mol.104.004465
61. Warfvinge K, Krause DN, Maddahi A, Edvinsson JCA, Edvinsson L, Haanes KA. Estrogen receptors alpha, beta and GPER in the CNS and trigeminal system - molecular and functional aspects. *J Headache Pain.* (2020) 21:131. doi: 10.1186/s10194-020-01197-0
62. Thorin E, Pham-Dang M, Clement R, Mercier I, Calderone A. Hyper-reactivity of cerebral arteries from ovariectomized rats: therapeutic benefit of tamoxifen. *Br J Pharmacol.* (2003) 140:1187–92. doi: 10.1038/sj.bjp.0705547
63. Tsang SY, Yao X, Chan FL, Wong CM, Chen ZY, Laher I, et al. Estrogen and tamoxifen modulate cerebrovascular tone in ovariectomized female rats. *Hypertension.* (2004) 44:78–82. doi: 10.1161/01.HYP.0000131659.27081.19
64. Aoki T, Kataoka H, Ishibashi R, Nozaki K, Egashira K, Hashimoto N. Impact of monocyte chemoattractant protein-1 deficiency on cerebral aneurysm formation. *Stroke.* (2009) 40:942–51. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.532556
65. Aoki T, Kataoka H, Shimamura M, Nakagami H, Wakayama K, Moriwaki T, et al. NF-kappaB is a key mediator of cerebral aneurysm formation. *Circulation.* (2007) 116:2830–40. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.728303

66. Jayaraman T, Berenstein V, Li X, Mayer J, Silane M, Shin YS, et al. Tumor necrosis factor alpha is a key modulator of inflammation in cerebral aneurysms. *Neurosurgery*. (2005) 57:558–64; discussion-64. doi: 10.1227/01.NEU.0000170439.89041.D6
67. Wajima D, Hourani S, Dodd W, Patel D, Jones C, Motwani K, et al. Interleukin-6 promotes murine estrogen deficiency-associated cerebral aneurysm rupture. *Neurosurgery*. (2020) 86:583–92. doi: 10.1093/neuros/nyz220
68. Yokosuka K, Rutledge C, Kamio Y, Kuwabara A, Sato H, Rahmani R, et al. Roles of Phytoestrogen in the Pathophysiology of Intracranial Aneurysm. *Stroke*. (2021) 52:2661–70. doi: 10.1161/STROKEAHA.120.032042
69. Ospina JA, Brevig HN, Krause DN, Duckles SP. Estrogen suppresses IL-1beta-mediated induction of COX-2 pathway in rat cerebral blood vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. (2004) 286:H2010–9. doi: 10.1152/ajpheart.00018.2003
70. Ospina JA, Duckles SP, Krause DN. 17beta-estradiol decreases vascular tone in cerebral arteries by shifting COX-dependent vasoconstriction to vasodilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. (2003) 285:H241–50. doi: 10.1152/ajpheart.00018.2003
71. Aoki T, Nishimura M, Matsuoka T, Yamamoto K, Furuyashiki T, Kataoka H, et al. PGE(2) -EP(2) signalling in endothelium is activated by haemodynamic stress and induces cerebral aneurysm through an amplifying loop via NF-kappaB. *Br J Pharmacol*. (2011) 163:1237–49. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01358.x
72. Sheinberg DL, Mccarthy DJ, Elwardany O, Bryant JP, Luther E, Chen SH, et al. Endothelial dysfunction in cerebral aneurysms. *Neurosurg Focus*. (2019) 47:E3. doi: 10.3171/2019.4.FOCUS19221
73. Starke RM, Chalouhi N, Ali MS, Jabbour PM, Tjounmakaris SI, Gonzalez LF, et al. The role of oxidative stress in cerebral aneurysm formation and rupture. *Curr Neurovasc Res*. (2013) 10:247–55. doi: 10.2174/15672026113109990003
74. Aoki T, Nishimura M, Kataoka H, Ishibashi R, Nozaki K, Hashimoto N. Reactive oxygen species modulate growth of cerebral aneurysms: a study using the free radical scavenger edaravone and p47phox(-/-) mice. *Lab Invest*. (2009) 89:730–41. doi: 10.1038/labinvest.2009.36
75. Starke RM, Thompson JW, Ali MS, Pascale CL, Martinez Lege A, Ding D, et al. Cigarette Smoke Initiates Oxidative Stress-Induced Cellular Phenotypic Modulation Leading to Cerebral Aneurysm Pathogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. (2018) 38:610–21. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.310478
76. Bonita R. Cigarette smoking, hypertension and the risk of subarachnoid hemorrhage: a population-based case-control study. *Stroke*. (1986) 17:831–5. doi: 10.1161/01.STR.17.5.831
77. Lindkleiv H, Sandvei MS, Njolstad I, Lochen ML, Romundstad PR, Vatten L, et al. Sex differences in risk factors for aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a cohort study. *Neurology*. (2011) 76:637–43. doi: 10.1212/WNL.0b013e31820c30d3
78. Ogilvy CS, Gomez-Paz S, Kicieliński KP, Salem MM, Akamatsu Y, Waqas M, et al. Cigarette smoking and risk of intracranial aneurysms in middle-aged women. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. (2020) 91:985–90. doi: 10.1136/jnnp-2020-323753
79. Chalouhi N, Ali MS, Jabbour PM, Tjounmakaris SI, Gonzalez LF, Rosenwasser RH, et al. Biology of intracranial aneurysms: role of inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab*. (2012) 32:1659–76. doi: 10.1038/jcbfm.2012.84
80. Frosen J, Piippo A, Paetau A, Kangasniemi M, Niemela M, Hernesniemi J, et al. Remodeling of saccular cerebral artery aneurysm wall is associated with rupture: histological analysis of 24 unruptured and 42 ruptured cases. *Stroke*. (2004) 35:2287–93. doi: 10.1161/01.STR.0000140636.30204.da
81. Brincat MP, Calleja-Agius J, Baron YM. The skin carotid and intervertebral disc: making the connection! *Climacteric*. (2007) 10 Suppl 2:83–7. doi: 10.1080/13697130701591998
82. Calleja-Agius J, Brincat M. The effect of menopause on the skin and other connective tissues. *Gynecol Endocrinol*. (2012) 28:273–7. doi: 10.3109/09513590.2011.613970
83. Baron YM, Galea R, Brincat M. Carotid artery wall changes in estrogen-treated and -untreated postmenopausal women. *Obstet Gynecol*. (1998) 91:982–6. doi: 10.1097/00006250-199806000-00021
84. Aoki T, Kataoka H, Morimoto M, Nozaki K, Hashimoto N. Macrophage-derived matrix metalloproteinase-2 and -9 promote the progression of cerebral aneurysms in rats. *Stroke*. (2007) 38:162–9. doi: 10.1161/01.STR.0000252129.18605.c8
85. Aoki T, Kataoka H, Moriwaki T, Nozaki K, Hashimoto N. Role of TIMP-1 and TIMP-2 in the progression of cerebral aneurysms. *Stroke*. (2007) 38:2337–45. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.481838
86. Qin Z, Li G, Liu N, Zhao C, Zhao H. Effect of estrogen administration on middle cerebral arterial viscoelastic properties in aged female rats. *Acta Cir Bras*. (2016) 31:661–7. doi: 10.1590/S0102-865020160100000004
87. Wang SJ, Zhao SJ, Wang YS, Yu T, Luo M. Effects of estrogen intervention on the biomechanical characteristics of serum SOD, MDA, and middle cerebral artery in aged female rats. *Clin Exp Obstet Gynecol*. (2015) 42:295–9. doi: 10.12891/ceog1756.2015
88. Tutino VM, Mandelbaum M, Takahashi A, Pope LC, Siddiqui A, Kolega J, et al. Hypertension and Estrogen Deficiency Augment Aneurysmal Remodeling in the Rabbit Circle of Willis in Response to Carotid Ligation. *Anat Rec (Hoboken)*. (2015) 298:1903–10. doi: 10.1002/ar.23205
89. Chalouhi N, Starke RM, Correa T, Jabbour PM, Zanaty M, Brown RD, et al. Differential sex response to aspirin in decreasing aneurysm rupture in humans and mice. *Hypertension*. (2016) 68:411–7. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07515
90. Hasan DM, Mahaney KB, Brown RD, Meissner I, Piepgras DG, Huston J, et al. Aspirin as a promising agent for decreasing incidence of cerebral aneurysm rupture. *Stroke*. (2011) 42:3156–62. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.619411
91. Hasan DM, Starke RM, Gu H, Wilson K, Chu Y, Chalouhi N, et al. Smooth muscle peroxisome proliferator-activated receptor gamma plays a critical role in formation and rupture of cerebral aneurysms in mice *in vivo*. *Hypertension*. (2015) 66:211–20. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05332
92. Shimada K, Furukawa H, Wada K, Korai M, Wei Y, Tada Y, et al. Protective role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in the development of intracranial aneurysm rupture. *Stroke*. (2015) 46:1664–72. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.007722

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Fréneau, Baron-Menguy, Vion and Loirand. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.





**Titre :** Rôle de variants génétiques rares d'*ANGPTL6* et de *CTSO* dans la formation des anévrismes intracrâniens

**Mots clés :** anévrisme intracrânien, cellule musculaire lisse, *ANGPTL6*, *CTSO*

**Résumé :** L'anévrisme intracrânien (AIC) est une dilatation locale des artères cérébrales. Sa rupture provoque une hémorragie méningée mortelle dans 40% des cas et mène à des handicaps sévères chez la moitié des survivants. L'AIC touche 3% de la population générale et les formes familiales représentent 10% des cas. Par une approche de séquençage d'exome dans des formes familiales d'AIC, notre laboratoire a identifié deux gènes dans lesquels des variants rares étaient présents chez les membres atteints : *ANGPTL6* et *CTSO*, variants prédits comme dommageables pour leur fonction. Ces gènes codent respectivement pour l'angiopoiétine-like 6 (*ANGPTL6*) et la cathepsine O (*CTSO*). *ANGPTL6* est une glycoprotéine circulante sécrétée par le foie et a un rôle dans l'angiogenèse développementale, le variant identifié  $\Delta$ -*ANGPTL6* empêche sa sécrétion. *CTSO* est une protéase à cystéine dont le substrat est inconnu, mais d'autres cathepsines sont connues pour être impliquées dans le remodelage vasculaire et surexprimées dans l'AIC. L'objectif de cette étude est d'identifier le rôle de ces deux protéines dans les artères et dans la formation des AIC.

La génération d'un modèle de souris exprimant le variant  $\Delta$ -*ANGPTL6* ainsi que des analyses *in vitro* dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) ont permis de montrer que les souris mutées présentent une dysfonction endothéliale, des dilatations focales des artères cérébrales ainsi qu'une angiogenèse altérée par un retard de recrutement des CMLV. *In vitro*, *ANGPTL6* contribue à l'adhésion et réduit la migration des CMLV. L'analyse de *CTSO* montre que dans la paroi artérielle, la protéine est majoritairement exprimée dans les CMLV et sa sécrétion est stimulée par l'étirement. La déplétion de *CTSO* dans les CMLV accélère leur adhésion sur une matrice de fibronectine, favorise leur phénotype contractile et augmente l'expression de la fibronectine. La surexpression des variants de *CTSO*, comparées à la forme sauvage, induit également une augmentation de l'expression de la fibronectine. Ces données suggèrent que *CTSO* pourrait dégrader la fibronectine et que les variants identifiés perdent cette capacité. Ce travail apporte les bases à la compréhension des mécanismes par lesquels les variants d'*ANGPTL6* et de *CTSO* prédisposent à l'AIC.

**Title :** Role of rare genetic variants of *ANGPTL6* and *CTSO* in intracranial aneurysm formation

**Keywords :** intracranial aneurysm, smooth muscle cell, *ANGPTL6*, *CTSO*

**Abstract :** An intracranial aneurysm (IA) is a local dilatation of the cerebral arteries. Its rupture causes a subarachnoid haemorrhage which is fatal in 40% of cases and leads to severe disabilities in half of the survivors. IA affects 3% of the general population and familial forms represent 10% of cases. Using whole exome sequencing approach in familial forms of IA, our laboratory identified two genes in which rare variants were present in affected members: *ANGPTL6* and *CTSO*, variants predicted to be damaging for their function. These genes encode for angiotensin-like 6 (*ANGPTL6*) and cathepsin O (*CTSO*) respectively. *ANGPTL6* is a circulating glycoprotein secreted by the liver and has a role in developmental angiogenesis, the identified  $\Delta$ -*ANGPTL6* variant impairs its secretion. *CTSO* is a cysteine protease with an unknown substrate, but other cathepsins are known to be involved in vascular remodelling and overexpressed in IA. The aim of this study is to identify the role of these two proteins in cerebral arteries and IA formation.

Generation of a mouse model expressing the  $\Delta$ -*ANGPTL6* variant and *in vitro* analyses in vascular smooth muscle cells (VSMC) showed that mutant mice exhibit endothelial dysfunction, focal dilatations of cerebral arteries and impaired angiogenesis due to delayed recruitment of VSMC. *In vitro*, *ANGPTL6* contributes to adhesion and reduces VSMC migration.

Analysis of *CTSO* shows that in the arterial wall, the protein is predominantly expressed in VSMC and its secretion is stimulated by stretch. Depletion of *CTSO* in VSMC accelerates their adhesion to a fibronectin matrix, promotes their contractile phenotype and increases fibronectin expression. Overexpression of *CTSO* variants, compared to the wild type, also induces an increase in fibronectin expression. These data suggest that *CTSO* may degrade fibronectin and that the identified variants lose this ability. This work provides the basis for understanding the mechanisms by which *ANGPTL6* and *CTSO* variants predispose to IA.