



HAL
open science

Développement d'une approche de thérapie cellulaire de l'anévrisme de l'aorte abdominale utilisant les fibroblastes gingivaux chez la souris

Andréas Giraud

► **To cite this version:**

Andréas Giraud. Développement d'une approche de thérapie cellulaire de l'anévrisme de l'aorte abdominale utilisant les fibroblastes gingivaux chez la souris. Biologie cellulaire. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB029 . tel-01589201

HAL Id: tel-01589201

<https://theses.hal.science/tel-01589201>

Submitted on 18 Sep 2017

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.

Université Paris V – René Descartes

THÈSE

Pour l'obtention du titre de Docteur

École Doctorale Bio Sorbonne Paris Cité
Discipline : Biologie Cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

Andréas Giraud

Le 10 juin 2016

**DÉVELOPPEMENT D'UNE APPROCHE DE THÉRAPIE
CELLULAIRE DE L'ANÉVRISME DE L'AORTE
ABDOMINALE UTILISANT LES
FIBROBLASTES GINGIVAUX
CHEZ LA SOURIS**

Projet doctoral dirigé par :

Pr. Antoine Lafont et Pr. Hafid Aït-Oufella

Jury :

Pr. Philippe Ménasché
Dr. Georges Uzan
Dr. Patrick Lacolley
Pr. Pierre Coste
Pr. Antoine Lafont
Pr. Hafid Aït-Oufella

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Directeur de thèse
Directeur de thèse



Ce projet doctoral a bénéficié d'une convention CIFRE et a été financé par la société Scarcell Therapeutics. Les travaux de recherche on été réalisés au centre de recherche cardiovasculaire de Paris situé à l'HEGP dans l'unité INSERM U970. Ce projet a été encadré par le Pr Hafid Aït-Oufella (INSERM U970) et le Pr Antoine Lafont (Scarcell Therapeutics).

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, les Pr Patrick Lacolley et Pr Georges Uzan d'avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs, ainsi que le Pr Philippe Ménasché et le Pr Pierre Coste d'avoir accepté d'examiner mes travaux. Merci d'avoir consacré du temps à l'évaluation de ce projet.

Je remercie le Pr Antoine Lafont de m'avoir fait venir sur Paris, d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse et de financer ce projet doctoral. Merci de m'avoir permis de réaliser ces travaux au centre de recherche cardiovasculaire, au PARCC !

J'exprime une profonde gratitude envers le Pr Hafid Aït-Oufella, tu m'as donné ma chance et tu as cru en moi. Merci de m'avoir intégré dans l'équipe du Dr Ziad Mallat, d'avoir pris du temps pour faire avancer mon projet doctoral. J'ai beaucoup appris en discutant de mes résultats avec toi, ton encadrement a été très précieux et m'a permis de grandir dans la construction de mes idées et du raisonnement scientifique.

Je remercie le Dr Alain Tedgui de m'avoir accueilli au sein de l'unité INSERM U970 durant ma période doctorale, mais aussi de son soutien quand ma situation était incertaine à la fin de ma première année.

Je remercie toute l'équipe du Dr Ziad Mallat d'avoir été à mes côtés durant ces années de doctorat. Je remercie la sous team HAO et particulièrement Lynda Zeboudj, ma petite sœur de thèse, de toute l'aide que tu m'as apportée pour mener à bien ce projet mais aussi pour ton soutien personnel, si j'y suis arrivé, tu y arriveras brillamment. Merci à Marie Vandestienne, notre bretonne à la chevelure de feu, pour ton aide technique en histologie mais surtout pour soutien sans faille, j'espère que mes prochains voisins de bureau seront aussi cool que toi. Je remercie aussi Jérémie Joffre alias « JJ Joffer », le bras droit d'Hafid, pour avoir partagé ses connaissances mais aussi de m'avoir remis en jambe à Aquaboulevard, j'ai une forme olympique maintenant ! Merci à Raphaël Cohen et Jean-Rémi Lavillegrand, les M2 qui ont mis l'ambiance dans l'équipe durant l'année 2015, vous êtes des graines de futurs chercheurs. Je remercie la sous team Taleb : Yacine Haddad pour son courage, sa patience, sa gentillesse et sa détermination, tu es vraiment un mec bien. Je remercie Sarvenaz Metghalchi de m'avoir fait rire pendant ces trois années, le coup du petit

poucet avec la poubelle de quarantaine trainée à l'animalerie restera gravé dans les annales. Je remercie Bruno Esposito de m'avoir appris les techniques de prélèvement et de chirurgie de la souris mais aussi pour toutes les blagues que tu as pu dire durant ces années. Je remercie le Dr Martin Steinmetz de m'avoir fait comprendre que la recherche « ça prend son temps ». Je remercie aussi Daniela Cabuzu, Jérémie Lemarié, Ludivine Laurans, Soraya Taleb, Stéphane Potteaux et Wared Nour.

Je remercie l'équipe du Dr Jean-Sébastien Silvestre de m'avoir aidé à de nombreuses reprises. Je remercie particulièrement Ivana Zlatanova, mon amie, on a fait les 400 coups au PARCC et en dehors tout en faisant le job les « jours ouvrés ». Au delà de ces moments de fête, merci de ton aide et de ta disponibilité au quotidien, tu as la fibre du chercheur, je suis persuadé que tu atteindras tes objectifs. Je tiens aussi à remercier le Dr José Vilar, le brillant ingénieur toujours prêt à rendre service et à partager ses connaissances techniques et scientifiques, mais surtout parce que tu trouves toujours la solution, merci pour ton aide. Je remercie Mathilde Lemitre de m'avoir accompagné pendant ma première année de thèse dans notre ancienne équipe. Je remercie aussi Ada Ngkelo, Kiave Ho Wang Yin et Cristina Pinto.

Je remercie aussi l'équipe du Dr Chantal Boulanger et particulièrement les deux algériens Marouane Kheloufi et Adel Hammoutene pour tous les moments passés ensemble à parler de science ou bien de quand nous ferions la prochaine soirée, vous êtes bons les gars. Marouane, il faut arrêter de venir bosser tous les week-ends et Adel continue de grandir comme ça ! Je remercie aussi le Dr Xavier Loyer, j'ai mis du temps à comprendre que tu étais un nounours, dur en apparence mais très gentil dans le fond, ne lâche pas Aquaboulevard, ça te rend meilleur. Merci à Juliette Lasselin, toujours prête à faire du sport ou la fête, mais aussi Marion Tanguy pour ses si bons gâteaux, et à Johan Poisson, Javier Perez-Hernandez, Cécile Devue, Dominique Charue et Sihem Sadoudi.

Je remercie Elizabeth Huc pour m'avoir apporté son soutien pendant ces trois dernières années aussi bien personnellement que professionnellement. Merci de la gestion presque parfaite de ton animalerie, cela permet à tous les chercheurs de travailler dans les meilleures conditions. Je remercie Nicolas Perez, Michel Salavado et Dominique Mace pour la gestion de nos lignées de souris. Merci aussi à Stacy Lecherbourg de m'avoir aidé à suturer les souris pendant prêt d'un an. Je remercie Pauline Chaillié pour toutes ces parties

de rigolade au PARCC puis à Toulouse. Je remercie Véronique Oberweis, notre « maman poule », pour ton efficacité dans la gestion des commandes et des comptes de la Team Mallat. Est-ce que le petit poussin deviendra coq ? Merci à Stéphanie Lamoureux pour ta disponibilité et la gestion du magasin et de la laverie, mais sache qu'un jour les Girondins seront meilleurs que le PSG, et je reviendrai décorer ton bureau ! Je remercie aussi Julie Piquet pour sa gentillesse et pour m'avoir fait assister à une opération à cœur ouvert sur un mouton. Je tiens à remercier particulièrement le secrétaire général du PARCC, Mr Philippe Coudol pour sa gestion administrative du centre de recherche, mais aussi de nous laisser la possibilité d'organiser les soirées d'Halloween et de la Summer Party, merci aussi pour l'organisation de la retraite annuelle et d'animer toutes ces soirées en tant que DJ, tu gères !

Je remercie l'équipe du Dr Eric Camerer et particulièrement Sylvain Le Gall d'avoir répondu à toutes mes questions scientifiques ainsi que pour sa sympathie, je te remercie aussi pour LA recette des crêpe Bretonnes ! Merci aussi à Ludovic Couty pour m'avoir formé à la culture cellulaire de FG et pour sa gestion du L2. Je remercie aussi Aline Chevalier, Salomé Gazit et Ramzi Nehmar. Je tiens aussi à remercier l'ancienne équipe du Dr Guillaume Duménil et particulièrement Arthur Charles-Orszag pour toutes les discussions scientifiques et constructives que j'ai eu avec toi, je remercie aussi Valentina Lo-Schiavo et Hebert Echenique mon ancien voisin de bureau. Merci aussi à Bamba Gaye pour ses multiples invitations à boire un petit Nespresso, tu es un mec balèze, je crois que je n'atteindrai jamais ton 1,97m, pourtant je fais du sport et mange de la soupe...

Je remercie l'équipe du Dr Pierre-Louis Tharaux et particulièrement Julien Vernerey avec qui chaque déjeuner était une partie de rigolade, tu nous manques ! Je remercie Pierre Nivoit pour toutes ses explications concernant la chirurgie de la souris et beaucoup d'autres domaines. Je remercie aussi Léa Guyonnet du BDE et Carole Hénique de sa gentillesse et pour m'avoir fourni la souris Tomato.

Je remercie l'équipe du Dr Dominique Eladari, Juliette Hadchouel pour ses précieux conseils sur l'optimisation des conditions de chirurgie chez la souris. Je remercie également Bettina Serbin pour son aide dans l'organisation de la Summer Party et sa bonne humeur quotidienne. Je remercie aussi les inséparables Maria Chavez et Francesco Trepiccione,

toujours prêts à faire la fête mais surtout pour leur ouverture d'esprit. Je remercie aussi les nouveaux mariés Chloé Rafael et Nikita Radionov, je vous souhaite le meilleur.

Je remercie le Pr Sylvie Séguier pour son soutien depuis mon arrivée au PARCC, mais aussi pour ses enseignements concernant les FG et leur isolation à partir de la gencive de souris. Je remercie aussi Chahrazade Kantari pour toutes les discussions sur le milieu de la recherche et pour sa gentillesse.

Je remercie mon ami Yann Sellier que j'ai rencontré lors des auditions de l'école doctorale, depuis, on ne s'est plus lâché ! On a partagé les galères de la thèse mais aussi les bons moments.

Je tiens à remercier Les Cartésiens de m'avoir initié à la vie associative, merci à Vanessa Zeponi, Aurélie Coubart, Laurianne Bessière et David Gomez. Je remercie aussi les membres de la Confédération des Jeunes Chercheurs, vous m'avez ouvert les yeux sur les enjeux et la reconnaissance du doctorat, ce qui m'a aidé à poursuivre mon projet doctoral. Je remercie particulièrement les membres du chantier Guide Du Doctorat avec qui nous avons passé de nombreux week-ends dans la salle de conférence du PARCC à rédiger des fiches pratiques sur le doctorat, merci à Jean-Tristan Brandenburg, Carole Chapin, Juliette Guérin, Philippe Gambette, Clément Courvoisier.

Je remercie ma famille pour son soutien sans faille avant, pendant et j'en suis sûr après le doctorat, merci mille fois.

Au delà de l'activité de recherche au laboratoire, j'ai partagé de grand moments avec les membres de l'unité U970, je remercie toutes les personnes qui m'ont accompagné dans mes aventures : à la Summer School et la visite des terres du Grand Condé, au GRRC de Toulouse, au Ski à la station les Orres, au RDV hebdomadaire à la table des habitués du Terminus Ballard et aux sportifs d'Aquaboulevard pendant les cours de body pump.

Table des matières

I. Introduction.....	10
1. Epidémiologie des maladies cardiovasculaires.....	10
2. Facteurs de risque.....	11
a) Sexe	11
b) Polymorphisme nucléotidique.....	12
c) Tabac	12
d) Hypertension artérielle	13
e) Cholestérol	13
f) Diabète.....	13
II. Généralités	15
1. Le système cardiovasculaire	15
a) Définition	15
b) Les vaisseaux sanguins	15
c) L'aorte	16
2. Structure de la paroi artérielle	17
a) L'intima.....	17
b) La média.....	18
c) L'adventice.....	19
3. La matrice extracellulaire de la paroi artérielle	19
a) L'élastine	20
b) Les collagènes	21
c) Les protéoglycanes	22
d) Les glycoprotéines de structure.....	22
4. Dégradation de la matrice extracellulaire	23
a) Les métalloprotéinases matricielles	23
b) Les inhibiteurs des MMPs.....	26
c) Les cathepsines.....	27
III. L'anévrisme de l'aorte abdominale	29
1. Généralités.....	29
a) Définition	29
b) Diagnostic	30
c) Traitements.....	30
La cure chirurgicale	31

Traitement endovasculaire	31
2. Physiopathologie de l'AAA	32
a) Dysfonction endothéliale.....	34
b) Remodelage matriciel de l'anévrisme de l'aorte abdominale.....	34
c) Réponse inflammatoire	36
Les monocytes / macrophages	36
Les lymphocytes	37
Les neutrophiles	38
Les mastocytes	39
Les cytokines	39
3. Les modèles animaux d'AAA.....	40
a) Modèle de perfusion d'élastase	40
b) Application d'élastase péri-aortique	41
c) Application de CaCl ₂ péri-aortique	42
d) Les souris hypercholestérolémiques	43
e) Infusion d'angiotensine II	43
f) Infusion d'angiotensine II et neutralisation du TGF-β	45
IV. Thérapie cellulaire	46
1. Historique	46
2. Les cellules souches et thérapies innovantes.....	46
a) Les cellules souches embryonnaires	48
b) Les cellules souches pluripotentes induites	48
c) Les cellules souches mésenchymateuses.....	49
d) Le potentiel thérapeutique des fibroblastes gingivaux.....	51
Les fibroblastes	51
Les fibroblastes gingivaux	52
Phénotype.....	53
Capacité de différenciation	54
Remodelage de la matrice extracellulaire	55
Propriétés immunomodulatrices des FG	56
Utilisation des FG à des fins thérapeutiques.....	57
3. Thérapie cellulaire de l'anévrisme de l'aorte abdominale.....	60
a) Les cellules musculaires lisses	60
b) Les cellules souches mésenchymateuses	61
Implantation de « feuillets cellulaires »	61
Implantation péri-adventitielle d'une prothèse	62
Administration par voie intravasculaire.....	62
Implantation par cathétérisation.....	63

Injection directe dans la paroi de l'aorte.....	64
c) Les fibroblastes gingivaux	64
Présentation du projet de thèse.....	66
Article.....	69
Discussion.....	99
Perspectives.....	102
ANNEXE.....	103
Bibliographie.....	106

Liste des abréviations :

AAA : Anévrisme de l'aorte abdominale

Ang II : Angiotensine II

CML : Cellule musculaire lisse

CSE : Cellule souche embryonnaire

CSM : Cellule souche mésenchymateuse

EGF : Facteur de croissance épidermique (Epidermal Growth Factor)

FG : Fibroblaste gingival

FGF2 : Facteur de croissance fibroblastique 2 (Fibroblast Growth Factor 2)

GAG : Glycosaminoglycane

HTA : Hypertension artérielle

IDO : Indoleamine 2,3-dioxygénase

IFN γ : Interféron gamma

IGF-1: Facteur de croissance ressemblant à l'insuline-1 (Insulin-like Growth Factor-1)

ICAM-1 : Molécule d'adhésion intercellulaire-1 (Inter Cellular Adhesion Molecule -1)

IL : Interleukine

iPSC : Cellule souche pluripotente induite

LDL : Lipoprotéine de basse densité (Low Density Lipoprotein)

MEC : Matrice extracellulaire

MMP : Métalloprotéinase matricielle (Matrix MetalloProteinase)

NO : Monoxyde d'azote

PG : Protéoglycane

PGE2 : Prostaglandine E2

PNN : Polynucléaire neutrophile

TGF- β 1 : Facteur de croissance tumorale *beta*-1 (Tumor Growth Factor *beta*-1)

TIMP : Inhibiteur tissulaire de métalloprotéinase (Tissue Inhibitor of MetalloProteinase)

tPA : Activateur du plasminogène tissulaire

TNF α : Facteur de nécrose tumorale *alpha* (Tumor Necrosis Factor)

uPA : Activateur du plasminogène de type urokinase

VCAM-1 : Molécule d'adhésion cellulairevasculaire-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1)

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (Vascular Endothelial Growth Factor)

I. Introduction

1. Épidémiologie des maladies cardiovasculaires

Les pathologies cardiovasculaires sont responsables de 17,5 millions de morts par an. Elles représentent la première cause de mortalité dans le monde selon un rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé de 2011 (1). En France, les maladies cardiovasculaires représentent 25,9% des décès et se classent juste derrière les décès par cancer (29,7%) d'après les dernières données du CépiDc (Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès) datant de 2011 (Tableau 1).

	2007	2008	2009	2010	2011
Décès	520 535	530 643	535 366	539 083	534 571
Décès cardiovasculaires	145 272 (28%)	146 527 (27,6%)	144 343 (26,9%)	142 456 (26,4%)	138 168 (25,9%)
Décès par cancer	156 135 (30%)	157 812 (29,7%)	159 444 (29,8%)	158 848 (29,5%)	159 098 (29,7%)

Tableau 1 : Évolution du nombre de décès cardiovasculaires et de décès par cancer rapportés à l'ensemble des décès en France de 2007 à 2011.

Source CépiDc (Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès)

Les études épidémiologiques confortées par des expérimentations animales ont permis de mettre évidence au cours des dernières décennies plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire associés à une incidence accrue de la maladie. Ces facteurs peuvent être d'origine génétique, physiologique et/ou pathologique et encore environnementale. De nombreux modèles mathématiques d'estimation du risque cardiovasculaire global découlent de ces études. Les plus connues sont l'étude Framingham qui organise un suivi exhaustif des

habitants d'une ville depuis plus de 30 ans (2) et le projet SCORE, modèle dérivé de 12 cohortes issues de pays européens (3).

Les anévrismes de l'aorte abdominale (AAA) représentent la 3^e cause de décès d'origine cardiovasculaire et la 15^e cause de mortalité dans les pays industrialisés (4). L'AAA est établi lorsque le diamètre de l'aorte abdominale est augmenté de plus de 50% (5). La prévalence de l'AAA chez les personnes de plus de 60 ans est estimée entre 4 et 8% chez l'homme et entre 0,5 et 1,5% chez la femme. Sa prévalence augmente avec l'âge (6). Le risque majeur de l'AAA est la rupture dont le taux de mortalité atteint 80% en l'absence de prise en charge chirurgicale (7). En France, environ 6 000 décès sont causés par des anévrismes rompus chaque année. La progression de l'AAA est variable d'un patient à l'autre, elle est évaluée à 0,2-0,5 cm par an.

2. Facteurs de risque

Les principaux facteurs de risque de survenue d'un AAA sont le sexe, l'hérédité, l'âge supérieur à 60 ans et le tabagisme. Le tabagisme est le facteur de risque le plus fortement associé aux AAA (8). Les principaux mécanismes de pathogénèse induits par le tabac incluent des modifications épigénétiques, une augmentation de l'activité des métalloprotéinases matricielles (MMPs) et une réponse immunitaire altérée (9). L'hypertension artérielle (HTA), la sédentarité et l'hypercholestérolémie (fraction LDL élevée) sont également des facteurs de risque cardiovasculaire significatifs mais modérés (10). L'hypertriglycéridémie et l'obésité ne semblent pas être associés aux AAA (11). Le diabète et l'activité physique régulière sont des facteurs plutôt protecteurs (12). L'étude Tromso a mis en évidence une forte association entre les facteurs de risque de l'athérosclérose et ceux de l'AAA (13).

a) Sexe

Il est actuellement bien établi que le risque cardiovasculaire augmente avec l'âge. En général, l'homme est nettement plus exposé aux accidents cardio-vasculaires que la femme en période d'activité génitale. En particulier, il a été montré que la prévalence de l'AAA augmente avec l'âge chez l'homme et la femme, mais elle est nettement supérieure chez les

hommes (7,6% *versus* 1,3% entre 65 et 80 ans) (14). De manière surprenante, la proportion de femmes, tout âge confondu, mourant de maladies cardiovasculaires est plus importante que celle des hommes (15). En effet, les femmes ayant développées un AAA ont un risque de rupture trois fois plus important que les hommes (16).

b) Polymorphisme nucléotidique

Les études de GWAS (Genome Wide Association Studies) d'association pangénomique dans les maladies coronaires ont permis d'identifier 32 *loci* portant des polymorphismes nucléotidiques (SNP : Single Nucléotide Polymorphism) associés à un risque plus élevé de maladies cardiovasculaires (17). Parmi les SNP identifiés, deux sont associés au métabolisme du cholestérol et à la réponse aux statines. Ils sont portés par les *loci* 1p13.3 et 11q23.3. Un autre SNP identifié au niveau du locus 9p21.3 du gène codant pour la protéine P16 est associé à un risque accru de 29% par allèle porté de développer un AAA ou un anévrisme intra-cérébral.

D'autres études basées sur l'histoire familiale ou sur des jumeaux montrent une héritabilité de l'athérosclérose et des AAA allant de 30% à 70% (8). Cependant, seul un faible pourcentage de l'héritabilité s'explique par ces polymorphismes (9).

c) Tabac

Le tabagisme représente un risque majeur de développer une maladie cardiovasculaire et notamment un AAA. D'après une méta-analyse ayant inclus 500 000 personnes âgées de 60 ans dans 25 études de cohortes internationales, les fumeurs actifs ont un risque de décès d'origine cardiovasculaire multiplié par 2 par rapport aux non-fumeurs (18). Par ailleurs, d'autres études réalisées chez l'animal montrent que le tabagisme augmente l'incidence des AAA (19). En effet, l'exposition chronique à la fumée de cigarette augmente la pression artérielle, l'expression des MMPs, altère la réponse lymphocytaire T et entraîne des modifications épigénétiques favorisant le développement des AAA (10).

d) Hypertension artérielle

L'hypertension artérielle est également un facteur de risque important pour les maladies cardiovasculaires. Le risque augmente avec le niveau de pression artérielle. L'hypertension est principalement due à une augmentation des résistances vasculaires périphériques qui conduit à un remodelage incluant notamment une augmentation de la rigidité artérielle. L'hypertension peut être associée à une élévation de la concentration d'angiotensine II (Ang II), puissant vasoconstricteur, qui participe au développement des AAA et à l'augmentation de la taille des plaques d'athérosclérose chez des souris hypercholestérolémiques (20). Les mécanismes d'agression vasculaires induits par l'Ang II sont multiples et incluent une augmentation de l'inflammation, de l'expression des métalloprotéases matricielles et d'un stress oxydant (21).

e) Cholestérol

Le lien entre l'hypercholestérolémie et les maladies cardiovasculaires est bien établi, essentiellement pour les maladies coronaires. L'élévation du cholestérol total, et du LDL-cholestérol (LDL-c) en particulier, est associée à une augmentation du risque coronarien athéro-thrombotique (22). Chez l'homme, l'hypercholestérolémie a été identifiée comme un facteur de risque modéré d'AAA (23). Dans les modèles animaux, l'hypercholestérolémie induite par un régime riche en matières grasses augmente l'incidence des AAA après plusieurs mois de régime (24).

f) Diabète

La maladie coronaire est la première cause de mortalité et de morbidité chez les patients diabétiques, avec un risque pouvant être multiplié par 4 par rapport aux sujets non diabétiques. Une étude a d'ailleurs montré que la mortalité cardiovasculaire des diabétiques n'ayant jamais eu d'évènement coronaire est comparable à celle des sujets non diabétiques ayant déjà fait un infarctus (25). Les patients diabétiques présentent également des

particularités dans le développement de l'athérosclérose avec des lésions plus inflammatoires et plus riches en débris nécrotiques que les non diabétiques (26).

Le diabète est associé à une prévalence et une progression plus faible de la maladie anévrismale (27). Les mécanismes physiopathologiques qui expliquent cette protection ne sont pas élucidés ; la glycation de la matrice extracellulaire (MEC) empêcherait la protéolyse de la paroi (28) et l'épaisseur pariétale plus marquée chez les patients diabétiques ont été évoqués (29).

II. Généralités

1. Le système cardiovasculaire

a) Définition

Le système cardiovasculaire est un circuit fermé qui assure le transport du sang du cœur vers les extrémités et les divers organes, et un retour de ceux-ci vers le cœur. Le sang est composé de globules rouges, de globules blancs, de plaquettes et de plasma. La circulation du sang permet le transport et l'échange de nutriments, d'oxygène et d'hormones. Elle participe également à l'élimination des déchets métaboliques. Le système vasculaire est compartimenté et hiérarchisé depuis l'aorte à la sortie du cœur jusqu'au retour veineux.

b) Les vaisseaux sanguins

Les artères conduisent le sang éjecté à haute pression par le cœur vers la périphérie et maintiennent la pression sanguine (figure 1).

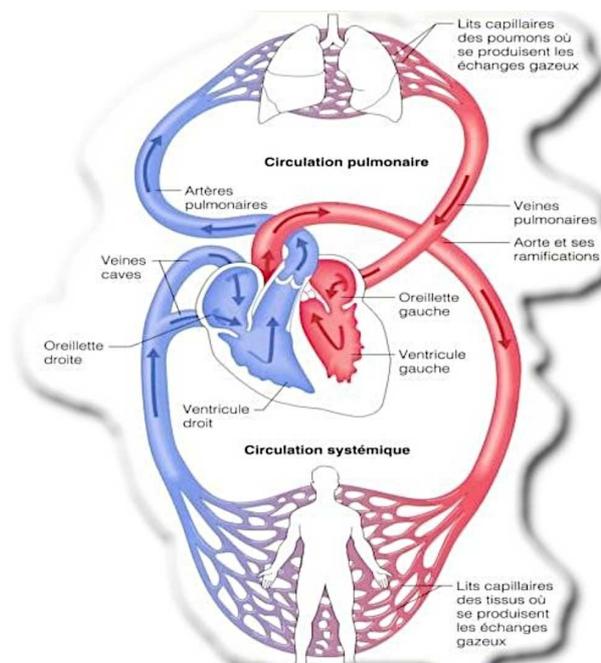


Figure 1 : Schéma du système cardio-vasculaire

<https://anatomiehumaine.wordpress.com>

Il existe deux types d'artères. Les artères de gros calibre (1 à 4 cm) dites artères élastiques sont composées essentiellement d'élastine. Elles amortissent la pulsativité artérielle à la sortie du cœur. Les artères, de moyen ou petit calibre, sont appelées artères musculaires. Elles sont moins riches en élastine, moins extensibles que les artères élastiques. Elles ont pour rôle de distribuer et de réguler le sang en périphérie en fonction des besoins métaboliques de chaque organe. Les artères de résistance se divisent ensuite en artérioles qui présentent un diamètre inférieur à 0,5 mm avec une composition similaire aux artères musculaires.

Les capillaires enfin ont une longueur de 1 mm et un diamètre compris entre 8 et 10 μm . Les capillaires sont formés d'une monocouche cellulaire endothéliale reposant sur une membrane basale. Ils assurent les échanges entre les tissus périphériques.

Les veines canalisent le retour du sang vers le cœur. Ce processus débute à la sortie du capillaire en empruntant des vaisseaux de petit calibre appelés veinules. Les veines possèdent une paroi très fine et une lumière plus importante que les artères. Elles possèdent des valves anti-reflux qui imposent une circulation sanguine à sens unique, de la périphérie vers le cœur.

c) L'aorte

L'aorte est la principale artère élastique de l'organisme. Elle assure le cheminement du sang éjecté par le ventricule gauche vers les organes. Au départ de l'aorte ascendante naissent les artères coronaires. L'aorte décrit ensuite une courbe appelée la crosse de l'aorte puis traverse le thorax et l'abdomen avant de se diviser en deux branches terminales : les artères iliaques primitives qui sont destinées essentiellement aux membres inférieurs (figure 2). L'aorte abdominale chemine à gauche de la veine cave inférieure, en avant du rachis. Les vaisseaux qui irriguent les organes intra-abdominaux naissent au niveau du tronc cœliaque (foie, rate) puis en continuant vers le bas : l'artère mésentérique supérieure (intestin grêle), les artères rénales, les artères gonadiques et l'artère mésentérique inférieure (côlon).

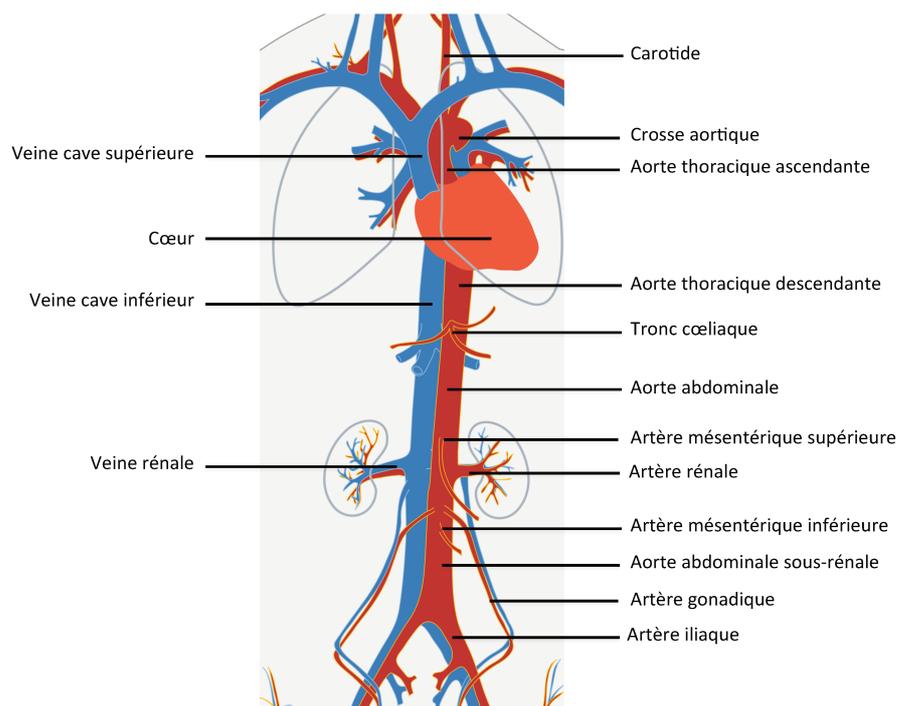


Figure 2 : Structure anatomique de l'aorte

2. Structure de la paroi artérielle

La paroi artérielle se compose de trois tuniques concentriques distinctes. Depuis la lumière vasculaire vers l'extérieur, on distingue l'intima, la média et l'adventice.

a) L'intima

L'intima est la tunique en contact avec la lumière vasculaire et le sang. Elle est constituée de l'endothélium et d'une membrane basale. L'endothélium se présente sous la forme d'une monocouche de cellules endothéliales (figure 3). Elles expriment à leur surface des protéines qui régulent le trafic des cellules circulantes dans le sang. Ces protéines permettent la migration des leucocytes vers les tissus dans des conditions normales et contrôlent l'augmentation de cette migration lors des phénomènes d'inflammation (30). Un grand nombre de molécules d'adhérence cellulaire ont été identifiées et sont pour la plupart,

réparties en quatre grandes familles de récepteurs adhésifs : les sélectines, la superfamille des immunoglobulines, les intégrines et les cadhérines.

Les cellules endothéliales exercent également un rôle essentiel dans plusieurs fonctions physiologiques (31). Elles régulent la coagulation, la fibrinolyse et le tonus vasomoteur (32).

Les cellules endothéliales sont tapissées d'une fine couche de glycosaminoglycanes chargés négativement appelée glycocalyx (33). Le manteau glycanique exerce des effets vasculoprotecteurs grâce à sa capacité à induire une réorganisation du cytosquelette de la cellule endothéliale sous-jacente en réponse à des modifications des contraintes de cisaillement du flux sanguin (34). Il est également impliqué dans la régulation de la production du NO, le maintien de la perméabilité vasculaire et le contrôle de coagulation (35).

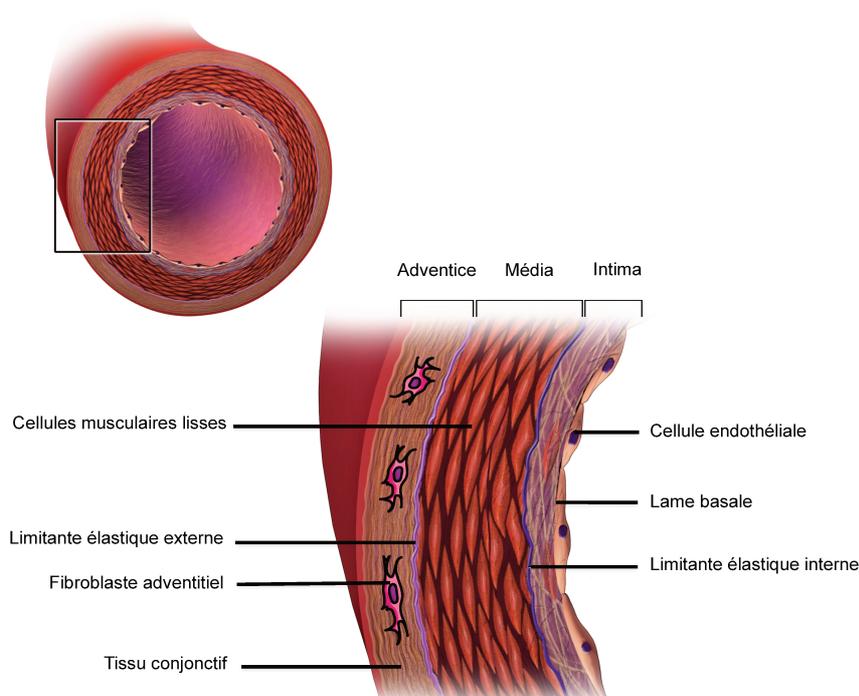


Figure 3 : Schéma de la paroi artérielle

Adapté de <https://en.wikiversity.org>

b) La média

La média est la tunique la plus épaisse des artères. Sa composition varie selon le type d'artère. Elle est très riche en lames élastiques dans les artères dites élastiques.

La média ne contient qu'un type cellulaire : les cellules musculaires lisses (CML). Ces cellules sont entourées de matrice extracellulaire et organisées en unités lamellaires associant fibre élastique, CML, bande de collagène et glycosaminoglycanes (36). Les CML maintiennent l'intégrité de la paroi vasculaire *via* deux fonctions, une fonction de synthèse en produisant les protéines de la matrice extracellulaire comme l'*alpha* actine (α SMA) et plus spécifiquement la protéine 22 *alpha* (SM22 α) du muscle lisse et une fonction contractile (37). Les CML sont sensibles à différents *stimuli* biochimiques (cytokines, angiotensine...) ou physiques (contraintes radiales) afin de maintenir l'intégrité de la paroi artérielle (38).

c) L'adventice

L'adventice est la tunique externe de la paroi artérielle. Elle commence après la limitante élastique externe et se termine au niveau de la graisse péri-adventitielle. C'est un tissu conjonctif constitué de fibres de collagène et de fibroblastes. Les fibroblastes produisent différents composants structuraux de la MEC, comme le collagène de type I et III et en quantité moindre de l'élastine (39). Les fibroblastes adventitiels expriment le facteur tissulaire permettant d'activer la voie extrinsèque de la coagulation lors de lésions de la paroi afin de limiter l'extravasation sanguine (40). L'adventice contient des terminaisons nerveuses permettant la modulation du tonus vasculaire par le système sympathique, des vaisseaux lymphatiques et enfin des *vasa-vasorum*, micro-vaisseaux permettant la perfusion de la paroi (41).

3. La matrice extracellulaire de la paroi artérielle

La MEC est le support structurel majeur de la paroi artérielle. Elle assure les propriétés d'élasticité et de solidité de la paroi. Les constituants les plus représentés de la MEC sont le collagène et l'élastine ; elle contient aussi des protéoglycanes et des glycoprotéines comme la fibronectine et la laminine (42). La MEC constitue également la structure d'ancrage pour les cellules vasculaires. Elle influence le phénotype, la survie et la différenciation cellulaire. Le renouvellement de la MEC de la paroi artérielle est un processus extrêmement lent. Il est assuré par un équilibre entre la synthèse des constituants par les cellules vasculaires et leur

dégradation par des enzymes protéolytiques comme les MMPs, l'élastase, la plasmine ou les cathepsines (43).

a) L'élastine

La synthèse de l'élastine débute par l'expression des gènes MFAP1, MFAP2, FBN1 et FBN2. Les glycoprotéines de structures qui en résultent, les fibrillines et les *Microfibril-Associated Glycoproteins* (MAGP), forment un échafaudage sur lequel la tropoélastine vient se fixer (figure 4) (44). Les molécules de tropoélastine sont ensuite liées les unes aux autres grâce à l'action de la lysyl oxydase (LOX) et des lysyl oxydase-like (LOXL) (45). La liaison des fibres élastiques aux cellules se fait *via* la fibuline-5. Elles forment alors un réseau tridimensionnel possédant une grande capacité de variation de taille et de forme, ce qui confère l'élasticité aux tissus vasculaires.

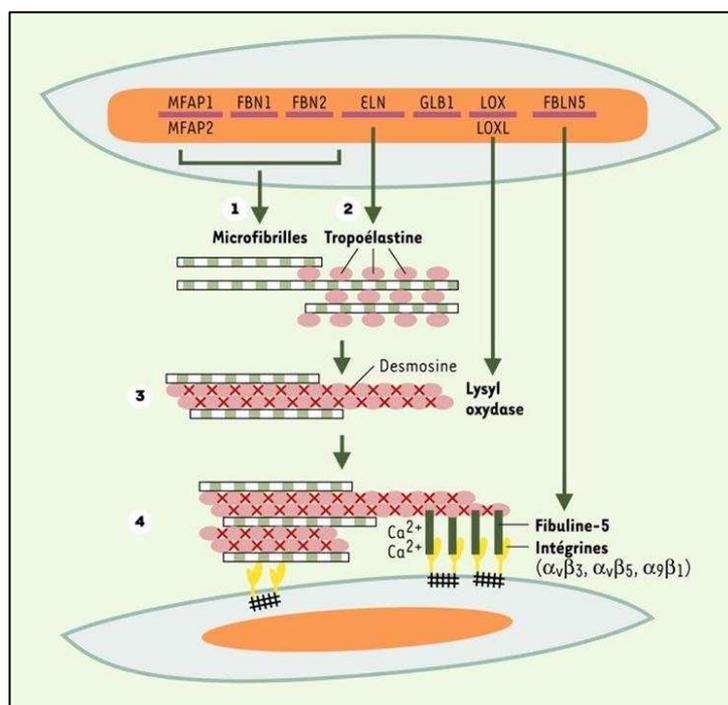


Figure 4 : Synthèse de l'élastine

Jacob MP, Médecine/Sciences 2003 (46)

Les fibres élastiques des artères contiennent 90% d'élastine. Elles sont organisées en lames concentriques parallèles à la surface du vaisseau. L'élastine a un rôle dans la morphogénèse vasculaire, elle a une fonction régulatrice au niveau artériel au cours du développement embryonnaire en contrôlant la prolifération des CML (47). Des facteurs solubles comme le *Transforming Growth Factor beta-1* (TGF- β 1), l'*Insulin-like Growth Factor* (IGF-1), l'*Interleukin 1-beta* (IL1- β), le *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF α) et l'*Interferon gamma* (IFN- γ) modulent la synthèse d'élastine (48). Les fibres élastiques sont des macro-molécules très stables, leur dégradation est catalysée par une enzyme, l'élastase qui est sécrétée dans la matrice extracellulaire par les macrophages et les polynucléaires.

Chez l'homme, l'hémizygotie du gène de l'élastine se traduit cliniquement par une sténose supra-avalvulaire aortique, pathologie artérielle isolée ou associée au syndrome de Williams-Beuren (49).

b) Les collagènes

Les collagènes sont les protéines les plus représentées dans l'organisme (50). Les collagènes forment une famille de 27 membres distincts regroupés en deux grandes sous-familles : les collagènes fibrillaires et les collagènes non-fibrillaires. Les collagènes fibrillaires de types I et III, synthétisés par les fibroblastes et les cellules musculaires lisses, sont présents dans toute la paroi vasculaire où ils représentent environ 80-90% du collagène total (51). Le collagène de type I, le plus abondant, assure le support structural du vaisseau, le collagène de type III est impliqué dans l'élasticité et l'extensibilité de la paroi. Les collagènes non-fibrillaires comme le collagène IV forment une charpente au niveau de la jonction dermo-épidermique et des membranes basales. La fonction principale des collagènes est de conférer une résistance mécanique à l'étirement des artères, mais contrairement à l'élastine, ils sont inextensibles.

Une mutation sur une chaîne α de collagène s'accompagne d'anomalies vasculaires décrites dans le syndrome d'Ehler-Danlos vasculaire de type IV (52). Les mutations des chaînes α 1 ou α 2 du collagène de type I sont responsables d'ostéogénèses imparfaites et de syndromes d'Ehlers-Danlos de type I, II, V et VII. Des mutations au niveau du collagène IV sont associées au syndrome d'Alport et des mutations du collagène VII à certaines formes d'épidermolyse bulleuse.

c) Les protéoglycanes

Les protéoglycanes (PGs) résultent de la combinaison, dans des proportions variables, de protéines et de glycosaminoglycanes (GAG) (53). Ce sont des composants essentiels de la MEC qui piègent l'eau nécessaire aux propriétés mécaniques des artères et forment un réseau hydraté dans lequel « baignent » les cellules. Les PGs contrôlent la perméabilité tissulaire et les mouvements des ions grâce à leur forte charge électrique négative. Ils participent à la régulation de la prolifération cellulaire en stockant des facteurs de croissance comme le FGF-2 (*fibroblast growth factor 2*) notamment par la présence d'héparanes sulfates qui contrôlent la biodisponibilité et la fonction de ces facteurs (54). En effet, leur localisation à l'interface membrane plasmique/MEC leur permet de contrôler l'intégrité structurale des tissus et d'influencer de nombreuses fonctions cellulaires comme la croissance, la différenciation, l'adhésion et la migration. Enfin, de par leur aptitude à former des complexes avec les autres molécules de la MEC, les PGs sont considérés comme essentiels pour le dépôt de la matrice synthétisée par les CML vasculaires.

d) Les glycoprotéines de structure

La différenciation et les fonctions des différentes cellules vasculaires nécessitent une interaction directe entre elles et la MEC. Les glycoprotéines de structure assurent ces interactions. Ces macromolécules sont des protéines sur lesquelles sont greffées de courtes chaînes glucidiques (55). Certaines sont ubiquitaires comme la fibronectine, d'autres ont des localisations spécifiques comme les laminines des membranes basales. La plupart de ces glycoprotéines sont des multimères. Elles ont en commun des domaines structuraux, des domaines fonctionnels, des sites de fixation aux cellules *via* les intégrines ou autres récepteurs dont le plus fréquent contient la séquence Arg-Gly-Asp (RGD) et des sites d'interactions avec les autres protéines de la MEC.

La fibronectine contribue à l'organisation de la matrice en favorisant l'adhérence des cellules à la MEC (56). Elle interagit avec les intégrines et participe à l'organisation du cytosquelette. Elle participe, *via* la formation de complexes fibronectine/intégrine, aux

processus de communication intercellulaire en stimulant des voies de transduction du signal, et module ainsi la prolifération, la différenciation et la motilité cellulaire. Les laminines sont les constituants protéiques majeurs de la lame basale. Ce sont des hétérotrimères de 850 kDa formés de chaînes α , β et γ . Elles participent à la structure des membranes basales dans lesquelles elles interagissent avec le collagène de type IV et les protéoglycanes à héparane sulfate (57). Les laminines modulent l'adhésion, la prolifération, la différenciation et la polarisation des cellules avec lesquelles elles interagissent *via* les intégrines.

Cheuk *et al.* ont rapporté une forte diminution de l'expression de l'intégrine $\alpha5\beta1$ dans les anévrismes des tissus aortiques et une corrélation avec la densité des cellules musculaires lisses (58). Etant donné que l'intégrine $\alpha5\beta1$ se lie d'une façon spécifique à la fibronectine et au collagène, ces résultats suggèrent que l'absence d'activité de l'intégrine $\alpha5\beta1$ pourrait modifier la liaison des protéines matricielles et altérer l'architecture de la média conduisant ainsi à la déformation anévrismale de l'aorte.

4. Dégradation de la matrice extracellulaire

La dégradation de la MEC au cours des processus pathologiques vasculaires est étroitement orchestrée par deux systèmes protéolytiques, celui de la plasmine constitué des activateurs du plasminogène, et les métalloprotéinases matricielles (MMPs) (59,60).

Les activités de ces enzymes sont régulées par des cascades protéolytiques dans l'espace péricellulaire. Des assemblages multiprotéiques au niveau des structures membranaires (intégrines, protéinases, éléments matriciels, inhibiteurs, activateurs, etc.) participent aussi à l'activité catalytique (61). Ces protéinases induisent par leur action la formation de peptides matriciels comme les matrikines, issues de la dégradation de l'élastine, qui régulent à leur tour l'expression des MMPs et des activateurs du plasminogène (62).

a) Les métalloprotéinases matricielles

Les MMPs sont des endopeptidases dépendantes du zinc appartenant à la grande famille des protéases. Elles sont fixées à la membrane ou sécrétées. Les MMPs régulent un grand nombre de processus biologiques par clivage protéique et participent au remodelage tissulaire

lors de la cicatrisation, à la signalisation intercellulaire, à l'inflammation et à l'angiogenèse (63). Les MMPs sont caractérisées par la présence d'un motif très conservé de fixation du zinc au niveau du site catalytique. La famille des MMPs comprend 22 membres divisés en sous-groupes : les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, les matrilysines, les MMPs associées à la membrane (MT-MMP) et les autres MMPs. Avec ses 22 membres, les MMPs peuvent dégrader tous les composants de la MEC.

D'un point de vue structurel, les MMPs peuvent être divisées en deux groupes : les MMPs sécrétées (A, B, C et E) et les MMPs transmembranaires (D et F) (64).

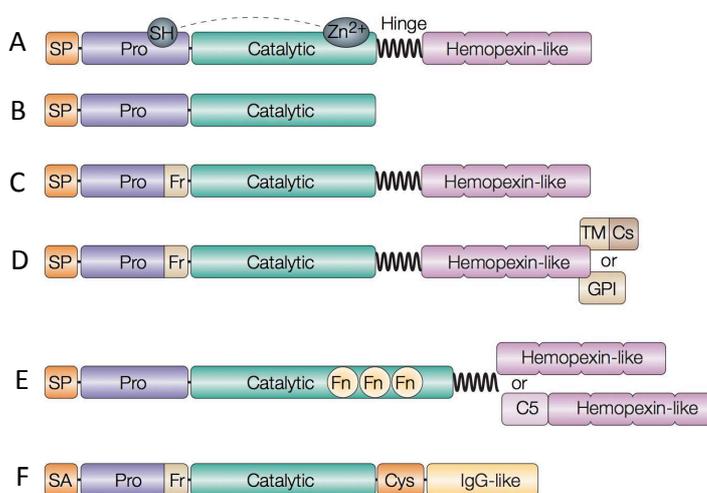


Figure 5 : Structure des MMPs

Parks W. et al., Nature Reviews Immunology 2004 (64)

Toutes les MMPs possèdent un signal peptidique N-terminal « SP » qui dirige les MMPs vers le réticulum endoplasmique au cours de la traduction puis hors de la cellule. Il est suivi d'un domaine « Pro » qui maintient l'enzyme dans un état latent jusqu'à son clivage et l'activation consécutive de l'enzyme. Le propeptide, qui contient un groupement thiol (SH) interagit avec le zinc, pour maintenir les MMPs sous une forme inactive appelée zymogène. Le domaine catalytique contient un site de liaison au zinc. A l'exception des MMP-7, -26 et -23, toutes les MMPs possèdent un domaine homologue à l'hémopexine connecté au site catalytique par une charnière polypeptidique « Hinge ». Ce domaine modifie l'affinité de l'enzyme pour certains substrats, régule son activité protéolytique, la liaison aux TIMPs, les inhibiteurs des MMPs. La première et la dernière répétition du domaine hémopexine sont reliées par un pont disulfure.

Les gélatinases (structure E) possèdent des domaines répétés liant le collagène sur les motifs fibronectine « Fn ». Le motif « Fr » permet la reconnaissance et l'activation de certaines MMPs sécrétées par les protéases de type furine (structure C). Ainsi, la plupart des MMPs sont constitutivement sécrétées après leur synthèse, sauf les MT-MMPs qui possèdent un domaine transmembranaire (TM) et une courte région cytoplasmique (Cs) ou un domaine d'ancrage au glycosylphosphatidylinositol (GPI) et sont exprimées à la surface de la cellule (structure D). La MMP-23 (structure F) est elle aussi transmembranaire et possède un signal d'ancrage N-terminal (SA) ainsi qu'un domaine riche en cystéines (Cys) et un domaine de type immunoglobuline (Ig).

MMP	Autre appellation	Structure
MMP-1 -8 -13 -18	Collagénase 1, 2, 3 et 4	A
MMP-2 -9	Gélatinase A et B	E
MMP-3 -10 -11	Stromélysine 1, 2 et 3	A
MMP-7 - 26	Matrilysine 1 et 2	B
MMP-12	Metalloélastase des macrophages	A
MMP-14 -15 -16 -17 -24 -25	MT1, 2, 3, 4, 5, 6-MMP	D
MMP-19	RAS1-1	A
MMP-20	Enamélysine	A
MMP-21 -22 -27	-	A
MMP-23	CA-MMP	F
MMP-28	Epilysine	C

Tableau 2 : Liste des MMPs

Adapté de Sternlicht M. et al., *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2001 (63)

La structure des MMPs leur confère donc des activités spécifiques pour leurs substrats matriciels. On distingue (65):

- Les collagénases qui peuvent cliver la triple hélice des collagènes natifs comme les collagènes de type I, II et III
- Les MMP-2 et -9 qui ont été caractérisées *in vitro* par leur capacité à cliver les fibres de collagène dénaturé d'où leurs noms de gélatinase A et B. Elles clivent le collagène IV qui est un composant essentiel des membranes basales et sont encore appelées collagénases de type IV. Les MMP-2 et -9 présentent également une activité élastase qui participe à la dégradation des fibres élastiques de la paroi artérielle. Les gélatinases sont également capables de libérer des facteurs de

croissance ancrés dans la MEC mais aussi d'en activer certains comme le TGF- β (66)

- La métallo-élastase macrophagique ou MMP-12 qui hydrolyse surtout l'élastine
- Les stromélysines qui dégradent puissamment les protéoglycanes et divers éléments de la matrice comme la laminine, la fibronectine, la gélatine et le collagène. La stromélysine-1 a aussi la capacité d'activer certaines métalloprotéases comme la collagénase interstitielle, les gélatinases ou la matrilysine
- Les matrilysines ainsi désignées en raison de leur activité protéolytique vis-à-vis de la quasi-totalité des constituants de la matrice dont l'élastine
- La MT1-MMP intervient surtout dans l'activation de la progélatinase A et permet de faciliter les phénomènes de migration cellulaire.

Considérées globalement, les MMPs peuvent dégrader la quasi-totalité des composants de la matrice extracellulaire et nécessitent un contrôle étroit de leur expression et de leur activité. Elles sont faiblement exprimées dans les tissus sains alors que leur expression est augmentée lors des processus de remodelage tissulaire physiologique ou pathologique (67). La production et l'activité des MMPs peuvent excéder celle de leurs inhibiteurs entraînant la perte de l'équilibre de la balance MMPs/TIMPs garant de la stabilité et du renouvellement tissulaire. Elles participent dans ces conditions à des processus divers comme la réparation tissulaire et la cicatrisation cutanée au cours des blessures, l'embryogenèse ou l'involution utérine, ou encore l'angiogenèse (68). Les MMPs sont associées à des états pathologiques variés comme les arthrites rhumatismales, les phénomènes d'invasion tumorale et de dissémination métastatique. Dans le cadre des maladies cardiovasculaires, le rôle capital des MMPs a été mis en évidence dans l'athérosclérose et également dans la formation et la progression de l'AAA (59).

b) Les inhibiteurs des MMPs

Une dégradation contrôlée et coordonnée des composants de la MEC est nécessaire à la régulation de nombreux processus biologiques. Cette régulation est assurée, entre autres, par les inhibiteurs des MMPs appelés TIMPs. Les quatre TIMPs identifiés à ce jour sont TIMP-1,

-2 -3 et -4. Ils inhibent l'activité de toutes les MMPs par formation d'un complexe non covalent avec l'enzyme sous sa forme active (69).

La capacité d'inactivation des MMPs par ces inhibiteurs est cependant limitée. Les TIMPs forment un complexe équimolaire avec les formes actives des MMPs. Ils se lient au domaine catalytique des MMPs et bloquent l'accès au centre actif contenant l'atome de zinc (69). Ces complexes sont stables et irréversibles. Les TIMPs inhibent l'activité des MMPs mais avec un certain degré de spécificité fonction de chaque TIMP. Par exemple TIMP-2 et -3 inhibent la MT1-MMP alors que le TIMP-1 en est incapable (70). Par ailleurs, TIMP-2, -3 et -4 sont capables de lier des ProMMPs comme la ProMMP-2, les TIMP-1 et -3 la ProMMP-9 (71). En dehors de leur activité inhibitrice des métalloprotéases, les TIMPs sont également des facteurs de croissance vis-à-vis d'un grand nombre de cellules (72,73). *In vitro*, TIMP-1 stimule la croissance des CML, des fibroblastes et des cellules endothéliales (74).

La régulation de l'expression des MMPs/TIMPs est modulée par des facteurs de croissance, des hormones et des cytokines (75). Seules la MMP-2 et les MT-MMPs sont exprimées de manière constitutive dans les tissus sains. Leur expression est fortement régulée par les interactions matrice-cellule (intégrines) ou les interactions cellule-cellule (couple CD40-CD40L entre lymphocytes T et CML) (76). Les cytokines jouent un rôle dans la stimulation ou l'induction de la synthèse des MMPs comme l'IL-1 β , le PDGF, le TNF- α (77) (78). A l'inverse, le TGF- β , les corticostéroïdes et l'acide rétinoïque ont un rôle plutôt inhibiteur de l'expression des MMPs (79-81). L'IL-1 β , IL-6, le TGF- β 1, les acides rétinoïques, le facteur de croissance épidermique (EGF) et l'oncostatine stimulent l'expression de TIMP-1.

c) Les cathepsines

Les cathepsines sont une classe de protéases lysosomales, elles sont activées par un environnement acide (82). Chez l'homme, il existe 14 sous-types de cathepsines : A, B, C, D, F, G, H, K, L, O, S, V, W et X. La plupart sont des cystéines-protéases, le reste étant des acides aspartique-protéases (D et E) ou sérine-protéases (G). Les cathepsines sont activées par hydrolyse du précurseur zymogène grâce au faible pH trouvé dans le lysosome. Les facteurs de risque de l'AAA comme le tabagisme, l'hypertension et l'athérosclérose induisent des dommages endothéliaux entraînant la sécrétion de cathepsine (83). L'activité des cathepsines

peut être modulée par deux facteurs : le pH et la présence d'inhibiteurs endogènes comme la cystatine C (84). Des facteurs pro-inflammatoires tels que le TNF- α et l'IFN- γ peuvent induire la sécrétion des cathepsines S et K qui peuvent dégrader l'élastine par les cellules endothéliales, les macrophages et les CML (85,86). Les cathepsines peuvent activer les MMPs. Ainsi la déficience en cathepsine S, qui diminue l'activité des MMP-2 et -9 ainsi que la cathepsine K, protège de la maladie anévrismale chez la souris (87).

III. L'anévrisme de l'aorte abdominale

1. Généralités

a) Définition

L'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA) correspond à une dilatation progressive de l'aorte caractérisée sur le plan histologique par un infiltrat inflammatoire local, une raréfaction des CML et une destruction des fibres élastiques. Les anévrismes peuvent apparaître sur tout l'arbre artériel mais la localisation abdominale est la plus fréquente (60% des cas).

Il existe trois formes anatomiques d'anévrismes (Figure 6). Les anévrismes dits « vrais » ou fusiformes, sont caractérisés par une déformation des trois tuniques de la paroi artérielle. Ils se présentent sous la forme d'un fuseau par une dilatation circonférentielle diffuse. Les anévrismes sacciformes, moins fréquents, ont la forme d'une excroissance latéralisée. Enfin, les pseudo-anévrismes ou anévrismes disséquant résultent d'une dissection secondaire à un traumatisme causant la rupture de l'intima et de la média de la paroi vasculaire, laissant ainsi le sang s'infiltrer et former une poche artificielle.

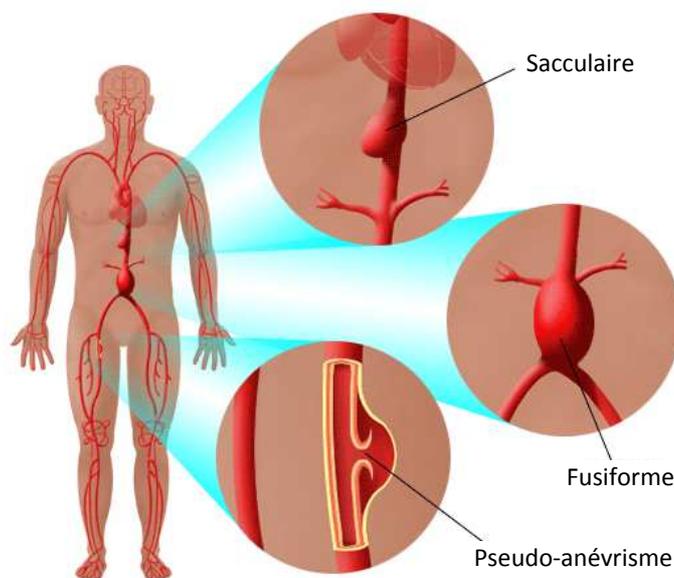


Figure 6 : Schéma des différents types d'anévrismes de l'aorte

Adapté de www.stanfordhealthcare.org

b) Diagnostic

La majorité des AAA sont asymptomatiques et sont découverts fortuitement au cours d'un examen systématique : examen physique de routine, IRM, scanner ou examen radiologique demandé pour un autre motif. Il n'existe à ce jour aucun marqueur biologique de la pathologie anévrismale utilisable en pratique courante. La palpation de l'AAA est sûre et n'augmente pas le risque de rupture. Sa sensibilité pour le diagnostic est plutôt faible mais reste fondamentale (8,88). Les deux examens complémentaires de référence sont l'échographie Doppler et l'angiocscanner. Les renseignements apportés par ces examens sont d'ordre quantitatif avec la mesure du diamètre externe adventice-adventice de l'AAA et qualitatif par mise en évidence de la morphologie, de la structure et de l'étendue de l'AAA.

L'échographie Doppler est un examen simple, fiable, non invasif et peu coûteux pour le dépistage, le diagnostic et le suivi de l'AAA. C'est l'examen recommandé pour le dépistage (89). Sa sensibilité varie de 92 à 99% selon les études et sa spécificité est proche de 100%. L'angiocscanner aortique affine le diagnostic de l'AAA et constitue un excellent examen pré-opératoire. Il donne à peu près les mêmes résultats que l'échographie mais de façon plus précise. C'est la technique de référence pour les AAA compliqués ou litigieux dont le diamètre est compris entre 40 et 45 mm. Cette technique n'est pas recommandée pour le dépistage car elle a un coût plus élevé, elle est irradiante et potentiellement toxique du fait de l'injection de produit de contraste. De la même manière, l'angio-IRM aortique donne des résultats comparables à ceux de l'angiocscanner, avec une moindre toxicité mais un coût plus élevé. Son utilisation va dépendre essentiellement de la disponibilité locale (90). Enfin, l'artériographie de l'aorte abdominale, non systématique du fait de son caractère invasif et de la possibilité de sous estimation de la taille de l'AAA en cas de thrombus mural, est réservée aux cas de diagnostics douteux. L'IRM est souvent réalisée à visée anatomique avant un traitement endovasculaire.

c) Traitements

La vitesse d'expansion de l'AAA est variable et dépend de sa taille et de sa forme, du terrain génétique et des facteurs de risque cardiovasculaire. À l'échelle d'un individu, la croissance de l'AAA est non linéaire et non prévisible ; à l'échelle d'une population, la

croissance des AAA est plutôt de type exponentiel, d'autant plus élevée que le diamètre initial est grand. A défaut de critères de prédiction fiables de la rupture de l'anévrisme, deux types d'interventions sont actuellement pratiquées : la cure chirurgicale et la mise en place d'endoprothèse par voie endovasculaire.

La cure chirurgicale

La chirurgie est généralement recommandée lorsque le diamètre de l'AAA dépasse 55 mm, ou si le taux d'expansion est supérieur à 1 cm par an (91). Cette technique est utilisée depuis les années 50 à la fois pour la prévention de la rupture et pour sa réparation. Elle nécessite une incision au niveau de l'abdomen du patient. Durant l'opération, la circulation dans l'aorte est bloquée de part et d'autre de l'anévrisme. Celui-ci est incisé et nettoyé avant la mise en place de la prothèse connectant le tissu aortique sain en amont et en aval de la partie dilatée. Les complications suivant cette technique de traitement sont accrues lorsqu'elle est utilisée comme moyen de réparation de la rupture de l'anévrisme. Pour les interventions préventives, le taux de mortalité est inférieur à 2%. Ce taux atteint 8% en cas de chirurgie urgente et 35% en cas de rupture (92).

Traitement endovasculaire

Chez un patient considéré comme inopérable, placer une prothèse à l'intérieur de l'anévrisme par voie endovasculaire jusqu'à l'AAA en passant par l'artère fémorale a été réalisé pour la première fois en 1991 par Parodi (93). Ces endoprothèses appelées stents sont des ressorts métalliques contenant une membrane en polyester qui exclue la poche anévrismale de la tension artérielle et du flux sanguin. Ainsi, le patient ne subit pas de laparotomie ni de clampage aortique, et il y a moins de perte sanguine. Cette technique appelée réparation endovasculaire de l'AAA (EVAR) a été une véritable révolution dans le traitement des AAA. Malgré quelques échecs techniques, l'endoprothèse est rapidement devenue un traitement alternatif et même concurrentiel à la chirurgie conventionnelle (94). Le traitement endovasculaire des AAA s'est progressivement imposé et des milliers

d'endoprothèses aortiques ont été implantées à travers le monde. Actuellement, environ un tiers des patients est traité par une endoprothèse pour un AAA aux Etats-Unis (95).

2. Physiopathologie de l'AAA

Les études anatomopathologiques ont clairement montré que la paroi artérielle est fragilisée au niveau d'un anévrisme et que la structure de la média est considérablement remaniée (figure 7). L'épaisseur de la média est divisée par sept (96). Le nombre de fibres élastiques est diminué et leur structure altérée. Les fibres de collagène sont fragmentées, les modifications de ces protéines fibreuses altèrent les propriétés mécaniques de l'artère qui perd progressivement sa capacité à lutter contre la distension. Des études expérimentales et cliniques chez l'homme ont montré que des altérations qualitatives et quantitatives de la composition en collagène étaient associées à une augmentation du diamètre de l'aorte et la formation d'AAA (97).

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

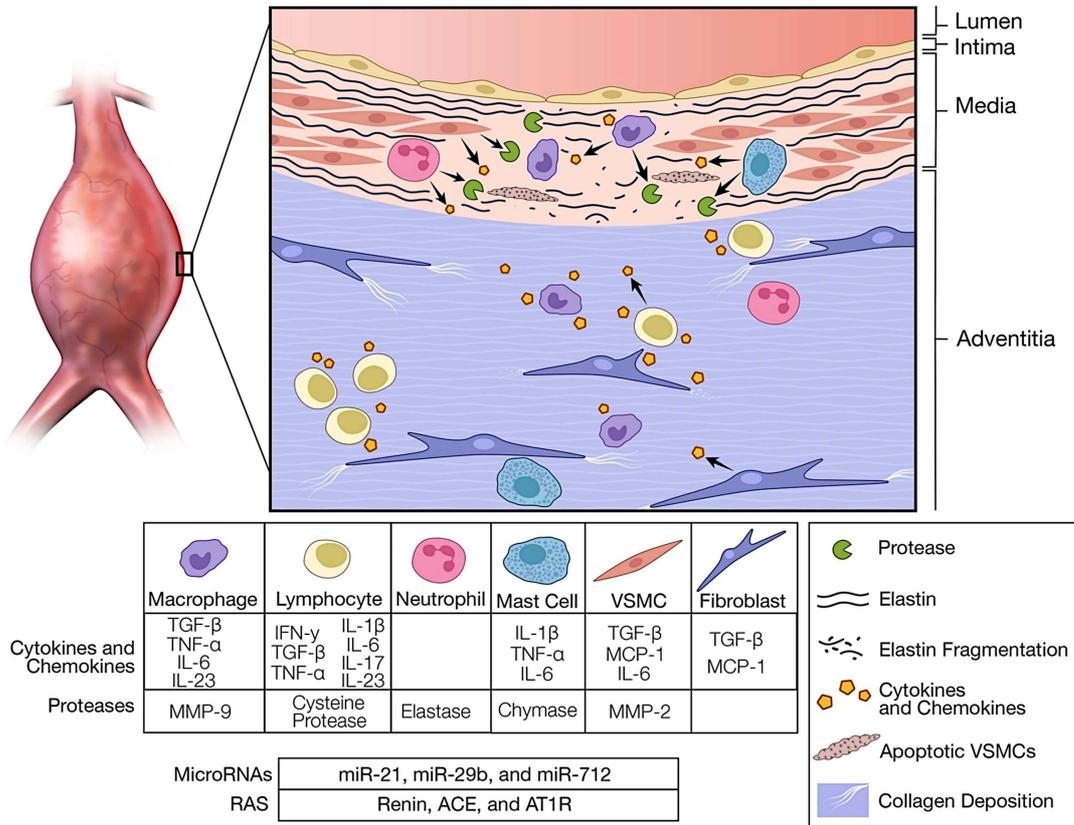


Figure 7 : Représentation schématique de la physiopathologie de l'AAA

Davis FM et al., Heart 2014 (98)

On peut considérer d'une certaine manière que l'AAA résulte de la dégénérescence athérosclérotique de la paroi artérielle (99). En effet il existe une pathogénie commune aux deux maladies modulée par des facteurs locaux. Cependant, la majorité des personnes atteintes d'athérosclérose développent plutôt des lésions sténosantes que des anévrismes. Ces deux pathologies présentent par ailleurs une différence dans la composition en CML de la paroi vasculaire. En effet, dans le cas d'un anévrisme, une nette décroissance des CML est observée avec une infiltration de cellules inflammatoires dans la média tandis que les CML sont plus abondantes au niveau de la média et de l'intima dans les plaques d'athérosclérose. Ceci montre le rôle important des CML dans le remodelage artériel (100). La diminution du nombre de CML dans la média rend l'AAA vulnérable à l'infiltration inflammatoire et à la protéolyse.

La surface endoluminale des AAA est souvent recouverte d'un thrombus, d'épaisseur variable, parfois absent. Ce thrombus est dépourvu de cellules endothéliales, de CML ou de fibroblastes, mais riche en polynucléaires neutrophiles (PNN) (101).

a) Dysfonction endothéliale

Les cellules endothéliales qui tapissent la face endoluminale des vaisseaux sont sensibles à des facteurs chimiques comme les cytokines, l'angiotensine II et également à des forces physiques comme le shear stress. Elle régule, entre autres, le flux sanguin en aval en libérant des substance vasodilatatrices comme le monoxyde d'azote (102) et contrôle le recrutement pariétal des leucocytes circulants en produisant des chimiokines et des molécules d'adhérence. Un travail expérimental récent a souligné le rôle spécifique de l'endothélium dans le développement de l'AAA induit par l'angiotensine II. Dans un modèle chimère, Rateri et al. ont montré que la déficience en récepteur de l'angiotensine de type AT1a leucocytaire n'avait aucun impact sur le développement de l'AAA alors que la déficience en AT1aR chez la souris receveuse était nécessaire pour le développement de la maladie anévrismale. Finalement, les auteurs ont montré que l'invalidation de AT1aR spécifiquement dans l'endothélium réduisait significativement la sévérité de la maladie aortique (103).

L'angiotensine II induit la surexpression du miR-712 chez la souris (homologue humain miR-205) (104). Le miR-712, notamment synthétisé par les cellules endothéliales, stimule l'activité des MMPs en inhibant directement l'expression de TIMP-3 et de RECK, un inhibiteur de protéases. Ainsi, chez des souris traitées par angiotensine II, l'administration d'antagomiR-712 ou -205 réduit la sévérité de l'AAA.

b) Remodelage matriciel de l'anévrisme de l'aorte abdominale

L'AAA entraîne une dégradation de la MEC aboutissant progressivement à l'inaptitude de la paroi à répondre de manière adaptée aux contraintes mécaniques, ceci se traduit par la dilatation puis la rupture de la paroi de l'aorte. Des modèles *in vitro* et *in vivo* chez l'animal ont montré le rôle clé de la balance protéases/anti-protéases dans l'évolution des AAA (105–107). Ainsi, l'augmentation locale de l'activité d'enzymes protéolytiques dégrade les artères *in vitro* et induit des AAA *in vivo* (108,109). L'expression protéique et d'ARNm de la MMP-9 est plus élevée dans les AAA alors que celle de son inhibiteur TIMP-1 peut être diminuée, augmentée ou inchangée (110,111). La surexpression locale de TIMP-1 stabilise la progression de l'anévrisme dans un modèle d'AAA chez le rat (112). Les souris

hypercholestérolémiques *ApoE*^{-/-} et les souris invalidées génétiquement pour le TIMP-1 présentent une augmentation de la fréquence des AAA (113). Par ailleurs, les souris *Timp-1*^{-/-} normocholestérolémiques développent une maladie anévrismale plus sévère que les souris contrôles (114).

La MMP-2 produite par les fibroblastes adventitiels agit de manière synergique avec la MMP-9 macrophagique favorisant la survenue des AAA (115). Chez l'homme, la paroi des AAA contient significativement plus de MMP-2 et -9 comparée à celle des aortes normales. Les analyses effectuées par zymographie et Western Blot ont montré une augmentation de l'expression de la MMP-2 pour les petits AAA alors que la MMP-9 est plus élevée pour les gros AAA (116). L'invalidation du gène codant pour la MMP-9 réduit considérablement la maladie anévrismale chez l'animal (107). La doxycycline, un antibiotique de la famille des tétracyclines, a montré une certaine efficacité en inhibant de manière non spécifique les MMPs et en limitant leur expression génique par les CML *in vitro* (117). Chez l'animal, l'administration de doxycycline, entraîne une diminution de l'activité des gélatinases et une diminution de la taille des AAA (118). Cependant les essais cliniques utilisant la doxycycline pour contrôler la balance protéolytique de l'AAA ont montré des effets contradictoires (119,120). Outre les MMP-2 et -9, l'augmentation de l'expression des MMP-1 -3 et -12 est également observée dans l'AAA.

Le thrombus anévrisimal fait partie intégrante de la physiopathologie de l'AAA, il est biologiquement actif. Il favorise la fibrinogénèse luminale et la fibrinolyse pariétale. Les PNN y sont retrouvés en grand nombre et produisent une quantité importante de MMP-9 (121). Le thrombus est un site de stockage et de sécrétion de protéases par les PNN circulants qui adhèrent à la fibrine sur la surface endoluminale du thrombus (122). Les MMP-9, -3 et l'élastase retrouvées dans le thrombus anévrisimal sont d'origine leucocytaire, elles diffusent vers la paroi artérielle, participant à la dégradation de la MEC. La surface luminale du thrombus est un lieu hostile à la survie des CML et des cellules endothéliales. La paroi aortique située au niveau du site de thrombus est davantage altérée, avec plus d'inflammation et de protéases (123). En effet, la présence de cellules inflammatoires dans la paroi augmente la quantité des MMPs et de l'élastase leucocytaire.

L'AAA est caractérisé par une forte activité des activateurs du plasminogène tissulaire (tPA) et de type urokinase (uPA) ainsi que la plasmine (124). Le système fibrinolytique, véhiculé par le thrombus pariétal, joue un rôle majeur dans l'évolution des anévrismes en activant les MMPs et en aggravant l'apoptose des CML. Cette évolution est corrélée à

l'activité de fibrinogène détectée dans le plasma (complexes thrombine-antithrombine) et à l'activité de fibrinolyse (produit de dégradation de la fibrine). Le thrombus est le principal site de stockage du plasminogène, du tPA et, à une moindre mesure, de l'uPA sécrété par les PNN. Les activateurs sont également présents dans la paroi : l'uPA des macrophages et le tPA des fibroblastes vasculaires. À l'interface entre le thrombus et la paroi se concentre une surface d'activation du plasminogène en plasmine et d'activation des MMPs responsable du phénomène de fibrinolyse abluminale et de dégradation de la matrice favorisant la rupture (122).

c) Réponse inflammatoire

Les monocytes / macrophages

L'examen anatomopathologique des AAA chez l'animal et chez l'homme a mis en évidence un infiltrat inflammatoire important et précoce suggérant un rôle de la réponse immune dans la physiopathologie de l'AAA. L'inflammation est un élément clé du développement de l'AAA se traduisant par une vaste infiltration de la média et de l'adventice par des cellules inflammatoires (125). Bien que plusieurs types cellulaires soient capables de synthétiser de l'élastase, seuls les PNN et les macrophages peuvent produire cette enzyme en quantité importante. L'élastase et les collagénases sont des enzymes sécrétés dans des conditions d'activation des cellules inflammatoires. Il a été montré *in vitro* que le macrophage était la cellule la plus efficace dans la dégradation de l'élastine insoluble *via* la MMP-12 (126). Au-delà de l'activité protéasique se pose la question des circonstances de leur apparition dans la paroi aortique. Chez l'homme, les macrophages sont la principale population observée dans la paroi artérielle. Malgré les études approfondies impliquant la réponse inflammatoire dans l'anévrisme, le rôle des monocytes et des macrophages dans la pathogenèse de la maladie n'est pas entièrement connu (6). De plus, les contributions distinctes des sous-populations de monocytes et de macrophages dans l'AAA sont encore relativement inexploitées. Toutefois, il a été montré que la déplétion en monocytes réduit la formation et les complications des AAA chez la souris (127). Des études expérimentales ont mis en évidence le rôle important des chimiokines comme CCL2, CXCL4 ou CCL5 dans le recrutement des monocytes dans la paroi de l'AAA (128). L'inhibition de CCR2 empêche le

recrutement des monocytes vers le site anévrisimal (129). Une étude sur le trafic monocyttaire dans l'AAA a mis en évidence que les deux sous-populations de monocytes, classiques et non-classiques, sont mobilisées depuis la rate vers le compartiment sanguin puis vers l'anévrisme en réponse à l'angiotensine II (130).

L'utilisation de modèles de souris a mis en évidence le rôle crucial des macrophages dans l'AAA (131,132). Par ailleurs, l'infiltration macrophagique est particulièrement précoce dans la paroi de l'aorte. Les macrophages de type M1, plutôt pro-inflammatoires, sécrètent des MMPs et des cytokines inflammatoires et induisent l'apoptose de CML *in vitro* (133). Les macrophages peuvent également s'orienter vers un phénotype M2 plutôt anti-inflammatoire et sont alors impliqués dans la réparation tissulaire. Il a été montré chez l'animal que l'haploinsuffisance de Notch1 dans des cellules dérivées de la moelle osseuse réduit la survenue de l'anévrisme et de l'infiltration macrophagique. Dans ce travail, les macrophages ont une polarisation de type M2 (134). Ces résultats ont été confirmés récemment avec un inhibiteur pharmacologique de Notch1 qui induit une polarisation macrophagique M2 et une réduction de la progression de l'anévrisme aortique (135). Les macrophages sont une source importante de protéases comme la MMP-9, qui compromettent l'intégrité de la paroi du vaisseau par la dégradation de la matrice extracellulaire (107). Les souris *Mmp-2^{-/-}* et *Mmp-9^{-/-}* sont protégées contre la dégradation de la paroi aortique et le développement d'anévrisme (115). Le transfert de macrophages exprimant la MMP-9 chez les animaux déficients en MMP-9 induit des anévrismes. Cela confirme d'une part le rôle pathogène de la MMP-9 et montre d'autre part que les macrophages constituent la principale source de MMP-9. De plus, il a été rapporté que la MMP-9 est également requise pour favoriser la migration des macrophages sur le site inflammatoire (136). Les produits de fragmentation des fibres élastiques ont une activité chimiotactique *in vitro* sur les macrophages et les autres cellules inflammatoires (137).

Les lymphocytes

La paroi anévrismale contient des macrophages mais également des acteurs de la réponse adaptative, les lymphocytes T essentiellement de type CD4⁺ et des lymphocytes B (138). Les lymphocytes T CD4⁺ infiltrés dans la média et l'adventice présentent un phénotype mémoire activé et produisent des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IFN- γ et

l'IL-5 (139). Chez l'animal, l'absence de lymphocytes matures s'accompagne d'une réduction significative de la maladie anévrismale confirmant leur rôle pathogène (140). Un taux élevé d'IFN- γ ainsi qu'une surexpression du facteur de transcription T-bet ont été retrouvés dans la paroi anévrismale humaine suggérant une forte implication des lymphocytes de type Th1 (141). La production d'IFN- γ par les cellules Th1 CD4⁺ augmente l'inflammation de la paroi et l'expression des MMPs (140). Il a également été montré que l'IL-17 produite par les lymphocytes de type Th17 favorise le développement de l'AAA chez la souris (142).

Les lymphocytes CD4⁺ de type Th2 sont également impliqués dans la physiopathologie de l'anévrisme (143). Les cellules Th2 sécrètent de l'IL-4 qui polarise les macrophages vers un phénotype M2 et stimulent la production de MEC par les fibroblastes (144,145). Les lymphocytes T régulateurs (T_{reg}) sont induits par l'IL-2 et TGF- β 1. Leur fonction principale est de contrôler les lymphocytes T autoréactifs par de nombreux mécanismes parmi lesquels la production d'IL-10 et de TGF- β 1. Chez l'animal, dans différents modèles, Ait-Oufella *et al.* ont rapporté que la déficience ou la déplétion en lymphocytes T_{reg} aggrave la maladie anévrismale. La reconstitution du pool de cellules T_{reg} prévient cette aggravation. Cependant, le transfert de T_{reg} isolés de souris *Il-10*^{-/-} n'a aucun effet protecteur suggérant que la protection vasculaire est médiée par la production d'IL-10 (146). Chez l'homme, il a été rapporté une proportion plus faible de T_{reg} circulants chez les patients atteints d'AAA par rapport à des sujets indemnes de maladie vasculaire (147).

Les lymphocytes B sont retrouvés dans l'AAA au niveau de l'adventice mais leur rôle dans la physiopathologie de l'AAA est peu connue (138).

Les neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles sont présents dans le thrombus endoluminal. Une proportion plus faible infiltrant la paroi vasculaire a été identifiée. Des expériences chez la souris ont montré que l'induction d'une neutropénie diminue la taille des anévrismes (148). Ce résultat a été confirmé chez des souris déficientes en L-sélectine, une protéine impliquée dans l'adhésion des neutrophiles aux tissus (149). Ces études suggèrent un rôle pathogène des polynucléaires neutrophiles dans le développement de l'AAA. Par ailleurs, d'autres expériences ont montré que la dipeptidyl peptidase I (DPPI), une cystéine protéase importante pour l'activation de l'élastase neutrophilique, de la cathepsine G et de la protéinase 3, est nécessaire au recrutement des neutrophiles dans l'AAA (150).

Les mastocytes

Les mastocytes sont des cellules inflammatoires impliquées dans l'hypersensibilité immédiate et les réactions allergiques chroniques. Ces cellules ont été trouvées dans des anévrismes humains, principalement dans la média et l'adventice (151). Les mastocytes sécrètent de la chymase qui active les MMP-2 et -9 et d'autres enzymes dégradant la MEC, favorisant ainsi la formation de l'AAA (152,153). Parallèlement, les mastocytes peuvent produire des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et l'INF- γ et des chimiokines comme MCP-1, ils jouent donc un rôle direct et indirect dans la formation de l'anévrisme en entretenant l'inflammation vasculaire (154,155). De plus, la déficience génétique en mastocytes chez la souris protège contre la formation d'AAA (156).

Les cytokines

Selon leur nature, les cellules immunitaires sécrètent des facteurs pro- et anti-inflammatoires dans la paroi vasculaire qui influencent négativement ou positivement la progression de l'AAA. Dans le plasma de patients atteint d'AAA, le TNF- α est retrouvé en plus grande concentration par rapport à des sujets sans maladie anévrismale (157). Dans la paroi, plusieurs cytokines pro-inflammatoires sont impliquées dans le développement de l'AAA. Ainsi, les IL-1 β , -6, -17 et -23 sont plus exprimées dans les tissus d'AAA par rapport aux tissus sains chez l'homme (98). De plus, l'inactivation génétique des IL-17, -23 et de l'IL-1 β atténuent la formation des AAA (142,158).

La déficience génétique en IL-10 aggrave la maladie anévrismale suggérant un rôle protecteur. Les travaux du laboratoire ont montré que l'action protectrice des lymphocytes T_{reg} est médiée par la production d'IL-10 (146).

Bien que son rôle soit encore l'objet de débat, plusieurs travaux suggèrent que le TGF- β protège contre la maladie anévrismale. En effet, la neutralisation systémique du TGF- β entraîne une augmentation de l'incidence et la sévérité des AAA. Sur le plan histologique, la neutralisation du TGF- β induit une augmentation de l'apoptose des CML, une fragmentation de l'élastine et une augmentation de l'infiltration inflammatoire pariétale (127). Dans un

modèle d'AAA chez le rat, la surexpression locale de TGF- β stabilise l'AAA préexistant (159). De plus, la surexpression du TGF- β induite par l'administration de cyclosporine A chez le rongeur induit une stabilisation de l'AAA en inhibant la protéolyse et en favorisant la réparation dans la paroi vasculaire (160).

3. Les modèles animaux d'AAA

Les animaux ont permis de développer des modèles d'AAA dont certains aspects physiopathologiques se rapprochent de la maladie humaine sans toutefois la reproduire parfaitement. Les différents modèles expérimentaux d'AAA développés chez le lapin, le porc, le rat et la souris ont permis d'améliorer la compréhension de la maladie afin de trouver de nouveaux traitements (Annexe 1 : Tableau des cibles thérapeutiques de l'AAA). La souris est devenue l'animal de choix pour plusieurs raisons : la petite taille, le coût, la capacité de comparer des fonds génétiques bien documentés et la facilité d'élevage permettant de croiser des souris dont un ou plusieurs gènes sont surexprimés ou invalidés. La souris hypercholestérolémique déficiente en apolipoprotéine E (*ApoE*^{-/-}) développe spontanément en vieillissant des lésions d'athérosclérose parfois associées à des dilatations anévrismales au niveau de l'aorte abdominale qui miment la pathologie humaine (161).

a) Modèle de perfusion d'élastase

Dès 1982, l'activité élastase a été mesurée dans la paroi d'AAA. Cette activité était liée à l'évolution anévrismale puisqu'elle était significativement plus élevée par rapport aux aortes saines. Ensuite, des travaux sur le rat ont démontré que la perfusion d'élastase pancréatique dans la lumière aortique entraînait une dilatation de l'artère formant un sac anévrismal (109). Dans ce modèle, les auteurs ont montré une dilatation de l'aorte de l'ordre de 30% dès la deuxième heure suivant la perfusion d'élastase, alors que la fragmentation de la média est encore minime (162). L'AAA se développe et continue à croître jusqu'au 5^{ème} jour après l'induction, bien après la disparition de l'activité de l'élastase, ce qui suggère que l'élastase perfusée n'est pas, à elle seule, responsable de la dégradation de la MEC. Ce modèle de

perfusion d'élastase au niveau de l'aorte abdominale a ensuite été adapté sur d'autres animaux, le porc, la carotide de lapin et la souris (107,163,164).

L'adaptation de ce modèle chez la souris a permis de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de la dilatation de l'aorte après perfusion d'élastase (165). La perfusion d'élastase pancréatique est une technique chirurgicale qui consiste à faire des ligatures temporaires autour de l'aorte proximale et distale puis à injecter l'élastase dans la lumière avec une pression de 100 mmHg pendant 5 minutes. Ce modèle expérimental d'AAA présente néanmoins certains inconvénients, le principal étant que la dilatation de l'aorte ne conduit pas à sa rupture. Ensuite, l'augmentation du diamètre est rapide et induit l'infiltration de nombreux PNN dans la paroi aortique, alors que chez l'homme, les AAA se développent sur plusieurs années et contiennent peu de PNN en dehors du thrombus (166). De plus, l'expression des MMPs dans les parois riches en PNN est assez éloignée de la pathologie humaine. Malgré ces limites, la perfusion d'élastase est un modèle d'étude locale de dégénérescence anévrismale d'une aorte native qui permet l'étude du rôle des protéases dans la dégénérescence anévrismale. Il est utilisé dans des approches thérapeutiques pré-cliniques (167).

Ce modèle est bien établi mais la perfusion d'élastase présente des difficultés techniques comme l'exclusion de toutes les artères collatérales de l'aorte par ligature, la cathétérisation d'une aorte murine, et ensuite la fermeture de celle-ci sans induire de sténose. Ces défis techniques ont limité la généralisation de ce modèle.

b) Application d'élastase péri-aortique

Plus récemment, un autre modèle expérimental d'AAA a été développé chez la souris (168). Il consiste en l'application d'élastase pancréatique autour de l'adventice, c'est à dire autour de l'aorte abdominale pendant 10 minutes. Ce modèle induit la formation d'un anévrisme présentant une dégradation des lames élastiques, une augmentation de la présence de macrophages activés, une diminution de l'expression de la protéine *alpha* du muscle lisse (α -SMA), et une augmentation de l'activité des MMPs. Par ailleurs, ce modèle ne surexpose pas l'aorte à des niveaux toxiques d'élastase pancréatique avec destruction de la surface de l'adventice de l'aorte ni à une dilatation mécanique induite par la pression de 100 mmHg exercée lors de la perfusion d'élastase. Le modèle d'application d'élastase péri-adventitielle

permet une étude plus approfondie du rôle des MMPs dans la maladie anévrismale. Il présente l'avantage d'être plus facile à réaliser puisqu'il ne nécessite pas de ligatures et de cathétérisation de l'aorte, qui est une étape critique de la perfusion d'élastase pancréatique (figure 8). Les anévrismes fusiformes développés par l'application d'élastase péri-aortique ont des similitudes avec les anévrismes humains même s'ils ne se compliquent jamais de rupture.

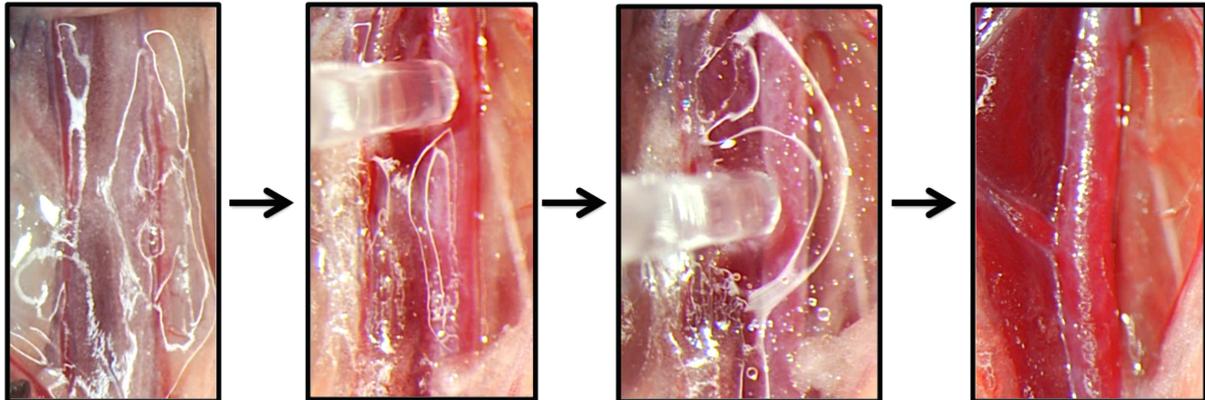


Figure 8 : Photos de la technique d'application d'élastase péri-aortique

c) Application de CaCl_2 péri-aortique

Le modèle d'AAA par application péri-aortique de chlorure de calcium (CaCl_2) a été initialement développé puis appliqué à la souris en 2001 (169,170). La technique est similaire au modèle élastase et consiste en l'application de CaCl_2 pendant 15 min sur la paroi externe de l'aorte abdominale depuis l'artère rénale jusqu'à la bifurcation iliaque. Ce modèle conduit à des dilatations de l'aorte de plus de 50% après 5 à 10 semaines (171). L'examen histologique montre des calcifications, une dislocation et une fragmentation des fibres élastiques de la paroi ainsi qu'un infiltrat inflammatoire. Les inconvénients de ce modèle se rapprochent de celui de l'élastase à l'exception de la progression plus lente de la maladie dans le modèle utilisant du CaCl_2 .

d) Les souris hypercholestérolémiques

L'apolipoprotéine E (ApoE) est le ligand d'un récepteur hépatique permettant l'hydrolyse des lipoprotéines de très basse densité (VLDL). Ainsi, la souris *ApoE^{-/-}* présente des taux plasmatiques de VLDL et de triglycérides supérieurs à ceux de la souris C57BL/6 sauvage et un taux de cholestérol HDL inférieur (172). Sous régime normal, la souris *ApoE^{-/-}* développe des stries lipidiques comportant des cellules spumeuses dès 6 à 10 semaines d'âge. Les souris *LDLr^{-/-}*, déficientes en récepteurs des lipoprotéines de faible densité, représentent un modèle d'hypercholestérolémie familiale. Sous régime normal, les souris *LDLr^{-/-}* ont un profil lipidique similaire à la souris sauvage C57BL/6 et ne développent pas de lésions d'athérosclérose. En revanche, sous un régime riche en matières grasses, le cholestérol plasmique des souris *LDLr^{-/-}* est multiplié par quatre et elles développent des plaques d'athérosclérose (173). Les souris hypercholestérolémiques *ApoE^{-/-}* et *LDLr^{-/-}* développent en vieillissant des lésions d'athérosclérose parfois associées à des dilatations anévrismales au niveau de l'aorte abdominale qui miment la pathologie humaine.

e) Infusion d'angiotensine II

L'angiotensinogène est synthétisé par le foie et clivé par la rénine en angiotensine I, inactive. Celle-ci est ensuite transformée en angiotensine II (Ang II) par l'enzyme de conversion de l'angiotensine sécrétée au niveau pulmonaire (figure 9). L'Ang II, peptide clé du système rénine-angiotensine-aldostérone, joue un rôle fondamental dans la régulation de la pression artérielle (174). L'Ang II agit en se fixant sur les récepteurs transmembranaires AT1R et AT2R qui ont des rôles antagonistes. L'AT2R est responsable de la vasodilatation, l'inhibition de la croissance cellulaire et l'apoptose. L'AT1R favorise l'augmentation de la pression artérielle par différents mécanismes : la vasoconstriction des artéioles, l'hypertrophie et l'hyperplasie vasculaire, la rétention d'eau en stimulant la sécrétion de la vasopressine et la sensation de soif. L'aldostérone synthétisée par le rein en réponse à l'Ang II joue également un rôle crucial dans le maintien de la volémie et la pression artérielle.

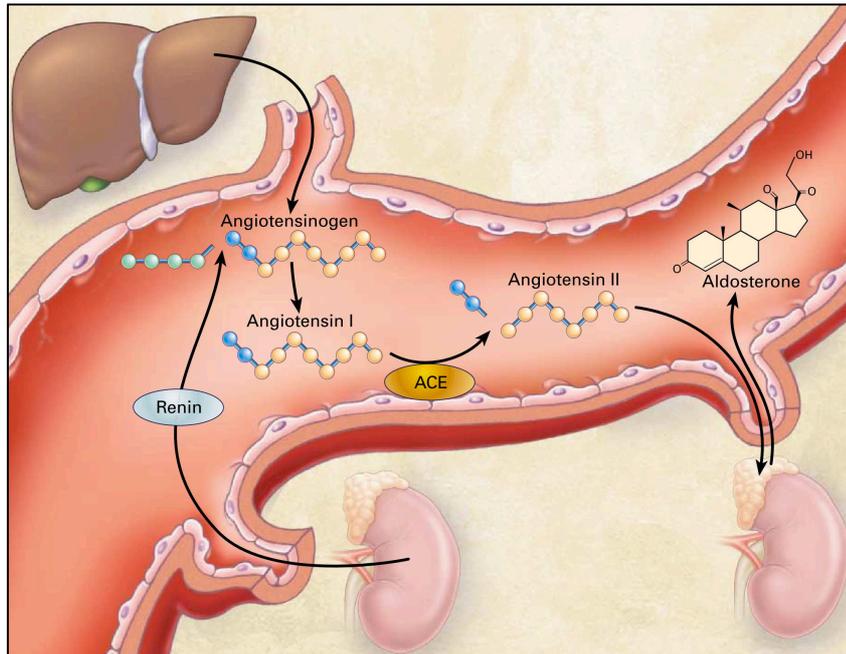


Figure 9 : Schéma du système rénine - angiotensine - aldostérone

Weber KT, *New England Journal of Medicine* 2001 (174)

L'infusion d'Ang II chez les souris $ApoE^{-/-}$ ou $LDLr^{-/-}$ est un modèle d'AAA fréquemment utilisé car il associe des facteurs de risque de maladie anévrismale identifiés chez l'homme, l'hypertension artérielle et l'hypercholestérolémie (20,175,176). La technique consiste en l'infusion continue d'Ang II à $1\mu\text{g}/\text{min}/\text{kg}$ pendant 28 jours. Dans ce modèle, le développement de l'AAA peut conduire à sa rupture qui survient entre J3 et J8. La rupture survient à la suite d'une dissection de la média au niveau supra-rénal et entraîne la mort dans 5 à 10% des cas (177). L'incidence d'AAA est plus fréquente chez les mâles, elle est estimée à 70-80% à J28. Aucune différence n'a été notée entre les modèles $ApoE^{-/-}$ ou $LDLr^{-/-}$ tant sur l'incidence que sur la sévérité de la maladie anévrismale (161). Ces modèles d'AAA induit par l'infusion d'Ang II chez les souris hypercholestérolémiques sont caractérisés par la présence, inconstante, d'un thrombus. Cependant, chez l'homme l'AAA se développe au niveau sous-rénal et le thrombus est endoluminal alors que dans ce modèle murin l'anévrisme est localisé au niveau supra-rénal et le thrombus est situé entre la média et l'adventice dans un tableau associant dissection et anévrisme.

Il a également été montré que l'infusion d'Ang II chez la souris C57BL/6 normocholestérolémique induit très rarement des AAA (106). L'ajout d'un régime riche en matières grasses augmente l'incidence des AAA au bout de plusieurs mois (24).

f) Infusion d'angiotensine II et neutralisation du TGF- β

Le rôle du TGF- β dans la pathologie anévrismale fait actuellement l'objet d'un débat. Dans les pathologies anévrismales syndromiques comme la maladie de Marfan une augmentation de l'activité TGF- β a été mise en évidence chez l'animal et chez l'homme sans toutefois qu'un lien causal soit établi (178–180). *A contrario*, des travaux physiopathologiques suggèrent plutôt un rôle protecteur du TGF- β . Chez l'animal, l'inactivation de la signalisation du TGF- β spécifiquement dans les CML induit une pathologie aortique chez la souris (181). Notre équipe a montré que la neutralisation systémique de l'activité du TGF- β par injection répétée d'anticorps anti-TGF- β augmente de façon majeure l'incidence et la sévérité des AAA chez des souris C57BL/6 sous Ang II (127). De plus, dans ce modèle la mortalité par rupture atteint 80% à J28. Sur le plan mécanistique, la neutralisation de l'activité du TGF- β induit une augmentation de l'apoptose des CML, une augmentation de l'infiltration inflammatoire dans la paroi aortique et une dégradation accélérée de la matrice extracellulaire, en partie liée à l'activité de la MMP-12.

Ces derniers résultats constituent des arguments solides en faveur d'un rôle protecteur du TGF- β dans la maladie anévrismale (182).

IV. Thérapie cellulaire

1. Historique

Les premières expériences de thérapie cellulaire utilisant des cellules totales de moelle osseuse ont été réalisées au début des années 1950 chez la souris, puis en 1957 chez l'homme (183). Désormais, l'activité de thérapie cellulaire utilisant des cellules souches hématopoïétiques (CSH) fait partie intégrante de l'arsenal thérapeutique utilisé chez les patients atteints de pathologies onco-hématologiques malignes en rechute ou réfractaires aux traitements conventionnels (184). Les sources de CSH utilisées sont la moelle osseuse, le sang placentaire et le sang périphérique après la mobilisation périphérique des CSH avec des facteurs de croissance comme le G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*). La greffe de CSH est effectuée sur des patients présentant une affection maligne du tissu hématopoïétique traités par chimiothérapie ou radiothérapie éradicatrice. Ainsi, après le traitement myéloablatif détruisant la moelle osseuse, la greffe de CSH vise à reconstituer le système hématopoïétique. Dans le cas d'une greffe allogénique, les cellules du donneur présentent des disparités HLA (*human leukocyte antigen*) avec celles du receveur. Ce type de greffe vise à éliminer les cellules malignes, cet effet est appelé GvL « *Graft versus Leukaemia* », mais il est également associé à une réponse de type GvH « *Graft versus Host* » (185).

Plus récemment, la thérapie cellulaire s'est développée dans d'autres pathologies chroniques non malignes.

2. Les cellules souches et thérapies innovantes

Les cellules souches sont des cellules capables de s'auto-renouveler et de se différencier en plusieurs types cellulaires. En fonction de leur capacité de différenciation, on distingue les cellules souches totipotentes, pluripotentes et multipotentes (figure 10). Les cellules souches embryonnaires sont totipotentes jusqu'au stade 8 cellules, elles sont capables de produire tous les types cellulaires y compris les trois feuillets embryonnaires. Au cours du développement

embryonnaire, les cellules souches deviennent pluripotentes, c'est à dire qu'elles peuvent se différencier en plusieurs types cellulaires mais ne peuvent pas engendrer un être humain en entier. A la fin du développement fœtal et jusqu'à l'âge adulte, l'homme dispose d'un stock de cellules souches multipotentes qui contrôlent la production continue de plusieurs types de cellules différenciées. Ces cellules souches ont des facultés régénératives nécessaires au renouvellement cellulaire des tissus tels que l'épiderme, la gencive, le sang, la muqueuse gastro-intestinale, etc. Elles jouent également un rôle crucial dans la réponse à une lésion tissulaire, au cours de laquelle elles deviennent activement engagées dans des processus de réparation. Il existe également une catégorie de cellules souches dites unipotentes qui sont douées d'auto-renouvellement mais sont déjà engagées dans une voie unique de différenciation.

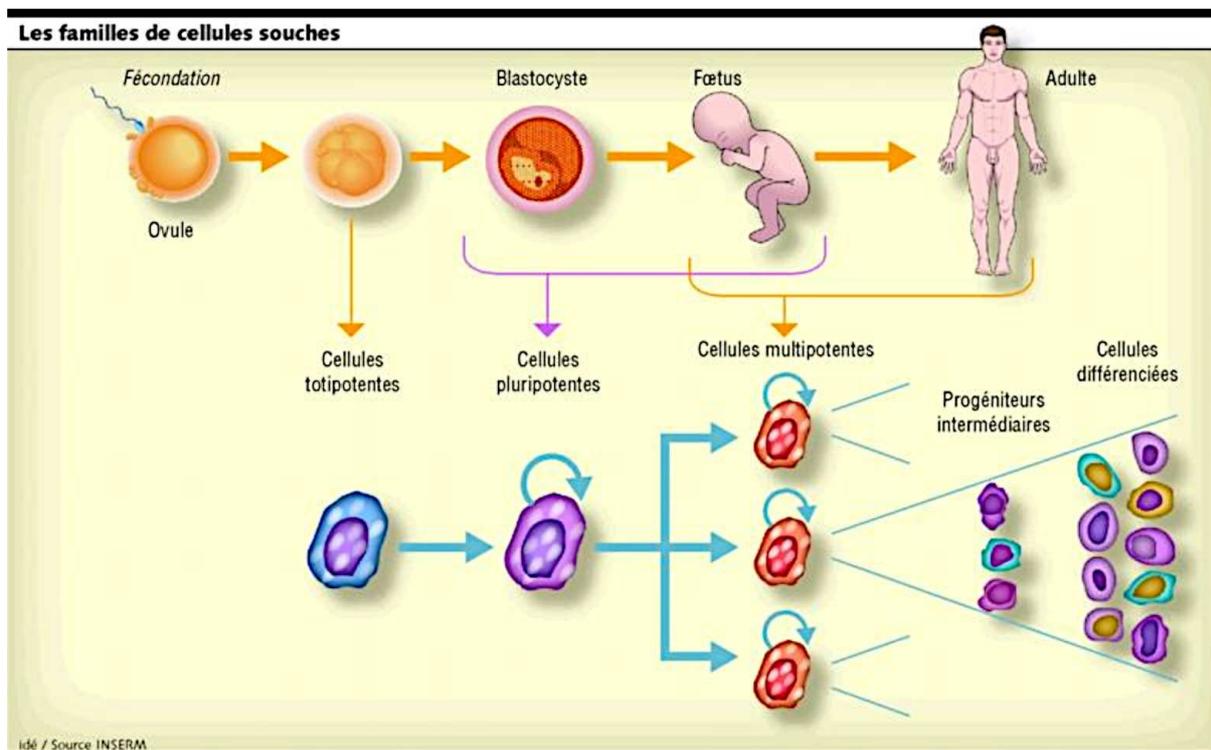


Figure 10 : Evolution du potentiel de différenciation des cellules souches au cours de la vie

Source INSERM

Les cellules souches ont la propriété de se multiplier et de se différencier pour remplacer les cellules d'un tissu lésé. Cependant leur capacité de réparation naturelle n'est parfois pas suffisante et entraîne un remodelage pathologique du tissu originel. Le principe de

la thérapie cellulaire est donc d'utiliser les propriétés réparatrices des cellules souches pour restaurer la fonction initiale de l'organe endommagé. Ainsi, plusieurs types de cellules souches ont été identifiées comme ayant un potentiel régénérateur dans le traitement de différentes pathologies.

a) Les cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires (CSE) ont été isolées et mises en culture au début des années 1980 chez la souris et à la fin des années 1990 chez l'homme (186,187). Elles ont un fort potentiel réparateur et peuvent se différencier *in vitro* vers tous les types cellulaires. L'utilisation de CSE en thérapie cellulaire a déjà donné lieu à plusieurs essais cliniques. Cette approche consiste à obtenir des cellules spécialisées saines et fonctionnelles à partir de CSE, puis à les injecter à un patient pour régénérer un organe ou restaurer sa fonction. Par exemple, des CSE humaines différenciées en épithélium pigmentaire rétinien ont été transplantées chez des patients atteints de dystrophie maculaire de Stargardt ou de dégénérescence maculaire liée à l'âge (188). Dans le domaine de la cardiologie, l'équipe du Pr. Ménasché a greffé des cellules cardiaques dérivées de CSE chez une patiente atteinte d'insuffisance cardiaque sévère (189). Plusieurs autres projets de thérapie cellulaire utilisant les CSE sont en cours de développement. Cependant, la greffe de cellules dérivées de CSE présente des limitations. Outre le caractère allogénique des CSE qui peut entraîner le rejet des cellules greffées, l'effet indésirable majeur est le risque de tumorigenèse lié aux mutations induites par l'amplification des CSE pour obtenir la lignée puis la différenciation cellulaire (190,191). De plus, le prélèvement de CSE pose des problèmes d'ordre éthique puisqu'il nécessite la destruction d'un embryon humain viable.

b) Les cellules souches pluripotentes induites

La reprogrammation de cellules différenciées en cellules souches pluripotentes induites (iPSC) consiste en la réactivation génétique des signaux d'immaturité et de prolifération caractéristiques d'une cellule pluripotente. La méthode de reprogrammation standard est celle développée par Shinya Yamanaka en 2006, elle consiste en l'introduction des quatre gènes

surexprimés dans les cellules souches embryonnaires : Oct3/4, Sox2, c-Myc, et Klf4 (192). La réactivation de la pluripotence des iPSC éteint les gènes de différenciation exprimés par les cellules naïves, souvent des fibroblastes. Depuis sa description, la méthode a évolué et ne nécessite plus de vecteurs viraux intégratifs mais des plasmides ou des virus de Sendai. Ces derniers étant transitoirement exprimés dans la cellule, ils n'entraînent pas de risque de mutation et d'expression prolongée des gènes car ils sont éliminés au fur et à mesure des divisions (193). L'intérêt des iPSC par rapport aux CSE est la possibilité d'utiliser des cellules autologues limitant les problèmes de rejet et d'utilisation d'immunosuppresseurs. Plusieurs essais précliniques sont en cours de développement. Cependant, l'utilisation de cellules dérivées d'iPSC en thérapie cellulaire présente des limites qui sont, d'une part le risque de formation de tératome par la présence d'une fraction résiduelle de cellules non différenciées et d'autre part la présence d'anomalies génétiques et épigénétiques dans les cellules après la différenciation (194).

c) Les cellules souches mésenchymateuses

Après la naissance, des cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont présentes dans plusieurs tissus comme la moelle osseuse, le tissu adipeux, le sang de cordon, le périoste et le foie fœtal. Elles sont issues du mésoderme et possèdent une activité d'auto-renouvellement et de différenciation qui est contrôlée par le microenvironnement avoisinant. Le terme de CSM désigne des cellules souches adultes ayant un potentiel de différenciation en divers types cellulaires comme les ostéoblastes, les chondrocytes et les adipocytes principalement (195). Ces cellules ont été caractérisées par leur capacité à adhérer au plastique avec une morphologie de fibroblaste, leur faculté à proliférer et leur expansion clonale aboutissant à une « unité formant colonie » de fibroblastes (CFU-F). Actuellement, les CSM issues de la moelle osseuse sont les cellules souches multipotentes les mieux caractérisées (196). Les CSM ne présentent pas de marqueurs spécifiques à leur surface, cependant, elles expriment les marqueurs CD73, CD90 et CD105 mais n'expriment pas les CD34, CD45, CD14, CD79 α et HLA-DR (197).

Les CSM ont des propriétés anti-inflammatoires par la sécrétion de facteurs solubles comme le TGF- β , la prostaglandine E2 (PGE2) ou l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) mais également par le biais de contact direct avec les cellules environnantes (figure 11). Elles

inhibent la prolifération des lymphocytes T, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et régulent l'équilibre Th1/Th2 ainsi que les fonctions des lymphocytes T_{reg} (198,199). Les CSM favorisent la survie des lymphocytes B mais peuvent également inhiber leur prolifération et la sécrétion d'anticorps (200). Les CSM inhibent la maturation, l'activation et la présentation antigénique des cellules dendritiques (201). Elles empêchent également l'activation des cellules NK (202).

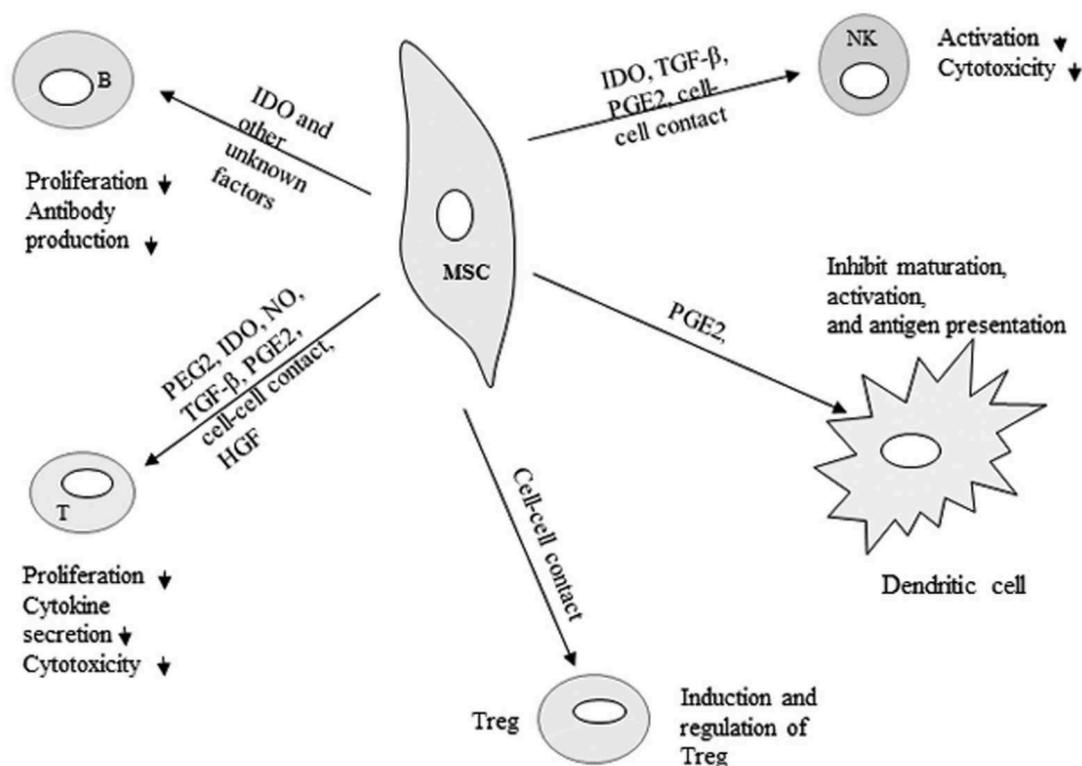


Figure 11 : Effets des CSM sur les cellules immunitaires

Gao F. et al., *Cell Death and Disease* 2016 (203)

De nombreuses approches thérapeutiques utilisant les CSM sont en cours de développement sur des maladies inflammatoires tel que l'asthme, la tendinite, l'AAA, l'infarctus, les lésions traumatiques de la moelle épinière ou encore l'accident vasculaire cérébral (204,205). La caractérisation progressive du potentiel des CSM a conduit à leur utilisation dans des essais cliniques dans le traitement de maladies telles que la GvH, la transplantation d'organes, le diabète, la sclérose en plaques et la maladie de Crohn (203). Des informations concernant les essais cliniques utilisant les CSM sont détaillées dans l'annexe 2. À ce jour, plus de 300 études explorant les effets thérapeutiques des cellules souches

mésenchymateuses ont été enregistrées sur la base de données des essais cliniques (206). Les CSM présentent l'intérêt de pouvoir être utilisées de manière autologue afin d'éviter les rejets de greffe mais leur effet immunosuppresseur permet aussi des traitements allogéniques. Les principales sources de CSM utilisées chez l'homme sont dérivées de moelle osseuse, de sang de cordon et dans une moindre mesure de tissu adipeux.

d) Le potentiel thérapeutique des fibroblastes gingivaux

Les fibroblastes

Les fibroblastes sont connus depuis longtemps mais restent mal caractérisés. Ces cellules sont présentes dans la plupart des tissus et sont les plus abondantes des tissus conjonctifs. Les fibroblastes régulent le développement, l'organogenèse, l'homéostasie et la réparation des tissus. Ce sont des cellules clés, autant dans des situations physiologiques que pathologiques. Les fibroblastes jouent un rôle majeur dans la cicatrisation tissulaire, l'inflammation, la fibrose et le cancer (207). Une des fonctions principales des fibroblastes est la sécrétion de MEC comme les fibres de collagène, d'élastine ainsi que des glycoprotéines. Les fibroblastes participent au remodelage de la MEC, assurant l'intégrité structurelle des tissus et créant un microenvironnement nécessaire à la survie des cellules avoisinantes telles que les cellules vasculaires, inflammatoires, épithéliales et des cellules souches spécifiques de tissus (208). Les fibroblastes interagissent avec les cellules du microenvironnement en sécrétant ou en libérant de la MEC, des facteurs de croissance et des cytokines, ils interagissent par contact avec des cellules du microenvironnement et créent des réseaux de communication cellulaire complexes.

Les fibroblastes sont un groupe hétérogène de cellules ayant des propriétés et des fonctions distinctes (209). En effet, que ce soit dans les tissus ou en culture, il existe différents types de cellules « fibroblaste-like » comme les myofibroblastes, les fibrocytes, les péricytes et les cellules souches mésenchymateuses. De plus, les fibroblastes peuvent subir des changements liés au vieillissement ou à une agression. Leur phénotype est modulé par des facteurs génétiques et environnementaux (210).

Les fibroblastes gingivaux

La plupart des cellules de la muqueuse buccale et des tissus autour des dents proviennent de la crête neurale crânienne (211). En revanche, les cellules des autres tissus comme la peau du tronc, l'appareil circulatoire musculaire, squelettique et les cellules sanguines dérivent du mésoderme. Les fibroblastes présents dans le tissu conjonctif de la muqueuse buccale ont un profil d'expression génique distinct des fibroblastes dermiques (212) (213). Il est probable que l'origine embryonnaire puisse expliquer une partie des différences phénotypiques et fonctionnelles entre les fibroblastes dermiques et ceux de la gencive, comme la vitesse de réparation et de guérison. La réponse des fibroblastes gingivaux (FG) aux blessures de la muqueuse buccale est différente et n'entraîne pas la formation de cicatrice (214). Des blessures expérimentales, réalisées au niveau de la muqueuse gingivale ou masticatoire kératinisée du palais, ont abouti à des cicatrices cliniques et histologiques significativement réduites par rapport aux blessures cutanées similaires, ces dernières ayant entraîné la formation de cicatrices hypertrophiques. De plus, la vitesse de réparation est plus rapide au niveau de la muqueuse buccale (215,216). Ces propriétés de cicatrisation de la gencive sont attribuées aux FG et montrent leur fort potentiel dans des applications thérapeutiques régénératrices (Tableau 3).

Fibroblastes Gingivaux		Fibroblastes Dermiques
Originaires de la crête neurale		Originaires du mésoderme
Profil d'expression différent des gènes HOX pendant l'embryogénèse		
Synthèse qualitative et quantitative différente des molécules de la MEC		
Expression différente des intégrines		
Interactions différentes avec la MEC		
Production de médiateurs et réponse inflammatoire différentes		
Rapide	Remodelage du réseau de fibrine	Lent
Rapide	Invasion dans une matrice de collagène	Lente
Rapide	Réparation du tissu lésé	Lente
Non	Cicatrice	Oui

Tableau 3 : Comparaison des fibroblastes gingivaux et des fibroblastes dermiques

Adapté de Fournier B. et al., Stem Cells and Development 2013 (217)

Les FG ont des fonctions liées à la spécificité de la cavité buccale. La gencive sépare l'interface entre les dents et la muqueuse buccale. Elle participe activement à la réponse et à la tolérance immunitaire. Le renouvellement cellulaire y est très rapide (218). La composition

de la MEC de la gencive et le phénotype des FG ressemblant à des cellules de peau fœtales apportent un avantage fonctionnel important dans la cicatrisation des plaies (219,220).

Phénotype

Les cellules du tissu conjonctif gingival ont la même origine embryonnaire, elles expriment des marqueurs de la crête neurale comme la nestine, la tubiline β III et la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) *in vitro* (221). Une étude chez la souris a mis en évidence que la majorité des cellules de la gencive dérivent de la crête neurale mais qu'une faible proportion de celles-ci dérivent du mésoderme (222). Ainsi, lorsque la gencive est mise en culture à partir d'une biopsie, 90% des cellules adhérentes sont positives pour le gène rapporteur de la crête neurale *Wnt1*.

Les FG expriment un large panel de marqueurs de différenciation comme le CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 et la vimentine (Tableau 4). A l'inverse, ils n'expriment pas le CD34, CD200 et le HLA-DR. Les fibroblastes et les CSM sont présents dans la plupart des tissus, y compris dans la gencive. Ces deux types cellulaires ont une morphologie similaire et partagent certaines caractéristiques. Les interactions entre les FG et les CSM de la muqueuse buccales restent indéterminées. Par ailleurs, il a été suggéré que les cultures *ex vivo* des CSM et des fibroblastes ne peuvent pas être distinguées par leur morphologie, leurs marqueurs de surface et leur potentiel de différenciation (223). Cependant, les FG présentent quelques différences phénotypiques avec les CSM, notamment une plus faible expression du CD146 et de l' α -SMA (217).

	FG	Cellules souches gingivales	MSC
CD29	+	+	+
CD34	-	-	-
CD44	+	+	+
CD73	+	+	+
CD90	+	+	+
CD105	+	+	+
CD146	Low	Low	High
CD138	Variable	Variable	Variable
CD200	-	-	Low
CD271	Variable	-	+
HLA-DR	-	-	-
STRO-1	Low	+	+
α-SMA	Variable	-	+
Vimentine	High	+	+
Phosphatase alcaline	+	-	+

Tableau 4 : Comparaison phénotypique des FG, des cellules souches gingivales et des CSM
Adapté de Fournier B. et al., *Stem Cells and Development* 2013 (217)

Capacité de différenciation

Les FG sont une source de cellules souches multipotentes. Ils présentent une capacité de différenciation vers trois grandes lignées mésenchymateuse : ostéoblaste, chondrocyte et adipocyte (224). Il a également été montré que les FG peuvent se différencier *in vitro* vers des lignées non mésenchymateuses avec un phénotype neurone-like exprimant la tubuline- β 3 (225). Les CSM et les FG humains peuvent être isolés à l'aide des mêmes protocoles et leurs besoins nutritifs *in vitro* sont identiques. Par ailleurs, la culture de FG contient une faible proportion de CSM, surtout aux passages précoces de la culture primaire. Cependant, il n'a pas encore été démontré que la capacité de différenciation des FG soit influencée par les CSM.

Remodelage de la matrice extracellulaire

Les FG participent activement au renouvellement de la MEC de la gencive. Le collagène subit un renouvellement très rapide dans le tissu gingival et les FG sont responsables de la synthèse de collagène de type I, III et V (226). L'élastine est abondamment exprimée par les FG et s'accumule seule ou au niveau des vaisseaux sanguins de la gencive (227,228). De plus, la plupart des composants microfibrillaires nécessaires à l'assemblage du réseau élastique comme la fibuline-5 et les fibrilline-1 et -2 sont produites par les FG (229,230). Alors que les fibres élastiques de la peau présentent des altérations liées au vieillissement, celles de la gencive restent relativement stable (231). Des mesures d'élasticité à partir de tissus de porcs indiquent que l'élasticité de la gencive est plus élevée que celle de la peau avec une résistance d'environ 20 kPa et 8kPa respectivement (232). Par ailleurs, ces cellules sont sensibles aux contraintes mécaniques de la MEC *via* les récepteurs aux intégrines qui modulent le profil d'expression génique et orientent la différenciation des FG (233). Ils produisent diverses molécules de la MEC comme les protéoglycanes, les glycosaminoglycanes et la Ténascine C. Les FG sécrètent également des facteurs de croissance différents des fibroblastes dermiques, mais l'abondance de ces molécules dans la gencive n'est pas connue (234).

Lorsque la gencive subit une agression, les FG sont activés et migrent vers le site lésé en synthétisant de nouveaux composants matriciels. La cicatrisation de la plaie gingivale est rapide et associée à une réponse inflammatoire peu importante par rapport à une blessure de la peau (215,235). Pendant cette phase, un tissu de granulation se forme, la fibronectine est dégradée puis remplacée par du collagène de type III. Les FG prolifèrent pendant la cicatrisation, puis, sous l'influence de cytokines comme le TGF- β 1, se différencient en myofibroblastes exprimant l' α -SMA. Cette phase de remodelage peut durer plusieurs semaines selon la taille de la plaie. Par ailleurs, dans la muqueuse buccale lésée, le niveau de TGF- β 3 ayant une activité anti-fibrosante est élevé par rapport au TGF- β 1 pro-fibrosant (236,237). Durant la phase de cicatrisation, le collagène de type III est progressivement remplacé par le type I, la digestion du collagène existant et la synthèse de nouvelles fibres est réalisée par les FG. Pendant cette phase, la balance des MMPs et des TIMPs joue un rôle crucial, les FG synthétisent les TIMP-1 et -2 qui inhibent l'activité des MMP-1 -8 et -9 synthétisées par les cellules inflammatoires principalement. Par ailleurs, les FG expriment

également les MMP-1 -2 et -13 (238,239). L'activité spécifique des FG dans la gencive permet une réparation rapide du tissu sans cicatrice ni fibrose après une blessure (217).

Propriétés immunomodulatrices des FG

Dans la cavité buccale, la gencive protège les tissus sous-jacents contre l'effet d'accumulation constante de biofilm microbien à l'interface entre la gencive et les dents. Les FG sont la première ligne de défense contre ce biofilm, ils interagissent avec les microorganismes, les molécules d'origine microbienne et les cellules immunitaires. Les FG communiquent directement avec les cellules immunitaires en établissant des contacts cellule-cellule, ou indirectement par la sécrétion de facteurs solubles (240,241). Comme les CSM, les FG ont des propriétés immunosuppressives qui contribuent à l'efficacité de la régénération de la gencive (242). Lorsque des FG sont injectés dans la circulation, ils préviennent le rejet de greffe de peau allogénique, l'hypersensibilité de contact, la colite expérimentale, et l'arthrite chez la souris (243).

Les FG peuvent induire l'apoptose des lymphocytes T activés (222), inhiber la prolifération des lymphocytes T effecteurs et inversement induire l'expansion des lymphocytes T régulateurs (244). Ils peuvent également bloquer l'activation des monocytes/macrophages, des cellules dendritiques et des mastocytes (245,246). Les FG peuvent orienter le phénotype des macrophages M1 pro-inflammatoires vers un phénotype M2 anti-inflammatoire réparateur (247). Ces fonctions immuno-modulatrices peuvent être attribuées, entre autres, à la libération de facteurs solubles comme, l'IL-10, la PGE2 ou l'induction d'enzyme comme IDO (figure 12). Les lymphocytes T, en produisant de l'IFN- γ , peuvent à leur tour induire l'expression du HLA de classe II et d'IDO par les FG (244).

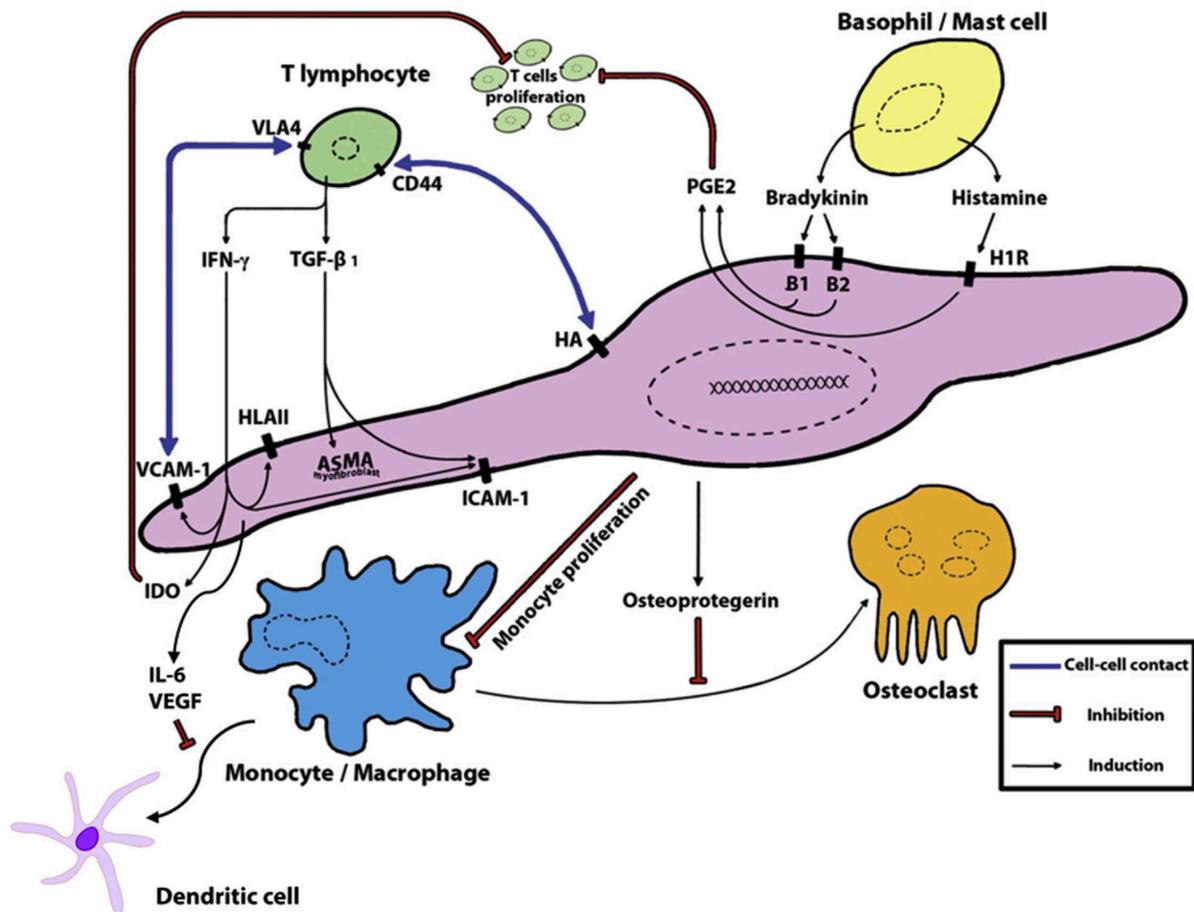


Figure 12 : Immunomodulation induite par les fibroblastes gingivaux

Hakkinen L. et al., *Cytotherapy* 2014 (225)

Utilisation des FG à des fins thérapeutiques

Bien que les thérapies utilisant des cellules souches soient, pour la plupart, encore au stade expérimental ou en phase clinique I/II, les fibroblastes dermiques sont utilisés en pratique clinique depuis des décennies dans diverses pathologies comme la greffe cutanée pour les grands brûlés et la chirurgie reconstructrice faciale (248,249). Concernant ces traitements, il a été montré chez le porc que le transfert allogénique de fibroblastes dermiques entraînait de moins bons résultats en terme d'infiltration inflammatoire et de cicatrisation que la greffe autologue (250). Ainsi, l'intérêt des banques de fibroblastes dermiques cryoconservés est limité même si les cellules gardent leur capacité de re-épithélialisation après la décongélation (251). D'une manière générale, les problèmes rencontrés par la greffe

de fibroblastes dermiques sont leur faible intégration au tissu, la formation de cicatrices et le manque de régénération de l'architecture et de fonction de la peau (252).

En raison de leurs propriétés très intéressantes, les FG pourraient être préférés aux fibroblastes dermiques pour des applications thérapeutiques nécessitant la régénération du tissu conjonctif et des muqueuses épithéliales. Ainsi, les FG pourraient améliorer la réparation du derme et réduire la formation de cicatrices après un traumatisme, ces deux aspects sont les problèmes cliniques majeurs des thérapies régénératives cutanées (253). Les études qui utilisent des FG sont en majorité au stade préclinique mais elles présentent déjà des avantages comparées à la greffe de fibroblastes dermiques ou la greffe de CSM. Une approche de thérapie cellulaire dans la cavité buccale utilisant des FG cultivés puis réinjectés dans la gencive a montré, trois mois après la greffe, une augmentation du tissu gingival. L'analyse histologique a révélé un tissu entièrement kératinisé sur tous les sites traités (254). Des transferts hétérotopiques de FG ont également été réalisés dans des applications extra-orales chez l'homme. Un traitement autologue au niveau de cordes vocales lésées a été réalisé chez 5 patients. La greffe entraînait une amélioration de la qualité tissulaire et des ondes vocales après 12 mois sans aucun effet indésirable (255). L'efficacité des FG a été testée *in vitro* dans la régénération de la trachée (256). Ainsi, la co-culture de FG avec des cellules épithéliales de la trachée a induit une différenciation épithéliale organisée sous forme d'une couche stratifiée proche de la structure anatomique alors que la co-culture avec des CSM entraîne une prolifération importante et la formation d'un épithélium de plusieurs couches.

Plus récemment, une étude a comparé l'efficacité de réparation des CSM et des FG sur des souris brûlées par irradiation. Les résultats ont révélé le développement précoce d'un épiderme épais entièrement régénéré avec apparition de follicules pileux chez les souris traitées avec les FG, bien plus tôt que chez les souris traitées avec des CSM (257). La réparation tissulaire était accélérée dans le groupe traité avec les FG. Les analyses plus approfondies ont montré que le traitement par FG était associé à une meilleure architecture collagénique, une moindre production de MMPs, et une sécrétion plus importante de facteurs de croissance (VEGF, l'EGF et le FGF7) par rapport au groupe recevant des CSM. La réponse inflammatoire locale induite par l'irradiation était modulée par les deux approches de thérapie cellulaire avec une diminution de l'infiltration inflammatoire cutanée et une polarisation macrophagique vers un phénotype M2. Cependant il n'existait pas de différence entre l'utilisation de FG et de CSM.

L'ensemble des résultats suggère que les FG sont une source prometteuse de cellules souches pour la thérapie cellulaire. Sur le plan pratique, le prélèvement de gencive est moins invasif que celui des CSM dérivées de moelle osseuse ou de tissu adipeux, de plus, l'isolation et la prolifération des FG sont plus simples et rapides (258).

3. Thérapie cellulaire de l'anévrisme de l'aorte abdominale

La physiopathologie de l'AAA est complexe et intègre un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation de la MEC, en particulier du collagène et de l'élastine ainsi qu'une composante inflammatoire locale. Plusieurs agents pharmacologiques ayant des fonctions anti-inflammatoires comme les statines ou une activité inhibitrice des métalloprotéases matricielles comme la Doxycycline ont été testés. Chez l'animal, la Doxycycline réduit l'activité des MMPs et la sévérité de la maladie anévrismale (120,259). Malheureusement, chez l'homme les résultats positifs n'ont pas été confirmés (260). De la même manière, un traitement prolongé par statines n'a pas montré de bénéfice en terme de progression anévrismale chez l'homme (261,262). De plus, l'administration de traitements systémiques expose les patients à des effets secondaires potentiels.

Une approche plus récente est basée sur une action vasculaire locale en utilisant les propriétés régénératives des cellules multipotentes. Plusieurs types de cellules ont été testés à visée thérapeutique dans différents modèles animaux d'AAA.

a) Les cellules musculaires lisses

Dans la paroi anévrismale, les observations anatomopathologiques ont montré une augmentation de l'apoptose des CML dont le nombre est diminué (109,263). La raréfaction des CML dans la média participe probablement à la dilatation anévrismale dans la mesure où ces cellules synthétisent des éléments de soutien de la matrice extracellulaire comme le collagène de type I (264,265).

Allaire *et al.* se sont intéressés au rôle des CML dans la physiopathologie de l'AAA en utilisant un modèle de xéno greffe d'aorte de cochon d'inde décellularisé chez le rat (266). Les auteurs ont montré que l'ensemencement direct par voie endoluminale de $10 \cdot 10^6$ CML vasculaires syngéniques prévenait la formation d'AAA, la dégradation de l'élastine et l'infiltration macrophagique (100). Ils ont aussi mis en évidence que malgré une localisation intimale des CML vasculaires, elles exerçaient un effet paracrine protecteur au niveau adventiciel en inversant la balance MMP/TIMP vers un profil anti-protéolytique. Dans ce

modèle, la stabilisation de l'anévrisme était associée à une augmentation de l'expression du TGF- β 1 dans l'intima, mais pas du TGF- β 2 et TGF- β 3 (267).

Ces résultats indiquent que l'administration endovasculaire de CML protège contre la progression de l'AAA par la sécrétion de TGF- β 1 dans la paroi. Cependant, la susceptibilité des CML à l'apoptose dans le contexte de l'AAA et la difficulté d'obtention d'un nombre suffisant de cellules à partir d'une biopsie humaine limitent l'application de cette approche de thérapie cellulaire.

b) Les cellules souches mésenchymateuses

Implantation de « feuillets cellulaires »

Plusieurs études utilisant des CSM pour traiter l'AAA chez l'animal ont été réalisées avec différentes modalités techniques. Tout d'abord, Hashizume *et al.* ont utilisé le modèle d'AAA induit par l'Ang II chez la souris *ApoE*^{-/-} pendant 28 jours. Les CSM dérivées de moelle osseuse étaient implantées à J0 autour de l'aorte abdominale après laparotomie. Les cellules étaient préparées avec des boîtes de culture à surface Upcell[®] permettant de décoller les cellules sans traitement enzymatique et de les récolter sous forme de « feuillets cellulaires » (268). Après 4 semaines d'infusion d'Ang II, le diamètre de l'aorte abdominale des souris traitées avec les CSM était significativement plus petit que celui des souris non traitées. Par ailleurs, l'activité des MMP-2 et -9 était plus faible chez les souris traitées, alors que l'expression de TIMP-1 était augmentée. Les cytokines pro-inflammatoires IL-6, MCP-1 et TNF- α analysées étaient aussi plus faibles dans le groupe ayant reçu les CSM. De plus, la dégradation de l'élastine était diminuée. Les résultats de cette étude suggèrent que le transfert de « feuillets cellulaires » de CSM dérivées de moelle osseuse inhibe la réaction inflammatoire induite par l'Ang II.

Implantation péri-adventitielle d'une prothèse

Le modèle de perfusion d'élastase chez la souris a également été utilisé dans une stratégie de thérapie cellulaire utilisant des CSM dérivées de tissu adipeux. La méthode d'implantation des cellules consistait en la mise en place d'une prothèse spongieuse Ivalon[®] autour de l'aorte reliée à un cathéter sous cutané (167). Après 5 jours, 10^5 CSM étaient injectées par le cathéter et délivrées dans la prothèse Ivalon[®] au niveau péri-adventitiel. 14 jours après la perfusion d'élastase, le diamètre des AAA était réduit chez les souris traitées avec les CSM par rapport aux animaux ayant reçu une solution saline. L'analyse histologique a montré une diminution de l'infiltration monocytaire et une préservation des fibres élastiques dans les aortes des souris traitées. Dans cette étude, les auteurs n'ont pas montré la présence des cellules greffées, par ailleurs, l'injection de 10^5 cellules paraît relativement faible comparée aux études décrites précédemment.

Administration par voie intravasculaire

Pour traiter l'AAA de manière moins invasive, cette même équipe a transféré des CSM dérivées de moelle par des injections intraveineuses répétées dans le modèle d'AAA induit par l'Ang II chez la souris *ApoE^{-/-}* (269). Les souris recevaient 10^6 CSM par semaine à partir de l'implantation des pompes osmotiques délivrant l'Ang II. Après 28 jours, l'incidence et la taille des AAA étaient réduites chez les souris injectées avec des CSM par rapport au groupe contrôle ayant reçu une solution saline. L'infiltration macrophagique et l'activité des MMP-2 et -9 étaient diminuées dans le groupe traité, cependant la quantité de TIMP-1 dans la paroi était identique entre les deux groupes. Très peu de cellules injectées ont été retrouvées dans la paroi vasculaire suggérant plutôt un effet anti-inflammatoire systémique.

Une équipe a testé l'efficacité des CSM dérivées de moelle osseuse selon le sexe des souris dans le modèle de perfusion d'élastase (270). Trois injections intraveineuses de 3.10^6 CSM isolées de souris mâles ou femelles ont été réalisées 1, 3 et 5 jours après induction de l'AAA sur des souris mâles. Les animaux ont été sacrifiés 14 jours après la perfusion d'élastase. La croissance des AAA a été inhibée chez les souris traitées avec les CSM. Par ailleurs, les cellules issues de souris femelles se sont avérées plus efficaces que les CSM issues de souris mâles. Les tissus des souris traitées avec des CSM femelles présentent une

diminution du TNF α , de l'IL-1 β et de MCP-1, alors qu'aucune différence n'a été observée dans les tissus de souris traitées avec des CSM mâles.

Une autre étude utilisant des CSM humaines dérivées de sang placentaire a été réalisée chez la souris pour traiter l'AAA induit par perfusion d'élastase (142). Une seule injection intraveineuse de 10⁶ CSM était réalisée le jour de l'induction de l'AAA. Les auteurs ont montré que l'infiltration macrophagique et lymphocytaire ainsi que la destruction des fibres élastiques étaient réduites chez les souris ayant reçu les CSM. Par ailleurs, ils ont aussi mis en évidence une diminution de la production de la cytokine IL-17, suggérant un effet paracrine de la sécrétion de facteurs solubles comme le TGF- β , le facteur de croissance hépatocytaire ou le PGE2 par les CSM. La relevance clinique d'une xénogreffe, c'est à dire une injection de cellules humaines chez la souris immunocompétente est discutable tout comme sa pertinence clinique.

Implantation par cathétérisation

Allaire *et al.* ont comparé l'effet des CSM dérivées de moelle osseuse à des CML vasculaires dans le modèle de xénogreffe d'aorte de cochon d'inde chez le rat (271). La perfusion endovasculaire d'un million de CSM était plus efficace que la perfusion de CML vasculaires sur la maladie aortique et sur le contrôle de la balance MMP-9/TIMP-1 (272).

Le transfert de CSM par cathétérisation a également été réalisé chez le porc dans un modèle d'AAA fusiforme induit par la technique EVAR (réparation endovasculaire de l'AAA) suivi de l'ouverture longitudinale de l'aorte abdominale et de sa suture avec un patch Dacron[®] (273). Les CSM (10.10⁶ cellules) dérivées de tissu adipeux étaient injectées dans le sac anévrisimal entre l'endoprothèse et l'aorte. Les résultats de cette étude ont montré que les CSM étaient présentes 3 semaines après l'implantation et qu'elles exerçaient une immunosuppression locale comparé au groupe non traité. Cette même équipe a continué de développer cette stratégie de thérapie cellulaire (274). Ainsi, ils ont inclus 10⁶ CSM dérivées de tissu adipeux de porc mâle dans une matrice de fibrine. Ensuite, la matrice de fibrine contenant les CSM a été implantée, après la pose de l'endoprothèse et de la suture du patch Dacron[®], dans le sac anévrisimal de porcs femelles. A trois mois, les cellules mâles (portant le chromosome Y) ont été retrouvées par hybridation *in situ*. Les analyses histologiques ont confirmé la diminution de l'inflammation pariétale, une fibrose dans le sac anévrisimal sans

calcification et une régénération des fibres élastiques chez les animaux traités, trois mois après intervention. Ces résultats suggèrent que l'administration de CSM dans le sac anévrisimal stabiliserait l'AAA après un traitement EVAR.

Injection directe dans la paroi de l'aorte

Chez le porc, une autre approche de thérapie cellulaire a été réalisée par implantation directe de CSM dérivées de la moelle osseuse dans la paroi après induction de l'AAA (163). L'implantation de $10 \cdot 10^6$ CSM marquées a été réalisée avec succès et montrait la présence des CSM une semaine après la greffe. Par ailleurs, le niveau d'expression du VEGF était augmenté trois jours après l'implantation des cellules suggérant un rôle des CSM dans la réparation tissulaire et l'angiogenèse.

c) Les fibroblastes gingivaux

Lafont *et al.* ont testé l'effet des FG sur l'activité des MMPs dans un modèle de culture *ex vivo* d'anneaux aortiques de lapin. Après 21 jours de co-culture, l'activité des MMP-1, -3 et -9 était réduite et la sécrétion de TIMP-1 augmentée (275,276). *Ex vivo*, les FG inhibaient également la MMP-7 par un mécanisme dépendant de la sécrétion de TGF- β 1 (277). En effet, lorsque les FG étaient traités avec un siRNA ciblant le TGF- β 1 ou s'ils surexprimaient la décorine, un inhibiteur du TGF- β 1, l'expression de la MMP-7 était rétablie. L'inhibition de la dégradation d'anneaux aortiques de lapin en culture a apporté la preuve de concept que les propriétés réparatrices des FG peuvent être transposées à un autre organe.

L'équipe d'Antoine Lafont a ensuite développé un modèle expérimental d'anévrisme de la carotide chez le lapin (164). L'anévrisme était induit par la perfusion de 3U d'élastase pendant 15 minutes et entraînait une dilatation de 50% de la carotide associée à une destruction des fibres élastiques et une infiltration de macrophages après 4 semaines. De plus, l'activité de la MMP-9 était augmentée par rapport à la carotide contrôle non perfusée à l'élastase. Ce modèle a ensuite été utilisé afin de développer une approche de thérapie cellulaire utilisant les FG pour déterminer si l'effet protecteur observé *ex vivo* était transposable *in vivo*. Quatre semaines après la perfusion d'élastase, 10^6 FG de lapin ont été

transférés directement dans la lumière artérielle pendant 15 minutes sous pression (278). Le transfert de FG a permis de réduire significativement le diamètre de l'anévrisme de la carotide de lapin un mois après la thérapie cellulaire avec une stabilisation du diamètre après trois mois. Cette réduction a été attribuée à une régénération du réseau élastique, préalablement détruit lors de l'induction de l'anévrisme par l'élastase porcine. Pour détecter les cellules après l'implantation, des FG humains ont été greffés et un anticorps anti-Lamine A/C humaine a permis de retrouver les FG dans l'adventice 3 mois après le traitement. L'analyse histologique des anévrismes a montré une diminution des cellules inflammatoires CD45⁺ dans le groupe traité avec les FG. Les taux tissulaires de cytokines pro-inflammatoires (IL1- β et IL-6) étaient plus faibles et les taux de médiateurs anti-inflammatoires (TGF- β et IL-4) étaient plus élevés dans les carotides traitées avec les FG, un mois et trois mois après la greffe. L'activité de la MMP-9 était diminuée en présence de FG et l'activité TIMP-1 augmentée. Sur le plan histologique, le transfert de FG était associé à une densité d'élastine supérieure aux carotides contrôles. Ces résultats montrent que les FG ont un effet protecteur contre la dégradation de la paroi vasculaire dans un modèle *in vivo* de dilatation de carotide de lapin.

Présentation du projet de thèse

L'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA) correspond à une dilatation progressive de l'aorte dont la complication souvent mortelle est la rupture. Les AAA sont la conséquence d'un remodelage pathologique expansif de la paroi aortique caractérisé par une perte des CML, une destruction de la matrice extracellulaire et une inflammation locale chronique (6). Actuellement, le traitement de l'AAA repose sur la chirurgie et la pose d'endoprothèse par voie endovasculaire (94). Ce traitement associé à une morbi-mortalité non négligeable ne traite pas les mécanismes de destruction de la paroi mais uniquement ses conséquences.

La capacité de réparation tissulaire est très variable d'un organe à un autre, la paroi artérielle est un exemple de réparation insatisfaisante. A l'opposé, la gencive est capable d'une réparation parfaite semblable à la réparation embryonnaire, sans cicatrice ni fibrose. Cette faculté est attribuée aux FG. Ces cellules ont également des propriétés immunomodulatrices permettant une certaine tolérance au niveau du tissu gingival. Les travaux d'Antoine Lafont ont permis de démontrer qu'il était possible de transposer les capacités réparatrices des FG au niveau artériel (276,277). Les FG humains limitent la dilatation carotidienne chez le lapin. Cependant, la pertinence clinique de ce modèle de xénogreffe est discutable pour la pathologie anévrismale aortique.

L'objectif de ce projet était de développer une approche de thérapie cellulaire afin de limiter la progression de la maladie anévrismale aortique chez la souris en utilisant une allogreffe locale de fibroblastes gingivaux.

- La première étape du projet consistait à isoler et cultiver de façon optimale les FG murins. Ensuite, nous avons caractérisé le profil de production de cytokines pro- et anti-inflammatoires et également la production de TIMP-1.
- L'étape suivante consistait à standardiser et optimiser la transplantation péri-aortique de FG chez la souris. Nous avons choisi de les déposer localement, autour de l'aorte abdominale après avoir induit l'AAA par application péri-aortique d'élastase chez la souris *ApoE*^{-/-} (168). Les FG étaient maintenus localement dans un hydrogel biocompatible, le Chitosan. Il s'agit d'un polysaccharide, utilisé en thérapies périodontales reconstructrices, composé de chaînes de D-Glucosamine biodégradable.

Le chitosan possède des propriétés hémostatiques, antimicrobiennes (279). Enfin, il n'altère pas la survie des FG en culture (280,281).

Les premiers essais de thérapie cellulaire avaient pour objectif de suivre *in vivo* les cellules après l'implantation. Pour ce faire, nous avons utilisé des FG de souris Rosa^{mT/mG} qui expriment la protéine fluorescente Tomato. Nous avons montré que les FG survivent *in vivo* et s'organisent sous forme d'une épaisse couche péri-adventitielle, 7 jours et 14 jours après l'induction de l'AAA (figure 14). Le remodelage artériel a également été analysé par des colorations histologiques, l'Orcéine mettant en évidence le réseau élastique et le Rouge Sirius le collagène. Des aortes ont également été congelées 7 jours après l'induction de l'AAA pour analyser le niveau d'expression des MMP-2 et -9, de TIMP-1 de l'IL-10, du TGF- β et du collagène de type III. L'activité des métalloprotéases *in vivo* a été mesurée par tomographie en fluorescence par imagerie VisEnTM. Le diamètre des aortes a été mesuré après 28 jours de traitement afin de confirmer la capacité des FG à limiter le remodelage expansif de l'AAA.

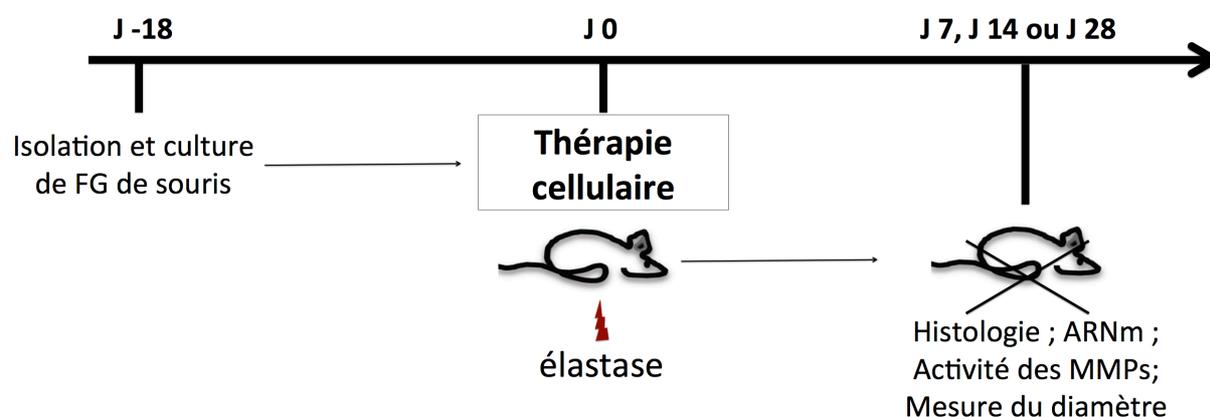


Figure 14 : Protocole dans le modèle d'application péri-aortique d'élastase

Les MMP-2 et -9 jouent un rôle majeur dans le développement de l'AAA. Le modèle expérimental d'application péri-aortique d'élastase chez la souris reproduit cet aspect de la pathologie humaine (168). Par ailleurs, les FG sécrètent du TIMP-1 en grande quantité et inhibent fortement la dégradation d'aortes anévrismales humaines en co-culture *via* la formation de complexe MMP-9/TIMP-1 (278). Nous avons donc utilisé des FG isolés de souris *Timp-1*^{-/-} afin d'étudier spécifiquement son rôle dans la protection vasculaire induite par les FG.

Enfin, nous avons testé l'efficacité des FG dans un autre modèle d'AAA chez la souris normocholestérolémique développé au laboratoire. Ce modèle associant infusion d'Ang II et injection d'anticorps neutralisant anti-TGF- β est caractérisé par la survenue fréquente de rupture létale (127). Dans ce modèle d'AAA, l'implantation des FG a été réalisée 7 jours après l'induction de l'AAA (figure 14). L'utilisation de ce modèle a eu pour objectif de déterminer la capacité des FG à inhiber la formation, la progression et surtout la rupture de l'AAA.

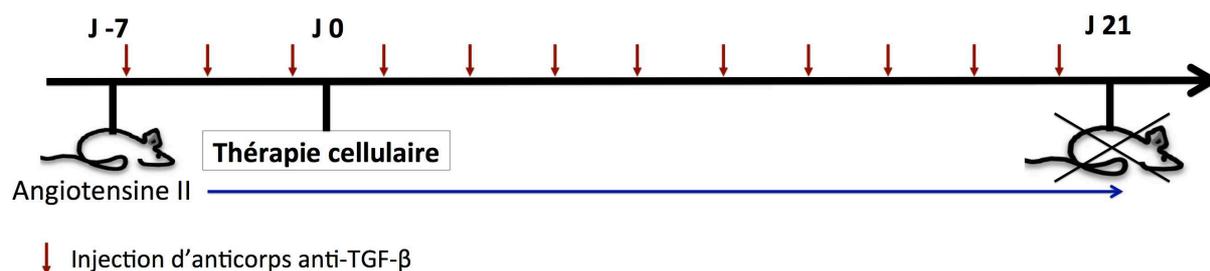


Figure 14 : Protocole expérimental du modèle Ang II et anti-TGF- β

Article

Submitted to Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology

Gingival fibroblasts protect against experimental abdominal aortic aneurysm development and rupture through TIMP-1 production

Short title: Gingival fibroblasts protect against AAA

Andreas Giraud¹, Lynda Zeboudj¹, Marie Vandestienne¹, Jérémie Joffre¹, Bruno Esposito¹,
Stephane Potteaux¹, José Vilar¹, Daniela Cabuzu¹, Johannes Kluwe², Sylvie Segulier¹, Alain
Tedgui¹, Ziad Mallat^{1,3}, Antoine Lafont¹ & Hafid Ait-Oufella^{1,4}

¹Inserm U970, Paris Cardiovascular Research Center, Paris, France, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité.

²Department of Gastroenterology & Hepatology, Hamburg University Medical Center Hamburg, Germany.

³Department of Medicine, Division of Cardiovascular Medicine, University of Cambridge, Cambridge, UK.

⁴Medical Intensive Care Unit, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Université Pierre-et-Marie Curie, Paris 6.

Correspondence to Hafid Ait-Oufella, Inserm U970, Paris Cardiovascular Research Center, 56, rue Leblanc Paris, France

Email: hafid.aitoufella@inserm.fr

Abstract

Background. Abdominal aortic aneurysm (AAA), frequently diagnosed in old patients, is characterized by chronic inflammation, vascular cell apoptosis and metalloproteinases-mediated extracellular matrix destruction. Despite improvement in the understanding of the pathophysiology of the aortic aneurysm disease, no pharmacological treatment is yet available to limit dilatation and/or rupture.

Objectives. We previously reported that human gingival fibroblasts (GFs) can reduce carotid artery dilatation in a rabbit model of elastase-induced aneurysm. Here, we sought to investigate the mechanisms of GF-mediated vascular protection in two different models of aneurysm growth and rupture in mice.

Methods and Results. *In vitro*, mouse GFs proliferated and produced large amounts of anti-inflammatory cytokines and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (Timp-1). GFs deposited on the adventitia of abdominal aorta survived for as long as 14 days, proliferated and organized as a layer structure. Furthermore, GFs locally produced Il-10, TGF- β and Timp-1. In a mouse elastase-induced AAA model, GFs prevented both macrophage and lymphocyte infiltration, elastin degradation and aneurysm growth. Specific invalidation of *Timp-1* in GFs abolished the beneficial effect of cell therapy. In an Angiotensin II/anti-TGF- β model of aneurysm rupture, GF cell-based treatment limited aortic dissection, prevented abdominal rupture and increased survival.

Conclusion. GF cell-based therapy is a promising approach to inhibit aneurysm progression and rupture through the local production of Timp-1.

Key words: Abdominal aortic aneurysm, remodeling, cell therapy, gingival fibroblasts, metalloproteases

Introduction

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is a common vascular disease of the aorta, characterized by medial degeneration and chronic aortic wall inflammation. Ruptured AAA is one of the leading causes of death particularly in men and women aged over 60 years¹. Despite recent advances in the understanding of its pathophysiological mechanisms, medical therapeutic options limiting aneurysm growth and/or rupture are still limited².

The physiopathology of non-syndromic AAA is complex, including elastin and collagen destruction, smooth muscle cell apoptosis and infiltration of inflammatory cells^{3,4}. Several experimental studies have documented the importance of the imbalance between metalloproteases and metalloprotease inhibitors in the progression of the disease. Matrix metalloproteinase-(MMP)-2 and MMP-9 are abundantly expressed in the aneurysmal wall while Tissue Inhibitor of MetalloProteinases (TIMPs) levels are decreased⁵. In mouse, genetic invalidation of *Mmp-2* or *Mmp-9* prevented the development of the aortic aneurysmal lesions. In addition, in *apoE^{-/-}* mice, *Mmp-9* genetic invalidation protected against atherosclerotic media destruction and ectasia⁶. Similarly, overexpression of *Mmp-9* inhibitors such as plasminogen activator inhibitor 1 and *Timp-1* induced arterial aneurysm stabilization in rats^{7,8}. Despite encouraging beneficial results, these gene transfer strategies are uneasy to develop in human. Our group and others proposed original local cell therapy approaches. Allaire et al. reported that endovascular transplantation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) prevented AAA progression in a rodent model. Later, the same group showed that the endovascular seeding of bone marrow mesenchymal stem cells decreased AAA diameter expansion more efficiently than VSMCs⁹. However, the isolation of bone marrow cell remains an outsized procedure requiring local and/or general anesthesia and bone puncture and/or biopsy. Use of fibroblasts from oral mucosal gingiva represents a promising alternative for cell therapy because of the high regeneration potential, fetal-like phenotype and anti-inflammatory properties of gingival fibroblasts (GFs)¹⁰. GFs have been used successfully to repair vocal fold scarring¹¹, tracheal injury¹² and to correct urethral strictures¹³. Recently, we developed a cell-based treatment using GFs. *In vitro*, GFs produced TIMP-1 and anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and TGF- β ¹⁴. *In vivo*, human GF endovascular engraftment in rabbit carotid artery, after elastase infusion, resulted in a significant reduction of local dilation. Local GF deposition was associated with a decrease of the *Mmp-9/Timp-1* ratio¹⁵. Despite encouraging conclusions, the relevance of these findings remains questionable for several reasons. First, the experimental protocol included a xenograft of

human GF in rabbit vascular tissue. Second, observations were done in a model of carotid dilation that is far from aortic aneurysm physiopathology. Finally, the mechanisms of arterial protection induced by GF cell-based treatment have not been directly addressed.

In this study, we developed a cell therapy approach using allograft of GFs in two different mouse models of AAA. We showed that mouse GFs when deposited on the adventitia around the abdominal aorta were able to survive and proliferate, and organize in an adventitial layer structure. GFs limited vascular wall degradation, innate and adaptive immune cell infiltration and prevented aneurysm progression and rupture. Genetic invalidation of *Timp-1* in GFs abolished their vascular protective functions.

Methods

Animals. Experiments were conducted according to the guidelines formulated by the European Community for experimental animal use (L358-86/609EEC) and were approved by the Ethical Committee of INSERM and the French Ministry of Agriculture (agreement A75-15-32). C57BL/6J *Timp-1*^{-/-} mice were purchased from The Jackson Laboratory. We used male mice between 8 and 10 weeks of age. C57BL/6J and *ApoE*^{-/-} mice were from Charles River. Mouse anti-human TGF- β (β 1, β 2, and β 3) (clone 2G7) was provided by Didier Fradelizi (Institut Cochin, *Plate-forme d'imagerie du petit animal*, Hôpital Cochin, Paris, France), and efficacy was demonstrated previously¹⁶. Angiotensin II was purchased from Sigma-Aldrich, and ALZET osmotic pumps were from Charles River Laboratories.

Characterization of aneurysmal lesions. Both cryostat and paraffin-embedded aortic sections were used. Elastin staining was visualized using orcein, and the number of elastin lamellae was quantified by a researcher blinded to the experimental protocol (4 measurements/section, 8 sections/animals). Sections were stained for collagen using Sirius Red, T lymphocytes using anti-CD3 antibody (Dako), and macrophages using anti-mouse CD68 antibody (Serotec). The percentage of cellular area with positive staining was quantified using Histolab software (Microvision).

Chitosan hydrogel. Chitosan hydrogel was prepared as described by Fatimi et al.¹⁷. Briefly, chitosan solution was made by dissolving 2 g of chitosan powder (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in aqueous hydrochloride solution and deionized water at room temperature under constant magnetic stirring for 24 h. Chitosan solution was sterilized by autoclaving at 121°C for 20 min and kept at 4°C. β -glycerophosphate (β -GP) 12% solution was prepared by dissolving β -GP powder in Opti-MEM medium and sterilized using a 0.22 μ m filter. β -GP solution was mixed with chitosan solution at ratio 1:2 respectively before immediate use.

Culture of mouse gingival fibroblasts. Mouse GF were isolated from gingiva of males C57BL/6J genetic background mice (6 week-old) and cultured in 75 cm² culture flasks in DMEM/F12 medium with 20% Fetal Calf Serum (FCS), 4 ng/mL of Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2), 200 UI/mL penicillin, 200 μ g/mL streptomycin, 2.5 μ g/mL amphotericin B. Medium culture was changed every two days (supplemental figure 1). After 12 days, GF

were trypsinized and replated at 1.10^6 cells per 150 cm² culture flasks in DMEM/F12 10% FCS supplemented with 4 ng/mL FGF-2, 100 UI/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 1,25 µg/mL amphotericin b. GF were cultured until 90% confluence and expanded to passage 3 before *in vivo* transfer. At passage 3, GF were trypsinized, counted with viability dye Trypan blue (Countess™ Automated Cell Counter, Invitrogen) and centrifuged three times with DMEM/F12 10% FCS, DMEM/F12 0% FCS and opti-MEM 0% FCS respectively. Cell pellet was suspended in conditioned media, 25×10^6 GF were mixed in 1000 µL chitosan hydrogel and 100 µL was laid down around the abdominal aorta.

Mouse models of abdominal aneurysm.

Elastase-induced AAA. Surgical procedure and treatment were performed on 8-week old males C57BL/6J *ApoE*^{-/-} mice (Charles River, France) fed a chow diet (A03-10, Safe, France) as previously reported¹⁸. Animals were anesthetized with 2% Isofluran, placed on a heating pad and received 0.05 mg/kg subcutaneous buprenorphine. After median laparotomy, the abdominal aorta, from the left renal vein to the iliac bifurcation, was exposed and bathed in 10 µL of filtered porcine pancreatic elastase (E1250; Sigma-Aldrich) during 5 min. The aorta was flushed three times with 0,9% NaCl to stop reaction. Chitosan hydrogel with 2.5×10^6 GF or without GF (Control) was deposited on the adventitia around the abdominal aorta, and abdominal content was replaced. The peritoneal cavity was closed with 7-0 polyamide suture (Cardionyl, peters surgical), and skin with 7.5 mm Michel suture clips (Fine Science Tools, Germany). Mice received 0,05 mg/kg buprenorphine in 1 mL subcutaneous 0.9% NaCl administration and placed in Isofluran box for 15 min until chitosan hydrogel is solidified. Mice were sacrificed at day 3, 7, 14 or 28 days.

Angiotensin II/anti-TGF-β AAA model. AAAs were induced in normocholesterolemic C57BL/6J mice by subcutaneous infusion of Angiotensin II (Sigma-Aldrich) at 1000 ng/kg/min for 28 days (mini-pumps Alzet, Charles River), along with systemic neutralization of TGF-β (i.p. injection of 500 µg, 3 times per week; Biotem), as previously described¹⁶. A 5-point grading system was used to classify aneurysms based on Daugherty's definition¹⁹. At day 7 of Angiotensin II infusion, a laparotomy was performed, AAA stage was recorded and chitosan hydrogel (with or without 2.5×10^6 GF) was grafted around abdominal aorta, upper

celiac trunk. Surviving mice were sacrificed at day 28. Survival was analyzed according to the site of rupture (abdominal or thoracic).

Fluorescent tomography. Mice were anesthetized with isofluran and received intravenously 150µl of a fluorescent imaging probe MMPsense 680 (NEV 10126, PerkinElmer) 24 hours before sacrifice. This agent is optically silent in its unactivated state and becomes highly fluorescent following activation by matrix metalloproteinases (MMPs) including MMP-2, -3, -9 and -13. Images were acquired using a fluorescence molecular tomography system (FMT 2500TM, VisEn Medical).

Flow cytometry. Stainings included the following antibodies: Alexa Fluor 647 anti-CD29 (HMB1-1, BioLegend), Alexa Fluor 700 anti-CD44 (IM7, BioLegend), Alexa Fluor 488 anti-CD90.2 (30-H12, BioLegend), PE/Cy7 anti-CD105 (MJ7/18, BioLegend), PE anti-CD138 (281-2, BD Biosciences), PerCP anti-CD45 (30-F11, BD Biosciences). Forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) were used to gate live cells excluding debris and cell aggregates in total cells. Cells were acquired using a BD LSRII Fortessa flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo™ (TreeStar, Inc.).

ELISA. For cytokines and proteins measurements, GF were cultured in flask until 90% confluence, medium was changed by OptiMEM 0% FCS during 24h and supernatant harvested. Il-4, Il-10, Tgf-β, Timp-1 production in the supernatant was measured using specific ELISAs (BD Biosciences and R&D Systems).

Quantitative real-time PCR. Quantitative real-time PCR was performed, after Trizol RNA extraction and RT-PCR, on an ABI Prism 7700 (Applied Biosystems™) in duplicate for each sample. GAPDH cycle threshold was used to normalize gene expression : (F:5' –CGT CCC GTA GAC AAA ATG GTG AA- 3'; R:5'-GCC GTG AGT GGA GTC ATA CTG GAA CA- 3'). The following primer sequences were used: Il-10 (F:5' – CTC CTA GAG CTG GGG ACT GCC TTC A - 3'; R:5' – CTG GGG CAT CAC TTC TAC CAG GTA AAA - 3'), Timp-1 (F:5'- CCC CCT TTG CAT CTC TGG CAT CT -3'; R:5' – GCG GTT CTG GGA CTT GTG GGC ATA -3'), Col3a1 (F:5'- ACC CCG AAC TCA AGA GTG GAG AA -3'; R:5' – GAC AGT CAT GGG GCT GGC ATT TA -3') , Mmp-2 (F:5'- CCG AGA CCG CTA

TGT CCA CTG T -3'; R:5' – CCG GTC ATC ATC GTA GTT GGT TGT -3'), Mmp-9 (F:5'- CCG TCA TTC GCG TGG ATA AGG AGT-3'; R:5'– GTA GCC CAC GTC CAC CTG GTT-3'), TFG-b1 (F:5'- CGG AGA GCC CTG GAT ACC AAC TA-3'; R:5'– GCC GCA CAC AGC AGT TCT TCT CT-3'). Relative expression was calculated using the 2-delta-delta CT method.

Statistical analysis. Values are expressed as percentage or mean \pm SEM when appropriate. Statistical tests included Mann-Whitney, Chi-squared, and Fisher's exact tests. Kaplan-Meier survival curves were constructed and analyzed using log-rank (Mantel-Cox) test. P values of less than 0.05 were considered significant.

Results

***In vitro* characterization of mouse gingival fibroblasts**

We first developed a protocol to isolate and culture mouse gingival fibroblasts (GFs) (Figure 1A). *In vitro*, GFs proliferated but were spherical and exhibited no, or very few, pseudopodia extension. However, in a Fibroblast Growth Factor-2-rich medium, GFs showed extended pseudopodia and exhibited elongation, and cell survival was improved (supplemental figure 1). Interestingly, mouse GFs exhibited characteristics of mesenchymal stem cells. They showed plastic adherent properties, expressed CD90 (Thy-1) and CD105 (Endoglin) but lacked CD45 expression. In addition, GFs expressed receptors involved in cell-cell adhesion, matrix adhesion (CD138) and migration, including CD44 and CD29 (supplemental figure 2).

GFs have been shown to produce anti-inflammatory cytokines and inhibitors of metalloproteases. Both functions were analyzed at each cell culture passage by qPCR and ELISA to select the optimal condition for cell therapy. As shown on figure 1, maximum expression of TGF- β and Timp-1 was observed at passage 3, which was selected for harvesting GFs for cell therapy (Figure 1B, C).

Peri-adventitial gingival fibroblast engraftment

We aimed to develop a local cell therapy based on peri-adventitial engraftment of GFs in an elastase-induced AAA model. After median laparotomy, peri-aortic wall injury was induced by external application of elastase during 5 minutes. After flushing twice, 2.5×10^6 GFs, isolated from Rosa^{mT/mG}, enfolded in a chitosan gel, were deposited on the adventitia around the abdominal aorta (Figure 2A). Animals were sacrificed at day 3, 7 and 14 after surgery and Tomato-Fluorescent Protein+ GFs were analyzed by fluorescent microscopy. We confirmed that GFs survived *in vivo* (Figure 2B), proliferated and organized as in a thick peri-adventitial layer structure (Figure 2C).

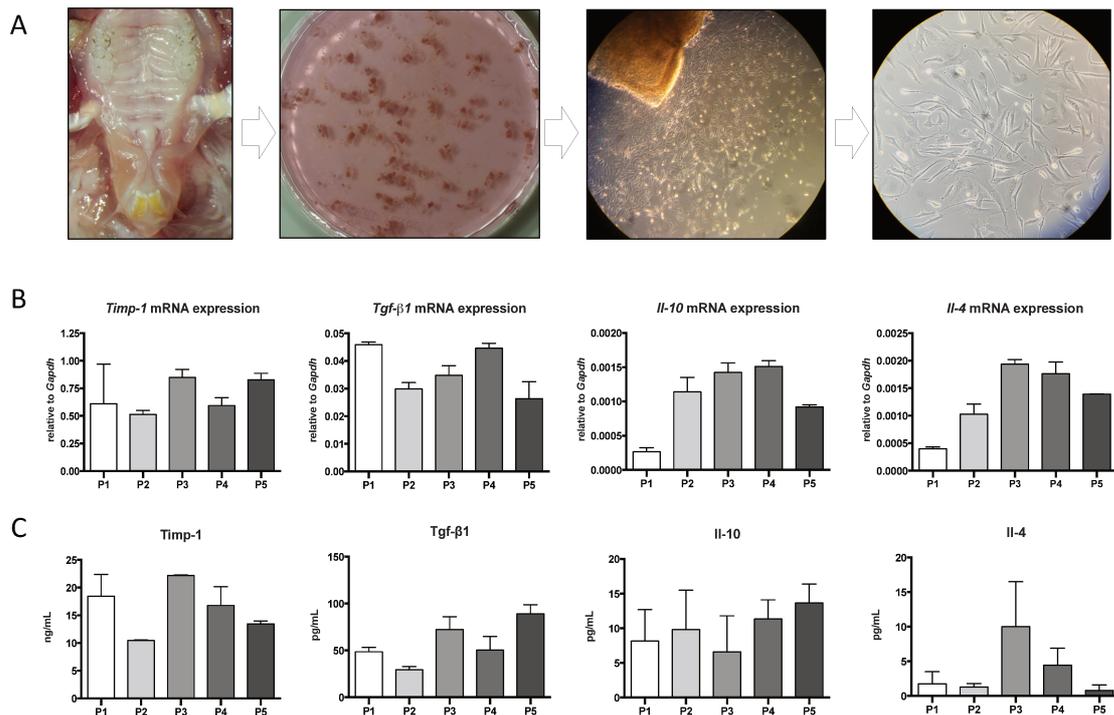


Figure 1. Mouse gingival fibroblast isolation and characterization. *A*, mouse gingiva was extracted and small pieces were cultured in bottom flasks during 14 days before first passage. *B*, *Timp-1*, *Tgf-β1*, *Il-10*, *Il-4* and *Col3a1* mRNA expression by GFs quantified at different cell culture passages. *C*, quantification by ELISA in the supernatant of *Timp-1*, *Tgf-β1*, *Il-10* and *Il-4* production by GFs at different cell culture passages.

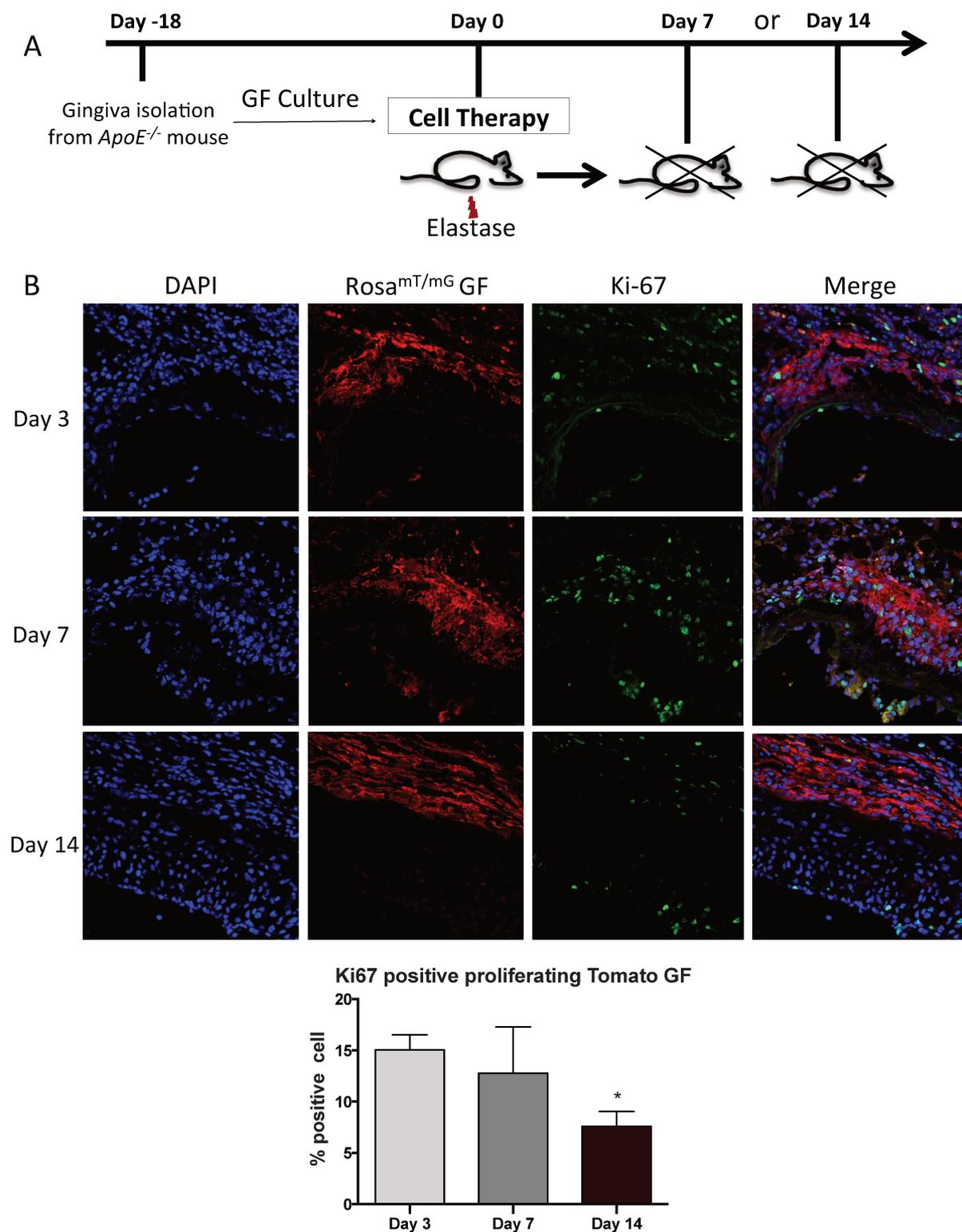


Figure 2. *A*, Mouse GFs were cultured during 18 days until passage 3, enfolded in chitosan hydrogel and engrafted around abdominal aorta after elastase injury. *B*, representative photomicrographs (up) and quantitative analysis (down) of GF engraftment. Rosa^{mT/mG} GFs (Red) proliferated in vivo (Ki-67 positive) with a peak at day 7 and organized as a thick peri-adventitial layer. * $P < 0.05$

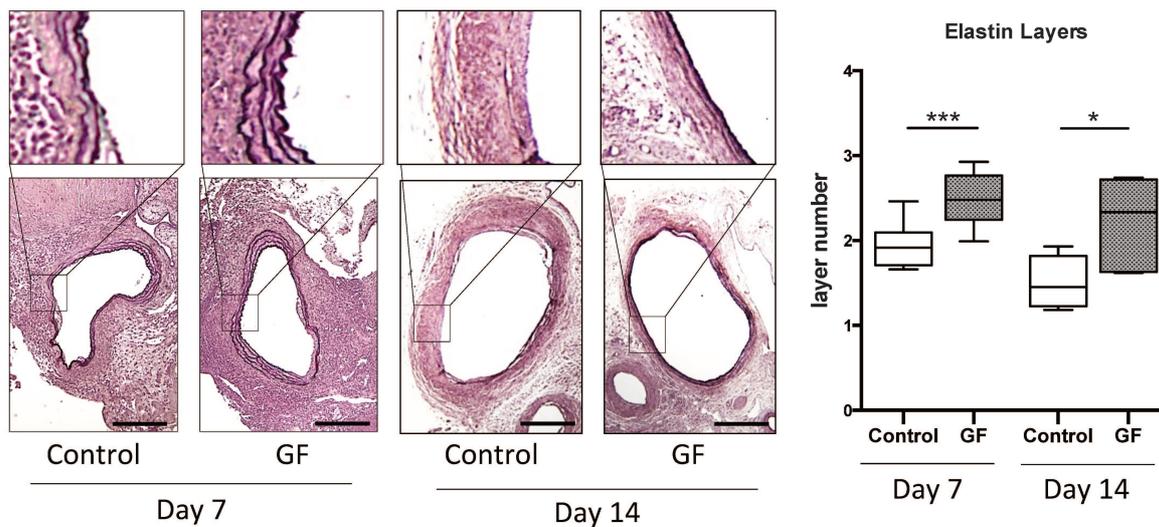
Gingival fibroblasts limited inflammatory cell infiltration

Innate²⁰ and adaptive^{16,21} immunity plays a pathogenic role in the physiopathology of AAA. Immune cell infiltration was quantified at day 7 and day 14 following elastase challenge using immunohistochemistry. In the control group, massive macrophage infiltration was observed in the adventitia and the media at day 7 and to a lower extent at day 14. T cell infiltration was important both at day 7 and 14 (figure 3). GF therapy significantly limited CD68⁺ macrophage infiltration at day 7 (-55%, P<0.05) (Figure 3A), and CD3⁺ T cell infiltration at day 7 (-39%, P<0.05) and day 14 (-48%, P<0.01) (Figure 3B).

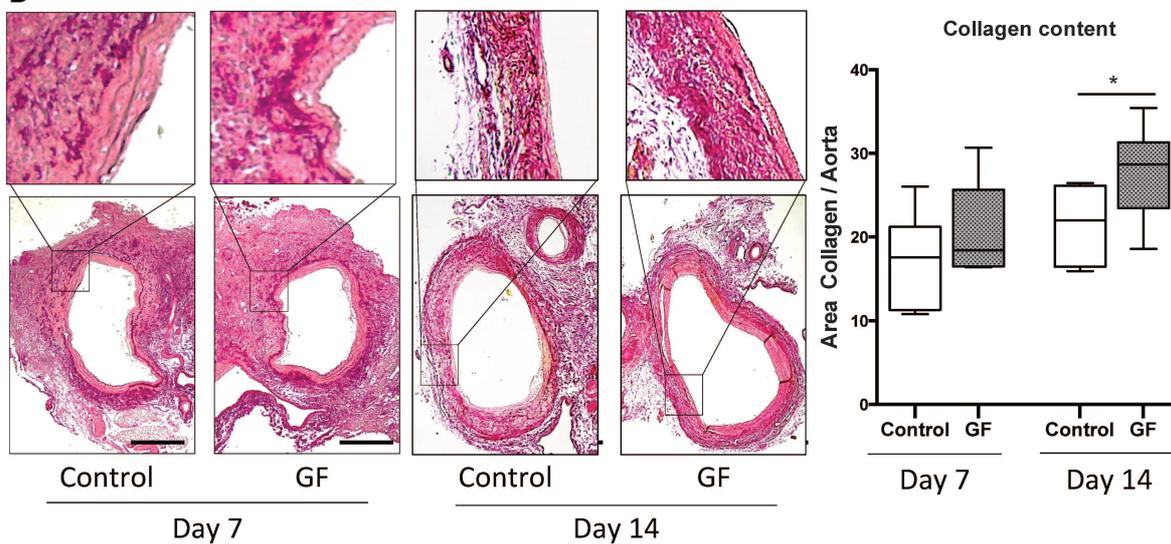
Gingival fibroblasts prevent aortic wall degradation and AAA formation

The degradation of extracellular matrix commonly observed in advanced aneurysms is a key mechanism in AAA formation, which promotes vascular dilation until rupture. In our model, elastase leads to local elastin degradation in the abdominal area. GF deposition limited elastin degradation, as assessed by the significantly higher number of layers in the GF-treated group at day 7 and day 14, compared with the control group: 2.6±0.3 vs 2.0±0.2 (P<0.001), and 2.2±0.5 vs 1.5±0.3 (P<0.05), respectively (Figure 4A). GFs also induced an increase in collagen accumulation in the peri-adventitial area (Figure 4B). At day 7, we found in the abdominal aortic wall of the GF-treated group a significant reduction of *Mmp-9*, *Mmp-2* mRNA expression and a significant increase of *Timp-1*, *Tgf-β*, *Il-10* and *Col3a1* mRNA expression (Figure 4C). MMP protease activity in the aortic wall, quantified using fluorescent tomography, was significantly reduced in the aorta of GF-treated animals compared with controls (Figure 4D).

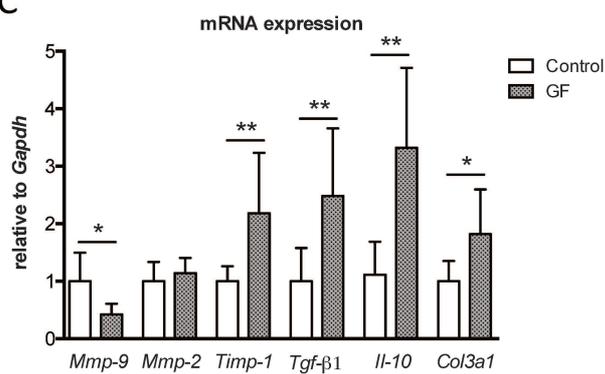
A



B



C



D

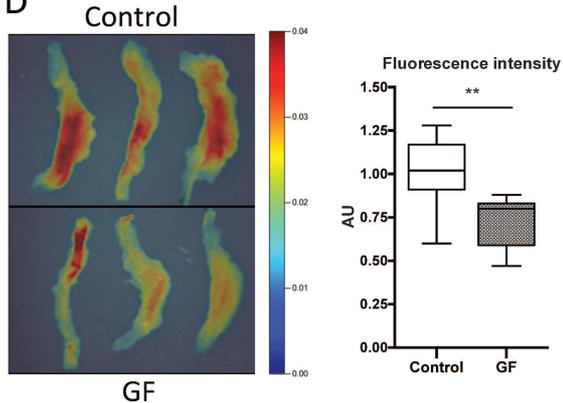


Figure 4. GFs limited aortic wall degradation. *A*, representative photomicrographs (Orcein staining, left) and quantitative analysis (right) of elastin layers in the abdominal aortic wall at day 7 and day 14 following engraftment. *B*, representative photomicrographs (Sirius Red staining, left) and quantitative analysis (right) of collagen accumulation in the abdominal aortic wall at day 7 and day 14 following engraftment. *C*, Quantification of *Mmp-9*, *Mmp-2*, *Timp-1*, *Tgf- β* , *Il-10* and *Col3a1* mRNAs expression in the abdominal aorta from mice treated with chitosan gel alone (control) or GF cells. *D*, Quantification of matrix metalloproteinase (MMP)-sense 680 activity in the abdominal aorta after 7 days of treatment, measured by fluorescent tomography. *N*=6-8 mice per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$. Scale bar 250 μm .

Genetic invalidation of *Timp-1* in GF abolished the vascular protection

To investigate the causal role of TIMP-1 in the vascular protection induced by GFs, we performed cell therapy experiments using GFs obtained from *Timp-1*^{-/-} mice. First, we ensured that GFs from *Timp-1*^{-/-} mice did not produce Timp-1 *in vitro* (Supplemental figure 3). Then, we locally engrafted wild-type or *Timp-1*^{-/-} GF after local administration of elastase. At day 7, macrophage and CD3⁺ T cell infiltration in the adventitia was not significantly different between WT GF- and *Timp-1*^{-/-}GF-treated mice (supplemental figure 4). Using qPCR, we found a marked reduction of *Timp-1 mRNA* expression in the abdominal aorta of *Timp-1*^{-/-} GF-treated group and an increase in *Mmp-9 mRNA* expression (figure 5 A). Metalloprotease activity was significantly higher in the aorta from the group treated with *Timp-1*^{-/-} GFs (figure 5B). Next, we addressed the effects of cell therapy on the vascular matrix degradation. At day 7, we found that elastin layer degradation was more pronounced in the group treated with *Timp-1*^{-/-} GFs in comparison to the group treated with wild-type GF (Figure 5C) with no differences in collagen content (Figure 5D). Finally, we assessed the long-term effect of GF (wild-type or *Timp-1*^{-/-}) engraftment on aneurysm formation. As shown in the figure 6, wild-type GFs significantly prevented aorta dilatation and AAA formation at day 28, and the protection was abolished when using *Timp-1*^{-/-} GFs (figure 6). These findings provided strong evidence that GF protected against aortic wall destruction through Timp-1 production.

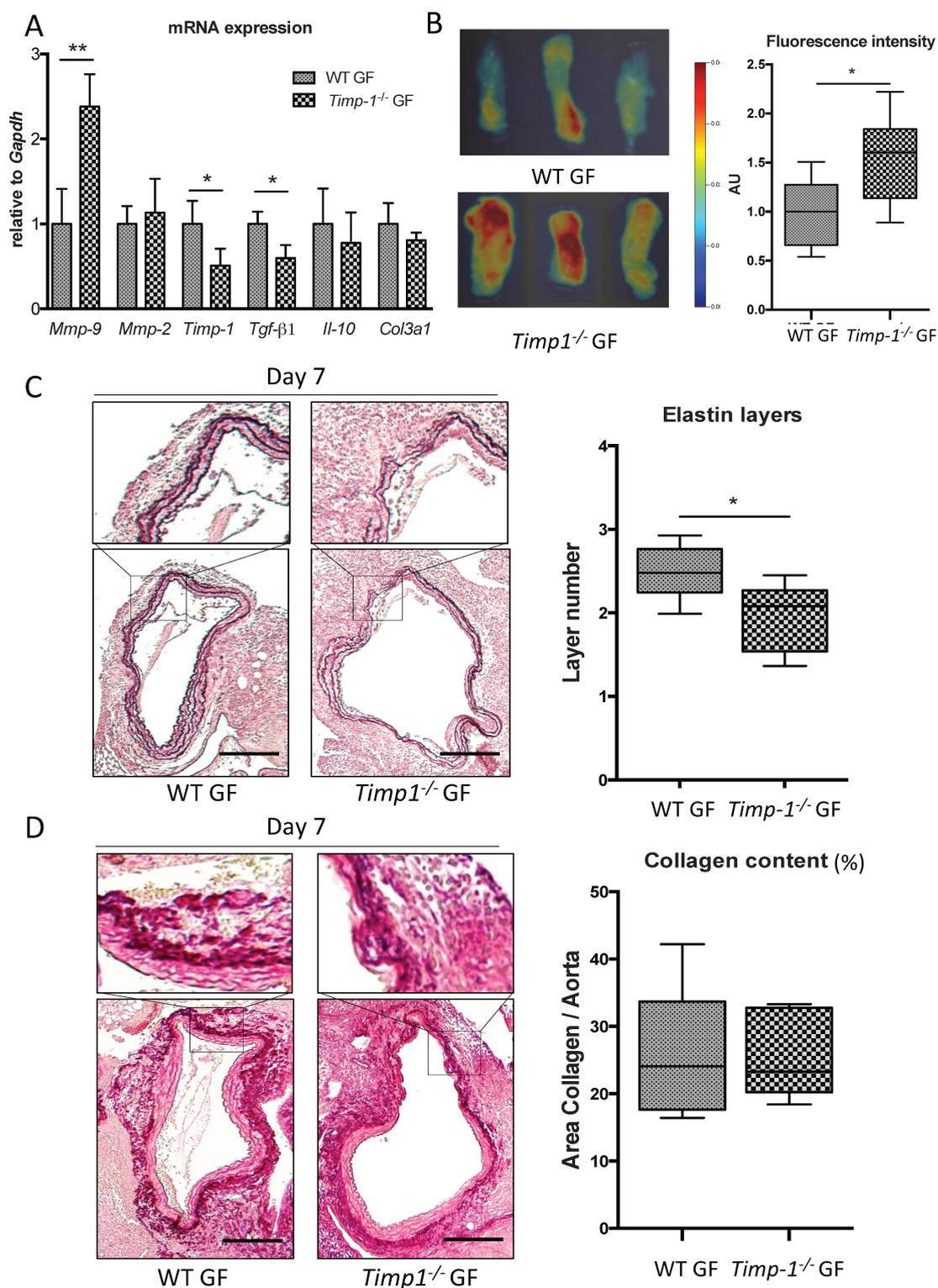


Figure 5. *Timp-1* is involved in the vascular protection induced by GFs. **A**, Quantification of *Mmp-9*, *Mmp-2*, *Timp-1*, *Tgf-β*, *IL-10* and *Col3a1* mRNAs expression in the abdominal aorta from mice treated with Wild-type or *Timp-1*^{-/-} GF cells. **C**, Quantification of matrix

metalloproteinase (MMP)-sense 680 activity in the abdominal aorta after 7 days of treatment, measured by fluorescent tomography. D, representative photomicrographs (Orcein staining, left) and quantitative analysis (right) of elastin layers in the abdominal aortic wall at day 7 and day 14 following engraftment of Wild-type or *Timp-1*^{-/-} GFs. E, representative photomicrographs (Sirius Red staining, left) and quantitative analysis (right) of collagen accumulation in the abdominal aortic wall at day 7 and day 14 following engraftment of Wild-type or *Timp-1*^{-/-} GFs. N=6-8 mice per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$. Scale bar 250 μm .

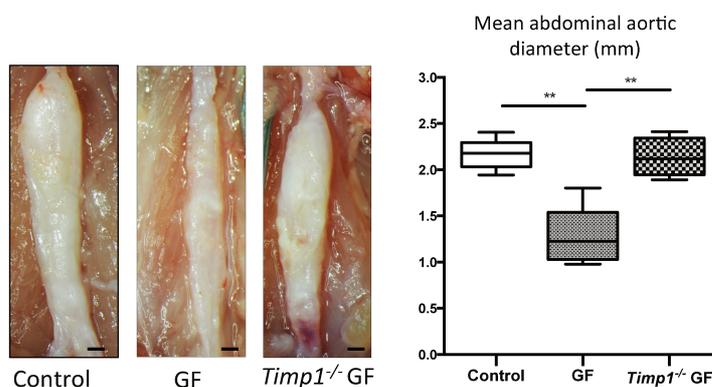


Figure 6. GF cell therapy protected against AAA formation through *Timp-1* production. In a mouse model of elastase-induced AAA, animals were treated by chitosan alone (control), Wild-type or *Timp-1*^{-/-} GFs and sacrificed at day 28. Representative photomicrographs (up) and quantitative analysis (down) of the abdominal aortic diameter at day 28 following engraftment of chitosan alone (control), Wild-type or *Timp-1*^{-/-} GFs. N=6-8 mice per group. ** $P < 0.01$. Scale bar 250 μm .

Gingival fibroblasts prevent AAA rupture

The most deleterious complication of AAA is the aneurysm rupture that is responsible for dramatic mortality and morbidities²². Hitherto, no pharmacological treatment is yet available to prevent aortic rupture. We investigated whether peri-adventitial engraftment of GFs could protect against rupture in a mouse model characterized by frequent AAA-related sudden death¹⁶. Seven days before GF cell therapy (Day-7), C57BL/6J mice were infused with Angiotensin II and were repetitively injected with neutralizing anti-TGF- β antibody for 28 days. One week later (Day 0), a median laparotomy was done, AAA stage was recorded and 2.5×10^6 GFs enfolded in a chitosan gel were engrafted around the abdominal aorta (Figure 7A). The control group received Chitosan gel alone. GF cell-based treatment significantly reduced abdominal aneurysm progression (Figure 7 B), dilation (Figure 7C), severity (Figure 7D) and finally reduced death related to abdominal aortic aneurysm rupture (Figure 7E). By contrast GF cell therapy did not prevent aneurysm formation (Figure 7C) and rupture in the descending thoracic aorta (figure 7F).

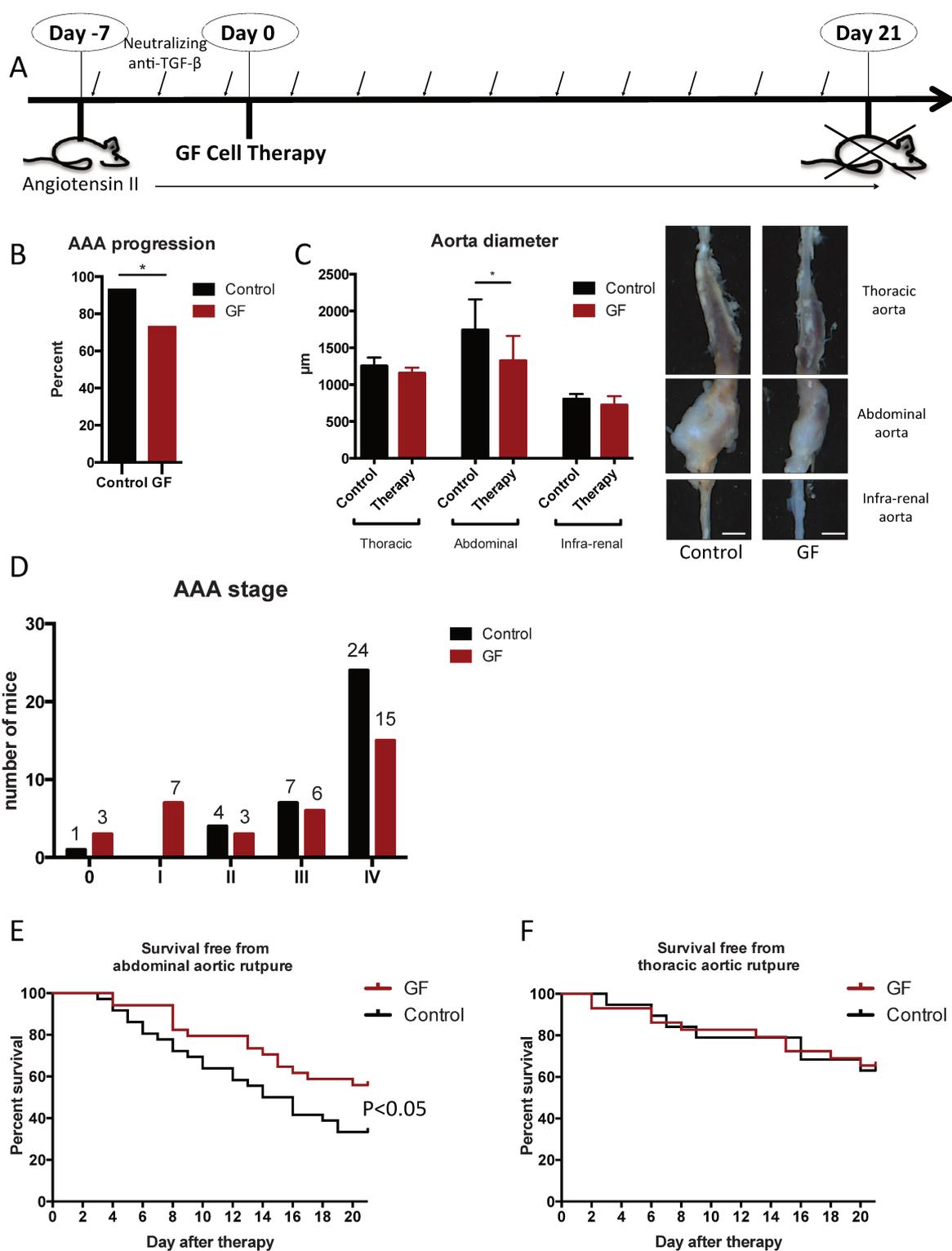


Figure 7. GF cell therapy is protective in an angiotensin II/Anti-Tgf- β mouse model of AAA. A, At day -7, angiotensin II infusion was started in association with neutralizing anti-Tgf- β antibody injection (3 times/week). At day 0, GF engraftment around the abdominal aorta was done and animals were followed during 21 days. B, AAA stage progression between Day 0

and Day 21. C, quantification of aortic diameter at day 21 after GF cell therapy. D, quantification of AAA severity at day 21 after GF cell therapy. Survival curves showing mortality related abdominal (E) or thoracic (F) and aneurysm rupture. N=34-36/group, * $P<0.05$.

Discussion

In this study, we showed that GF cell therapy protected against AAA formation and rupture in two different mouse models of aneurysm formation and rupture. GF prevented vascular wall degradation and limited inflammatory cell infiltration within the abdominal aortic wall. By using genetic invalidation of Timp-1 in GFs, we provided strong evidence that paracrine Timp-1 production by GFs is a pivotal protective mechanism of this cell therapy approach.

It has been previously shown that human GFs exert protective effects *in vitro* when co-cultured with aortic rings or engrafted *in vivo* around injured rabbit carotid artery¹⁵. In the present study, we used two complementary models of aortic aneurysm. Elastase-induced AAA was helpful to analyze in depth the local effects of GF cell therapy on deleterious remodeling of the aortic wall, whereas the Ang II/anti-TGF β model helped us to evaluate the effect of GF therapy on aneurysm rupture and death.

We focused on MMPs/TIMPs that have been clearly identified as major actors in the pathophysiology of AAA. In mouse models of AAA, Mmp-2 and Mmp-9 activities in the aortic wall have been shown to increase over time²³. Pyo et al. found that the absence of *Mmp-9* protected mice from aortic elastase perfusion-infused AAA formation²⁴. In peri-aortic CaCl₂ injury-induced AAA, lesion formation was fully blocked in both *Mmp-9* and -2 gene deficient mice²⁵. Compared with non-aneurysmal aortas with atherosclerotic occlusive disease and normal aortic tissue, levels of active MMP-2 and MMP-9 are significantly increased in human AAA tissue. Zymography and immunoblot analysis demonstrated increased expression of MMP-2 in small AAA lesions and MMP-9 in large AAA lesions²⁶.

Targeting MMPs is an interesting therapeutic approach for the treatment of aneurysmal disease. Doxycycline, a tetracycline antibiotic, has been shown to non-specifically inhibit MMPs and to limit their gene expression²⁷. Several animal studies have demonstrated beneficial effects of Doxycycline in preventing AAA²⁸. However, clinical trials reported conflicting results²⁹. Another approach was based on the modulation of TIMPs, the natural inhibitors of MMPs, found in most tissues and body fluids. An imbalance in the MMP: TIMP activity ratio may underlie the pathogenesis of AAA. Genetic invalidation of *Timp-1* led to increased MMP-2 and MMP-9 activity and worsened aortic aneurysm disease in both hypercholesterolemic *apoE*^{-/-} and non-hypercholesterolemic C57/Bl6 mouse models^{30,31}. In our study, we used a cell-based treatment with peri-aortic delivery of Timp-1. We found an increase of *Timp-1* gene expression in the aorta of GF-treated animals and an important

reduction of metalloprotease activity by tomography analysis. Loss of vascular protection in animals treated with *Timp-1*^{-/-} GF clearly indicated the central beneficial role of Timp-1 production in this GF cell therapy strategy. In angioII/anti-TGF- β model, GF limited dilation and rupture specifically in the abdominal aorta, where cells were engrafted but had no effect on the thoracic aorta, free of GFs, suggesting a local paracrine protection. This locally restricted action is interesting because MMPs are also involved in several physiological functions, including survival, host defense, tissue repair or angiogenesis and their systemic inhibition could have harmful side effects³².

The reduction of metalloprotease activity could also be partially explained by a reduction of Mmp-9 gene expression related to decreased macrophage infiltration. Longo et al. showed that the transfer of *Mmp9*^{+/+} macrophages into *Mmp-9*^{-/-} mice restored AAA formation, indicating that macrophages are a major source of Mmp-9²⁵. The local production of TGF- β by GFs might be responsible for the reduction of both macrophages and T lymphocytes infiltration. However, we believe that the local production of TGF- β by GFs was unlikely to be a major mechanism of vascular protection because GFs still exerted protection despite neutralization of systemic TGF- β activity in the angioII/anti-TGF- β model. Several human and experimental studies have reported that quantitative and qualitative abnormalities of collagen content are associated with aortic dilation and aneurysm formation³³. In GF-treated animals, we observed an increase in collagen content that resulted either from a reduction of matrix degradation due to local production of Timp-1 and/or increased collagen expression since *Col3a1 mRNA* expression was also increased in the aorta from mice treated with GFs. However, it is unlikely that GF cell therapy protection was mediated by collagen production because mice treated collagen content was similar in mice protected mice treated with WT GFs and unprotected mice engrafted with *Timp-1*^{-/-} GF cells.

Conclusion

Using two complementary mouse models, we documented that peri-adventitial GF engraftment represents a promising cell therapy approach to inhibit aneurysm progression and rupture through the local production of Timp-1.

Acknowledgements

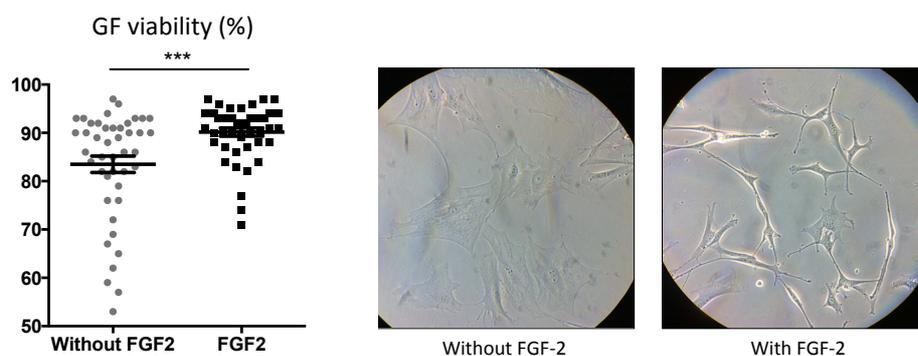
This work was supported by Inserm (HAO, ZM) and the British Heart Foundation (Z.M.).

Competing Financial interests

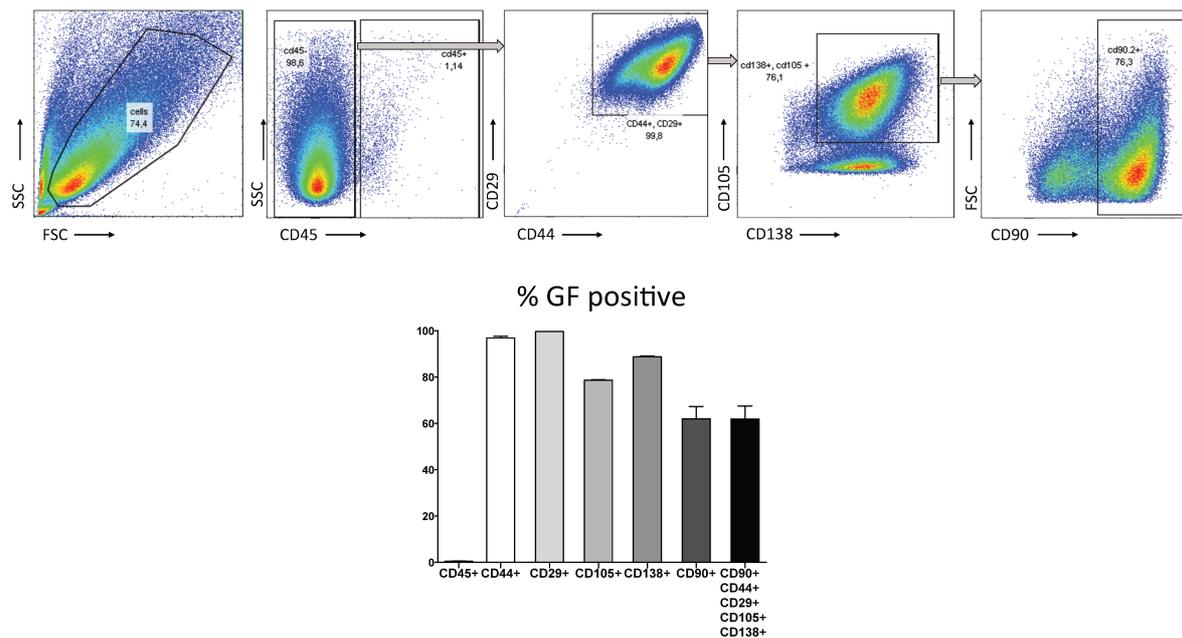
Antoine Lafont is co-founder of Scarcell therapeutics, a company developing GFs cell therapy

Disclosures

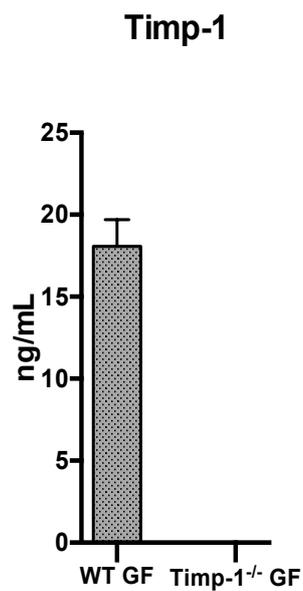
None



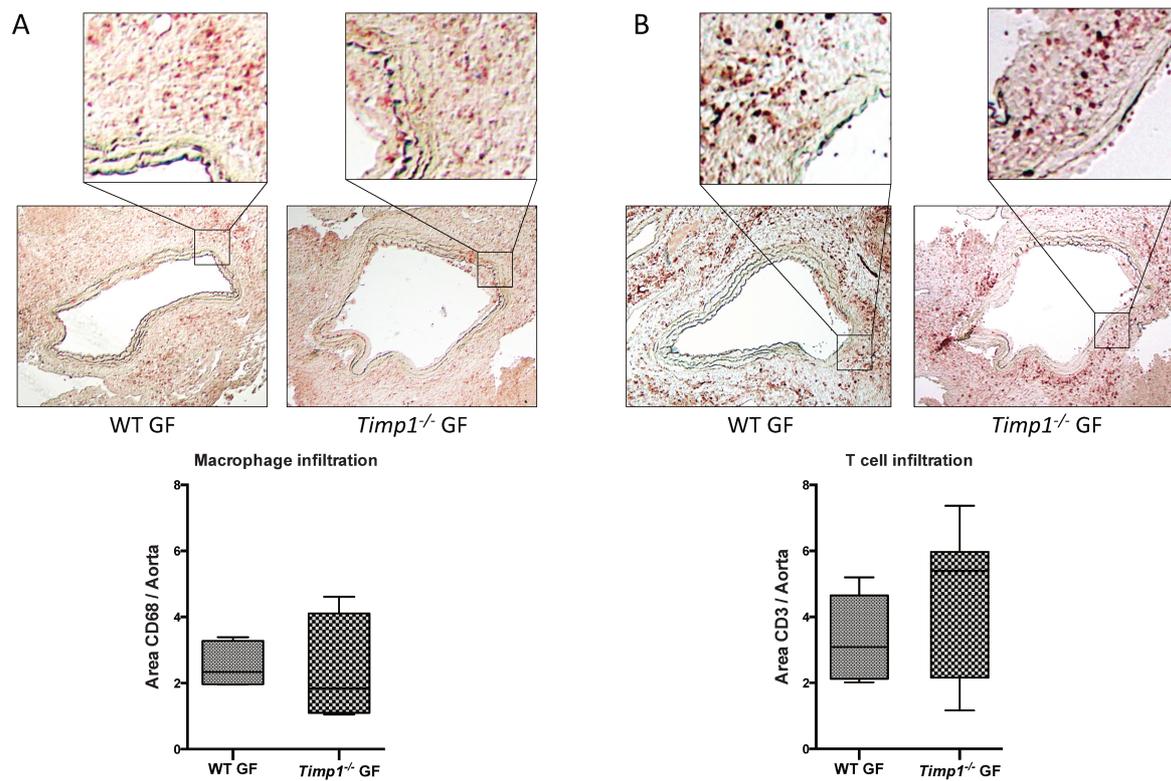
Supplemental figure 1. *In vitro*, cells proliferated but were spherical and exhibited no/few pseudopodia extension. However, in a Fibroblast Growth Factor (FGF)-2 rich medium, GFs developed extended pseudopodia and exhibited elongation and survival was improved. Survival was evaluated using Trypan blue exclusion test. *** $P < 0.0001$



Supplemental figure 2. Flow cytometry characterization of gingival fibroblasts at passage 3. Gingival fibroblasts express CD90 (Thy-1) and CD105 (Endoglin) but lack CD45 expression. In addition, GF express receptors involved in cell-cell adhesion, matrix adhesion (CD138) and migration such as CD44 and CD29.



Supplemental figure 3. Gingival fibroblasts from wild-type (WT) and *Timp-1*^{-/-} mice were isolated and cultured in vitro. *Timp-1* production in the supernatant was measured by ELISA. As shown on the graph, we confirmed that *Timp-1*^{-/-} mice do not produce *Timp-1*.



Supplemental figure 4. Representative photomicrographs and quantitative analysis of CD68+ macrophage (A) and CD3+ T cell (B) infiltration in the abdominal aortic wall at day 7 following engraftment. No significant difference between groups. (n=6-8/group).

References

1. Nordon IM, Hinchliffe RJ, Loftus IM, Thompson MM. Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8:92-102.
2. Klink A, Hyafil F, Rudd J, et al. Diagnostic and therapeutic strategies for small abdominal aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8:338-347.
3. Davis FM, Rateri DL, Daugherty A. Abdominal aortic aneurysm: novel mechanisms and therapies. *Curr Opin Cardiol*. 2015;30:566-573.
4. Potteaux S, Tedgui A. Monocytes, Macrophages and Other Inflammatory Mediators of Abdominal Aortic Aneurysm. *Curr Pharm Des*. 2015;21:4007-4015.
5. Sakalihasan N, Delvenne P, Nussgens BV, Limet R, Lapiere CM. Activated forms of MMP2 and MMP9 in abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 1996;24:127-133.
6. Knox JB, Sukhova GK, Whitemore AD, Libby P. Evidence for altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in human aortic diseases. *Circulation*. 1997;95:205-212.
7. Allaire E, Forough R, Clowes M, Starcher B, Clowes AW. Local overexpression of TIMP-1 prevents aortic aneurysm degeneration and rupture in a rat model. *J Clin Invest*. 1998;102:1413-1420.
8. Qian HS, Gu JM, Liu P, Kauser K, Halks-Miller M, Vergona R, Sullivan ME, Dole WP, Deng GG. Overexpression of PAI-1 prevents the development of abdominal aortic aneurysm in mice. *Gene Ther*. 2008;15:224-232.
9. Schneider F, Saucy F, de Blic R, Dai J, Mohand F, Rouard H, Ricco JB, Becquemin JP, Gervais M, Allaire E. Bone marrow mesenchymal stem cells stabilize already-formed aortic aneurysms more efficiently than vascular smooth muscle cells in a rat model. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2013;45:666-672.
10. Hakkinen L, Larjava H, Fournier BP. Distinct phenotype and therapeutic potential of gingival fibroblasts. *Cytotherapy*. 2014;16:1171-1186.
11. Chhetri DK, Berke GS. Injection of cultured autologous fibroblasts for human vocal fold scars. *Laryngoscope*. 2011;121:785-792.
12. Kobayashi K, Suzuki T, Nomoto Y, Tada Y, Miyake M, Hazama A, Nakamura T, Omori K. Potential of heterotopic fibroblasts as autologous transplanted cells for tracheal epithelial regeneration. *Tissue Eng*. 2007;13:2175-2184.
13. Bhargava S, Patterson JM, Inman RD, MacNeil S, Chapple CR. Tissue-engineered buccal mucosa urethroplasty-clinical outcomes. *Eur Urol*. 2008;53:1263-1269.
14. Gogly B, Naveau A, Fournier B, Reinald N, Durand E, Brasselet C, Coulomb B, Lafont A. Preservation of rabbit aorta elastin from degradation by gingival fibroblasts in an ex vivo model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1984-1990.
15. Durand E, Fournier B, Couty L, Lemitre M, Achouh P, Julia P, Trinquart L, Fabiani JN, Segulier S, Gogly B, Coulomb B, Lafont A. Endoluminal gingival fibroblast transfer reduces the size of rabbit carotid aneurysms via elastin repair. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:1892-1901.
16. Wang Y, Ait-Oufella H, Herbin O, Bonnin P, Ramkhelawon B, Taleb S, Huang J, Offenstadt G, Combadiere C, Renia L, Johnson JL, Tharaux PL, Tedgui A, Mallat Z. TGF-beta activity protects against inflammatory aortic aneurysm progression and complications in angiotensin II-infused mice. *J Clin Invest*. 2010;120:422-432.
17. Fatimi A, Chabrot P, Berrahmoune S, Coutu JM, Soulez G, Lerouge S. A new injectable radiopaque chitosan-based sclerosing embolizing hydrogel for endovascular therapies. *Acta Biomater*. 2012;8:2712-2721.

18. Bhamidipati CM, Mehta GS, Lu G, Moehle CW, Barbery C, DiMusto PD, Laser A, Kron IL, Upchurch GR, Jr., Ailawadi G. Development of a novel murine model of aortic aneurysms using peri-adventitial elastase. *Surgery*. 2012;152:238-246.
19. Manning MW, Cassis LA, Daugherty A. Differential effects of doxycycline, a broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor, on angiotensin II-induced atherosclerosis and abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:483-488.
20. Mellak S, Ait-Oufella H, Esposito B, Loyer X, Poirier M, Tedder TF, Tedgui A, Mallat Z, Potteaux S. Angiotensin II mobilizes spleen monocytes to promote the development of abdominal aortic aneurysm in ApoE^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:378-388.
21. Ait-Oufella H, Wang Y, Herbin O, Bourcier S, Potteaux S, Joffre J, Loyer X, Ponnuswamy P, Esposito B, Dalloz M, Laurans L, Tedgui A, Mallat Z. Natural regulatory T cells limit angiotensin II-induced aneurysm formation and rupture in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:2374-2379.
22. Hellenthal FA, Buurman WA, Wodzig WK, Schurink GW. Biomarkers of AAA progression. Part 1: extracellular matrix degeneration. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6:464-474.
23. Eagleton MJ, Ballard N, Lynch E, Srivastava SD, Upchurch GR, Jr., Stanley JC. Early increased MT1-MMP expression and late MMP-2 and MMP-9 activity during Angiotensin II induced aneurysm formation. *J Surg Res*. 2006;135:345-351.
24. Pyo R, Lee JK, Shipley JM, Curci JA, Mao D, Ziporin SJ, Ennis TL, Shapiro SD, Senior RM, Thompson RW. Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest*. 2000;105:1641-1649.
25. Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest*. 2002;110:625-632.
26. Freestone T, Turner RJ, Coady A, Higman DJ, Greenhalgh RM, Powell JT. Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 1995;15:1145-1151.
27. Liu J, Xiong W, Baca-Regen L, Nagase H, Baxter BT. Mechanism of inhibition of matrix metalloproteinase-2 expression by doxycycline in human aortic smooth muscle cells. *J Vasc Surg*. 2003;38:1376-1383.
28. Kaito K, Urayama H, Watanabe G. Doxycycline treatment in a model of early abdominal aortic aneurysm. *Surg Today*. 2003;33:426-433.
29. Dodd BR, Spence RA. Doxycycline inhibition of abdominal aortic aneurysm growth: a systematic review of the literature. *Curr Vasc Pharmacol*. 2011;9:471-478.
30. Silence J, Collen D, Lijnen HR. Reduced atherosclerotic plaque but enhanced aneurysm formation in mice with inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene. *Circ Res*. 2002;90:897-903.
31. Eskandari MK, Vijungco JD, Flores A, Borensztajn J, Shively V, Pearce WH. Enhanced abdominal aortic aneurysm in TIMP-1-deficient mice. *J Surg Res*. 2005;123:289-293.
32. Lindsey ML, Iyer RP, Jung M, DeLeon-Pennell KY, Ma Y. Matrix metalloproteinases as input and output signals for post-myocardial infarction remodeling. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;91:134-140.
33. de Figueiredo Borges L, Jaldin RG, Dias RR, Stolf NA, Michel JB, Gutierrez PS. Collagen is reduced and disrupted in human aneurysms and dissections of ascending aorta. *Hum Pathol*. 2008;39:437-443.

Discussion

Cette étude a permis de montrer que les FG implantés au niveau péri-aortique survivent *in vivo*, prolifèrent et s'organisent sous la forme d'une couche épaisse. Les FG protègent de la formation et de la rupture des AAA dans deux modèles différents chez la souris. Les FG inhibent la dégradation de la MEC et limitent l'infiltration de lymphocytes et de macrophages dans la paroi vasculaire. La sécrétion de TIMP-1 par les FG et son activité paracrine jouent un rôle majeur dans les mécanismes de protection.

Notre équipe avait déjà montré que les FG humains présentaient des propriétés bénéfiques *in vitro* lorsqu'ils étaient co-cultivés avec des anneaux d'aortes et *in vivo* dans le modèle de dilatation carotidienne chez le lapin induit par l'élastase (278). Cependant, les travaux réalisés dans cette étude sont plus relevant cliniquement avec une allogreffe dans deux modèles d'AAA. Le modèle d'AAA induit par l'application péri-aortique d'élastase a été très utile pour la détection des cellules *in vivo* après implantation, mais aussi pour l'analyse de l'effet local des FG greffés sur le remodelage pathologique de l'aorte. Le modèle d'AAA induit par l'infusion d'Ang II combiné à la neutralisation du TGF- β nous a permis d'évaluer la capacité des FG à prévenir la rupture de l'AAA qui est la complication majeure entraînant la mort chez l'humain. Il nous a permis d'évaluer si la protection est maintenue lorsque l'activité TGF- β , également produite par les FG, est inhibée.

Concernant les mécanismes de protection de la paroi vasculaire, nous nous sommes intéressés particulièrement à la balance MMPs/TIMPs qui a déjà été clairement identifiée comme acteur majeur dans la physiopathologie de l'AAA (63). En effet, il a été montré que la délétion du gène de la MMP-9 inhibe la formation d'AAA dans le modèle de perfusion d'élastase (107). De plus, l'activité des MMP-2 et -9 est systématiquement plus élevée dans la paroi aortique malade et l'inactivation génétique de ces protéases protège contre le développement de l'AAA dans le modèle d'application péri-aortique de CaCl₂ (115). Chez l'homme, la paroi des AAA contient significativement plus de MMP-2 et -9 par rapport à des aortes normales. Par ailleurs, les analyses effectuées par zymographie et Western Blot ont montré une augmentation de l'expression de la MMP-2 pour les petits AAA alors que la MMP-9 est plus élevée pour les gros AAA (116). Cibler les MMPs est une approche thérapeutique intéressante de l'AAA, la doxycycline a montré une certaine efficacité en

inhibant de manière non spécifique les MMPs et en limitant leur expression génique (117). L'administration de doxycycline chez l'animal entraîne un effet bénéfique sur l'incidence et la taille des AAA par une diminution de l'activité des MMPs (118,120). Cependant les essais cliniques utilisant la doxycycline pour contrôler la balance protéolytique de l'AAA ont montré des effets décevants (119).

Une autre approche basée sur la modulation de TIMP-1 montre l'importance de la balance MMPs/TIMPs dans la physiopathologie de l'AAA. Ainsi, les souris hypercholestérolémiques *ApoE*^{-/-} invalidées pour le gène codant pour TIMP-1 ont une maladie anévrismale plus sévère (113). Par ailleurs, les souris *Timp-1*^{-/-} normocholestérolémiques développent de plus gros anévrismes par rapport aux souris normales (114). Dans cette étude, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression de l'ARN messager de TIMP-1 dans les aortes des souris traitées avec les FG, celle-ci était associée à une importante diminution de l'activité des métalloprotéinases par tomographie fluorescente. Par ailleurs, la protection vasculaire obtenue en terme de dégradation matricielle et de dilatation aortique était abolie lorsque nous avons utilisé des FG de souris *Timp-1*^{-/-} suggérant un rôle majeur de TIMP-1 dans les bénéfices obtenus par cette thérapie cellulaire. Dans le modèle d'AAA induit par l'Ang II et la neutralisation du TGF- β , les FG limitent la dilatation et la rupture de l'anévrisme au niveau abdominal mais ils n'ont aucun effet protecteur au niveau de l'aorte thoracique, à distance de leur site d'implantation suggérant une action paracrine des FG. Cette action locale ciblée des FG est intéressante dans la mesure où elle n'affecte probablement pas les MMPs dans d'autres territoires. Les MMPs ont des fonctions bénéfiques qu'il convient de préserver, elles sont impliquées dans la survie cellulaire, la réparation tissulaire ou l'angiogenèse (68).

La réduction de l'activité protéasique globale quantifiée par ViSen™ pourrait également s'expliquer par la réduction locale de l'expression de la MMP-9, elle-même attribuable à une diminution marquée de l'infiltration macrophagique. En effet, il a été montré que les macrophages sont la principale source de MMP-9 dans l'AAA. Chez la souris, Longo *et al.* ont rapporté que le transfert de macrophage *Mmp-9*^{+/+} chez la souris *Mmp-9*^{-/-} restaure la formation d'AAA (115). Ceci étant dit, le mécanisme qui limite l'infiltration macrophagique n'est pas élucidé. Nous avons émis l'hypothèse que la sécrétion locale de TGF- β par les FG pourrait être responsable de cette diminution d'infiltration inflammatoire. Dai *et al.* ont rapporté que la surexpression de TGF- β dans la paroi aortique de rat réduit l'infiltration macrophagique (159). Dans la même idée, Wang *et al.* ont montré que la neutralisation du

TGF- β par injection répétée d'anticorps neutralisant aggrave l'infiltration monocytaire et macrophagique chez la souris (127). Cependant, il est probable que la production de TGF- β par les FG ne soit pas le mécanisme central de protection de l'aorte anévrismale puisque le transfert de FG reste bénéfique dans le modèle d'AAA induit par la neutralisation systémique du TGF- β en administrant un anticorps bloquant combiné à l'infusion continue d'Ang II.

Les macrophages M1 ont un rôle majeur dans la dégradation des fibres élastiques et dans l'induction de l'apoptose des CML vasculaires (98,133). Les FG ont la capacité de bloquer l'activation des monocytes/macrophages et d'orienter le phénotype des macrophages M1 vers un phénotype M2 réparateur (245,247). Ces fonctions immuno-modulatrices peuvent être attribuées, entre autres, à la libération de facteurs solubles comme, l'IL-10, la PGE2 ou d'IDO (225). Un ou plusieurs de ces mécanismes limiterait l'infiltration macrophagique mais n'a pas été exploré dans cette étude. Les FG peuvent induire l'apoptose des lymphocytes T activés (222), inhiber la prolifération des lymphocytes T effecteurs et inversement induire l'expansion des lymphocytes T régulateurs. Les lymphocytes T, en produisant de l'IFN- γ , peuvent à leur tour induire l'expression du HLA de classe II et d'IDO par les FG (244). La diminution de l'infiltration lymphocytaire chez les souris traitées avec les FG a été mise en évidence dans cette étude.

Des études chez l'animal et chez l'homme ont montré que des altérations qualitatives et quantitatives du collagène étaient associées à une augmentation du diamètre de l'aorte et la formation d'AAA (97). Nous avons observé une augmentation de la quantité de collagène dans la paroi des aortes de souris traitées avec les FG. Cette augmentation résulte d'une part de la réduction de la dégradation de la paroi vasculaire par la production de TIMP-1 et d'autre part de l'augmentation de la synthèse comme le montre l'augmentation d'expression de l'ARN messager du collagène de type III. Toutefois, compte tenu du fait que le contenu aortique en collagène n'est pas différent entre les souris traitées avec les FG contrôles et les souris traitées avec des FG *Timp-1*^{-/-} et que la protection vasculaire est abolie dans le groupe utilisant les FG *Timp-1*^{-/-}, on peut conclure que cette surproduction de collagène n'est pas le mécanisme de protection central de la thérapie cellulaire utilisant les FG.

L'utilisation de deux modèles complémentaires d'AAA chez la souris a permis de montrer que le transfert local de FG inhibe la progression et la rupture de l'AAA par la production de TIMP-1. Ces résultats viennent confirmer le potentiel réparateur des FG au niveau de la paroi vasculaire et suggèrent qu'ils pourraient être utilisés localement pour le traitement de l'AAA.

Perspectives

Les qualités de réparation tissulaire et les fonctions immunomodulatrices des FG font de ces cellules des candidats très prometteurs pour la thérapie cellulaire (257). Parallèlement, la simplicité technique d'isolation et de culture de cette population cellulaire renforce leur potentiel thérapeutique applicable en médecine. Cependant, il reste encore quelques étapes avant de prétendre à une réelle utilisation chez l'homme. Une des principales questions à laquelle il convient désormais de répondre concerne le mode de greffe à développer. Trois possibilités s'offrent à nous, une injection intravasculaire sous pression, un dépôt péri-adventitial ou un « coating » sur endoprothèse. Chacune de ces techniques a des avantages et des inconvénients et il faudra probablement privilégier l'approche qui sera la plus efficace en terme de régénération et la moins invasive :

- L'injection intravasculaire sous pression nécessite une laparotomie pour le clamage aortique, par ailleurs, l'aorte anévrismale est déjà fragilisée par la maladie, il serait donc risqué d'injecter les FG sous pression.

- Ces travaux ont montré que l'application péri-adventitielle est efficace pour prévenir le développement ainsi que la rupture de l'AAA, cependant, cette technique nécessite aussi un acte chirurgical invasif afin de déposer les FG autour de l'aorte.

- La mise en place d'une endoprothèse préalablement « coatée » avec les FG est la technique la moins invasive, elle permettrait d'une part, d'empêcher la rupture de l'AAA grâce à l'endoprothèse, et d'autre part de promouvoir la réparation de la paroi ainsi que la régulation de l'inflammation sans les contraintes mécaniques du flux sanguin et de l'onde de pouls.

La stratégie du « coating » sur endoprothèse est la technique la moins invasive, elle sera donc privilégiée et testée prochainement chez le porc.

ANNEXE

ANNEXE 1 :

Tableau des cibles thérapeutiques de l'anévrisme de l'aorte abdominale

Cellular or molecular pathway	Target	Intervention: mechanism	Response to AAA in rodent model			
			Calcium Chloride	Elastase	AngII	
Inflammation	Macrophage	Everolimus: mTOR pathway inhibitor that decreases CCR2 expression on monocytes ⁵⁴⁵			↓	
		MKEY: CCL5-based synthetic cyclic peptide that prevents CXCL4-CCL5 heterodimer formation ²⁰		↓	↓	
		AMD3100: a CXCR4 antagonist ⁵⁴⁴	↓			
	T Lymphocytes	CD-31-derived peptide: immunosuppressive effect through activation of CD31 pathway ⁵⁴⁶			↓	
		IL	Anakinra: IL-1 β receptor inhibitor ¹³		↓	
Cellular signalling	TNF	Mesenchymal stem cells: suppress inflammatory responses ^{12 567}		↓	↓	
		Infliximab: monoclonal antibody against TNF- α ⁵²¹	↓			
	c-JNK	SP600125: selective inhibitor of JNK signalling ²³	↓			
		Azathioprine: immunosuppressive that also inhibits downstream JNK signalling ⁵⁴⁷			↓	
	TGF- β	Polyclonal anti-TGF- β neutralising antibody ¹¹			↑	
		Cyclosporine: immunosuppressive that also induces TGF- β signalling ⁵²⁴	↓	↓		
		PPAR γ	Rosiglitazone: PPAR γ agonist ⁵⁶⁸			↓
ECM degradation	MMP	Pioglitazone: PPAR γ agonist ⁵⁶⁹			↓	
		Doxycycline: non-selective MMP antagonist. AAA formation ^{530 570}		↓	↓	
		AAA progression ⁵³²			↔	
	Cysteine Proteases	BDA-410: calpain specific inhibitor ⁵⁷¹			↓	
	Serine Proteases	NK3201: chymase specific inhibitor ⁵⁷²			↓	
MicoRNAs	miR-21	anti-miR-21: miR-21 antagonist ⁵⁴⁹		↑	↑	
		Lentiviral vector of miR-21: systemic viral vector that overexpresses miR-21 ⁵⁴⁹		↓	↓	
	miR-29b	anti-miR-29b: miR-29b antagonist ⁵⁷¹		↓	↓	
		Lentiviral vector of miR-29b: systemic viral vector that overexpresses miR-29b ²¹		↑	↑	
Phospholipid components	miR-712, miR-205 (human homolog)	anti-miR-712: miR-712 antagonist ²²			↓	
		Cyclooxygenase-2	Celecoxib: selective COX-2 inhibitor ⁵⁷³			↓
			Prostanoid Receptor EP4	ONO-AE3-208: a prostanoid receptor antagonist ⁵⁷⁴	↓	
	5-lipoxygenase	LP105: pirinixic acid derivative; inhibitor of 5-LOX ⁵⁷⁵			↓	

AAA, Abdominal aortic aneurysm; CCL5, C-C motif ligand 5; COX-2, cyclooxygenase-2; CXCL4, chemokine (C-X-C motif) ligand 4; CXCR4, chemokine (C-X-C motif) receptor 4; ECM, extracellular matrix; IL, interleukins; JNK, Jun N-terminal kinase; miR, microRNA; MMP, matrix metalloproteinases; mTOR, mammalian target of rapamycin; PPAR, Peroxisome proliferator-activated receptor; TNF, tumour necrosis factor; 5-LOX, 5-lipoxygenase.

ANNEXE 2 :

Tableau résumant les applications cliniques utilisant des CSM (203)

Disease	Sample size	Study period	MSCs		Effect	Stage
			Source of MSCs	Dosage ^a		
Acute and chronic GvHD	18 Adults	3 Days to 1 year	Allogeneic BM-MSCs	1–2 × 10 ⁶ /kg, 1 dose	Y	Phase I/II
GvHD	20 Adults	1 Year	Allogeneic BM-MSCs	/	Y	/
GvHD	3 Adults	20–103 Days	Allogeneic BM-MSCs	0.5 × 10 ⁶ /kg, 1 dose	Y	/
GvHD	12 Adults	795–1914 days	Allogeneic BM-MSCs	0.4 – 1.1 × 10 ⁶ /kg, 3 doses	Y	/
Sclerodermatous chronic GvHD	4 Adults	4.6–23 Months	Allogeneic BM-MSCs	1–2 × 10 ⁷ , 1 dose	Y	/
GvHD	32 Adults	28 Days	Allogeneic BM-MSCs	2 or 8 × 10 ⁶ /kg, 1 dose	Y	/
GvHD	55 Adults	60 Months	Allogeneic BM-MSCs	0.4–9 × 10 ⁷ , 1–5 doses	Y	Phase II
GvHD	7 Children	29 Months	Allogeneic BM-MSCs	0.4–3 × 10 ⁶ /kg, 1 dose	Y	/
GvHD	8 Adults	3 Years	Allogeneic BM-MSCs	1(0.7–9) × 10 ⁶ /kg, 1–2 doses	Y	/
Multiple sclerosis	10 Adults	10 Months	Autogenous BM-MSCs	/	Y	Phase IIA
Multiple sclerosis	8 Adults	/	Autogenous BM-MSCs	2 × 10 ⁶ /kg, 1 dose	Y	/
Multiple sclerosis	7 Adults	6 Months	BM-MSCs	2 × 10 ⁷ , 1 dose	Y	/
Multiple sclerosis	10 Adults	1 Year	Autologous BM-MSCs	1–2 × 10 ⁶ /kg, 1 dose	Y	Phase IIA
Multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis	MS: 15 adults, ALS: 19 adults	6 Months	Autologous BM-MSCs	MS: 6.32 × 10 ⁷ ; ALS: 1.74 × 10 ⁷ , 1 dose	Y	Phase I/II
Multiple sclerosis	10 Adults	12 Months	Autogenous BM-MSCs	3–5 × 10 ⁷ , 1 dose	Y	Phase I
Multiple sclerosis	10 Adults	13–26 Months	Autologous BM-MSCs	8.73 × 10 ⁶ , 1 dose	Y	/
Multiple sclerosis	15 Adults	12 Months	Autogenous BM-MSCs	1–2 × 10 ⁶ /kg, 1 dose	Y	Phase II
Multiple sclerosis	16 Adults	6 Months	Placenta MSCs	15–60 × 10 ⁷ , 1 dose	Y	Phase IB
Kidney transplantation	159 Adults	1 Year	Autogenous BM-MSCs	1–2 × 10 ⁶ /kg, 1 dose	Y	/
Kidney transplantation	2 Adults	360 Days	Autologous BM-MSCs	1.7 or 2 × 10 ⁶ /kg, 1 dose	Y	/
Kidney transplantation	4 Adults	540 Days	Autologous BM-MSCs	2 × 10 ⁶ /kg, 1 dose	Y	Phase I/II
Kidney transplantation	6 Adults	6 Months	Autologous BM-MSCs	1 × 10 ⁶ /kg, 2 doses	Y	Phase I
Type II Diabetes	10 Adults	3 Months	Allogeneic placenta-derived MSCs	1.35 × 10 ⁶ /kg, 1 dose	Y	Phase I
Diabetes	41 Adults	2 Years	Autologous BM-MSCs	Intramuscular. No clear statement for dosage	Y	/
Osteoarthritis	4 Adults	1 Year	Autogenous BM-MSCs	8–9 × 10 ⁶ , injected in the knee	N	/
Crohn's disease	12 Adults	12 Months	Autogenous BM-MSCs	2 × 10 ⁷ at 4-week intervals, injected into the lumen and the wall of the tracks	Y	/
Crohn's disease	5 Adults	12–30 Months	Autologous ASCs	3–30 × 10 ⁶ injected into the wall of the tracks	N	Phase I
Crohn's disease	9 Adults	6 Weeks	Autologous BM-MSCs	1–2 × 10 ⁶ /kg, 2 doses	Y	Phase I
Crohn's disease	12 Adults	2 Years	Human placenta-MSCs	2–8 × 10 ⁸ /person, 2 doses	Y	Phase I
Crohn's disease	16 Adults	6 Weeks	Allogeneic MSCs	2 × 10 ⁶ /kg, 4 doses	Y	Phase II
SLE	15 Adults	17.2 ± 9.5 Months	Autogenous MSCs	1 × 10 ⁶ /kg, 1 dose	Y	/
SLE	4 Adults	12–18 Months	Allogeneic BM-MSCs	≥ 1 × 10 ⁶ /kg, 1 dose	Y	/
Ulcerative colitis	40 Adults	/	Allogeneic BM-MSCs	1.5 × 10 ⁸ , 1 dose	Y	/

Abbreviations: BM-MSC, bone marrow-derived mesenchymal stem cell; GvHD, graft versus host disease; SLE, systemic lupus erythematosus; Y, effect was shown; N, effect was not shown
^aMSCs were administrated intravenously except the special statement

Bibliographie

1. Organization WH. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. 2011;
2. Pencina MJ, D'Agostino RB, Larson MG, Massaro JM, Vasan RS. Predicting the 30-year risk of cardiovascular disease: The framingham heart study. *Circulation*. 2009;119(24):3078–84.
3. Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald a. P, Sans S, Menotti a., De Backer G, et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: The SCORE project. *Eur Heart J*. 2003;24(11):987–1003.
4. Ernst CB. Abdominal aortic aneurysm. *N Engl J Med*. 1993;329(24):1753–9.
5. Johnston KW, Rutherford RB, Tilson MD, Shah DM, Hollier L, Stanley JC. Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. *Journal of Vascular Surgery*. 1991. p. 452–8.
6. Klink A, Hyafil F, Rudd J, Faries P, Fuster V, Mallat Z, et al. Diagnostic and therapeutic strategies for small abdominal aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol*. Nature Publishing Group; 2011;8(6):338–47.
7. Lederle F a, Johnson GR, Wilson SE, Chute EP, Hye RJ, Makaroun MS, et al. The aneurysm detection and management study screening program: validation cohort and final results. Aneurysm Detection and Management Veterans Affairs Cooperative Study Investigators. *Arch Intern Med*. 2000;160(10):1425–30.
8. Fink H, Lederle F, Roth C, Bowles C, Nelson D, Haas M. The accuracy of physical examination to detect abdominal aortic aneurysm. *Arch Intern Med* [Internet]. 2000;160(6):833–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10737283>
9. Elmore JR, Obmann M a, Kuivaniemi H, Tromp G, Gerhard GS, Franklin DP, et al. Identification of a genetic variant associated with abdominal aortic aneurysms on chromosome 3p12.3 by genome wide association. *J Vasc Surg Off Publ Soc Vasc Surg [and] Int Soc Cardiovasc Surgery, North Am Chapter* [Internet]. Elsevier Inc.; 2009;49(6):1525–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19497516>
10. Norman PE, Curci J a. Understanding the effects of tobacco smoke on the pathogenesis of aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(7):1473–7.
11. Norman PE, Davis TME, Le MTQ, Golledge J. Matrix biology of abdominal aortic aneurysms in diabetes: mechanisms underlying the negative association. *Connect Tissue Res*. 2007;48(3):125–31.
12. De Rango P, Farchioni L, Fiorucci B, Lenti M. Diabetes and Abdominal Aortic Aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;47(3):243–61. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1078588413007405>
13. Forsdahl SH, Singh K, Solberg S, Jacobsen BK. Risk factors for abdominal aortic aneurysms: a 7-year prospective study: the tromsø study, 1994–2001. *Circulation*. 2009;119(16):2202–8.
14. Scott R, Bridgewater S, Ashton H. Randomized clinical trial of screening for abdominal aortic aneurysm in women. *Br J Surg* [Internet]. 2002;89(3):283–5.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11872050>

15. Panico S, Mattiello a. Epidemiology of cardiovascular diseases in women in Europe. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;20(6):379–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2010.02.004>
16. Brown LC, Powell JT. Risk factors for aneurysm rupture in patients kept under ultrasound surveillance. UK Small Aneurysm Trial Participants. *Ann Surg*. 1999;230(3):289–96; discussion 296–7.
17. Prins BP, Lagou V, Asselbergs FW, Snieder H, Fu J. Genetics of coronary artery disease: Genome-wide association studies and beyond. *Atherosclerosis* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;225(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.05.015>
18. Mons U, Muezzinler a., Gellert C, Schottker B, Abnet CC, Bobak M, et al. Impact of smoking and smoking cessation on cardiovascular events and mortality among older adults: meta-analysis of individual participant data from prospective cohort studies of the CHANCES consortium. *Bmj* [Internet]. 2015;350(apr20 2):h1551–h1551. Available from: <http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.h1551>
19. Buckley C, Wyble CW, Borhani M, Ennis TL, Kobayashi DK, Curci J a., et al. Accelerated enlargement of experimental abdominal aortic aneurysms in a mouse model of chronic cigarette smoke exposure. *J Am Coll Surg*. 2004;199(6):896–903.
20. Daugherty a, Cassis L. Chronic angiotensin II infusion promotes atherogenesis in low density lipoprotein receptor -/- mice. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;892(606):108–18.
21. Daugherty A, Manning MW, Cassis L a. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysm in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Investig*. 2000;105(11):1605–12.
22. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger a M, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. 1998;97(18):1837–47.
23. Stamler J, Daviglius ML, Garside DB, Dyer a R, Greenland P, Neaton JD. Relationship of baseline serum cholesterol levels in 3 large cohorts of younger men to long-term coronary, cardiovascular, and all-cause mortality and to longevity. *JAMA*. 2000;284(3):311–8.
24. Police SB, Thatcher SE, Charnigo R, Daugherty A, Cassis LA. Obesity promotes inflammation in periaortic adipose tissue and angiotensin ii-induced abdominal aortic aneurysm formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(10):1458–64.
25. Haffner S, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. 1998;229–34.
26. Burke AP, Kolodgie FD, Zieske A, Fowler DR, Weber DK, Varghese PJ, et al. Morphologic findings of coronary atherosclerotic plaques in diabetics: A postmortem study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(7):1266–71.
27. Shantikumar S, Ajjan R, Porter KE, Scott DJ a. Diabetes and the Abdominal Aortic Aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;39(2):200–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejvs.2009.10.014>
28. Golledge J, Karan M, Moran CS, Muller J, Clancy P, Dear AE, et al. Reduced

- expansion rate of abdominal aortic aneurysms in patients with diabetes may be related to aberrant monocyte-matrix interactions. *Eur Heart J*. 2008;29(5):665–72.
29. Åstrand H, Rydén-Ahlgren Å, Sundkvist G, Sandgren T, Länne T. Reduced Aortic Wall Stress in Diabetes Mellitus. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2007;33(5):592–8.
 30. Daniel AE, Van Buul JD. Endothelial junction regulation: A prerequisite for leukocytes crossing the vessel wall. *J Innate Immun*. 2013;5(4):324–35.
 31. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. *Blood*. 1999;94(1):1–8.
 32. Alhenc-Gélas F, Soubrier F, Hubert C, Allegrini J, Corvol P. The peculiar characteristics of the amino acid sequence of angiotensin I-converting enzyme, as determined by cDNA cloning of the human endothelial enzyme. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1989;14 Suppl 4:S6–9.
 33. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, Van Zandvoort M a MJ, Oude Egbrink MG a. The endothelial glycocalyx: Composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2007;454(3):345–59.
 34. Thi MM, Tarbell JM, Weinbaum S, Spray DC. The role of the glycocalyx in reorganization of the actin cytoskeleton under fluid shear stress: a “bumper-car” model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(47):16483–8.
 35. Rosenberg RD, Rosenberg JS. Natural anticoagulant mechanisms. *J Clin Invest*. 1984;74(1):1–6.
 36. Clark JM, Glagov S. Transmural organization of the arterial media. The lamellar unit revisited. *Arteriosclerosis*. 2015;5(1):19–34.
 37. Weissberg PL, Cary NR, Shanahan CM. Gene expression and vascular smooth muscle cell phenotype. *Blood Press Suppl*. 1995;2:68–73.
 38. Shanahan CM, Weissberg PL. Smooth muscle cell heterogeneity: patterns of gene expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18(3):333–8.
 39. Ruckman JL, Luvall P a., Hill KE, Giro MG, Davidson JM. Phenotypic stability and variation in cells of the porcine aorta: Collagen and elastin production. *Matrix Biol*. 1994;14(2):135–45.
 40. Bloem LJ, Chen L, Konigsberg WH, Bach R. Serum Stimulation of Quiescent Human Fibroblasts Induces the Synthesis of Tissue Factor mRNA Followed by the Appearance of Tissue Factor Antigen and Procoagulant Activity. 1989;423:418–23.
 41. Mulligan-Kehoe MJ, Simons M. Vasa vasorum in normal and diseased arteries. *Circulation*. 2014;129(24):2557–66.
 42. Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular Extracellular Matrix and Arterial Mechanics. *Physiol Rev*. 2010;89(3):957–89.
 43. Xu J, Shi G-P. Vascular wall extracellular matrix proteins and vascular diseases. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;1842(11):2106–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25045854>
 44. Jacob MP, Badier-Commander C, Fontaine V, Benazzoug Y, Feldman L, Michel JB. Extracellular matrix remodeling in the vascular wall. *Pathol Biol* [Internet].

- 2001;49(4):326–32. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0369811401001511>
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0369811401001511/pdf?md5=a150090529693e0ae6dca67d5289fb37&pid=1-s2.0-S0369811401001511-main.pdf>
45. Penner AS, Rock MJ, Kielty CM, Michael Shipley J. Microfibril-associated glycoprotein-2 interacts with fibrillin-1 and fibrillin-2 suggesting a role for MAGP-2 in elastic fiber assembly. *J Biol Chem*. 2002;277(38):35044–9.
 46. Jacob M. L ' invalidation du gène de la fibuline-5 induit une élastinopathie. *medecine/science*. 2003;19:4–6.
 47. Li DY, Brooke B, Davis EC, Mecham RP, Sorensen LK, Boak BB, et al. Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. *Nature*. 1998;393(May):276–80.
 48. Choi WS, Mitsumoto a, Kochevar IE. Involvement of reactive oxygen species in TGF-beta1-induced tropoelastin expression by human dermal fibroblasts. *Photochem Photobiol* [Internet]. 2009;85(6):1425–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19709383>
 49. Osei-Owusu P, Knutsen RH, Kozel B a, Dietrich HH, Blumer K, Mecham RP. Altered Reactivity of Resistance Vasculature Contributes to Hypertension in Elastin Insufficiency. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* [Internet]. 2014;654–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24414067>
 50. Myllyharju J. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet* [Internet]. 2004;20(1):33–43. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168952503003196>
 51. van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J*. 1991;5(13):2814–23.
 52. Malfait F, De Paepe A. The Ehlers-Danlos Syndrome. In: Halper J, editor. *Progress in Heritable Soft Connective Tissue Diseases SE - 9* [Internet]. Springer Netherlands; 2014. p. 129–43. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-7893-1_9
 53. Halper J. Proteoglycans and Diseases of Soft Tissues. In: Halper J, editor. *Progress in Heritable Soft Connective Tissue Diseases SE - 4* [Internet]. Springer Netherlands; 2014. p. 49–58. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-7893-1_4
 54. Ornitz DM. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: Complex interactions essential for development. *BioEssays*. 2000;22(2):108–12.
 55. LaManna G, Barone G. The molecular structure of cell adhesion molecules. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 1997;66:823–62. Available from: <http://www.annualreviews.org.gate2.inist.fr/doi/pdf/10.1146/annurev.biochem.66.1.823>
 56. Hynes RO, Yamada KM. Fibronectins: Multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol*. 1982;95(2 I):369–77.
 57. Hallmann R, Horn N, Selg M, Wendler O, Pausch F, Sorokin LM. Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev*. 2005;85(3):979–1000.
 58. Cheuk BL., Cheng SW. Differential expression of integrin $\alpha 5\beta 1$ in human abdominal aortic aneurysm and healthy aortic tissues and its significance in pathogenesis. *J Surg Res* [Internet]. 2004;118(2):176–82. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022480403003512>

59. Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 2008;75(2):346–59.
60. Takagi H, Manabe H, Kawai N, Goto S-N, Umemoto T. Plasma tissue plasminogen activator and abdominal aortic aneurysm presence: a systematic review and meta-analysis. *Ann Vasc Surg. United States;* 2010 Jul;24(5):686–9.
61. Lindstedt KA, Kovanen PT. Proteolysis of pericellular matrix: A process linking inflammation to plaque destabilization and rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(12):2205–6.
62. Maquart FX, Bellon G, Pasco S, Monboisse JC. Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation. *Biochimie.* 2005;87(3-4 SPEC. ISS.):353–60.
63. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;463–516.
64. Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol [Internet].* 2004;4(8):617–29. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri1418>
65. Palombo D, Maione M, Cifiello BI, Udini M, Maggio D, Lupo M. Matrix metalloproteinases. Their role in degenerative chronic diseases of abdominal aorta. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 1999;40(2):257–60.
66. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 2000;14:163–76.
67. Lijnen HR. Metalloproteinases in development and progression of vascular disease. *Pathophysiol Haemost Thromb [Internet].* 2004;33(5-6):275–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15692229>
68. Rohani MG, Parks WC. Matrix remodeling by MMPs during wound repair. *Matrix Biol [Internet]. Elsevier B.V.;* 2015;44-46:113–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2015.03.002>
69. Bode W, Fernandez-Catalan C, Grams F, Gomis-Rüth FX, Nagase H, Tschesche H, et al. Insights into MMP-TIMP interactions. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;878:73–91.
70. Will H, Atkinson SJ, Butler GS, Smith B, Murphy G. The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3. *J Biol Chem.* 1996;271(29):17119–23.
71. Bigg HF, Shi YE, Liu YE, Steffensen B, Overall CM. Specific, high affinity binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH-terminal hemopexin-like domain of human gelatinase A: TIMP-4 binds progelatinase A and the COOH-terminal domain in a similar manner to TIMP-2. *J Biol Chem.* 1997;272(24):15496–500.
72. Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett.* 1992;298(1):29–32.
73. Kikuchi K, Kadono T, Furue M, Tamaki K. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) may be an autocrine growth factor in scleroderma fibroblasts. *The Journal of investigative dermatology.* 1997. p. 281–4.

74. Ries C. Cytokine functions of TIMP-1. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2014;71(4):659–72. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-013-1457-3>
75. Clark I, Swingler T, Sampieri C, Edwards D. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2008;40(6-7):1362–78. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272507004104>
76. Nagashima H, Aoka Y, Sakomura Y, Uto K, Sakuta A, Aomi S, et al. Matrix metalloproteinase 2 is suppressed by trapidil, a CD40-CD40 ligand pathway inhibitor, in human abdominal aortic aneurysm wall. *J Vasc Surg* [Internet]. 2004;39(2):447–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14743151>
77. Hanemaaijer R, Koolwijk P, le Clercq L, de Vree WJ, van Hinsbergh VW. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. Effects of tumour necrosis factor alpha, interleukin 1 and phorbol ester. *Biochem J* [Internet]. 1993;296:803–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1137766&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
78. Newby AC. Matrix metalloproteinase inhibition therapy for vascular diseases. *Vascul Pharmacol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012 [cited 2014 Nov 3];56(5-6):232–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22326338>
79. Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, Whitham SE, Docherty AJ, Angel P, et al. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* [Internet]. 1987;6(7):1899–904. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=553574&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
80. Norsgaard H, Kurdykowski S, Descargues P, Gonzalez T, Marstrand T, Dünstl G, et al. Calcipotriol counteracts betamethasone-induced decrease in extracellular matrix components related to skin atrophy. *Arch Dermatol Res* [Internet]. 2014;306(8):719–29. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00403-014-1485-3> \nfile:///Users/jurgen/Documents/Hybrid/downloads/Springer/Springer Confirmed OA/art%3A10.1007%2Fs00403-014-1485-3.pdf\npapers2://publication/doi/10.1007/s00403-014-1485-3
81. Zhou T-B, Qin Y-H. The potential mechanism for the different expressions of gelatinases induced by all-trans retinoic acid in different cells. *J Recept Signal Transduct* [Internet]. 2012;32(3):129–33. Available from: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10799893.2012.672992>
82. Qin Y, Shi GP. Cysteiny l cathepsins and mast cell proteases in the pathogenesis and therapeutics of cardiovascular diseases. *Pharmacol Ther* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;131(3):338–50. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3134138&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
83. Wang Y, Tang C, Qin Y. Cathepsins: a new culprit behind abdominal aortic aneurysm. *Regen Med Res* [Internet]. 2013;1:5. Available from: <http://www.regenmedres.com/content/1/1/5>
84. Shi GP, Sukhova GK, Grubb A, Ducharme A, Rhode LH, Lee RT, et al. Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms. *J Clin Invest* [Internet].

- 1999;104(9):1191–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=409823&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
85. Sukhova GK, Shi GP, Simon DI, Chapman HA, Libby P. Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1998;102(3):576–83.
 86. Shi GP, Dolganov GM. Comprehensive transcriptome of proteases and protease inhibitors in vascular cells. *Stroke* [Internet]. 2006;37(2):537–41. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16373647
 87. Qin Y, Cao X, Guo J, Zhang Y, Pan L, Zhang H, et al. Deficiency of cathepsin S attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2012;96(3):401–10. Available from: <http://cardiovascres.oxfordjournals.org.ezp-prod1.hul.harvard.edu/content/96/3/401.long>
 88. Venkatasubramanian a. K, Mehta T, Chetter IC, Bryce J, Renwick P, Johnson B, et al. The value of abdominal examination in the diagnosis of abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2004;27(1):56–60.
 89. Lederle F a, Lederle F a. Ultrasonographic screening for abdominal aortic aneurysms. *Ann Intern Med* [Internet]. 2003;139(6):516–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13679330>
 90. Wanhainen A, Themudo R, Ahlström H, Lind L, Johansson L. Thoracic and abdominal aortic dimension in 70-year-old men and women – A population-based whole-body magnetic resonance imaging (MRI) study. *J Vasc Surg* [Internet]. 2008;47(3):504–12. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0741521407017466>
 91. Lederle F, Wilson S, Johnson G, Reinke D, Littooy F, Acher C, et al. Immediate repair compared with surveillance of Small Abdominal Aortic Aneurysms. *N Engl J Med*. 2002;346(19):1437–44.
 92. Pfeiffer T, Reiher L, Grabitz K, Sandmann W. Results of conventional surgical therapy of abdominal aortic aneurysms since the beginning of the “endovascular era.” *Der Chir* [Internet]. 2000;71(1):72–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s001040051016>
 93. Parodi JC, Palmaz J., Barone HD. Transfemoral Intraluminal Graft Implantation for Abdominal Aortic Aneurysms: Two Decades Later. *Ann Vasc Surg* [Internet]. 2012;26(7):895–905. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0890509612003202>
 94. Steuer J, Lachat M, Veith FJ, Wanhainen A. Endovascular grafts for abdominal aortic aneurysm. *Eur Heart J* [Internet]. 2015;ehv593. Available from: <http://eurheartj.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/eurheartj/ehv593>
 95. Zarins CK, White R a, Fogarty TJ. Aneurysm rupture after endovascular repair using the AneuRx stent graft. *J Vasc Surg*. 2000;31:960–70.
 96. Baxter BT, McGee GS, Shively VP, Drummond IAS, Dixit SN, Yamauchi M, et al. Elastin content, cross-links, and mRNA in normal and aneurysmal human aorta. *J Vasc Surg* [Internet]. 1992 Aug [cited 2015 Nov 15];16(2):192–200. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/074152149290107J>

97. de Figueiredo Borges L, Jaldin RG, Dias RR, Stolf NAG, Michel JB, Gutierrez PS. Collagen is reduced and disrupted in human aneurysms and dissections of ascending aorta. *Hum Pathol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2008;39(3):437–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2007.08.003>
98. Davis FM, Rateri DL, Daugherty A. Mechanisms of aortic aneurysm formation: translating preclinical studies into clinical therapies. *Heart* [Internet]. 2014;100(19):1498–505. Available from: <http://heart.bmj.com/cgi/doi/10.1136/heartjnl-2014-305648>
99. Peshkova IO, Schaefer G, Koltsova EK. Atherosclerosis and Aortic Aneurysm: is inflammation a common denominator? *FEBS J* [Internet]. 2015;n/a – n/a. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/febs.13634>
100. Allaire E, Muscatelli-Groux B, Mandet C, Guinault A-M, Bruneval P, Desgranges P, et al. Paracrine effect of vascular smooth muscle cells in the prevention of aortic aneurysm formation. *J Vasc Surg* [Internet]. 2002 Nov [cited 2014 Nov 3];36(5):1018–26. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0741521402002720>
101. Adolph R, Vorp D a., Steed DL, Webster MW, Kameneva M V., Watkins SC. Cellular content and permeability of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 1997;25(5):916–26.
102. Siasos G, Mourouzis K, Oikonomou E, Tsalamandris S, Tsigkou V, Vlasis K, et al. The Role of Endothelial Dysfunction in Aortic Aneurysms. *Curr Pharm Des. Netherlands*; 2015;21(28):4016–34.
103. Rateri DL, Moorleggen JJ, Balakrishnan A, Owens AP, Howatt DA, Subramanian V, et al. Endothelial cell-specific deficiency of ang II type 1a receptors attenuates ang II-induced ascending aortic aneurysms in LDL Receptor-/- mice. *Circ Res*. 2011;108(5):574–81.
104. Kim CW, Kumar S, Son DJ, Jang IH, Griendling KK, Jo H. Prevention of abdominal aortic aneurysm by anti-MicroRNA-712 or anti-MicroRNA-205 in angiotensin II-infused mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(7):1412–21.
105. Allaire E, Hasenstab D, Kenagy RD, Starcher B, Clowes MM, Clowes AW. Prevention of aneurysm development and rupture by local overexpression of plasminogen activator inhibitor-1. *Circulation*. 1998;98(3):249–55.
106. Deng GG, Martin-mcnulty B, Sukovich DA, Freay A, Thinnes T, Loskutoff DJ, et al. Urokinase-Type Plasminogen Activator Plays a Critical Role in Angiotensin II – Induced Abdominal Aortic Aneurysm. *Cross Sect*. 2003;
107. Pyo R, Lee JK, Shipley JM, Curci J a, Mao D, Ziporin SJ, et al. Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest* [Internet]. 2000;105(11):1641–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=300851&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
108. PB D, WH B, WC G. Elastolytic and collagenolytic studies of arteries: Implications for the mechanical properties of aneurysms. *Arch Surg* [Internet]. 1984 Apr 1;119(4):405–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1001/archsurg.1984.01390160041009>
109. Anidjar S, Salzmann JL, Gentric D, Lagneau P, Camilleri JP, Michel JB. Elastase-induced experimental aneurysms in rats. *Circulation*. 1990;82(3):973–81.

110. Thompson RW. Role of Matrix Metalloproteinases in Abdominal Aortic Aneurysms. *Ann N Y Acad Sci.* 1996;800:157–74.
111. Mao D, VanVickle SJ, Curci JA, Thompson RW. Expression of Matrix Metalloproteinases and TIMPs in Human Abdominal Aortic Aneurysms. *Ann Vasc Surg* [Internet]. 1999;13(2):236–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0890509606617597>
112. Allaire E, Forough R, Clowes M, Starcher B, Clowes AW. Local overexpression of TIMP-1 prevents aortic aneurysm degeneration and rupture in a rat model. *J Clin Invest.* 1998;102(7):1413–20.
113. Silence J, Collen D, Lijnen HR. Reduced atherosclerotic plaque but enhanced aneurysm formation in mice with inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene. *Circ Res.* 2002;90(8):897–903.
114. Eskandari MK, Vijungco JD, Flores A, Borensztajn J, Shively V, Pearce WH. Enhanced Abdominal Aortic Aneurysm in TIMP-1-Deficient Mice. *J Surg Res.* 2004;293:289–93.
115. Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest* [Internet]. 2002;110(5):625–32. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=151106&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
116. Freestone T, Turner RJ, Coady A, Higman DJ, Greenhalgh RM, Powell JT. Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 1995;15(8):1145–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7627708>
117. Liu J, Xiong W, Baca-Regen L, Nagase H, Baxter BT. Mechanism of inhibition of matrix metalloproteinase-2 expression by doxycycline in human aortic smooth muscle cells. *J Vasc Surg.* 2003;38(6):1376–83.
118. Mata KM, Tefé-Silva C, Floriano EM, Fernandes CR, Rizzi E, Gerlach RF, et al. Interference of doxycycline pretreatment in a model of abdominal aortic aneurysms. *Cardiovasc Pathol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2014;24(2):110–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carpath.2014.10.004>
119. Dodd BR, Spence RA. Doxycycline inhibition of abdominal aortic aneurysm growth: a systematic review of the literature. *Curr Vasc Pharmacol.* United Arab Emirates; 2011 Jul;9(4):471–8.
120. Kaito K, Urayama H, Watanabe G. Doxycycline treatment in a model of early abdominal aortic aneurysm. *Surg Today.* 2003;33(6):426–33.
121. Fontaine V, Jacob M-P, Houard X, Rossignol P, Plissonnier D, Angles-Cano E, et al. Involvement of the mural thrombus as a site of protease release and activation in human aortic aneurysms. *Am J Pathol* [Internet]. 2002;161(5):1701–10. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1850780&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
122. Fontaine V, Touat Z, Mtairag EM, Vranckx R, Louedec L, Houard X, et al. Role of leukocyte elastase in preventing cellular re-colonization of the mural thrombus. *Am J Pathol* [Internet]. 2004;164(6):2077–87. Available from:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1615778&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
123. Kazi M, Thyberg J, Religa P, Roy J, Eriksson P, Hedin U, et al. Influence of intraluminal thrombus on structural and cellular composition of abdominal aortic aneurysm wall. *J Vasc Surg* [Internet]. 2003;38(6):1283–92. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0741521403007912>
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0741521403007912/pdf?md5=cf6be129b67fba209a26451b5c67a4f8&pid=1-s2.0-S0741521403007912-main.pdf>
 124. Houard X, F. Rouzet. Topology of the fibrinolytic system within themural thrombus of human abdominal aortic aneurysms. *J Pathol*. 2007;212(March):20–8.
 125. Hellenthal F a MVI, Buurman W a, Wodzig WKWH, Schurink GWH. Biomarkers of abdominal aortic aneurysm progression. Part 2: inflammation. *Nat Rev Cardiol* [Internet]. 2009;6(8):543–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19546866>
 126. Curci J a., Liao S, Huffman MD, Shapiro SD, Thompson RW. Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest*. 1998;102:1900–10.
 127. Wang Y, Ait-Oufella H, Herbin O, Bonnin P, Ramkhelawon B, Taleb S, et al. TGF-beta activity protects against inflammatory aortic aneurysm progression and complications in angiotensin II-infused mice. *J Clin Invest* [Internet]. 2010 Feb;120(2):422–32. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2810071&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 128. Iida Y, Xu B, Xuan H, Glover KJ, Tanaka H, Hu X, et al. Peptide inhibitor of CXCL4-CCL5 heterodimer formation, MKEY, inhibits experimental aortic aneurysm initiation and progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:718–26.
 129. Moran CS, Jose RJ, Moxon J V, Roomberg A, Norman PE, Rush C, et al. Everolimus limits aortic aneurysm in the apolipoprotein E-deficient mouse by downregulating C-C chemokine receptor 2 positive monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2013;33(4):814–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23393391>
 130. Mellak S, Ait-Oufella H, Esposito B, Loyer X, Poirier M, Tedder TF, et al. Angiotensin II Mobilizes Spleen Monocytes to Promote the Development of Abdominal Aortic Aneurysm in Apoe-/- Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2015;35(2):378–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25524776>
 131. Mallat Z. Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2014;34(12):2509–19. Available from: <http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/ATVBAHA.114.304794>
 132. Tieu BC, Lee C, Sun H, LeJeune W, Recinos A, Ju X, et al. An adventitial IL-6/MCP1 amplification loop accelerates macrophage-mediated vascular inflammation leading to aortic dissection in mice. *J Clin Invest*. 2009;119(12):3637–51.
 133. Boyle JJ, Weissberg PL, Bennett MR. Tumor Necrosis Factor alpha Promotes Macrophage-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis by Direct and Autocrine Mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:1553–8.
 134. Hans CP, Koenig SN, Huang N, Cheng J, Beceiro S, Guggilam A, et al. Inhibition of

- Notch1 signaling reduces abdominal aortic aneurysm in mice by attenuating macrophage-mediated inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2012;32(12):3012–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23087364>
135. Cheng J, Koenig SN, Kuivaniemi HS, Garg V, Hans CP. Pharmacological inhibitor of notch signaling stabilizes the progression of small abdominal aortic aneurysm in a mouse model. *J Am Heart Assoc* [Internet]. 2014;3(6):e001064. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25349182>
136. Gong Y, Hart E, Shchurin A, Hoover-Plow J. Inflammatory macrophage migration requires MMP-9 activation by plasminogen in mice. *J Clin Invest*. 2008;118(9):3012–24.
137. Senior RM, Griffin GL, Mecham RP. Chemotactic activity of elastin-derived peptides. *J Clin Invest*. 1980;66(4):859–62.
138. Ocana E. Characterisation of T and B lymphocytes infiltrating abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis* [Internet]. 2003;170(1):39–48. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002191500300282X>
139. Forester ND, Cruickshank SM, Scott DJ a, Carding SR. Functional characterization of T cells in abdominal aortic aneurysms. *Immunology*. 2005;115(2):262–70.
140. Xiong W, Zhao Y, Prall A, Greiner TC, Baxter BT. Key roles of CD4+ T cells and IFN-gamma in the development of abdominal aortic aneurysms in a murine model. *J Immunol* [Internet]. 2004;172(4):2607–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14764734>
141. Galle C, Schandené L, Stordeur P, Peignois Y, Ferreira J, Wautrecht J-C, et al. Predominance of type 1 CD4+ T cells in human abdominal aortic aneurysm. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2005;142(3):519–27. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1809544&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
142. Sharma AK, Lu G, Jester A, Johnston WF, Zhao Y, Hajzuz V a, et al. Experimental abdominal aortic aneurysm formation is mediated by IL-17 and attenuated by mesenchymal stem cell treatment. *Circulation* [Internet]. 2012;126(11 Suppl 1):S38–45. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3448933&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
143. Schönbeck U, Sukhova GK, Gerdes N, Libby P. T(H)2 predominant immune responses prevail in human abdominal aortic aneurysm. *Am J Pathol*. 2002;161(2):499–506.
144. Postlethwaite AE, Holness M a., Katai H, Raghov R. Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. *J Clin Invest*. 1992;90(October):1479–85.
145. Zhu L, Zhao Q, Yang T, Ding W, Zhao Y. Cellular metabolism and macrophage functional polarization. *Int Rev Immunol* [Internet]. 2015;34(1):82–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25340307>
146. Ait-Oufella H, Wang Y, Herbin O, Bourcier S, Potteaux S, Joffre J, et al. Natural regulatory T cells limit angiotensin II-induced aneurysm formation and rupture in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(10):2374–9.

147. Yin M, Zhang J, Wang Y, Wang S, Böckler D, Duan Z, et al. Deficient CD4+CD25+ T regulatory cell function in patients with abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2010;30(9):1825–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20448211>
148. Eliason JL. Neutrophil Depletion Inhibits Experimental Abdominal Aortic Aneurysm Formation. *Circulation* [Internet]. 2005;112(2):232–40. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.517391>
149. Hannawa KK. L-Selectin-Mediated Neutrophil Recruitment in Experimental Rodent Aneurysm Formation. *Circulation* [Internet]. 2005;112(2):241–7. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.535625>
150. Pagano MB, Bartoli M a, Ennis TL, Mao D, Simmons PM, Thompson RW, et al. Critical role of dipeptidyl peptidase I in neutrophil recruitment during the development of experimental abdominal aortic aneurysms. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007;104(8):2855–60. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1797622&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
151. Mäyränpää MI, Trosien JA, Fontaine V, Folkesson M, Kazi M, Eriksson P, et al. Mast cells associate with neovessels in the media and adventitia of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* [Internet]. The Society for Vascular Surgery; 2009;50(2):388–95. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0741521409007988>
152. Keiichi F, Sachiko I, Katsumata T, Inagaki S, Kimura M, Tanaka K, et al. Chymase activates promatrix metalloproteinase-9 in human abdominal aortic aneurysm. *Clin Chim Acta*. 2008;388(1-2):214–6.
153. Tchougounova E, Lundquist A, Fajardo I, Winberg JO, Åbrink M, Pejler G. A key role for mast cell chymase in the activation of pro-matrix metalloproteinase-9 and pro-matrix metalloproteinase-2. *J Biol Chem*. 2005;280(10):9291–6.
154. Huang M, Pang X, Karalis K, Theoharides TC. Stress-induced interleukin-6 release in mice is mast cell-dependent and more pronounced in Apolipoprotein E knockout mice. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2003;59(1):241–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12829195>
155. Swedenborg J, Mäyränpää MI, Kovanen PT. Mast cells: important players in the orchestrated pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2011 Apr [cited 2014 Nov 3];31(4):734–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21205988>
156. Sun J, Sukhova GK, Yang M, Wolters PJ, MacFarlane L a, Libby P, et al. Mast cells modulate the pathogenesis of elastase-induced abdominal aortic aneurysms in mice. *J Clin Invest* [Internet]. 2007;117(11):3359–68. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2000808&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
157. Golledge AL V, Walker P, Norman PE, Golledge J. A systematic review of studies examining inflammation associated cytokines in human abdominal aortic aneurysm samples. *Dis Markers*. 2009;26(4):181–8.
158. Johnston WF, Salmon M, Su G, Lu G, Stone ML, Zhao Y, et al. Genetic and pharmacologic disruption of interleukin-1beta signaling inhibits experimental aortic aneurysm formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(2):294–304.

159. Dai J, Losy F, Guinault A-M, Pages C, Anegon I, Desgranges P, et al. Overexpression of transforming growth factor-beta1 stabilizes already-formed aortic aneurysms: a first approach to induction of functional healing by endovascular gene therapy. *Circulation* [Internet]. 2005 Aug 16 [cited 2014 Nov 3];112(7):1008–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16103255>
160. Dai J, Michineau S, Franck G, Desgranges P, Becquemin JP, Gervais M, et al. Long term stabilization of expanding aortic aneurysms by a short course of cyclosporine a through transforming growth factor-beta induction. *PLoS One*. 2011;6(12).
161. Daugherty A, Cassis LA. Mouse Models of Abdominal Aortic Aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2004;24(3):429–34. Available from: <http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.ATV.0000118013.72016.ea>
162. Halpern VJ, Nackman GB, Gandhi RH, Irizarry E, Scholes J V., Ramey WG, et al. The elastase infusion model of experimental aortic aneurysms: Synchrony of induction of endogenous proteinases with matrix destruction and inflammatory cell response. *J Vasc Surg* [Internet]. 1994 Jul [cited 2016 Jan 26];20(1):51–60. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0741521494901759>
163. Hyncek RL, DeRubertis BG, Trocciola SM, Zhang H, Prince MR, Ennis TL, et al. The creation of an infrarenal aneurysm within the native abdominal aorta of swine. *Surgery* [Internet]. 2007;142(2):143–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17689678>
164. Reinald N, Fournier B, Naveau A, Couty L, Lemitre M, Segulier S, et al. Fusiform aneurysm model in rabbit carotid artery. *J Vasc Res* [Internet]. 2010 Jan [cited 2014 Nov 3];47(1):61–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19672109>
165. Dale M a., Ruhlman MK, Baxter BT. Inflammatory Cell Phenotypes in AAAs: Their Role and Potential as Targets for Therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2015;1746–56. Available from: <http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/ATVBAHA.115.305269>
166. Anidjar S, Dobrin P, Eichorst M, Graham G, Chejfec G. Correlation of inflammatory infiltrate with the enlargement of experimental aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 1992;16(2):139–47.
167. Blose KJ, Ennis TL, Arif B, Justin S. Periadventitial adipose-derived stem cell treatment halts elastase-induced abdominal aortic aneurysm progression. 2014;9:733–41.
168. Bhamidipati CM, Mehta GS, Lu G, Moehle CW, Barbery C, Dimusto PD, et al. Development of a novel murine model of aortic aneurysms using peri-adventitial elastase. *Surg (United States)* [Internet]. Mosby, Inc.; 2012;152(2):238–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.surg.2012.02.010>
169. Gertz SD, Kurgan A, Eisenberg D. Aneurysm of the rabbit common carotid artery induced by periarterial application of calcium chloride in vivo. *J Clin Invest*. 1988;81(3):649–56.
170. Chiou AC, Chiu B, Pearce WH. Murine Aortic Aneurysm Produced by Periarterial Application of Calcium Chloride. *J Surg Res* [Internet]. 2001;99(2):371–6. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022480401962079>
<http://www.sciencedirect.com.ezp2.lib.umn.edu/science/article/pii/S0022480401962079>

171. Wang Y, Krishna S, Golledge J. The calcium chloride-induced rodent model of abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;226(1):29–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.09.010>
172. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*. 1992;71(2):343–53.
173. Ishibashi S, Goldstein JL, Michael S. Massive Xanthomatosis and Atherosclerosis in Cholesterol-fed Low Density Lipoprotein Receptor-negative Mice. *J Clin Invest*. 1994;93:1885–93.
174. Weber KT. Aldosterone in congestive heart failure. *N Engl J Med*. 2001;345(23):1689–97.
175. Malekzadeh S, Fraga-Silva RA, Trachet B, Montecucco F, Mach F, Stergiopoulos N. Role of the renin-angiotensin system on abdominal aortic aneurysms. *Eur J Clin Invest*. 2013;43(12):1328–38.
176. Daugherty a, Manning MW, Cassis L a. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest* [Internet]. 2000 Jun;105(11):1605–12. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=300846&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
177. Manning MW, Cassi L a, Huang J, Szilvassy SJ, Daugherty A. Abdominal aortic aneurysms: fresh insights from a novel animal model of the disease. *Vasc Med*. 2002;7:45–54.
178. Jones JA, Barbour JR, Stroud RE, Bouges S, Stephens SL, Spinale FG, et al. Altered transforming growth factor-beta signaling in a murine model of thoracic aortic aneurysm. *J Vasc Res*. 2008;45(6):457–68.
179. Habashi JP, Judge DP, Holm TM, Cohn RD, Loeys BL, Cooper TK, et al. Losartan, an AT1 Antagonist, Prevents Aortic Aneurysm in a Mouse Model of Marfan Syndrome. *Science* (80-) [Internet]. 2006;312(5770):117–21. Available from: <http://www.sciencemag.org/content/312/5770/117>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16601194>
<http://www.sciencemag.org/content/312/5770/117.full.pdf>
<http://www.sciencemag.org/content/312/5770/117.short>
<http://www.sciencemag.org/content/suppl/2006/04/05/>
180. Chen X, Lu H, Rateri DL, Cassis LA, Daugherty A. Conundrum of angiotensin II and TGF-beta interactions in aortic aneurysms. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;13(2):180–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2013.01.002>
181. Li W, Li Q, Jiao Y, Qin L, Ali R, Zhou J, et al. Tgfb2 disruption in postnatal smooth muscle impairs aortic wall homeostasis. *J Clin Invest*. 2014;124(2):755–67.
182. Mallat Z, Tedgui A. Atenolol versus Losartan in Marfan's Syndrome. *N Engl J Med* [Internet]. 2015;372(10):975–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25738678>
183. Thomas ED, Lochte HLJ, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med*. Not Available; 1957 Sep;257(11):491–6.
184. Agence de la biomédecine. *Activité nationale de greffe de CSH*. 2015.

185. H.G. P. A review of the current status and techniques of allogeneic bone marrow transplantation for treatment of leukaemia. *J Clin Pathol* [Internet]. 1983;36(11):1207–14. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L14205398> \n<http://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=00219746&id=doi:&atitle=A+review+of+the+current+status+and+techniques+of+allogeneic+bone+marrow+transplantation+for+treatm>
186. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. ENGLAND; 1981 Jul;292(5819):154–6.
187. Thomson JA, Itskovitz-eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. 1998;282(November):1145–8.
188. Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, Elliott D, Rosenfeld PJ, Gregori NZ, et al. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt’s macular dystrophy: Follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;385(9967):509–16. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61376-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61376-3)
189. Menasche P, Vanneau V, Hagege A, Bel A, Cholley B, Cacciapuoti I, et al. Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: First clinical case report. *Eur Heart J*. 2015;36(30):2011–7.
190. Knoepfler PS. Deconstructing stem cell tumorigenicity: A roadmap to safe regenerative medicine. *Stem Cells*. 2009;27(5):1050–6.
191. Sverdlov ED, Mineev K. Mutation rate in stem cells: An underestimated barrier on the way to therapy. *Trends Mol Med* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;19(5):273–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2013.01.004>
192. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006;126(4):663–76.
193. Manzini S, Viiri LE, Marttila S, Aalto-Setälä K. A Comparative View on Easy to Deploy non-Integrating Methods for Patient-Specific iPSC Production. *Stem Cell Rev Reports*. 2015;11(6):900–8.
194. Okano H, Nakamura M, Yoshida K, Okada Y, Tsuji O, Nori S, et al. Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells. *Circ Res*. 2013;112(3):523–33.
195. Caplan A. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* [Internet]. 1991;9(5):641–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1870029>
196. Rasini V, Dominici M, Kluba T, Siegel G, Lusenti G, Northoff H, et al. Mesenchymal stromal/stem cells markers in the human bone marrow. *Cytotherapy* [Internet]. Elsevier Inc; 2013;15(3):292–306. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2012.11.009>
197. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* [Internet]. Elsevier; 2006;8(4):315–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923606>
198. Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol*. 2007;28(5):219–26.

199. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells*. 2008;26(1):212–22.
200. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006;107(1):367–72.
201. Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW-F, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation* [Internet]. 2007;83(1):71–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17220794>
202. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell – natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2 – induced NK-cell proliferation. *Blood*. 2006;107(4):1484–90.
203. Gao F, Chiu SM, Motan DAL, Zhang Z, Chen L, Ji H-L, et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis* [Internet]. 2016;7(1):e2062. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/cddis.2015.327>
204. Nemeth K, Keane-myers A, Jared M, Metcalfe DD, Gorham JD, Bundoc VG, et al. Correction for Nemeth et al., Bone marrow stromal cells use TGF-beta to suppress allergic responses in a mouse model of ragweed-induced asthma. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2010;107(17):8041–8041. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1003664107>
205. Bonfield TL, Nolan Koloze MT, Lennon DP, Caplan AI. Defining human mesenchymal stem cell efficacy in vivo. *J Inflamm (Lond)* [Internet]. 2010;7(1):51. Available from: <http://www.journal-inflammation.com/content/7/1/51>
206. www.clinicaltrials.gov [Internet]. National Institutes of Health. 2016. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Mesenchymal+stem+cells&recr=Open>
207. Rasanen K, Vaheri A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp Cell Res* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;316(17):2713–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.04.032>
208. Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD, Dazzi F. Mesenchymal stem cells: The fibroblasts' new clothes? *Haematologica*. 2009;94(2):258–63.
209. Sorrell JM. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J Cell Sci* [Internet]. 2004;117(5):667–75. Available from: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.01005>
210. Fournier BP, Loison-Robert LS, Ferré FC, Owen GR, Larjava H, Hakkinen L. Characterisation of Human Gingival Neural Crest-Derived Stem Cells in Monolayer and Neurosphere Cultures. 2016;31:40–58.
211. Achilleos A, Trainor PA. Neural crest stem cells: discovery, properties and potential for therapy. *Cell Res* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012;22(2):288–304. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3271580&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

212. Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P, Han J, Rowitch DH, et al. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*. 2000;127(8):1671–9.
213. Rinn JL, Wang JK, Liu H, Montgomery K, van de Rijn M, Chang HY. A systems biology approach to anatomic diversity of skin. *J Invest Dermatol* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2008;128(4):776–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jid.5700986>
214. Glim JE, Van Egmond M, Niessen FB, Everts V, Beelen RHJ. Detrimental dermal wound healing: What can we learn from the oral mucosa? *Wound Repair Regen*. 2013;21(5):648–60.
215. Mak K, Manji A, Gallant-Behm C, Wiebe C, Hart DA, Larjava H, et al. Scarless healing of oral mucosa is characterized by faster resolution of inflammation and control of myofibroblast action compared to skin wounds in the red Duroc pig model. *J Dermatol Sci*. 2009;56(3):168–80.
216. Wong JW, Gallant-Behm C, Wiebe C, Mak K, Hart DA, Larjava H, et al. Wound healing in oral mucosa results in reduced scar formation as compared with skin: Evidence from the red duroc pig model and humans. *Wound Repair Regen*. 2009;17(5):717–29.
217. Fournier BPJ, Larjava H, Häkkinen L. Gingiva as a source of stem cells with therapeutic potential. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2013;22(24):3157–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23944935>
218. Winning TA, Townsend GC. Oral mucosal embryology and histology. *Clin Dermatol*. 2000;18(5):499–511.
219. Irwin CR, Picardo M, Ellis I, Sloan P, Grey a, McGurk M, et al. Inter- and intra-site heterogeneity in the expression of fetal-like phenotypic characteristics by gingival fibroblasts: potential significance for wound healing. *J Cell Sci* [Internet]. 1994;107 (Pt 5):1333–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7929639>
220. Schor SL, Ellis I, Irwin CR, Banyard J, Seneviratne K, Dolman C, et al. Subpopulations of fetal-like gingival fibroblasts: characterisation and potential significance for wound healing and the progression of periodontal disease. *Oral Dis*. 1996;2(2):155–66.
221. Marynka-Kalmani K, Treves S, Yafee M, Rachima H, Gafni Y, Cohen M a, et al. The lamina propria of adult human oral mucosa harbors a novel stem cell population. *Stem Cells* [Internet]. 2010;28(5):984–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20474080>
222. Xu X, Chen C, Akiyama K, Chai Y, Le AD, Wang Z, et al. Gingivae contain neural-crest- and mesoderm-derived mesenchymal stem cells. *J Dent Res* [Internet]. 2013;92(9):825–32. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3744273&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
223. Hematti P. Mesenchymal stromal cells and fibroblasts: a case of mistaken identity? *Cytotherapy* [Internet]. Elsevier; 2012;14(5):516–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22458957>
224. Fournier BPJ, Ferre FC, Couty L, Lataillade J-J, Gourven M, Naveau A, et al. Multipotent progenitor cells in gingival connective tissue. *Tissue Eng Part A* [Internet].

- 2010 Sep [cited 2014 Oct 25];16(9):2891–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20412029>
225. Hakkinen L, Larjava H, Fournier BPJ. Distinct phenotype and therapeutic potential of gingival fibroblasts. *Cytotherapy* [Internet]. Elsevier Inc; 2014;16(9):1171–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.04.004>
226. Beertsen W, McCulloch C a, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000*. 1997;13(201):20–40.
227. Chavrier C. The elastic system fibres in healthy human gingiva. *Arch Oral Biol*. ENGLAND; 1990;35 Suppl:223S – 225S.
228. Hsieh PC, Jin YT, Chang CW, Huang CC, Liao SC, Yuan K. Elastin in oral connective tissue modulates the keratinization of overlying epithelium. *J Clin Periodontol*. 2010;37(8):705–11.
229. Tsuruga E, Irie K, Sakakura Y, Yajima T. Tropoelastin expression by periodontal fibroblasts. *J Dent Res*. United States; 2002 Mar;81(3):198–202.
230. Tsuruga E, Irie K, Sakakura Y, Yajima T. Expression of fibrillins and tropoelastin by human gingival and periodontal ligament fibroblasts in vitro. *J Periodontal Res*. 2002;37(1):23–8.
231. Gogly B, Godeau G, Gilbert S, Legrand JM, Kut C, Pellat B, et al. Morphometric analysis of collagen and elastic fibers in normal skin and gingiva in relation to age. *Clin Oral Investig*. GERMANY; 1997 Sep;1(3):147–52.
232. Csiszar A, Wiebe C, Larjava H, Hakkinen L. Distinctive molecular composition of human gingival interdental papilla. *J Periodontol*. United States; 2007 Feb;78(2):304–14.
233. Reilly GC, Engler AJ. Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. *J Biomech* [Internet]. Elsevier; 2010;43(1):55–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.09.009>
234. Macri L, Silverstein D, Clark RAF. Growth factor binding to the pericellular matrix and its importance in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(13):1366–81.
235. Szpaderska AM, Zuckerman JD, DiPietro LA. Differential Injury Responses in Oral Mucosal and Cutaneous Wounds. *J Dent Res* [Internet]. 2003;82(8):621–6. Available from: <http://jdr.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/154405910308200810>
236. Schrementi ME, Ferreira AM, Zender C, DiPietro LA. Site-specific production of TGF- β in oral mucosal and cutaneous wounds. *Wound Repair Regen*. 2008;16(1):80–6.
237. Eslami A, Gallant-Behm CL, Hart D a, Wiebe C, Honardoust D, Gardner H, et al. Expression of integrin alphavbeta6 and TGF-beta in scarless vs scar-forming wound healing. *J Histochem Cytochem*. 2009;57(6):543–57.
238. Hakkinen L, Uitto V-J, Larjava H. Cell biology of gingival wound healing. *Periodontol 2000* [Internet]. 2000;24(1):127–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0757.2000.2240107.x>
239. Chaussain Miller C, Septier D, Bonnefoix M, Lecolle S, Lebreton-Decoster C, Coulomb B, et al. Human dermal and gingival fibroblasts in a three-dimensional culture: a comparative study on matrix remodeling. *Clin Oral Investig*. Germany; 2002 Mar;6(1):39–50.

240. Murakami S, Okada H. Lymphocyte-Fibroblast interactions. 1997;8:40–50.
241. Takashiba S, Naruishi K, Murayama Y. Perspective of cytokine regulation for periodontal treatment: fibroblast biology. *J Periodontol.* United States; 2003 Jan;74(1):103–10.
242. Zhang QZ, Nguyen a. L, Yu WH, Le a. D. Human Oral Mucosa and Gingiva: A Unique Reservoir for Mesenchymal Stem Cells. *J Dent Res.* 2012;91(11):1011–8.
243. Chen M, Su W, Lin X, Guo Z, Wang J, Zhang Q, et al. Adoptive transfer of human gingiva-derived mesenchymal stem cells ameliorates collagen-induced arthritis via suppression of Th1 and Th17 cells and enhancement of regulatory T cell differentiation. *Arthritis Rheum.* 2013;65(5):1181–93.
244. Mahanonda R, Sa-Ard-Iam N, Montreekachon P, Pimkhaokham A, Yongvanichit K, Fukuda MM, et al. IL-8 and IDO expression by human gingival fibroblasts via TLRs. *J Immunol.* 2007;178(2):1151–7.
245. Tang L, Li N, Xie H, Jin Y. Characterization of mesenchymal stem cells from human normal and hyperplastic gingiva. *J Cell Physiol.* 2011;226(3):832–42.
246. Séguier S, Tartour E, Guérin C, Couty L, Lemitre M, Lallement L, et al. Inhibition of the Differentiation of Monocyte-Derived Dendritic Cells by Human Gingival Fibroblasts. *PLoS One.* 2013;8(8):2–9.
247. Zhang Q-Z, Su W-R, Shi S-H, Wilder-Smith P, Xiang AP, Wong A, et al. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells elicit polarization of m2 macrophages and enhance cutaneous wound healing. *Stem Cells.* United States; 2010 Oct;28(10):1856–68.
248. Coulomb B, Friteau L, Baruch J, Guilbaud J, Chretien-Marquet B, Glicenstein J, et al. Advantage of the presence of living dermal fibroblasts within in vitro reconstructed skin for grafting in humans. *Plast Reconstr Surg.* UNITED STATES; 1998 Jun;101(7):1891–903.
249. Weiss RA, Weiss MA, Beasley KL, Munavalli G. Autologous cultured fibroblast injection for facial contour deformities: A prospective, placebo-controlled, phase III clinical trial. *Dermatologic Surg.* 2007;33(3):263–8.
250. Lamme EN, Van Leeuwen RTJ, Mekkes JR, Middelkoop E. Allogeneic fibroblasts in dermal substitutes induce inflammation and scar formation. *Wound Repair Regen.* 2002;10(3):152–60.
251. Yamada N, Uchinuma E, Matsumoto Y, Kuroyanagi Y. Comparative evaluation of re-epithelialization promoted by fresh or cryopreserved cultured dermal substitute. *J Artif Organs.* 2008;11(4):221–4.
252. Metcalfe AD, Ferguson MWJ. Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair. *Biomaterials.* 2007;28(34):5100–13.
253. Tziotzios C, Profyris C, Sterling J. Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics: Part II. Strategies to reduce scar formation after dermatologic procedures. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. Elsevier Inc; 2012;66(1):13–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2011.08.035>
254. Prato GPP, Rotundo R, Magnani C, Soranzo C, Muzzi L, Cairo F. An autologous cell hyaluronic acid graft technique for gingival augmentation: a case series. *J Periodontol.* United States; 2003 Feb;74(2):262–7.

255. Chhetri DK, Berke GS. Injection of cultured autologous fibroblasts for human vocal fold scars. *Laryngoscope*. 2011;121(4):785–92.
256. Kobayashi K, Suzuki T, Nomoto Y, Tada Y, Miyake M, Hazama A, et al. A tissue-engineered trachea derived from a framed collagen scaffold, gingival fibroblasts and adipose-derived stem cells. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;31(18):4855–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.02.027>
257. Linard C, Tissedre F, Busson E, Holler V, Leclerc T, Strup-Perrot C, et al. Therapeutic potential of gingival fibroblasts for cutaneous radiation syndrome: comparison to bone marrow-mesenchymal stem cell grafts. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2015;24(10):1182–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25584741>
258. Tomar GB, Srivastava RK, Gupta N, Barhanpurkar AP, Pote ST, Jhaveri HM, et al. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells are superior to bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cell therapy in regenerative medicine. *Biochem Biophys Res Commun*. United States; 2010 Mar;393(3):377–83.
259. Manning MW. Differential Effects of Doxycycline, a Broad-Spectrum Matrix Metalloproteinase Inhibitor, on Angiotensin II-Induced Atherosclerosis and Abdominal Aortic Aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2003;23(3):483–8. Available from: <http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.ATV.0000058404.92759.32>
260. Baxter BT, Pearce WH, Waltke EA, Littooy FN, Hallett JW, Kent KC, et al. Prolonged administration of doxycycline in patients with small asymptomatic abdominal aortic aneurysms: Report of a prospective (Phase II) multicenter study. *J Vasc Surg*. 2002;36(1):1–12.
261. Gottsäter A, Flondell-Sité D, Kölbel T, Lindblad B. Associations between statin treatment and markers of inflammation, vasoconstriction, and coagulation in patients with abdominal aortic aneurysm. *Vasc Endovascular Surg*. 2008;42(6):567–73.
262. Schouten O, van Laanen JH., Boersma E, Vidakovic R, Feringa HH., Dunkelgrun M, et al. Statins are Associated with a Reduced Infrarenal Abdominal Aortic Aneurysm Growth. *Eur J Vasc Endovasc Surg* [Internet]. 2006;32(1):21–6. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed7&NEWS=N&AN=2006268971>
263. Henderson EL, Geng Y-J, Sukhova GK, Whittemore AD, Knox J, Libby P. Death of Smooth Muscle Cells and Expression of Mediators of Apoptosis by T Lymphocytes in Human Abdominal Aortic Aneurysms. *Circulation* [Internet]. 1999;99(1):96–104. Available from: <http://circ.ahajournals.org/content/99/1/96.full>
264. Patel MI, Melrose J, Ghosh P, Appleberg M. Increased synthesis of matrix metalloproteinases by aortic smooth muscle cells is implicated in the etiopathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* [Internet]. 1996;24(1):82–92. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0741521496701489>
265. Kothapalli CR, Ramamurthi A. Induced elastin regeneration by chronically activated smooth muscle cells for targeted aneurysm repair. *Acta Biomater* [Internet]. Acta Materialia Inc.; 2010;6(1):170–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2009.06.006>
266. Allaire E, Guettier C, Bruneval P, Plissonnier D, Michel JB. Cell-free arterial grafts: morphologic characteristics of aortic isografts, allografts, and xenografts in rats. *J Vasc*

- Surg. UNITED STATES; 1994 Mar;19(3):446–56.
267. Losy F. Paracrine secretion of transforming growth factor- β 1 in aneurysm healing and stabilization with endovascular smooth muscle cell therapy. *J Vasc Surg* [Internet]. 2003 Jun [cited 2014 Nov 3];37(6):1301–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0741521402753366>
 268. Hashizume R, Yamawaki-Ogata a, Ueda Y, Wagner WR, Narita Y. Mesenchymal stem cells attenuate angiotensin II-induced aortic aneurysm growth in apolipoprotein E-deficient mice. *J Vasc Surg* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011 Dec [cited 2014 Nov 3];54(6):1743–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21908146>
 269. Fu X, Yamawaki-Ogata A, Oshima H, Ueda Y, Usui A, Narita Y. Intravenous administration of mesenchymal stem cells prevents angiotensin II-induced aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-deficient mouse. *J Transl Med* [Internet]. Journal of Translational Medicine; 2013 Jan [cited 2014 Nov 3];11(1):175. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3726376&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 270. Davis JP, Salmon M, Pope NH, Lu G, Su G, Sharma AK, et al. Attenuation of aortic aneurysms with stem cells from different genders. *J Surg Res* [Internet]. Elsevier Inc; 2015;199(1):249–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2015.04.025>
 271. Schneider F, Saucy F, De Blic R, Dai J, Mohand F, Rouard H, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells stabilize already-formed aortic aneurysms more efficiently than vascular smooth muscle cells in a rat model. *Eur J Vasc Endovasc Surg* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;45(6):666–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejvs.2013.03.007>
 272. Zidi M, Allaire E. Mechanical behavior of abdominal aorta aneurysm in rat model treated by cell therapy using mesenchymal stem cells. *Biomech Model Mechanobiol*. Germany; 2015 Jan;14(1):185–94.
 273. Riera Del Moral L, Aramburu CL, García JRR, de Cubas LR, García-Olmo D, García-Arranz M. Experimental model for adjuvant treatment with mesenchymal stem cells for aortic aneurysm. *Am J Stem Cells* [Internet]. 2012;1(3):174–81. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3636731&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 274. Riera Del Moral L, Largo C, Ramirez JR, Vega Clemente L, Fernandez Heredero A, Riera De Cubas L, et al. Potential of mesenchymal stem cell in stabilization of abdominal aortic aneurysm sac. *J Surg Res*. 2015;195(1):325–33.
 275. Naveau A, Reinald N, Fournier B, Durand E, Lafont A, Coulomb B, et al. Gingival fibroblasts inhibit MMP-1 and MMP-3 activities in an ex-vivo artery model. *Connect Tissue Res* [Internet]. 2007 Jan [cited 2014 Nov 3];48(6):300–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18075816>
 276. Gogly B, Naveau A, Fournier B, Reinald N, Durand E, Brasselet C, et al. Preservation of rabbit aorta elastin from degradation by gingival fibroblasts in an ex vivo model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2007 Sep [cited 2014 Nov 3];27(9):1984–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17641251>
 277. Gogly B, Fournier B, Couty L, Naveau A, Brasselet C, Durand E, et al. Gingival fibroblast inhibits MMP-7: evaluation in an ex vivo aorta model. *J Mol Cell Cardiol*

- [Internet]. Elsevier Inc.; 2009 Aug [cited 2014 Nov 3];47(2):296–303. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19397914>
278. Durand E, Fournier B, Couty L, Lemitre M, Achouh P, Julia P, et al. Endoluminal gingival fibroblast transfer reduces the size of rabbit carotid aneurisms via elastin repair. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2012 Aug [cited 2014 Nov 3];32(8):1892–901. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22628429>
 279. Francesko A, Tzanov T. Chitin, chitosan and derivatives for wound healing and tissue engineering. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. Germany; 2011;125:1–27.
 280. Silva D, Arancibia R, Tapia C, Acuña-Rougier C, Diaz-Dosque M, Cáceres M, et al. Chitosan and platelet-derived growth factor synergistically stimulate cell proliferation in gingival fibroblasts. *J Periodontal Res* [Internet]. 2013 Dec [cited 2014 Nov 3];48(6):677–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23452122>
 281. Fatimi A, Chabrot P, Berrahmoune S, Coutu JM, Soulez G, Lerouge S. A new injectable radiopaque chitosan-based sclerosing embolizing hydrogel for endovascular therapies. *Acta Biomater*. 2012;8(7):2712–21.

Résumé :

L'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA) correspond à une dilatation progressive de l'aorte dont la complication principale, et potentiellement mortelle, est la rupture. La physiopathologie de l'AAA est complexe mais elle comporte une destruction des fibres élastiques liée à l'activité des métalloprotéinases (MMPs) matricielles, une apoptose des cellules musculaires lisses et une infiltration inflammatoire chronique. Actuellement, il n'existe aucun traitement pharmacologique permettant de limiter la progression et la rupture de l'AAA. Les fibroblastes gingivaux (FGs) sont des cellules multipotentes anti-inflammatoires qui permettent une réparation parfaite de la gencive sans cicatrice ni fibrose. Ces propriétés font des FGs un candidat potentiel pour une approche de thérapie cellulaire de l'AAA. Les FGs murins cultivés *in vitro* produisent une grande quantité de TIMP-1, un inhibiteur des MMPs. Lorsque les FGs sont implantés autour de l'aorte, ils survivent, prolifèrent et s'organisent en une épaisse couche cellulaire au niveau de l'adventice. *In vivo*, les FGs produisent au niveau de la paroi aortique de l'IL-10, du TGF- β , du collagène et du TIMP-1. Parallèlement les FGs inhibent l'activité protéolytique de la MMP-9. Dans un modèle d'AAA induit par l'élastase, les FGs inhibent la dégradation de l'élastine, l'infiltration macrophagique et lymphocytaire ainsi que la croissance des AAA. L'invalidation génétique de TIMP-1 dans les FG abolit leur effet protecteur sur le remodelage aortique et la formation des AAA. Dans un second modèle d'AAA induit par l'infusion d'angiotensine II et l'injection d'anticorps neutralisant anti-TGF- β , les FGs limitent localement le développement de la maladie vasculaire et préviennent la rupture de l'aorte abdominale. L'ensemble de ces données expérimentales suggère qu'une approche de thérapie cellulaire utilisant les FG pourrait permettre de ralentir la croissance de l'AAA et *in fine* sa rupture.

Abstract :

Abdominal aortic aneurysm (AAA), frequently diagnosed in old patients, is characterized by chronic inflammation, vascular cell apoptosis and metalloproteinase-mediated extracellular matrix destruction. Despite improvement in the understanding of the pathophysiology of the aortic aneurysm disease, no pharmacological treatment is available to limit dilatation and/or rupture. In the study reported here, we tested whether periadventitial allograft of GF prevented abdominal aortic aneurysmal growth and rupture in mice and investigated the mechanisms of vascular protection. *In vitro*, mouse GF proliferated and produced large amounts of anti-inflammatory cytokines and Timp-1, an inhibitor of metalloproteinases. When layed down in the periadventitial abdominal aorta, we documented that GF survived *in vivo*, proliferated and organized as a thick layer. Furthermore, GF locally produced Il-10, TGF- β and Timp-1. In an elastase-induced AAA, GF prevented both macrophage and lymphocyte infiltration, elastin degradation and aneurysm growth. Specific invalidation of Timp-1 in GF abolished the beneficial effect of cell therapy. In an Angiotensin II/anti-TGF- β model of AAA, GF cell therapy limited AAA development and prevented abdominal rupture. Gingival fibroblast is a promising cell therapy approach to inhibit aneurysmal progression and rupture through the local production of Timp-1.