

# UNIVERSITÉ DE LIMOGES

ÉCOLE DOCTORALE ED 524

Biologie, Santé, «Bio-Santé»

FACULTÉ DE MÉDECINE

IFR 145 GEIST

***Equipe d'accueil 3842 « Homéostasie cellulaire et pathologies »***

Thèse

en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline : Sciences, Vie et Santé / Option : Immunologie

présentée et soutenue publiquement par

Kim Heang LY

le 2 juillet 2013

## **Implication des neurotrophines dans la physiopathologie du remodelage vasculaire de l'artérite à cellules géantes ou maladie de Horton**

Thèse co-dirigée par le **Pr Marie-Odile JAUBERTEAU** et le **Pr Luc MOUTHON**

### **JURY :**

Mr le Professeur Jean Claude LECRON (Université de Poitiers) Président

Mr le Professeur Bernard BONNOTTE (Université de Dijon) Rapporteur

Mr le Professeur Jean-François VIALARD (Université de Bordeaux) Rapporteur

Mme le Professeur Elisabeth VIDAL (Université de Limoges) Examineur

Mme le Professeur M-Odile JAUBERTEAU (Université de Limoges) Co-directrice de thèse

Mr le Professeur Luc MOUTHON (Université de Paris Descartes) Co-directeur de thèse

# Remerciements

Je tenais tout d'abord à remercier chaleureusement Mme le professeur Marie-Odile Jauberteau qui est l'initiative de ce sujet de thèse et qui l'a co-dirigé. Je ne pourrais jamais assez te remercier pour m'avoir accueilli, soutenu, orienté, réorienté dans ce travail. Je reste admiratif pour ton expérience et ton acuité dans la recherche fondamentale ainsi que pour la pertinence de tes propos et interprétations dans l'analyse de ce travail. Merci aussi pour ta disponibilité et ta réactivité mais aussi pour la direction de l'EA 3842 qui reconnaît en toi une grande directrice d'équipe. Je voulais enfin te remercier pour ta générosité et ton écoute de tous les instants qui m'ont permis de repartir du bon pied dans les moments de doutes. Je suis déjà ravi de nos futures collaborations scientifiques qui seront, j'en suis sûr, multiples et fructueuses.

Je tiens également à remercier le Pr Luc Mouthon qui a co-dirigé ce travail et qui m'a fait découvrir le monde mystérieux de la cellule musculaire lisse vasculaire. Je tenais à exprimer ma profonde admiration pour ton expertise et ton expérience scientifique reconnus de tous. Merci de m'avoir accueilli dans ton laboratoire pour me permettre de vivre pendant un an, une expérience unique dans l'élaboration d'un travail mené autour de la cellule musculaire lisse vasculaire. L'efficacité et la pertinence dont tu as fait preuve pour aborder ce travail sur le remodelage vasculaire dans l'artérite à cellules géantes et mettre en place une collection biologique assez unique mérite toute ma reconnaissance. Ce travail n'est que le début d'une longue collaboration scientifique que je pense sera fructueuse et qui nous permettra, j'espère, de « mettre la balle au fond » plusieurs fois.

Je voulais également remercier Mme le Pr Elisabeth Vidal qui m'a accueilli il y a presque 20 ans dans le service de Médecine Interne et qui m'a insufflé le goût de cette riche spécialité. Je voulais souligner votre sens clinique hors pair, votre expertise et votre rigueur scientifique dans de multiples domaines. Vous m'avez porté une confiance qui m'a permis d'avancer d'année en année vers des horizons que je n'espérais pas. Votre sens de l'écoute et vos conseils toujours judicieux ont permis de construire une équipe médicale motivée et soudée soulignant ainsi votre qualité dans la direction d'équipe. Puissez vous trouver ici ma profonde gratitude et ma sincère reconnaissance.

Je remercie les autres membres du jury de thèse de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail :

Je remercie le Pr Jean-Claude Lecron d'avoir accepté de présider ce jury. En espérant que ce travail permettra une collaboration scientifique dans le domaine des cytokines.

Je remercie le Pr Bernard Bonnotte d'avoir accepté d'être l'un des rapporteurs de ce travail. Son expertise sur le plan immunologique et son implication dans la physiopathologie de l'artérite à cellules géantes sont reconnues de tous. Puisse ce travail permettre de continuer une collaboration déjà clinique mais aussi fondamentale entre Dijon et Limoges.

Je remercie également le Pr Jean-François Viillard d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Son expérience et ses compétences dans le domaine de l'immunologie ne pourront qu'enrichir la discussion sur ce travail.

Je voulais remercier également mes collègues du service de Médecine interne A :

Je remercie le Pr Anne-Laure Fauchais pour son courage et son dynamisme dans ces nouvelles prises de fonctions. Anne-Laure, merci d'avoir ouvert cette voie de la recherche translationnelle sur les neurotrophines, de m'avoir permis d'avoir le temps de goûter à la recherche fondamentale et de m'avoir aidé par ton expertise sur les neurotrophines qui s'affine de jours en jours.

Je tenais également à remercier mes autres collègues de Médecin interne A, Eric, Sylvie, Holy, Guillaume, Sylvain, Clothilde et François, pour leur participation active dans ma traque incessante des patients atteints d'artérite à cellules géantes et notamment d'un fragment d'artère temporale. Ils m'ont permis d'avoir le temps de mener à bien ce travail. Je vous suis sincèrement reconnaissant de cet esprit d'équipe, digne héritage du Pr Vidal.

Je tiens également à remercier chaleureusement les membres de l'équipe EA 3842, qu'ils aient participé de près ou de loin à ce travail :

Je remercie tout particulièrement Barbara, « le deuxième maître Jedi » (après steph) qui m'a apporté tout le soutien nécessaire à une bonne santé mentale d'un thésard que ce soit dans le domaine technique ou logistique. Merci à toi Barbara pour ta générosité, pour m'avoir écouté et soutenu pendant ces trois ans et pour la richesse de nos discussions scientifiques ou métaphysiques.

Je remercie également les chercheurs statutaires motivés de l'EA 3842, Marie-Hélène, Mireille, Danielle, Serge et Fabrice pour leur gentillesse, leur disponibilité et leurs conseils avisés en toute circonstance.

Je remercie tout particulièrement Fabrice pour son implication exemplaire dans la recherche, pour son aide de tous les instants et pour son dynamisme (et ses blagues « le fond de l'eau est frais ») qui ont permis d'apporter de la bonne humeur et de l'excitation dans ce travail.

A Thomas, Hussein et Sofiane pour votre aide et nos discussions scientifiques mais aussi moins scientifiques dans la salle de culture le vendredi à 18H30. Vous m'avez apporté une bonne humeur quotidienne entrecoupée de discussions scientifiques de haut vol qui m'ont aidé à mener à bien ce travail.

A Romain, Carole, Lydie, Lamia et Elodie « la dream team d'Eagletown » pour votre aide au quotidien mais aussi pour les soirées détentes au « caps » et au « motorhead » saupoudré de piment d'espelette qui claque.

A Elsa, l'australienne, qui m'a aidé dans les prémisses de ce travail, pour sa gentillesse et sa bonne humeur. Aux deux Aurélie, Ludo, Cornélia, Pierre, Philippe pour leurs conseils et leur aide précieuse au cours de ces trois années. A Yohan Mousseau pour ses précieux conseils sur la culture cellulaire.

Aux plus jeunes Sandra, Hafidah, Soha, Amazigh et Clément qui dégagent un enthousiasme au contact de la recherche qui fait plaisir à voir. Ne changez rien.

Que l'EA 3842 garde intact son engouement pour la recherche et sa cohésion. Ceci sera le garant d'une future labellisation.



Je tenais également à remercier les membres de l'équipe « Neutrophiles et vascularites » l'institut Cochin que j'ai pu apprécié pendant un an :

A Mathieu, mon maître Jedi parisien « Maître Windu », qui m'a réinitié à la recherche, ouvert à la réflexion et à l'esprit scientifique et aidé dans toutes les expérimentations faites à Cochin. Cette rencontre fut enrichissante et empreinte d'une amitié sincère. Nous aurons l'occasion de nous revoir, j'en suis sûr (autour de la piscine ? quand tu veux), et pourrons rediscuter à nouveau de nos projets professionnels mais aussi personnels.

A Alexis, qui fut pour une trop courte période, mon compagnon de galère. Merci de ton aide précieuse pour m'avoir alimenté en CMLV au moment opportun. Je te souhaite plein de réussite pour la fin de thèse et la suite de ta carrière professionnelle qui sera, à coup sur, brillante.

A Tiana, notre fleur des îles, qui illuminait toujours nos journées avec sa joie et sa bonne humeur. Merci pour ta gentillesse et ta disponibilité. Que le meilleur de la vie puisse te surprendre (un fils guitar Hero ?)

A Nicolas pour sa bonne humeur, son aide au quotidien et pour la richesse de ces expériences personnelles et professionnelles qu'il a su partager. Je te souhaite d'aboutir dans tout ce que tu vas entreprendre et notamment dans la vente de tes innombrables scooters.

A Hanadi et Guillaume qui furent également des compagnons de galère au cours de cette année parisienne. Je vous souhaite plein de réussite dans votre vie.

A Julie G, Julie M, Céline et Dikhra qui furent mes amies complices lors de mon expatriation au sixième étage. Merci pour toutes ces discussions qui m'ont permis de ne pas me sentir trop seul loin de ma famille. Vous avez toute ma reconnaissance.

A Véronique et Magali pour leurs précieux conseils scientifiques et pour leur expertise lors de nos staff biblio, recherche ou ..plastique. Vous avez ma sincère admiration.

Je voulais également remercier pour leur participation active à la collection biologique :

Le Pr Loïc Gullevin, le Pr Claire Le-Jeunne, le Pr Antoine Brézin, Le Pr Pierre-Yves Robert, le Pr Philippe Bertin et le Pr François Labrousse et les différents médecins de leurs services respectifs. Je remercie également tout le personnel paramédical de Médecine interne A, du bloc d'ophtalmologie, du service de rhumatologie et de gériatrie du CHU de Limoges. Je remercie également Angélique Guillaudeau pour son aide en immunohistochimie, Karine Faucher-Durand pour la qPCR, Alain Chaunavel pour les BAT congelées et Chantal pour les superblocs TMA de paraffine.

Enfin je tenais à terminer ces remerciements par ma famille qui m'a toujours soutenu et conseillé dans ce que je voulais entreprendre et à qui je dédie cette thèse :

A mes parents pour leur amour, leur courage et leur optimisme face à l'adversité qui seront toujours exemplaires pour moi.

A ma sœur Monisokha, Aïssa et leurs enfants Meï, Léni et Sethi pour leur générosité et leur courage et pour m'avoir hébergé et supporté pendant mon périple parisien. Que la vie dont vous rêvez puisse vous surprendre très bientôt.

A mon frère Kim San, Leakhana et leurs enfants Leyton et Léa. Que la fin de cette thèse soit le début de nos retrouvailles qui furent si rares ces dernières années.

A Joseph et à Nina « mes deuxièmes parents » qui ont toujours su nous conseiller, épauler, aider, faire à manger...et supporter dans nos retards légendaires. Vous m'avez permis d'oublier souvent le quotidien lors de nos discussions sur la politique, la musique, le cinéma ou.... la spectrophotométrie. Ce travail n'aurait jamais pu se réaliser sans vous.

A mes enfants Lou-Anne, Romain et Elina pour le bonheur de les voir grandir et s'affirmer et pour leur patience pour le temps que je n'ai pas toujours pu leur donner ces dernières années. Je vais bientôt me rattraper les enfants.

Enfin, à Valérie, mon soutien de tous les instants, qui a toujours cru en moi depuis nos débuts et qui me donne la force de réaliser les rêves que je n'osais espérer.

## Résumé

**Rationnel** : L'artérite à cellules géantes (ACG) est caractérisée par une hyperplasie intimale inflammatoire conduisant à des manifestations ischémiques touchant les gros vaisseaux, et dont le diagnostic repose sur la biopsie d'artère temporale. Les neurotrophines (NT) et leurs récepteurs (NTR) sont des protéines régulant la croissance, la différenciation et la survie des neurones. Ils sont également impliqués dans la migration des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).

**Objectifs** : Nous émettons l'hypothèse que les NTs et les NTRs sont impliquées dans le remodelage vasculaire de l'ACG.

**Méthodes** : Nous avons inclus des patients ayant subi une biopsie de l'artère temporale pour une suspicion d'ACG. Nous avons développé une méthode de digestion enzymatique pour obtenir des CMLV issues d'artère temporale (TASMC) chez six patients atteints d'ACG et 10 témoins. Afin de rechercher un marqueur biologique de l'ACG, nous avons étudié la réactivité des sérums de patients avec des protéines extraites de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), et identifié des protéines par électrophorèse bidimensionnelle et spectrométrie de masse.

**Résultats** : Nous avons identifié des protéines cibles d'anticorps anti-CMLV. Ces protéines ont des fonctions potentielles dans le remodelage vasculaire et l'interaction avec des facteurs de croissance (PDGF, NGF). Les artères temporales de patients (n = 22) et de contrôles (n = 21) ont montré en immunohistochimie, une immunoréactivité pour le NGF, le BDNF, TrkB et la sortiline, alors que seuls les patients ACG ont montré une immunoréactivité pour NT3 et P75<sup>NTR</sup>. L'expression était plus intense chez les patients pour le NGF, le BDNF, TrkB et sortiline dans la média et l'intima avec une surexpression de TrkB chez les patients ACG présentant des complications ischémiques. La concentration de NGF dans le sérum était significativement plus élevée chez les patients (n = 28) par rapport aux contrôles (n = 48). Il n'y avait pas de différence entre les patients et les contrôles lors des tests de prolifération cellulaires. Le BDNF exogène semble faciliter la migration des TASMC des patients ACG par rapport aux contrôles.

**Conclusion** : Nos résultats suggèrent que les NT et leurs récepteurs sont impliqués dans le remodelage vasculaire de l'ACG. Le BDNF améliore la migration des TASMC des patients en se liant aux récepteurs TrkB et p75<sup>NTR</sup>. D'autres expériences effectuées sur un plus grand nombre d'échantillons de CMLV seront nécessaires pour confirmer ces résultats.

**Mots clés** : Artérite à cellules géantes, neurotrophines, remodelage vasculaire, inflammation

## Table des matières

<b>Liste des abreviations</b> .....	11
<b>Liste des Figures</b> .....	12
<b>Liste des tableaux</b> .....	14
<b>Introduction</b> .....	15
<b>Revue bibliographique</b> .....	17
I. L'artérite à cellules géantes.....	17
A. Physiopathologie .....	18
B. Epidémiologie.....	36
C. Signes cliniques .....	36
1. Les signes généraux.....	37
2. Les signes céphaliques .....	37
3. Signes rhumatologiques .....	39
4. Signes ophtalmologiques .....	39
5. Les manifestations artérielles .....	41
6. Manifestations neurologiques .....	44
7. Manifestations atypiques.....	44
D. Signes biologiques .....	45
E. Diagnostic de l'ACG .....	45
1. Biopsie de l'artère temporale.....	45
2. Critères de classification de l'ACG .....	47
3. Examens biologiques .....	48
4. Examens d'imagerie .....	48
F. Traitement.....	51
1. Traitement d'attaque .....	51
2. Traitement d'entretien.....	52
3. Effets secondaires de la corticothérapie .....	52
4. Traitement des reprises évolutives, des rechutes et d'épargne cortisonique.....	53
5. Traitements associés .....	55
G. Pronostic.....	55
H. Lien entre artérite à cellules géantes et neurotrophines.....	57
II. Les Neurotrophines et leurs récepteurs.....	58
I. Les neurotrophines .....	59
1. Structure des neurotrophines .....	59
2. Synthèse des neurotrophines .....	60
3. Les récepteurs aux NTs.....	62
4. La signalisation des récepteurs aux neurotrophines.....	67
III. Neurotrophines et cellules immunes .....	74
A. Le NGF .....	74
1. NGF et profil cytokinique .....	74
2. NGF et lymphocyte B.....	74
3. NGF et lymphocytes T .....	75
4. NGF et cellules dendritiques .....	75
B. Le BDNF .....	76
1. BDNF et lymphocytes B .....	76
2. BDNF et lymphocytes T .....	77
3. BDNF et cellules dendritiques .....	77
C. NT3 .....	77
IV. Les neurotrophines et le système cardio-vasculaire.....	79

A.	Neurotrophines et développement cardio-vasculaire .....	79
B.	Neurotrophines, angiogenèse et cellules endothéliales .....	80
C.	Neurotrophines et cellules musculaires lisses vasculaires.....	85
V.	Neurotrophines et pathologies inflammatoires et cardio-vasculaires. ....	87
A.	Neurotrophines, maladies inflammatoires chroniques et auto-immunes.....	87
1.	Neurotrophines et maladies auto-immunes systémiques .....	87
2.	Neurotrophines et maladies inflammatoires .....	90
3.	Neurotrophines et vascularites.....	91
4.	NTs, angiogénèse et maladies inflammatoires .....	92
VI.	Neurotrophines, athérosclérose et remodelage vasculaire.....	94
	<b>Objectifs de la thèse</b> .....	96
	<b>Matériels et méthodes</b> .....	98
I.	Cohorte de patients de Limoges .....	98
II.	Matériel biologique .....	98
A.	Collection biologique Cochin-Limoges .....	98
B.	Artères temporales congelées et incluses dans un bloc de paraffine.....	99
III.	Recherche d'anticorps sériques dirigés contre les CMLV isolées d'artère au cours de l'ACG :	100
A.	Cultures cellulaires .....	100
B.	Prise en charge des échantillons de sérum, plasma et des cellules mononucléées du sang périphérique.....	101
1.	Sérums et plasmas.....	101
2.	Cellules mononucléées du sang périphérique .....	101
C.	Immunofluorescence indirecte .....	101
1.	Identification du phénotype des cellules de biopsie d'artère temporale de patients suspects d'ACG .....	101
2.	Recherche d'auto-anticorps anti-CMLV par immunofluorescence indirecte .....	102
3.	Recherche d'auto-anticorps anti-CMLV par ELISA .....	103
IV.	Etude des facteurs de croissance neurotrophiques et de leurs récepteurs dans les biopsies d'artères temporales.....	104
A.	Culture cellulaire et phénotypage des cellules étudiées .....	104
B.	Expression protéique des NTs et de leurs récepteurs.....	104
1.	Immunohistochimie .....	104
2.	Western Blot.....	105
C.	Expression des transcrits des NTs et de leurs récepteurs.....	107
1.	Extraction d'ARNm .....	107
2.	RT-PCR .....	108
3.	Électrophorèses.....	108
4.	PCR quantitative (qRT-PCR).....	108
D.	Quantification du NGF et BDNF par technique ELISA. ....	111
E.	Etude de la fonctionnalité des NTs.....	112
1.	Test de viabilité cellulaire par XTT.....	112
2.	Test de prolifération cellulaire par BrdU.....	112
3.	Test de migration cellulaire.....	113
	<b>Résultats</b> .....	114
I.	Caractérisation d'anticorps anti-CMLV dans le sérum des patients atteints d'ACG .....	114
A.	Article 1 .....	115
B.	Article 2: .....	132
II.	Etude de l'implication des NTs et de leurs récepteurs dans la pathogénie du remodelage vasculaire de l'ACG .....	137
A.	Article 3: .....	138
III.	Résultats complémentaires.....	173
A.	Rôle de l'endothéline et de ses récepteurs dans le remodelage vasculaire de l'ACG .....	173

B. Effets de l'interleukine-1 $\beta$ sur les CMLV des patients atteints d'ACG .....	175
C. Implication des exosomes dans la réponse inflammatoire locale dans l'ACG .....	177
<b>Discussion générale</b> .....	181
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	192
<b>Références</b> .....	195

# Liste des abreviations

## A

**Ac** : Anticorps  
**ACG** : artérite à cellules géantes  
**ACL**: anticorps anti-cardiolipine  
**ACR**: American College of Rheumatology  
**ADN**: Acide DésoxyriboNucléique  
**ADNc** : Acide désoxyribonucléique complémentaire  
**Akt** : protéine kinase B  
**AECA**: anticorps anti-CE  
**AMPc**: Adénosine monophosphate cyclique  
**ARN**: Acide RiboNucléique  
**ARNm**: ARN messenger  
**ATP**: Adenosine Tri-Phosphate

## B

**BAD**: BCL-2 Associated agonist of cell Death  
**BAT**: Biopsie de l'artère temporale  
**BAX**: BCL-2 Associated X protein  
**BCL-2**: B Cell Lymphoma-2  
**BDNF**: Brain-Derived Neurotrophic Factor  
**BEX-1**: Brain-expressed X-linked 1  
**BSA**: Bovine serum albumin

## C

**CE** : cellules endothéliales  
**CCL**: Chemokine (C-C motif) ligand  
**CCR**: Chemokine (C-C motif) receptor  
**CD**: cluster de différenciation  
**CMH**: complexe majeur d'histocompatibilité  
**CMLV** : cellules musculaires lisses vasculaires  
**CPE**: Carboxypeptidase E  
**CREB**: CRE-binding protein  
**CRP**: C-reactive protein

## D

**DC**: Cellules dendritiques  
**DD**: Death Domain  
**DED**: Death Effector Domain  
  
**DISC**: Death Inducing Signaling Complex  
**dNTPs**: désoxyribonucléosides Triphosphates

## E

**EGF**: Epidermal Growth Factor  
**EGFR**: Epidermal Growth Factor Receptor  
**ERK**: Extracellular signal-Regulated Kinase

## F

**FADD**: Fas-Associated Death Domain  
**Fap-1**: Fas-associated phosphatase-1  
**Fas**: Fibroblast-Associated cell Surface  
**FasL**: Fibroblast-Associated cell Surface Ligand  
**FGF**: Fibroblast Growth-Factor  
**FRS2**: Fibroblast growth Factor Receptor Substrate 2

## G

**Gab1/2**: Grb2 associated binding protein 1/2  
**Grb2**: Growth factor receptor bound protein 2  
**GTP**: Guanosine-5'-TriPhosphate

## H

**HIF-1 $\alpha$** : Hypoxia Inducible Factor-1 alpha  
**HLA**: Human leucocyte antigen  
**HSP**: Heat shock protein  
**HT**: Hybridation Temperature (Température d'hybridation)

## I

**ICAM**: intracellular adhesion molecule  
**IFN- $\gamma$** : interferon- $\gamma$   
**IgG**: immunoglobuline G  
**IL**: interleukine  
**IL-1R1**: récepteur de type I de l'interleukine-1  
**IL-1Ra**: antagoniste du récepteur de l'interleukine-1  
**IL-1r1**: gène du récepteur de type I de l'interleukine-1  
**IL-1rn**: gène de l'antagoniste du récepteur de l'interleukine-1  
**IAP**: Inhibitors of Apoptosis Protein  
**IGF**: Insulin Growth Factor  
**Ig-like**: Immunoglobuline-like  
**IRAK**: Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase

## J

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

## K

**kDa**: kilo Dalton

## L

**LB**: Lymphocytes B  
**LEE**: Limitante élastique externe  
**LEI**: Limitante élastique interne,  
**LGR5**: Leucine-rich repeat containing G-protein coupled Receptor 5

**LPS**: Lipopolysaccharide  
**LPL**: LipoProtéine Lipase  
**LT $\gamma$** : Lymphocyte T Gamma Delta  
**LT**: Lymphocytes T  
**LTh1**: lymphocyte T helper 1  
**LTh17**: lymphocyte T helper 17

## M

**MAPK**: Mitogen Associated Protein Kinases  
**MCP-1**: monocyte chemoattractant protein 1  
**MEK**: MAP ERK Kinase  
**MICA**: MHC class I chain-related gene A  
**MMP**: métalloprotéases matricielles  
**MPO** : Myéloperoxydase  
**MMP**: Matrix metalloproteinase

## N

**NADE**: Neurotrophin receptor Associating Death Effectors  
**NF- $\kappa$ B**: Nuclear Factor kappa B  
**NGF**: Nerve Growth factor  
**NK**: Natural Killer  
**NO** : monoxyde d'azote  
**NOD/SCID**: NonObese Diabetic/Severe Combined ImmunoDeficiency  
**NRIF**: Neurotrophin Receptor Interacting Factor  
**NT-3**: Neurotrophine 3  
**NT 4/5**: Neurotrophine 4/5  
**NTRK**: Neurotrophin Receptor Kinase  
**NTs**: Neurotrophines

## P

**p38**: p38 MAP kinase  
**p75<sup>NTR</sup>**: p75 Neurotrophin receptor  
**PARP**: Poly-ADP Ribose Polymerase  
**Pb**: Paire de bases  
**PDGF**: Platelet-Derived Growth factor  
**PDGFR**: Platelet-Derived Growth factor Receptor  
**PDK1**: 3-Phosphoinositide Dependent protein Kinase 1  
**PECAM**: Platelet endothelial cell adhesion molecule  
**PI3K**: Phosphatidyl Inositol 3-Kinase  
**PKC**: Protein Kinase C  
**PLC $\gamma$** : PhosphoLipase  $\gamma$

## R

**RAF:** Raf kinase  
**RAGE:** Neurotrophin Receptor-interacting MAGE  
**RAP:** Receptor-Associated Protein  
**Ras:** Ras GTPase activating protein  
**RNAi:** RNA interference  
**ROS:** Espèces oxygénées réactives  
**RhoA:** Ras homolog gene family, membre A  
**RIP2:** Receptor-Interacting Protein 2

## S

**SC-1:** Schwann cell factor 1  
**SCID:** severe combined immunodeficiency  
**siRNA:** Small interfering RNA  
**Shc:** Src homology 2 domain containing transforming protein  
**shRNA:** small hairpin RNA  
**SNC:** Système Nerveux Central  
**SOS:** Son Of Svenless

## T

**TACE:** TNF Alpha Converting Enzyme  
**TGN:** réseau trans-golgien  
**TGF $\alpha$ :** Transforming Growth Factor alpha  
**TGF $\beta$ :** Transforming Growth Factor beta  
**TIR:** Toll-interleukin-1 receptor  
**TKI:** Tyrosine Kinase Inhibitor  
**TLR:** Toll-like recepteur  
**TNF:** Tumor Necrosis Factor  
**TNFR:** Tumor Necrosis Factor Receptor  
**TRADD:** TNF-receptorAssociated Death Domain  
**TRAF:** TNF Receptor Associated Factor  
**Trk:** Tropomyosin-Related Kinase

## V

**VCAM:** Vascular cell adhesion molecule  
**VEGF:** Vascular endothelial growth factor  
**VEGFR:** Vascular Endothelial Growth Factor Receptor  
**Vps10p:** Vacuolar carboxypeptidase sorting receptor-10  
**VS:** Vitesse de sedimentation



# Liste des Figures

<b>Figure 1:</b> Physiopathologie de l'artérite à cellules géantes	23
<b>Figure 2:</b> Exemples d'aspect inflammatoire, tortueux et nodulaire d'une artère temporale et de ses branches	38
<b>Figure 3 :</b> Exemples d'aspect de nécrose punctiforme ou étendue du cuir chevelu	38
<b>Figure 4 :</b> <b>A.</b> NOIAA de l'oeil gauche: aspect précoce du fond d'oeil avec un œdème papillaire. <b>B.</b> OACR respectant l'artère cilio-rétinienne	41
<b>Figure 5:</b> Imagerie d'aortite au TDM et au TEP/TDM	42
<b>Figure 6 :</b> Artérite des membres supérieurs à l'échographie-Doppler et à l'IRM	43
<b>Figure 7 :</b> Aspect histologique d'une artère temporale pathologique d'un patient atteint d'ACG	46
<b>Figure 8 :</b> Structures des NTs	59
<b>Figure 9 :</b> Structures primaires des 4 NTs	60
<b>Figure 10 :</b> De la synthèse à la sécrétion : exemple du BDNF	61
<b>Figure 11 :</b> Les NTs et leurs récepteurs	62
<b>Figure 12 :</b> Interactions de p75 <sup>NTR</sup> avec TrkA et NGF	64
<b>Figure 13 :</b> Différentes fonctions de la sortiline	67
<b>Figure 14 :</b> Voies de signalisation du récepteur p75 <sup>NTR</sup>	70
<b>Figure 15 :</b> Signalisation des récepteurs Trk	73
<b>Figure 16 :</b> Interactions entre le NGF et le BDNF avec les lymphocytes B et T	78
<b>Figure 17 :</b> Actions des NTs sur les CE	84
<b>Figure 18 :</b> Actions des NTs sur les CMLV : exemple du NGF	86
<b>Figure 19 :</b> Etude de l'expression protéique et des transcrits du système de l'endothéline-1	174
<b>Figure 20 :</b> Effets de l'IL-1 $\beta$ et du blocage de son récepteur sur les TSMCs de patients (n=4) et de sujets contrôles (n=6)	176
<b>Figure 21 :</b> Biogénèse des exosomes	178
<b>Figure 22 :</b> Expression de la protéine Rab27a en immunohistochimie dans les artères temporales de patients atteints d'ACG et contrôles.	180

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b>	Critères de classification de l'artérite à cellules géantes de l'ACR, format traditionnel	47
<b>Tableau 2 :</b>	Critères de classification de l'artérite à cellules géantes, format dit « en arbre »	47
<b>Tableau 3 :</b>	Principales complications de la corticothérapie	53
<b>Tableau 4 :</b>	Anticorps primaires et secondaires utilisés en immunofluorescence indirecte, en immunohistochimie et Western Blot	107
<b>Tableau 5 :</b>	Couples d'oligonucléotides utilisés en RT- PCR	110

# Introduction

L'artérite à cellules géantes (ACG), anciennement appelée maladie de Horton, est une vascularite primitive touchant les artères de moyen et de gros calibre et notamment l'aorte et ses branches. Les patients peuvent présenter des signes généraux et des signes céphaliques, ceux-ci étant liés aux phénomènes ischémiques touchant l'artère carotide externe. Il n'existe pas de marqueur biologique spécifique de l'ACG, les patients atteints présentent le plus souvent un syndrome inflammatoire biologique non spécifique. Le diagnostic de certitude repose sur les données histologiques d'une artère atteinte. On observe au sein de la paroi artérielle, un infiltrat de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (LTCD4<sup>+</sup>), de macrophages et de cellules géantes, produits de fusion de plusieurs macrophages. Il existe également une destruction de la limitante de l'élastique interne (LEI) associée à une hyperplasie intimale responsable d'une sténose voire d'une obstruction de la lumière artérielle.

La physiopathologie de l'ACG reste encore mal comprise [2]. Après activation par un stimulus antigénique non encore identifié, les cellules dendritiques présentes dans l'adventice produisent des chémokines permettant l'afflux de LTCD4<sup>+</sup> et de macrophages au sein de l'artère via les *vasa vasorum*. Les LTCD4<sup>+</sup> activés par les cellules dendritiques (DC) vont produire de l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) qui va favoriser la maturation et l'activation des macrophages ainsi que leur fusion en cellules géantes. Les macrophages activés et les cellules géantes vont produire des cytokines pro-inflammatoires tel que l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), l'interleukine 6 (IL-6) et le facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); des espèces réactives de l'oxygène (ROS); du monoxyde d'azote (NO); des métalloprotéases matricielles (MMP) et des facteurs de croissance dont le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) et le *platelet derived growth factor* (PDGF). Ces différentes protéines vont être impliquées dans la survenue des signes généraux de l'ACG et *in situ*, dans l'agression et le remodelage de la paroi artérielle aboutissant à l'hyperplasie intimale, secondaire à la prolifération et à la migration de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), élément initiateur de la sténose et de l'occlusion artérielle.

Les mécanismes pathogéniques impliquant les CD, les LTCD4<sup>+</sup> et les macrophages dans la phase initiale de l'ACG ont bien été détaillés dans plusieurs études. En revanche peu de données existent concernant l'implication du système immunitaire humoral dans

la physiopathologie de l'ACG et les mécanismes précis qui sous-tendent le remodelage vasculaire.

L'analyse histologique d'une artère temporale d'un sujet atteint d'ACG, outre la présence de LTCD4<sup>+</sup> et macrophages, montre peu de lymphocytes B (LB) et de plasmocytes. Plusieurs études ont eu pour objectif d'identifier des auto-anticorps chez les patients ayant une ACG. L'analyse du répertoire des lymphocytes B des patients atteints d'ACG a mis en évidence des autoanticorps dirigés contre des antigènes ubiquitaires comme la lamine C, la cytokératine, la sous-unité II du cytochrome oxydase mitochondrial [3]. Par ailleurs, des anticorps anti-cardiolipine ont été détectés dans le sérum de ces patients, dont la prévalence peut varier de 20 à 60% [4, 5]. Enfin dans certaines conditions des anticorps anti-CMLV ont été incriminés dans la survenue d'une vascularite [6]. Ainsi l'existence et le rôle d'éventuels auto-Acs restent à déterminer dans cette maladie.

Les neurotrophines (NT) et leurs récepteurs (NTR), sont des protéines impliquées dans la croissance, la différenciation et la survie des neurones. On distingue le *nerve growth factor* (NGF), le *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), la neurotrophine 3 (NT-3) et la neurotrophine 4/5 (NT-4/5). Les NT produisent leurs effets en interagissant avec leurs récepteurs : les récepteurs sélectifs des NT matures, tropomyosine kinase (Trk) (TrkA pour le NGF, TrkB pour le BDNF et NT-4 et TrkC pour NT-3) et un récepteur non sélectif de faible affinité pour les différentes NT matures, p75<sup>NTR</sup>. Outre leurs fonctions neuronales, il est apparu que les NT exerçaient un rôle physiologique dans le contrôle de la croissance de nombreux types cellulaires non neuronaux. C'est ainsi que les NTs ont été également impliquées dans la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales après l'activation de TrkA et TrkB et dans la migration des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) après activation de TrkA par le NGF [7].

Les objectifs de ce travail consistaient, dans un premier temps, à préciser le degré d'implication du système immunitaire humoral dans l'ACG. Cette partie du travail de thèse a été effectuée dans le laboratoire du Pr Luc Mouthon à l'unité INSERM U1016 de l'Institut Cochin à Paris et visait à identifier, à partir de CMLV de patients, un marqueur biologique spécifique dans le répertoire des auto-anticorps de ces patients.

Dans un second temps il nous semblait pertinent d'aborder les mécanismes physiopathologiques du remodelage vasculaire de l'ACG en regardant, dans ce contexte, l'implication éventuelle des neurotrophines, thème principal de l'équipe d'accueil 3842 du Pr Marie-Odile Jauberteau à la Faculté de Médecine de Limoges.

# Revue bibliographique

Cette première partie du manuscrit a pour objectif de présenter tout d'abord l'artérite à cellules géantes (ACG) avec tout d'abord les données concernant la physiopathologie de l'ACG.

Nous détaillerons dans un deuxième temps l'épidémiologie, les signes cliniques et biologiques, la biopsie de l'artère encore essentielle au diagnostic, les critères diagnostiques, les examens d'imagerie utiles au diagnostic, l'évolution, le traitement et le pronostic de cette maladie.

Nous discuterons ensuite du lien possible entre les neurotrophines et le remodelage vasculaire.

Nous présenterons dans un troisième temps le système des neurotrophines et de leurs récepteurs avant de détailler dans une dernière partie l'implication des neurotrophines dans le système immunitaire et le système cardio-vasculaire.

## I. L'artérite à cellules géantes

L'ACG est une vascularite systémique primitive dont la première description clinique date de 1890. Elle peut être attribuée à Jonathan Hutchinson, qui a décrit un patient de plus de 80 ans qui présentait une inflammation douloureuse des artères temporales l'empêchant de porter son chapeau. C'est Bayard Taylor Horton [8] qui rapportera la publication princeps de la maladie qui portera son nom en 1932 alors qu'il était médecin à la Mayo Clinic à Rochester dans le Minnesota. Il décrit deux femmes de 55 et 68 ans qui présentaient de la fièvre, une asthénie, des douleurs du cuir chevelu et notamment le long des artères temporales. L'analyse histologique de l'artère temporale atteinte montrait une infiltration d'aspect granuleux au sein du tissu. Les complications oculaires d'origine ischémique signalées en 1937 par Horton puis par Jennings [9], dominent le pronostic par leur fréquence et leur gravité. La preuve d'une atteinte artérielle plus diffuse fut apportée en 1941 par Gilmour puis en 1946 par Cooke [10]. La diversité des aspects cliniques fut soulignée en 1960 par Paulley et Hughes [11]. Parallèlement les premières descriptions concernant la pseudo-polyarthrite rhizomélique (PPR) sont publiées dans les années 1950 par Forestier [12]. Le lien avec l'ACG est discuté dès le début des années 1960 [11, 13-14]. L'efficacité de la corticothérapie est rapportée par Shick et al. en 1950 [15].

## A. Physiopathologie

La physiopathologie de l'ACG reste encore mal comprise. L'analyse des coupes histologiques des artères temporales de patients atteints de cette maladie permet de décrire des lésions constituées et d'identifier les différents acteurs de la pathogénie. La chronologie des différentes étapes qui sous tendent la physiopathologie de cette maladie est bien illustrée dans certaines publications [16-17]. Trois stades évolutifs ont été décrits :

- Un stade I ou initial : les lésions peuvent être focales, avec un infiltrat de cellules inflammatoires (lymphocytes, macrophages, polynucléaires) touchant les trois tuniques, une atteinte de la limitante élastique interne (LEI) et une destruction des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) plutôt focale et l'absence de thrombus et de cellules géantes
- Un stade II ou granulomateux : l'infiltrat inflammatoire est plus dense, touche les trois tuniques et se concentre au niveau de la LEI, la destruction des CMLV et de la LEI est plus étendue. On note enfin la présence d'un thrombus organisé avec une néovascularisation et des cellules géantes quasi-constantes.
- Stade III ou cicatriciel : L'infiltrat inflammatoire est discret et dispersé. Le thrombus est organisé avec des myofibroblastes centraux et une néovascularisation périphérique. Il existe une fibrose de la média et de l'adventice. Les cellules géantes sont rares ou proches de la LEI

L'analyse immunohistochimique d'artères temporales de patients atteints d'ACG a permis d'identifier les cellules constituant l'infiltrat inflammatoire. Il s'agit majoritairement de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (LTCD4<sup>+</sup>) exprimant des marqueurs d'activation précoce (CD25) et tardif (Ag HLA-DR), de macrophages et de cellules géantes résultantes de la fusion de macrophages. On peut trouver plus rarement des lymphocytes B, des plasmocytes, des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles [17-18]. Les LTCD4<sup>+</sup> présents au sein des lésions d'artérite temporale ont un profil T helper 1 (TH1) et produisent de l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) et de l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) [19]. Par ailleurs on note au sein de ces artères pathologiques une production accrue de cytokines pro-inflammatoires comme de IL-1 $\beta$ , de l'interleukine-6 (IL-6), du facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) et du transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1), qui est entre autre un marqueur de l'activation des macrophages [19-20]. L'ensemble de ces données concernant la nature des cellules présentes au sein de l'artère temporale d'un patient atteint de l'ACG et des cytokines qu'elles produisent conforte l'existence d'une réponse immune à médiation cellulaire dont les acteurs principaux sont les LTCD4<sup>+</sup> et les macrophages. L'origine de cette réponse immune reste encore inconnue puisqu'aucun antigène extérieur ou auto-antigène n'a été

identifié jusqu'ici. En revanche la cellule dendritique (DC) adventitielle, qui peut jouer le rôle de cellule présentatrice d'antigène, semble impliquer dans l'initiation de la réponse inflammatoire. Ces DC sont présents dans un état immature et quiescent dans l'artère saine. Elles expriment les Toll Like Récepteurs (TLR), la protéine S100, le récepteur 6 de chémokine de la famille CC (CCR6) mais n'expriment pas les marqueurs d'activation comme le CD83, le CMH-II ou les molécules de co-stimulation (CD80 ou CD86) qui leur permettent d'interagir avec les LTCD4<sup>+</sup>. Au sein de l'artère d'un patient atteint d'ACG les DC adventitielles sont matures, expriment le CMH-II, le CD83, le CD86 et le CCR7 et produisent des cytokines et des chémokines leur permettant de recruter et d'activer les LTCD4<sup>+</sup> (figure 1). Elles sont également présentes dans la média et sont au contact des granulomes [21]. Différents stimuli peuvent induire la maturation des DC parmi lesquels on peut trouver des cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$  et IL-1) et des motifs moléculaires de pathogènes (pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)) tel que le lipopolysaccharide (LPS) reconnu par les TLR-4 [22]. La DC adventitielle mature semble jouer un rôle majeur dans l'initiation du processus lésionnel de l'ACG. En effet à partir d'un modèle expérimental consistant à greffer des artères temporales de patients suspects ou atteints d'ACG sur des souris avec déficit immunitaire combiné sévère (SCID), plusieurs expériences ont permis de valider cette affirmation : l'injection intrapéritonéale de LPS 7 à 10 jours après la greffe d'une artère temporale (AT) de patient suspect d'ACG conduit 30 heures plus tard, à une maturation de DC adventitielles du greffon avec une expression des transcrits de CD83 ; l'administration d'un anticorps monoclonal anti-CD83 à J9-J11 après greffe entraîne une disparition de l'artérite du greffon d'AT d'un patient atteint d'ACG explanté une semaine après traitement. La densité des infiltrats lymphocytaires T, le niveau d'expression des transcrits d'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) et d'interleukine 1 bêta (IL-1 $\beta$ ) ont diminué de façon significative et les granulomes ont disparu. Enfin la greffe simultanée sur une souris SCID de trois fragments d'AT provenant respectivement de patient atteint d'ACG, d'un patient atteint de pseudo-polyarthrite rhizomélisque (PPR) seule et d'un sujet contrôle montre le développement d'une vascularite dans le greffon du patient atteint d'ACG mais aussi dans celui atteint de PPR. Les DC activées de ce patient sont capables de recruter les LT provenant du greffon d'AT du patient atteint d'ACG. Ce phénomène n'est pas présent si le fragment du patient atteint d'ACG n'est pas greffé simultanément avec le fragment d'AT du patient atteint de PPR. Ces résultats suggèrent que l'activation lymphocytaire est strictement dépendante de la fonctionnalité des DC [21]. L'activation des DC précède le recrutement de LTCD4<sup>+</sup> et cette activation est spécifique du ligand du TLR. Les ligands du TLR-4 induisent une panartérite transmurale, alors que ceux du TLR-5 provoquent plutôt un infiltrat inflammatoire adventiciel et périvasculaire [23]. Les DC activées

produisent de l'IL-6, de l'IL-12 et de IL-18 et des chémokines comme ligand de chémokine motif CC (CCL) 18, CCL19, CCL20 et CCL21 et leurs récepteurs spécifiques. Ensuite les DC activées devraient migrer vers les ganglions lymphatiques où elles peuvent déclencher la réponse immunitaire adaptative, mais chez les patients atteints d'ACG, ces cellules restent piégées dans la paroi artérielle [24]. Ce phénomène semble dû à l'action des chémokines CCL19 et CCL21 qui vont se fixer sur leur récepteur CCR7 de manière autocrine, ce qui contribue sans doute à entretenir la localisation et l'activation des DC au sein de la paroi artérielle. Sous l'action des chémokines les DC matures vont recruter les LTCD4<sup>+</sup> qui vont accéder à la paroi artérielle via les vasa vasorum. Ces LTCD4<sup>+</sup> qui vont infiltrer la limitante élastique externe et la jonction média-intima vont subir sélectivement une expansion clonale qui ne sera présente que dans les AT des patients atteints d'ACG et non dans leur sang périphérique [25-26]. L'importance du rôle des LT dans le maintien de la réponse inflammatoire de l'ACG a été vérifiée sur le même modèle de fragments d'AT de patients atteints d'ACG greffés sur des souris SCID qui ont reçu une injection de sérum anti-lymphocytaire. On observe une diminution marquée de la production de cytokines pro-inflammatoires et une régression des infiltrats inflammatoires dans les fragments d'AT [27]. Deux types de LT jouent un rôle essentiel dans l'ACG : les Lymphocytes T helper 17 (LTh17) produisant l'IL-17 et les lymphocytes Th1 (LTh1) produisant l'IFN- $\gamma$ . La polarisation des LT CD4<sup>+</sup> humains vers un profil LT Th17 peut survenir sous l'action conjuguée ou non du TGF- $\beta$ , de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6, de l'IL-21 et de l'IL-23 [28]. Les LT Th17 permettent l'élimination de certains micro-organismes comme *C. albicans* ou des bactéries extracellulaires. Ils sont aussi impliqués dans le mécanisme physiopathologique de nombreuses maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis, les maladies inflammatoires intestinales et la sclérose en plaques [28-29]. Les fibroblastes et les macrophages, entre autres, expriment le récepteur de l'IL-17 (IL-17R). La signalisation par ce récepteur induit la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-1 $\beta$  [30]. L'expression des transcrits de l'IL-17 dans les AT de patients atteints d'ACG et le taux circulant de cette cytokine sont plus importants que ceux retrouvés chez les patients contrôles [31]. Après corticothérapie systémique la proportion de LT Th17 circulants et le niveau d'expression des transcrits de l'IL-17 s'effondrent, tandis que le taux de LT Th1 circulants et l'expression des transcrits d'IFN- $\gamma$  restent inchangés. Parallèlement on observe une diminution du niveau d'expression des transcrits de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 et de l'IL-23. Ces résultats suggèrent que la plupart des manifestations aiguës d'ACG est liée à la production d'IL-17 [31]. L'effondrement du taux des LTh17 ne semble pas lié exclusivement à la corticothérapie et pourrait survenir dans l'évolution naturelle de l'ACG.



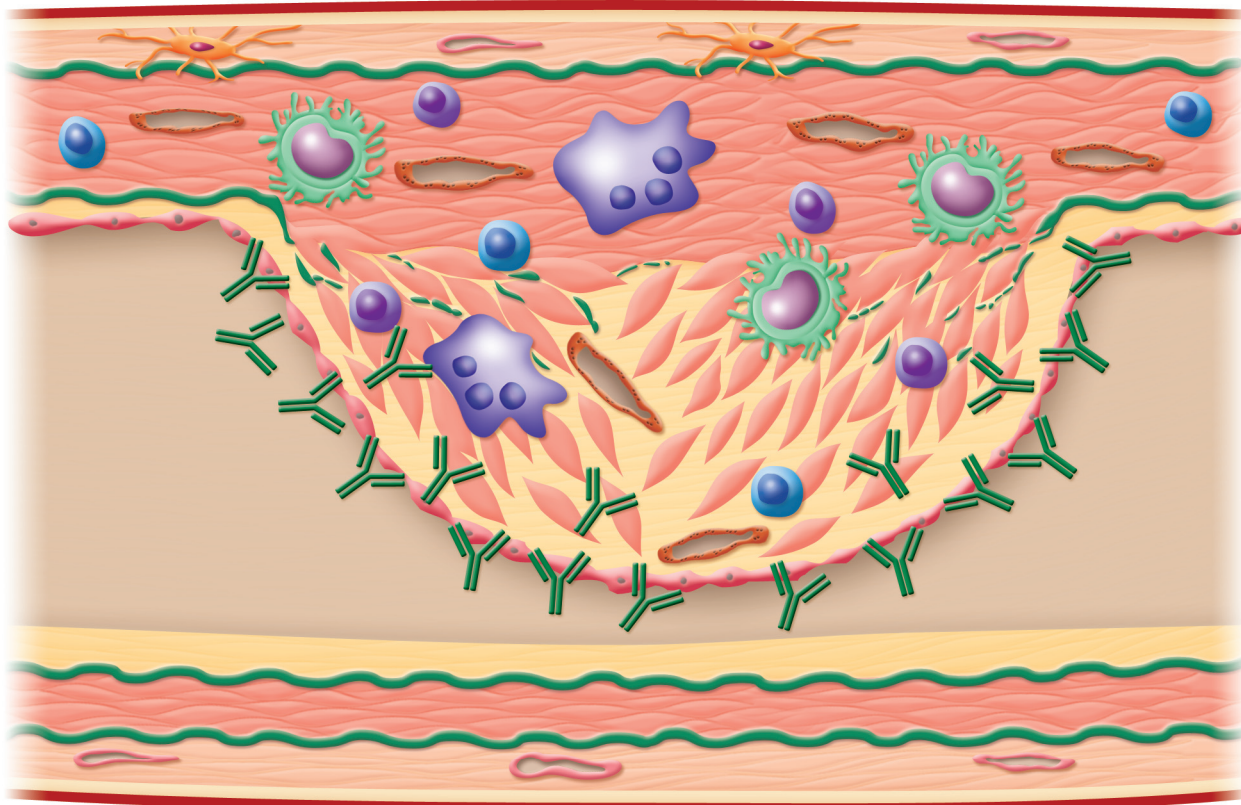
En effet en utilisant un marqueur spécifique des LTh17, le CD161, il a été démontré que ce marqueur était exprimé par des LTh1 infiltrant la paroi artérielle des patients atteints d'ACG ce qui suggère une polarisation des LTh17 vers un profil LTh1 sous l'effet de l'IL-12 [32]. Les LTh1 producteurs d'IFN- $\gamma$  représentent la sous population prédominante dans les AT des patients atteints d'ACG [31]. L'IFN- $\gamma$  favorise le recrutement et l'activation des macrophages, qui infiltrent la paroi artérielle par l'intermédiaire des vasa vasorum. Les macrophages présents dans l'adventice vont produire des cytokines pro-inflammatoires tel le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 et l'IL-32 [33] favorisant l'inflammation locale et systémique. La production d'IL-6 induit une synthèse de protéines inflammatoires et semble liée à la sévérité de l'ACG [34]. Dans la média, les macrophages activés par l'IFN- $\gamma$  peuvent fusionner et former des cellules géantes et participer à la formation de granulomes [35]. Ces granulomes, composés de LT CD4<sup>+</sup>, de macrophages et de cellules géantes sont préférentiellement situés à proximité de la LEI, à la jonction intima-média.





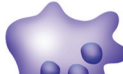





La sténose ou l'occlusion artérielle au cours de l'ACG est consécutive à l'hyperplasie intimale. Ce phénomène résulte de la destruction de la paroi artérielle par de multiples facteurs dont les formes réactives de l'oxygène (ROS), le monoxyde d'azote (NO) et les métalloprotéases matricielles (MMP), suivie d'une phase de « réparation » compensatrice où sont impliqués certains facteurs de croissance comme le platelet derived growth factor (PDGF) et le vascular endothelial growth factor (VEGF). Les effecteurs de ce remodelage vasculaire sont principalement des macrophages CD68<sup>+</sup> et les cellules géantes [35-36]. Parmi ces macrophages CD68<sup>+</sup>, deux sous populations semblent bien identifiées : une productrice de TGF- $\beta$ , d'IL-6 et d'IL-1 $\beta$  située dans l'adventice et l'autre présente principalement dans la média et l'intima proche de la LEI, produisant les ROS, le NO et les MMP [35]. Les MMP sont des enzymes protéolytiques et peuvent détruire des protéines de la matrice extra-cellulaire et l'élastine. MMP-2 et MMP-9 sont tous deux présents dans les infiltrats granulomateux proche de la LEI des AT de patients atteints d'ACG [37-39]. Toutefois, seule MMP-9 semble contribuer à la destruction de la LEI [39]. La libération de ROS conduit à la peroxydation lipidique des phospholipides membranaires des CMLV et des cellules mononucléées infiltrant la média [36]. Le rôle du NO n'est pas clair dans ce contexte, il a des propriétés cytotoxiques sur les CE mais semble également agir sur la vasomotricité des néovaisseaux au sein de l'hyperplasie intimale [40]. La combinaison des ROS et MMP contribue à l'apoptose des CMLV et des cellules mononucléées et à la destruction de la LEI. Ces événements sont contrebalancés par au moins 2 facteurs de protection. D'une part, l'aldose réductase, cétoréductase qui limite la peroxydation des lipides de la membrane phospholipidique, est détectée dans les macrophages, les LT et les CMLV présentes dans les zones de

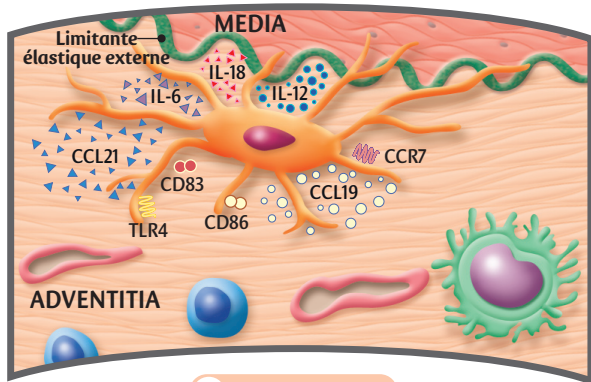
lésion de la paroi artérielle des patients atteints d'ACG. L'expression de cette enzyme est associée à celle de la 4-hydroxy-2-nonéal (HNE), produit de dégradation de la peroxydation lipidique détectée dans les CMLV. L'inhibition de l'activité d'aldose-réductase augmente la formation d'HNE et augmente le nombre de cellules apoptotiques dans la paroi artérielle [41]. D'autre part, le PDGF et le VEGF sont impliqués respectivement dans l'hyperplasie intimale et la néoangiogenèse. Le PDGF stimule la prolifération et la migration des CMLV de la média vers l'intima [42-43]. L'expression de PDGF-A et PDGF-B est plus importante dans les AT des patients atteints d'ACG que dans celles des sujets contrôles et siègent dans l'adventice et la média mais pas dans l'intima [44]. Le PDGF est principalement produit par les macrophages et les cellules géantes présents à la jonction intima-média, près de la LEI, mais aussi par les CMLV activées et les CE situées autour de la lumière vasculaire. Il existe un lien entre le niveau d'expression du PDGF, l'hyperplasie intimale responsable d'une sténose artérielle et la survenue des complications ischémiques tel que la claudication intermittente des mâchoires ou un événement ischémique oculaire ou cérébral [44]. Dans les artères normales, la présence des vasa vasorum est limitée à l'adventice. Dans les AT de patients atteints d'ACG, on note la présence de néocapillaires dans la média et l'intima. Cette néovascularisation est associée à l'hyperplasie intimale, la fragmentation de la LEI et la production de VEGF par les macrophages et les cellules géantes à la jonction média-intima [45]. L'hyperplasie intimale, à l'origine de la formation de zones hypoxiques, induit la production de VEGF, principal acteur de la néoangiogenèse. Ce phénomène est probablement à l'origine de la pérennisation du processus inflammatoire local. En effet, en produisant un certain nombre de chémokines, les vaisseaux nouvellement formés peuvent contribuer au recrutement de LT et de macrophages permettant ainsi de perpétuer le processus inflammatoire.

Ces données ont fait l'objet d'une publication dans *Autoimmunity reviews* [2].

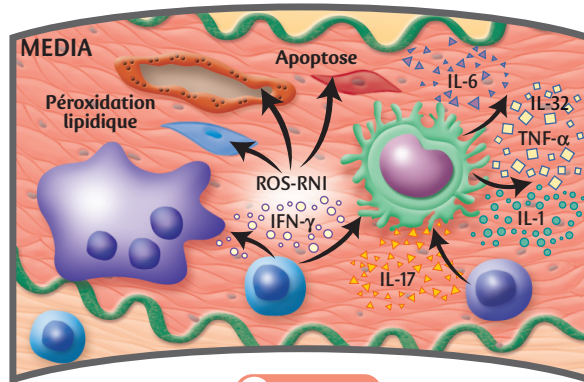
# Artérite à cellules géantes



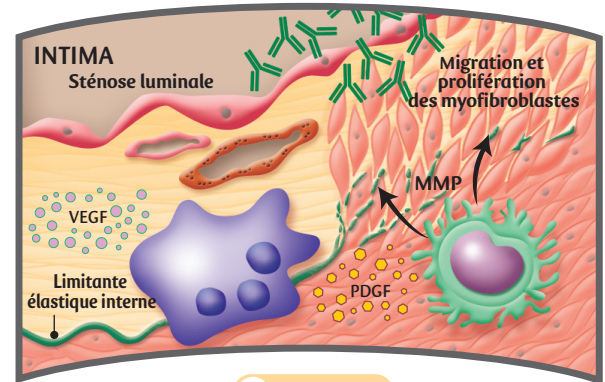
-  Lymphocytes T CD4<sup>+</sup>
-  Lymphocytes Th 17
-  Cellule dendritique
-  Cellule endothéliale
-  Cellule Géante
-  Macrophage
-  Néocapillaires
-  Vaso vasorum
-  Cellule musculaire lisse vasculaire
-  Anticorps



**A ADVENTICE**



**B MEDIA**



**C INTIMA**

**Figure 1:** Physiopathologie de l'artérite à cellules géantes, d'après Ly et al. Autoimmunity Reviews 2010 [2].

**(A)** En l'absence de signaux d'activation, les DC adventitielles immatures expriment à leur surface principalement les TLR, la protéine S100 et le CCR6. Après activation par un stimulus inconnu, ces DC vont exprimer des marqueurs d'activation (CD83) et des molécules de co-stimulation (CD86) et vont produire des cytokines (IL-6, IL-12 et IL-18) et des chémokines (CCL18, CCL19, CCL20 CCL21) et leurs récepteurs (CCR7). Ainsi elles vont rester piégées dans la paroi artérielle et agir comme des cellules présentatrices de l'antigène, en recrutant et activant les LT CD4<sup>+</sup>. Les LT CD4<sup>+</sup> vont infiltrer la paroi artérielle via les vasa vasorum et se positionner au niveau de la LEE et de la jonction intima-média. **(B)** Les LT CD4<sup>+</sup> vont ensuite subir une expansion clonale et se polariser selon un profil Th1 ou Th17 en fonction des cytokines et chémokines produites par les DC. Les LTh1 producteurs d'IFN- $\gamma$  vont recruter et activer des macrophages qui peuvent fusionner pour former des cellules géantes et participer à la formation de granulomes. Les Th17 produisant l'IL-17 comme les Th1 vont favoriser la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 et IL-6) par les macrophages ce qui va engendrer une inflammation locale et systémique. Les cellules géantes et les macrophages, situés à proximité de la limitante élastique interne à la jonction intima-média, vont également libérer des ROS, du NO et des MMP, qui vont contribuer à la peroxydation des lipides membranaires et à l'apoptose des CMLV et des CE. **(C)** Les macrophages et les cellules géantes produisent également le PDGF et le VEGF. Sous l'action combinée des MMP, du PDGF et du VEGF, la LEI est détruite et un remodelage vasculaire apparaît. Les myofibroblastes vont proliférer et migrer vers l'intima. Il se constitue une hyperplasie intimale et une sténose luminale associées parallèlement à des phénomènes d'angiogénèse. On note également la présence d'auto-anticorps dirigés contre les CE et les CMLV dont le rôle dans la pathogénie de l'ACG reste encore mal compris.

Abréviations: ACG: artérite à cellules géantes, CCL: chémokines (C-C motif) ligand, CCR: chémokine (C-C motif) receptor, CD: cluster de différenciation, CE: cellules endothéliales, CMLV: cellules musculaires lisses vasculaires, DC: cellules dendritiques, IFN- $\gamma$ : interféron- $\gamma$ , IL: interleukine, LEE: limitante élastique externe, LEI: limitante élastique interne, LT: les lymphocytes T, MMP: métalloprotéases matricielles, NO: monoxyde d'azote, PDGF: platelet-derived growth factor, ROS: espèces oxygénées réactives, Th1: lymphocytes T helper 1, Th17: lymphocytes T helper 17, TLR: Toll-like receptor, TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$ , VEGF: vascular endothelial growth factor

## **B. Epidémiologie**

L'incidence de l'ACG varie de 10 à 29 / 100 000 habitants en Europe et Amérique du Nord et augmente avec l'âge [46-47]. La fréquence de l'ACG semble plus élevée dans les pays du nord avec un gradient nord-sud et chez les caucasiens contrairement aux afro-américains, aux arabes et aux asiatiques [48-51]. L'ACG survient exclusivement chez les patients âgés de plus de 50 ans, surtout chez les personnes de plus de 70 ans [46]. La moyenne d'âge au moment du diagnostic est de 73 ans. Les femmes sont plus fréquemment touchées que les hommes [52-55] avec un ratio femmes sur hommes variant de 1,7 :1 à 3,8 :1. Des facteurs de risque acquis d'ACG ont été identifiés. La parité, l'âge de la ménopause, les facteurs de risque cardiovasculaires et le tabagisme, en particulier chez les femmes, ont été décrits comme étant associés à un risque accru d'ACG avec un odds ratio de 4,5 et 6,5, respectivement pour les deux derniers facteurs [56-58]. Des observations d'ACG chez des parents du premier degré ou des jumeaux monozygotes ont suggéré la possibilité de prédispositions génétiques à développer une ACG [59-60]. Il semblerait que certains haplotypes du système d'antigène leucocytaire humain (HLA) de classe I et II et le polymorphisme de certains gènes impliqués dans le processus lésionnel comme certaines molécules d'adhérence, cytokines, chémokines et facteurs de croissance soient impliqués dans la susceptibilité de développer une ACG [61]. Cependant ces études cas-témoins sont le plus souvent réalisées par deux équipes d'Europe du Sud, italienne et espagnole, sans cohorte de répliation dans leurs études. Ces résultats restent donc à confirmer dans d'autres régions du monde.

## **C. Signes cliniques**

Les motifs de consultations ou d'hospitalisations peuvent être diverses dans cette maladie. Il peut s'agir de céphalées temporales, de douleurs crâniennes, de signes rhumatologiques à type de PPR, de signes généraux parfois isolés, de différentes manifestations oculaires ou neurologiques qui peuvent être révélatrices. Le mode de début peut être progressif, marqué par des signes généraux ou rhumatologiques, ou bien rapide annoncé par des signes temporaires, voire même brutal, révélé par une complication ischémique. Le délai diagnostique habituel entre le début de la maladie et le diagnostic peut varier de 2 à 6 mois [62].

## **1. Les signes généraux**

La fièvre est un signe habituel retrouvé dans 20 à 60% des cas, elle dépasse le plus souvent 38° C, et atteint parfois 39° C. Son aspect est variable : en plateau, irrégulière avec des clochers fébriles, un maximum vespéral, elle peut être prolongée pendant des semaines parfois des mois. Les frissons sont habituellement absents mais des sueurs nocturnes peuvent être retrouvées. L'asthénie est un signe très fréquent, l'amaigrissement est constaté dans 40 à 80% des cas, l'importance est variable, pouvant atteindre plus de 10% du poids corporel [62-65].

## **2. Les signes céphaliques**

### **a. Les céphalées**

Les céphalées sont fréquentes et varient entre 60 et 85% des cas. Elles sont typiquement temporales ou fronto-temporales, unies ou bilatérales. Il s'agit de douleurs superficielles d'intensité variable, parfois discrètes retrouvées seulement par interrogatoire, parfois permanentes avec des paroxysmes déclenchés par le contact, le froid et pouvant entraîner des insomnies. Elles peuvent s'associer à une hyperesthésie cutanée ou du cuir chevelu et être exagérées par le port d'un chapeau, le contact d'un oreiller ou le frottement d'un peigne. Les céphalées peuvent siéger au niveau de la région occipitale, auriculaire postérieure ou quelquefois faciale, maxillaire ou rétro-orbitaire [62-65].

### **b. Les signes temporaux objectifs**

L'artère temporale peut apparaître nettement visible dessinant un cordon saillant et tortueux (figure 2). Elle peut être dure, épaissie et sensible à la palpation qui entraîne une recrudescence des douleurs. Les battements artériels peuvent être diminués ou abolis et on peut quelquefois palper des petits nodules particulièrement sensibles. La peau en regard de cette artère est hyperhémique et infiltrée. Les signes temporaux peuvent être discrets à type de sensibilité anormale de l'artère, induration, diminution ou abolition des battements artériels. Enfin l'artère temporale peut être normale à l'examen clinique tout en présentant des lésions histopathologiques témoignant d'un processus arthritique en activité [62-65].



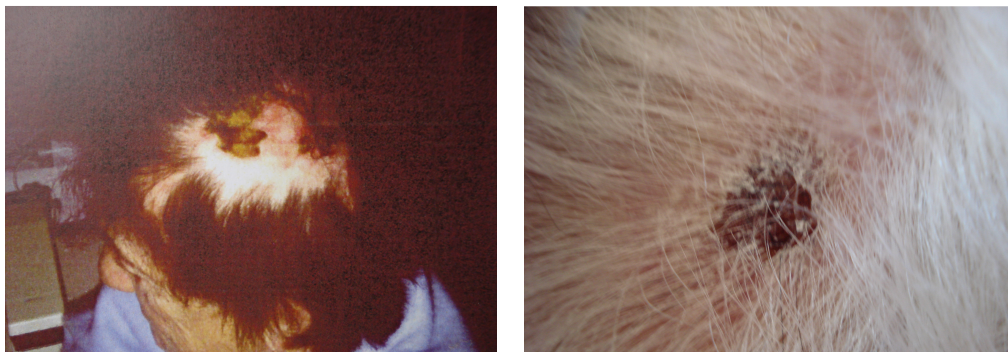


**Figure 2** : Exemples d'aspect inflammatoire, tortueux et nodulaire d'une artère temporale et de ses branches (photos du service de Médecine Interne A-CHU Limoges)

La claudication des mâchoires est retrouvée dans 20 à 50% des cas. Il peut s'agir d'une sensation de fatigue ou même d'une véritable douleur survenant au niveau des muscles masticateurs lors de l'alimentation et calmée par la mise au repos. Ce caractère ischémique a une grande valeur diagnostique. Parfois il peut s'agir d'une difficulté ou d'une impossibilité d'ouvrir totalement la bouche pouvant même réaliser un trismus. Les autres signes bucco-pharyngées traduisent également une atteinte des branches de la carotide externe et on peut noter des douleurs linguales lors de l'alimentation ou la parole, des douleurs pharyngées pouvant entraîner une dysphagie, une toux quinteuse rebelle et non productive et un enrrouement [62-65].

### **c. Autres signes céphaliques objectifs**

Les autres artères céphaliques superficielles peuvent être atteintes notamment les artères faciales, occipitales auriculaires postérieures, ces atteintes ont la même valeur diagnostique que l'atteinte de l'artère temporale. Une nécrose du cuir chevelu peut survenir et révéler la maladie (figure 3). L'atteinte de la langue est rare, pouvant aller de la simple douleur jusqu'à la nécrose [62-65].



**Figure 3** : Exemples d'aspect de nécrose punctiforme ou étendue du cuir chevelu (photos du service de Médecine Interne A-CHU Limoges)

### **3. Signes rhumatologiques**

Le tableau clinique le plus fréquent et le plus caractéristique est celui de la PPR. Sa fréquence varie entre 40 et 50% [65-67]. Elle se caractérise par des douleurs de rythme inflammatoire à localisation rhizomélique prédominant à la ceinture scapulaire d'où elle irradie vers le cou et les bras. Les douleurs peuvent siéger au niveau des 2 hanches et le long des gouttières inférieures du rachis. Leur horaire est inflammatoire, elles sont bilatérales, spontanées, exacerbées par le mouvement entraînant parfois une impotence fonctionnelle importante. L'examen objectif montre une limitation, par la douleur, de la mobilité active et une raideur articulaire et péri-articulaire. L'examen radiologique ne retrouve pas de lésion ostéo-articulaire. L'échographie articulaire est un examen essentiel et peut montrer une bursite ou une synovite des articulations des ceintures scapulaires et pelviennes avec une excellente sensibilité (92%) et spécificité (99%) surtout au niveau des articulations des épaules [68-69]. D'autres manifestations rhumatismales sont possibles, il s'agit de polyarthrite inflammatoire généralisée et transitoire, de mono-arthrite des grosses articulations touchant principalement les genoux, de polyarthrite inflammatoire chronique séronégative pouvant mimer une polyarthrite rhumatoïde. Le liquide synovial est inflammatoire sans abaissement du complément, la recherche du facteur rhumatoïde demeure négative.

### **4. Signes ophtalmologiques**

#### **a. Manifestions ischémiques oculaires**

Par leur fréquence et leur gravité, elles dominent le pronostic de l'ACG. Elles peuvent laisser une cécité définitive, quelquefois bilatérale. Avant l'ère des corticoïdes leur fréquence était de 50 à 60% des cas et pouvait entraîner une cécité complète dans 26% des cas et partielle dans 15% des cas. Depuis le recours systématique à la corticothérapie leur fréquence n'est plus que de 25 à 30%, avec une amaurose définitive dans 14% à 18% des cas, selon les séries et le mode de recrutement. Elles surviennent surtout avant la mise en route de la corticothérapie, mais peuvent survenir quelquefois peu de temps après le début de celle-ci [70].

La sémiologie des manifestations ischémiques oculaires est dominée par les troubles de la vision qui peuvent être transitoires ou permanents, atteindre un seul ou les 2 yeux. L'amaurose est la complication oculaire majeure, elle survient brusquement ou de façon rapidement progressive, et conduit généralement à une perte totale ou quasi totale de la



vision en quelques heures ou quelques jours. Une fois installée, l'amaurose est définitive entraînant une perte totale de la vision ou la persistance d'une simple perception lumineuse. Cette amaurose définitive peut être précédée quelques heures ou quelques jours auparavant de manifestations visuelles paroxystiques à type d'amaurose fugace, de brouillards visuels régressifs, d'amputation du champ visuel dans différents secteurs, de diplopie, de ptosis et d'hallucinations colorées. Ces signes peuvent se répéter et /ou s'associer et doivent être considérés comme une urgence thérapeutique de part le risque de la bilatéralisation de l'amaurose qui doit toujours être redoutée.

L'examen ophtalmologique montre des signes qui dépendent de la localisation de l'atteinte artérielle. La neuropathie optique ischémique antérieure aiguë (NOIAA) est l'atteinte la plus fréquente (77-92% des cas), l'examen du fond de l'œil (figure 4A) montre au début une papille hyperhémie légèrement saillante, puis elle va devenir œdémateuse et pâle s'associant parfois à quelques hémorragies en flammèches péri-papillaires. L'aspect évolue ensuite vers l'atrophie optique avec une papille décolorée en totalité dans un secteur, et parfois des excavations papillaires. Dans certains cas on constate l'association à des lésions d'infarctus rétinien. L'occlusion de l'artère centrale de la rétine (OACR) ou de l'une de ses branches (le plus souvent temporale supérieure) est plus rare (4-21% des cas). Elle se traduit par une baisse très brutale de l'acuité visuelle, l'examen du fond d'œil retrouve un champ rétinien œdémateux, blanc laiteux tranchant avec la couleur rouge cerise de la fovéa (figure 4B). Les artères rétiniennes sont étroites, rétrécies, les veines se distinguent mal des artères. La neuropathie optique rétrobulbaire (3-6% des cas) réalise le contraste entre une cécité parfois totale et un fond d'œil normal. D'autres aspects sont possibles : nodules dysoriques ayant l'aspect de petits exsudats disposés autour de la papille ; occlusion choroïdienne entraînant des placards pigmentés d'atrophie choroïdienne.

L'angiographie rétinienne est un examen essentiel en cas de manifestation oculaire ischémique. En cas de NOIAA, elle montre au début une hypofluorescence de la papille, aussi bien au temps précoce que tardif, et par la suite une diffusion du colorant au niveau de la papille. En cas d'occlusion de l'artère centrale de la rétine, elle objective un retard important à l'imprégnation des branches rétiniennes. Cet examen permet aussi de mettre en évidence dans la moitié des cas des anomalies de perfusion du réseau choroïdien avec un retard d'apparition et un allongement du temps de remplissage choroïdien.



**Figure 4 :** **A.** NOIAA de l'oeil gauche: aspect précoce du fond d'oeil avec un oedème papillaire. **B.** OACR respectant l'artère cilio-rétinienne : aspect au fond d'oeil. Dans la partie ischémique périphérique, la rétine est blanche et ischémique, les vaisseaux sont grêles, et la macula est «rouge cerise». Dans la partie épargnée centrale, la couleur du fond d'oeil et l'arborescence vasculaire est normale. (photos du service d'ophtalmologie-CHU Limoges)

## **b. Autres manifestations oculaires**

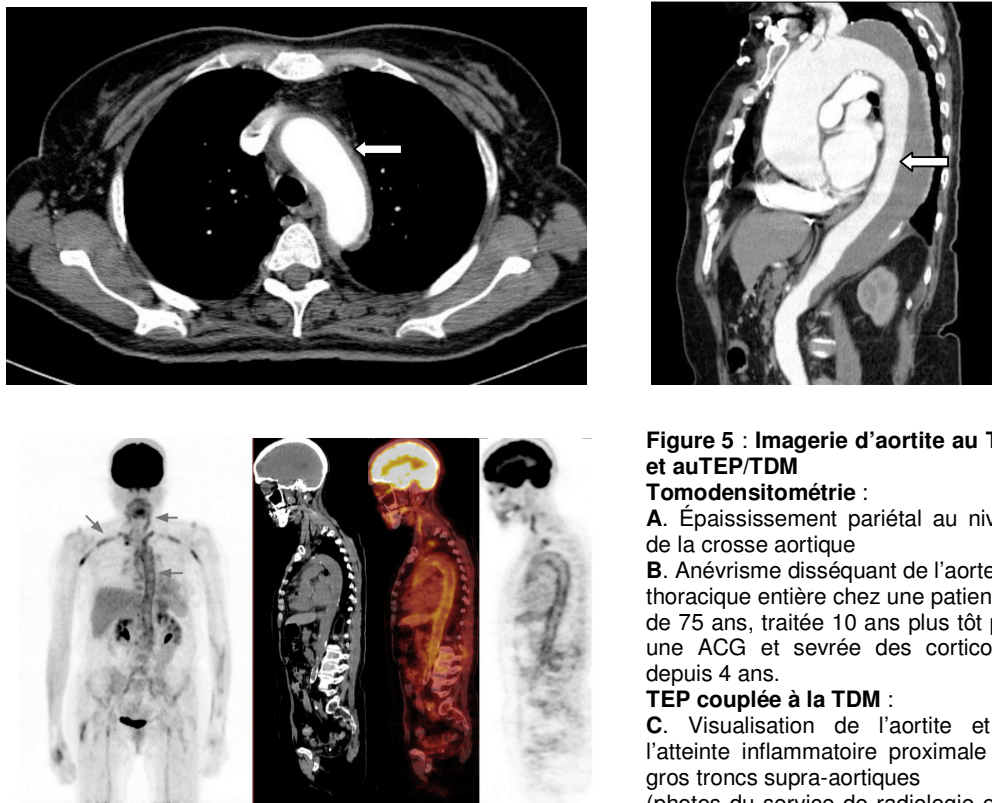
Une atteinte oculomotrice fréquente, survient dans environ 4,6 à 15% des cas, elle se manifeste par un ptosis ou une diplopie uni ou bilatérale. Il peut également s'agir d'une limitation douloureuse des mouvements oculaires, d'une exophtalmie, ou d'une ophtalmoplégie internucléaire. Ces manifestations sont transitoires, volontiers répétitives et peuvent annoncer une amaurose permanente. Une ischémie du segment antérieur de l'œil est possible mais rare, pouvant évoluer vers une ulcération de la cornée. Ces manifestations oculaires sont d'origine ischémique siégeant au niveau des artères ophtalmiques, centrales de la rétine, ciliaires courtes postérieures, entraînant soit un ramollissement ischémique du nerf optique, soit une occlusion de l'artère rétinienne. L'atteinte oculomotrice est due à une atteinte ischémique des rameaux des nerfs moteurs de l'œil et des muscles de l'orbite. L'atteinte du segment antérieur de l'œil est due à une ischémie des artères ciliaires longues [70]. Les manifestations cardio-vasculaires

## **5. Les manifestations artérielles**

### **a. L'aortite**

La fréquence de l'aortite est probablement sous-estimée. Elle est environ de 15% dans séries cliniques ou autopsiques [71-72]. Cependant cette fréquence est bien plus importante dans les études prospectives avec la réalisation systématique d'une tomodensitométrie aortique (angio-TDM). Elle varie alors entre 45 à 65% [73-74]. L'aorte

entière peut être atteinte mais les complications des aortites concernent surtout sa portion thoracique. L'aortite peut se constituer à bas bruit ou révéler la maladie par la survenue d'une complication (anévrisme ou dissection) [75]. Le délai moyen entre le diagnostic d'ACG est celui d'une complication d'une aortite est estimé à 2,5 ans pour l'aorte abdominale et 5,8 ans pour l'aorte thoracique. Le risque de développer un anévrisme thoracique chez un patient atteint d'ACG est 17 fois supérieur à celui de la population générale [76]. Le diagnostic d'aortite et de ses complications est actuellement facilité par l'utilisation de l'échographie-doppler, de l'angio-TDM (figures 5A et 5B), de l'IRM aortique (angio-IRM) ou de la tomographie à émission de positrons (TEP) (figure 5C) qui sont moins invasifs et irradiants que l'artériographie. Les deux premiers examens semblent bien indiqués quand l'aortite est patente et qu'il existe un épaississement de la paroi aortique. L'angio-IRM et la tomodensitométrie à émission de positon (TEP) permettent une exploration fonctionnelle de l'inflammation artérielle et peuvent détecter plus précocement les lésions d'aortite en montrant respectivement un hypersignal ou une fixation hypermétabolique témoin de l'œdème inflammatoire de la paroi artérielle [77].



**Figure 5 : Imagerie d'aortite au TDM et au TEP/TDM**

**Tomodensitométrie :**

**A.** Épaississement pariétal au niveau de la crosse aortique

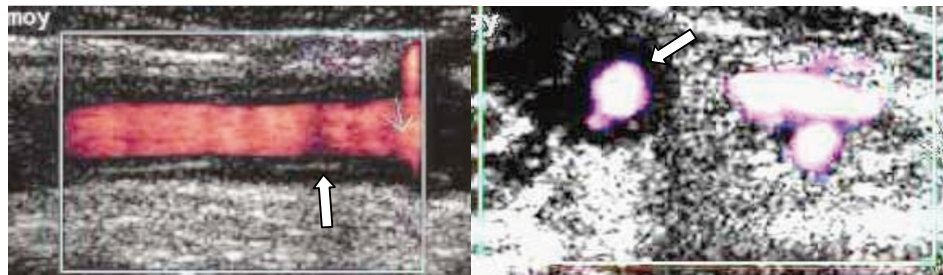
**B.** Anévrisme disséquant de l'aorte thoracique entière chez une patiente de 75 ans, traitée 10 ans plus tôt pour une ACG et sevrée des corticoïdes depuis 4 ans.

**TEP couplée à la TDM :**

**C.** Visualisation de l'aortite et de l'atteinte inflammatoire proximale des gros troncs supra-aortiques (photos du service de radiologie et de médecine nucléaire-CHU Limoges)

## b. Artérite des membres supérieurs et inférieurs

L'ACG peut s'étendre au niveau des gros troncs artériels supra-aortiques. La prévalence de cette atteinte est de 3 à 16% [78-79]. L'artérite des membres supérieurs prédomine (63% des cas). Elle est fréquemment bilatérale (66% des cas) et touche surtout les artères sous-clavières et axillaires (respectivement 53 et 37% des cas). Elle peut se manifester par un phénomène de Raynaud, une claudication des extrémités, une pâleur voire une nécrose des extrémités. Il est licite de rechercher la diminution ou la disparition du pouls, une inégalité tensionnelle et/ou un souffle perçu au niveau des artères sous-clavières, axillaires ou humérales. L'artérite des membres inférieurs survient chez un tiers des patients et touche surtout l'artère fémorale superficielle (25% des cas) [78]. Elle peut être asymptomatique ou se manifester par une claudication intermittente voire une ischémie d'un membre. L'échographie-doppler artériel est l'examen de choix pour l'étude des gros artériels dans ce contexte. Elle peut montrer un épaississement hypoéchogène de la paroi vasculaire autour de la lumière artérielle (signe du halo), une sténose et une occlusion (figure 6A) [80] et permet de suivre l'évolution sous traitement. L'angio-TDM, l'angio-IRM (figure 6B) et la TEP permettent également d'évaluer l'artérite des membres avec des précisions identiques à celles déjà citées pour l'aortite.



**Figure 6 :** Artérite des membres supérieurs à l'échographie-Doppler et à l'IRM

**Écho-doppler couleur : A.** Épaississement (flèche) de la paroi de l'artère axillaire droite (coupes longitudinale et transversale) avec signe du « halo sombre » (flèche) au cours d'une ACG à BAT négative chez une femme de 63 ans ayant un souffle bi-axillaire.

**Angio-IRM :B.** Sténoses progressives (flèches), bilatérales des artères sous-clavières et axillaires chez un homme de 53 ans ayant une fièvre prolongée inexpliquée et un syndrome inflammatoire marqué. (photos du service de radiologie et de médecine vasculaire-CHU Limoges)

### ***i. Les manifestations coronariennes***

Il est difficile de les considérer comme une manifestation de coronarite à cellules géantes car la fréquence des lésions athéromateuses coronaires à cet âge et le rôle éventuellement favorisant de la corticothérapie peuvent rendre compte de la fréquence accrue de l'angor et de l'infarctus du myocarde chez les sujets présentant une ACG. Il existe cependant quelques observations d'infarctus du myocarde mortel dus à une thrombose coronaire développée au niveau d'une coronarite à cellules géantes [81-82]. Ces lésions ne se limitent pas aux gros troncs coronaires, mais touchent également les artères intra-myocardiques.

## **6. Manifestations neurologiques**

### **a. Accidents vasculaires cérébraux**

Ils sont rares et peuvent atteindre le système carotidien et vertébro-basilaire entraînant des tableaux cliniques divers : hémiplégie, aphasie, hémianopsie latérale homonyme, ataxie avec ophtalmoplégie, syndrome de Wallenberg, cécité corticale [83]. Ces manifestations peuvent être révélatrices, survenant dans les premières semaines de l'évolution de l'ACG, ou peuvent représenter une complication tardive de cette maladie. Il est cependant très difficile en l'absence de preuves anatomiques de rapporter avec certitude à l'ACG des accidents neurologiques qui peuvent révéler des complications athéromateuses chez ces personnes âgées.

### **b. Les neuropathies périphériques**

Elles sont exceptionnelles, mais leur fréquence est probablement sous-estimée. Au niveau des membres il peut s'agir de mononévrites (sciatique poplitée externe, médian) de multinévrites, de polyneuropathies sensitivo-motrices distales plus ou moins symétriques, de radiculopathies [84].

## **7. Manifestations atypiques**

Ces manifestations sont le reflet de l'atteinte vasculaire diffuse de cette maladie. Il peut s'agir d'une atteinte pulmonaire ou pleuro-péricardique [85-86] Une atteinte

digestive peut être responsable d'un infarctus mésentérique [87]. Une hépatite granulomateuse cholestatique n'est pas rare [88]. Sur le plan endocrinien, un diabète insipide, une dysthyroïdie ou une hyperparathyroïdie peuvent s'observer [89]. Des atteintes utérines et ovariennes ont été décrites [90].

## **D. Signes biologiques**

Il n'y a pas de marqueur biologique spécifique de l'ACG. En revanche le syndrome inflammatoire est quasi-constant. La vitesse de sédimentation (VS) est pratiquement toujours augmentée avec une moyenne de 90 à 93 mm à la première heure [64, 91], elle peut toutefois être inférieure 50 mm/1<sup>er</sup>H [92]. La C-réactive-protéine, marqueur plus spécifique de l'inflammation que la VS est souvent élevée avec une moyenne de 95 mg/L [64, 91]. Les autres protéines de l'inflammation sont également élevées en corrélation avec la VS et la CRP (fibrinogène, haptoglobine et orosomucoïde). Une association entre un syndrome inflammatoire modéré et la survenue de complications ischémiques oculaires a été rapportée [93] [64]. Une anémie inflammatoire est observée dans plus de la moitié des cas [91], bien corrélée avec le syndrome inflammatoire. Une hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles survient dans un tiers des cas, elle dépasse rarement 12000 par mm<sup>3</sup>. Une thrombocytose n'est pas rare (50% des cas) et semble être corrélée avec le risque de complications ischémiques oculaires [64].

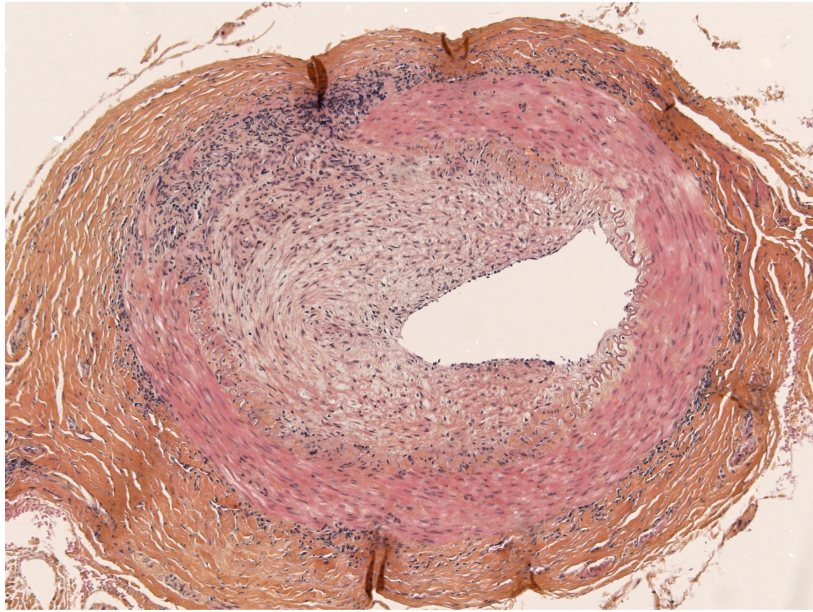
## **E. Diagnostic de l'ACG**

### **1. Biopsie de l'artère temporale**

Elle est essentielle au diagnostic et permet de légitimer le recours à la corticothérapie prolongée et à forte dose. Elle ne doit pas retarder la mise en route du traitement car les lésions histologiques vont persister encore 4 semaines après le début de la corticothérapie [94]. Il reste une discussion concernant la taille et la bilatéralité de la biopsie. Idéalement, elle doit être orientée par la clinique et mesurée au moins un centimètre [95]. Une BAT bilatérale permettrait d'améliorer la rentabilité diagnostique de 12,7% par rapport à une BAT unilatérale [96]. Classiquement, les lésions histologiques de l'ACG réalisent une panartérite segmentaire et focale [16]. Il existe un infiltrat inflammatoire polymorphe constitué de d'histiocytes, de lymphocytes et parfois de polynucléaires. Les cellules géantes sont présentes dans 50 à 70% des cas et leur



présence serait un facteur prédictif de l'atteinte ophtalmologique [18]. On note quasiment une destruction de la LEI avec une destruction des CMLV et une thrombose fréquente de la lumière artérielle (figure 7). Par ailleurs une micro-vascularite touchant les vaisseaux extra-adventitiels mais également les *vasa vasorum* et les vaisseaux intra-adventitiels a été décrite [97]. Sa présence semble être associée à la présence d'une PPR [98-99].



**Figure 7** : Aspect histologique d'une artère tempotale pathologique d'un patient atteint d'ACG. Panartérite granulomateuse avec un infiltrat de cellules inflammatoires, une rupture partielle de la limitante élastique interne, une hyperplasie intimale et une sténose précocclusive de la lumière artérielle (coloration à l'HES X100) (Photo du service d'anatomie pathologique- CHU de Limoges).

## 2. Critères de classification de l'ACG

Les critères de classification qui sont encore utilisés actuellement dans tous les articles scientifiques concernant l'ACG sont ceux de l'American College of Rheumatology (ACR) [100] qui a proposé des critères avec un format dit « traditionnel » (tableau 1) et des critères avec un format dit « en arbre » (tableau 2). Ces critères ont été élaborés en comparant 214 patients atteints d'ACG à 593 patients atteints d'un autre vascularite.

**Tableau 1** : Critères de classification de l'artérite à cellules géantes de l'ACR, format traditionnel

- 
- Âge au début de la maladie  $\geq$  50 ans
  - Céphalées d'apparition récente (nouveau début ou nouveau type de céphalées)
  - Anomalie de l'artère temporale à la palpation (induration ou diminution du pouls non due à l'artériosclérose des artères cervicales)
  - Vitesse de sédimentation supérieure à 50 mm à la première heure (méthode Westergren)
  - Biopsie d'artère temporale anormale montrant une vascularite caractérisée par la prédominance d'une infiltration par des cellules mononucléées ou par un granulome inflammatoire, habituellement avec des cellules géantes

---

La présence d'au moins trois critères parmi les cinq précédents permet de classer la maladie avec une sensibilité à 93,5% et une spécificité à 91,2%.

**Tableau 2** : Critères de classification de l'artérite à cellules géantes, format dit « en arbre »

- 
- Âge au début de la maladie  $\geq$  50 ans
  - Céphalées d'apparition récente (nouveau début ou nouveau type de céphalées)
  - Claudication de la mâchoire, de la langue ou troubles de la déglutition
  - Induration du cuir chevelu ou présence de nodules à distance de l'artère temporale ou d'autres artères du crâne
  - Anomalie de l'artère temporale à la palpation (induration ou diminution du pouls non due à l'artériosclérose des artères cervicales)
  - Biopsie d'artère temporale anormale montrant une vascularite caractérisée par la prédominance d'une infiltration par des cellules mononucléées ou par un granulome inflammatoire, habituellement avec des cellules géantes

---

La présence d'au moins trois critères parmi les six précédents permet de classer la maladie avec une sensibilité à 95,3% et une spécificité à 90,7%.



### 3. Examens biologiques

Il n'y a actuellement pas de marqueur spécifique diagnostique de l'ACG. Des autoanticorps ont été détectés dans le sérum de patients ayant une ACG. Il s'agit le plus souvent d'Ac anti-cardiolipine dont la prévalence dans cette maladie varie de 20 à 59% [4, 101]. Leur signification n'est pas claire, leur présence pourrait être corrélée à un risque de rechute avec une sensibilité de 74% et une spécificité de 100% [102]. Toutefois la recherche de ces Acs ne peut en aucun cas être utilisée comme un outil diagnostique. Des immunoglobulines G (IgG) dirigées contre la chaîne lourde de la ferritine seraient plus fréquemment retrouvées dans le sérum de patients atteints d'ACG comparés aux sujets témoins (55 % contre 1 % ;  $p < 0,01$ ) suggérant que la recherche de ces Acs pourraient contribuer au diagnostic d'ACG. Ces Acs seraient présents dans 92% des patients au moment du diagnostic [103]. Nous avons voulu vérifier ces données dans notre cohorte. Malheureusement, même s'ils ne sont détectés que chez 2,5% des sujets sains, ils sont retrouvés dans un tiers des patients suspects d'ACG mais pour lesquels ce diagnostic a été écarté [104]. Ainsi la contribution de ces anticorps au diagnostic d'ACG lors de la prise en charge d'un patient chez qui ce diagnostic est suspecté semble limitée.

### 4. Examens d'imagerie

Dans la stratégie diagnostique de l'ACG, certains examens d'imagerie déjà cités ci-dessus peuvent contribuer au diagnostic et permettre de débiter raisonnablement la corticothérapie à forte si la BAT par exemple est négative et que le patient ne remplit pas *stricto sensu* les critères de classification de l'ACR. Il s'agit de l'échographie-doppler, de l'angio-TDM, de l'angio-IRM et de la TEP couplée à la TDM. Ces examens ont surtout une utilité dans la mise en évidence d'une aortite ou d'une atteinte inflammatoire des vaisseaux supra-aortiques et notamment les artères vascularisant les membres supérieurs. De plus l'échographie-doppler et l'angio-IRM peuvent montrer directement une anomalie de l'artère temporale.

### **a. L'échographie-doppler artériel**

C'est un examen simple et non invasif qui permet d'aider au diagnostic en visualisant d'une part une anomalie de l'artère temporale. Les trois signes pertinents à rechercher sont :

- Le signe du halo : épaissement pariétal circulaire et homogène de l' artère. La sensibilité et la spécificité de ce signe si on le compare à la positivité de la BAT est de 69 et 82% respectivement [105]
- La sténose artérielle
- L'occlusion artérielle

Ces deux derniers signes ont une sensibilité d'environ 66% [105]. C'est surtout la combinaison de ces trois signes qui présente un intérêt diagnostique certain par rapport à l'histologie avec respectivement une sensibilité de 95% et une spécificité de 85% [80]. Cet examen est également utile dans le diagnostic d'une inflammation de la paroi artérielle de l'aorte et de ses branches. Il montre un épaissement homogène pariétal notamment des artères sous-clavières et axillaires qui sont plus fréquemment touchées dans l'ACG [106].

### **b. L'angio-TDM**

Cet examen permet d'aider au diagnostic d'ACG en montrant un épaissement pariétal circonférentiel et homogène supérieur à 3 mm de l'aorte qui peut être présent chez un patient sur deux et un épaissement des artères des membres supérieurs et des membres inférieurs [73, 79]. Outre le diagnostic, l'angio-TDM permet également un suivi de l'inflammation pariétale des gros vaisseaux et peut montrer une régression de l'épaissement pariétal sous corticothérapie [74, 79, 107].

### **c. L'angio-IRM**

Comme l'écho-doppler des artères temporales, l'angio-IRM peut montrer des anomalies pouvant aider au diagnostic d'ACG. On peut voir un hypersignal en séquences pondérées T1 et un hypersignal T2 témoin de l'œdème pariétal artériel [108]. Par ailleurs la sensibilité et la spécificité de ces anomalies sont respectivement de 80 et 71% par rapport à la BAT [109]. Il n'y a pas de différence significative entre l'angio-IRM et l'écho-doppler artériel pour le diagnostic d'ACG [109]. Les anomalies d'hypersignaux sont également présentes au niveau des gros vaisseaux permettant ainsi un orientation diagnostique forte en faveur de l'ACG [110]. L'angio-IRM permet également de bien visualiser les anévrysmes et les sténoses. Les anomalies d'hypersignaux aortiques

semblent régresser sous corticothérapie mais semblent persister à long terme [111-112] ce qui rend difficile leurs interprétations dans le suivi de l'activité de l'ACG.

#### **d. La tomographie à émission de positrons couplée au TDM (TEP-scan)**

La détection d'une fixation hypermétabolique de l'artère temporale n'est pas envisageable dans la pratique courante du fait de la petite taille de l'artère (< 2mm) et de sa proximité avec le cerveau. Cet examen d'imagerie fonctionnelle permet une détection précoce de l'inflammation artérielle des gros vaisseaux [113-114] et apporte une aide précieuse au diagnostic d'ACG. Une méta-analyse récente portant sur la rentabilité diagnostique du TEP-scan dans l'ACG estime une sensibilité à 80%, une spécificité à 89%, une valeur prédictive positive à 85% et négative à 88% [115]. De plus une fixation hypermétabolique intense initiale pourrait être corrélée au risque de développer un anévrisme chez un patient atteint d'ACG avec aortite [116]. Par ailleurs les fixations hypermétaboliques diminuent sous corticothérapie en corrélation avec un bon contrôle clinique et la normalisation du syndrome inflammatoire [117]. Cependant la signification de certaines anomalies est difficile quand le patient présente des lésions d'athérosclérose [117-118]. Comme pour l'angio-IRM, la place du TEP-scan dans le suivi de l'activité de l'ACG est difficile à déterminer [117]. L'hypermétabolisme aortique peut persister dans plus de 50% des cas à trois mois de la corticothérapie sans réel lien avec le risque de rechute alors que le syndrome inflammatoire a disparu [119].

## **F. Traitement**

La corticothérapie est le traitement de choix de l'ACG, elle doit être commencée dès que le diagnostic est porté, avant même d'avoir le résultat de la biopsie de l'artère temporale. Elle a pour but de prévenir les complications oculaires, qui restent plus rares une fois le traitement mis en route. Son efficacité clinique est spectaculaire avec une régression des troubles cliniques en 12 à 48 heures, constituant un test diagnostique d'un grand intérêt lorsque la biopsie de l'artère temporale est négative. La prednisone est le corticoïde le plus utilisé.

### **1. Traitement d'attaque**

En l'absence de complication ischémique, une posologie de l'ordre de 0,5 à 1 mg par kilo et par jour (mg/kg/j) d'équivalent prednisone est communément admise [120-121]. L'utilisation à la phase d'attaque d'un assaut cortisonique intraveineux (IV) de méthyl-prednisolone (MP) dans le but de contrôler plus rapidement le syndrome inflammatoire, de diminuer la fréquence des cortico-résistances primaires et de permettre ainsi une épargne cortisonique à long terme a été suggérée. Une posologie IV de 240 mg/j de MP, ne permet pas d'améliorer la réponse initiale ou une épargne cortisonique ultérieure [122]. En revanche à plus forte dose (1g/j pendant 3j de MP) le taux de rechute semble diminuer associé à une épargne cortisonique plus rapide [123]. Cette stratégie reste cependant à confirmer par de plus larges études.

En présence d'une complication ischémique ou de signe précurseur d'événement ischémique (par ex. amaurose fugace), les assauts cortisoniques IV de MP sont préconisés à la dose de 500 à 1g/j pendant 3 jours [120-121] avec un relais par la prednisone à la dose d'1 mg/kg/j. La durée du traitement d'attaque est fonction de la normalisation des signes cliniques et des paramètres biologiques de l'inflammation. Elle est classiquement de 3 à 4 semaines. Bien que les signes cliniques s'amendent rapidement, l'inflammation biologique s'abaisse progressivement pour revenir à la normale en un délai variant entre 1 à 6 semaines. Les lésions ischémiques constituées, oculaires ou cérébrales ne régressent qu'exceptionnellement en totalité. Si la dose initiale n'entraîne pas une amélioration rapide elle doit être augmentée ou associée à une autre thérapeutique.

## **2. Traitement d'entretien**

La diminution de la corticothérapie doit se faire sous surveillance clinique et biologique stricte. Il existe une phase de dégression rapide dont le but est de raccourcir au maximum la période d'utilisation des fortes doses de corticoïdes afin de limiter les conséquences iatrogènes. Entre six et 10 semaines après le début du traitement, la posologie initiale sera réduite à 15 à 20 mg/j par paliers de réduction d'une à deux semaines. On procède ensuite à une phase de décroissance lente avec une réduction de la posologie de 2,5 mg toutes les 2 à 4 semaines jusqu'à la posologie de 10 mg/j puis avec une réduction d'1 mg/mois jusqu'à l'arrêt du traitement [120-122]. Cette diminution de doses n'est autorisée qu'en l'absence de signes cliniques, l'objectif étant de rechercher la dose minimale qui maintient les malades asymptomatiques avec des protéines de l'inflammation normales. La durée moyenne de la corticothérapie est le plus souvent de 18 à 36 mois.

## **3. Effets secondaires de la corticothérapie**

Les effets secondaires de la corticothérapie sont importants et surviennent chez environ 40 à 80 % des malades [122, 124] (Tableau 3). Il s'agit surtout de l'ostéoporose cortisonique qu'il convient de prévenir systématiquement par du calcium et de la vitamine D. En outre la corticothérapie peut entraîner une myopathie invalidante, aggraver ou révéler un diabète, une diverticulite, favoriser des infections, précipiter l'évolution d'une hypertension artérielle et d'une cataracte.

**Tableau 3** : Principales complications de la corticothérapie

<b>Endocriniennes</b>	<b>Apparence cushingoïde, diabète</b> latent ou clinique,
<b>Minéralocorticoïdes</b>	<b>Rétention hydrosodée</b> , oedèmes, hypokaliémie, <b>HTA</b>
<b>Ostéo-musculaires</b>	<b>Myopathie, ostéoporose fracturaire</b> , ostéonécrose aseptique des épiphyses
<b>Gastro-intestinales</b>	Ulcère peptique, oesophagite, <b>diverticulite</b>
<b>Psychiatriques</b>	<b>Troubles de l'humeur et du sommeil</b> , état dépressif, psychose
<b>Infectieuses</b>	<b>infections bactériennes</b> et virales, réactivation tuberculeuse
<b>Oculaires</b>	<b>Glaucome, cataracte</b> postérieure
<b>Dermatologiques</b>	Atrophie cutanée, pétéchies, ecchymoses, retard de cicatrisation, acné, hirsutisme

**En gras** : Les complications les plus fréquentes et/ou les plus graves

#### **4. Traitement des reprises évolutives, des rechutes et d'épargne cortisonique**

Certains patients sont corticodépendants et rechutent régulièrement à l'arrêt du traitement ou lors de la diminution posologique (reprise évolutive), de plus il existe des formes rebelles à la corticothérapie ce qui amène à rechercher d'autres traitements. La reprise évolutive (RE) survient dans 40 à 62% des cas avec un délai médian de 7 à 16 mois et une dose moyenne entre 7 et 10 mg/j de prednisone [124-126]. L'attitude thérapeutique lors de la première voire de la deuxième RE est fonction de son expression clinique et/ou biologique. Il peut s'agir de reprise de signes céphaliques, d'une fièvre isolé, de la survenue d'un événement ischémique et de la reprise du syndrome inflammatoire. En cas de céphalée, de fièvre ou de syndrome inflammatoire isolé, il est préconisé de reprendre la dose antérieure efficace qui précédait la RE. En cas de survenue d'événement ischémique ou de claudication de la mâchoire, une reprise de la corticothérapie à 60 mg/j est conseillée précédée d'un bolus IV de MP en cas de complication ischémique oculaire [121]. L'adjonction d'un traitement immunosuppresseur parmi ceux cités ci-dessous est indiquée lors de la troisième RE. La fréquence des rechutes survenant à l'arrêt de la corticothérapie est d'environ 20% [125-126] avec un délai de survenue variable entre 1 à 25 mois. L'attitude thérapeutique non codifiée est en général la reprise de la corticothérapie dont la posologie et la voie d'administration dépendent de la nature clinico-biologique de la rechute.

Différentes molécules et stratégies thérapeutiques ont fait l'objet d'études contrôlées et randomisées versus placebo ou non : il s'agit du méthotrexate, de l'azathioprine, l'hydroxychloroquine et des anti-TNF. D'autres molécules ont été testées

dans les formes réfractaires de l'ACG en études ouvertes comme le cyclophosphamide et la disulone et le tocilizumab.

Trois études ont testé l'intérêt du méthotrexate comme traitement d'épargne cortisonique dès l'initiation du traitement en association avec la CT [127-129]. Elles comportaient respectivement 42, 98 et 21 patients. Le schéma thérapeutique était différent dans ces trois essais. Les résultats de ces études sont bien résumés dans une méta-analyse faite à partir des données individuelles des patients [130]. L'adjonction du méthotrexate a permis de réduire les doses cumulées de prednisone de 842 mg sur 48 semaines avec une diminution de risque de première et deuxième rechute de respectivement 35 et 51%. Cependant cet effet était plus marqué pour les rechutes de PPR et n'était pas significatif pour les rechutes céphaliques.

L'intérêt de l'azathioprine a été étudié chez 31 patients atteints d'ACG et/ou de PPR chez qui cette molécule avait été prescrite chez des patients en rémission [131]. L'effet d'épargne cortisonique n'a été que très modeste et noté qu'à la 52<sup>ème</sup> semaine de traitement avec des effets secondaires non négligeables. Sur 16 patients sous azathioprine, sept ont arrêté le traitement pour toxicité qui était principalement digestive.

L'hydroxychloroquine a été évaluée pour ses propriétés d'épargne cortisonique dans une étude contre placebo à l'initiation de la corticothérapie comportant 74 patients. Cette molécule n'a pas montré d'efficacité sur l'épargne cortisonique et les patients ont présenté un risque de rechutes élevé au cours de l'essai et six mois après son arrêt. Par ailleurs la fréquence des effets indésirables notamment cutanée était importante [132].

Parmi les anti-TNF $\alpha$  actuellement commercialisés, deux d'entre eux ont fait l'objet d'essais randomisés versus placebo en double insu dans le but d'obtenir une épargne cortisonique. L'essai utilisant l'infliximab a été arrêté précocement du fait de son inefficacité après l'inclusion de la moitié des patients prévus dans l'étude [133]. L'adalimumab, dans un essai non publié n'a pas non plus montré d'efficacité en tant qu'agent d'épargne cortisonique [132].

Le cyclophosphamide a été utilisé chez des patients atteints d'ACG réfractaires dans deux études ouvertes [134-135]. L'analyse des 88 patients traités par cyclophosphamide montre une efficacité dans 84% des cas avec un taux de rechute dans 19% malgré l'association avec un autre immunosuppresseur et notamment le méthotrexate. Un tiers des patients ont présenté des effets indésirables qui ont motivé l'arrêt du traitement dans 12,5% des cas.

La dapsonne permet une efficacité en épargne cortisonique dans l'ACG [136] en diminuant la durée et la dose totale de la corticothérapie. Cependant ce médicament reste de maniement difficile, en raison du risque d'anémie hémolytique, de

méthémoglobinémie et d'agranulocytose, ce qui réserve son usage aux complications graves des corticoïdes ainsi qu'aux patients atteints d'ACG réfractaires.

Le tocilizumab qui est un anticorps monoclonal humanisé antagoniste du récepteur de l'IL-6, semble être intéressant dans le contrôle de l'ACG dans les formes réfractaires. Plusieurs études ouvertes ont testé cette molécule dans ce contexte et le plus souvent chez des patients en échappement thérapeutique [137-141]. Sur les 14 cas décrits dans la littérature, une rémission et une diminution de la posologie ont été obtenues chez tous les patients. Aucun effet indésirable notable n'a été rapporté. Il faut cependant souligner que les données autopsiques d'une patiente décédée d'un infarctus du myocarde, en rémission de sa maladie six mois après l'arrêt du tocilizumab, montraient encore une atteinte inflammatoire de l'aorte et des gros vaisseaux [140].

## **5. Traitements associés**

Outre les traitements adjuvants à la corticothérapie, seul l'acide acétylsalicylique semble validé comme traitement complémentaire dans la prévention des complications ischémiques de l'ACG [142-143]. Une complication ischémique céphalique ne surviendrait que dans 8 à 16% des patients ayant reçu de l'aspirine après initiation de la corticothérapie versus 29 à 48% des patients qui n'en ont pas reçu avec une réduction de risque de 80%. Ces résultats sont discordants avec ceux obtenus par trois autres études [144-146] qui rapportent plus d'événements ischémiques chez les patients sous aspirine. Cependant, en l'absence de contre-indication, la prescription de faible dose d'aspirine est recommandée [120-121] par la ligue européenne contre les maladies rhumastismales et la société britannique de rhumatologie.

## **G. Pronostic**

Le pronostic de l'ACG est difficile à déterminer et doit être considéré sous différents angles. Il faut considérer le pronostic vital, fonctionnel, à court et à long terme et l'impact de la corticothérapie et des traitements immunosuppresseurs prescrits dans cette maladie. En terme de mortalité globale le pronostic vital n'est pas différent de celui de la population générale avec une survie à 5 ans de 80% chez les patients atteints d'ACG [54, 147-148]. On note par contre une surmortalité cardio-vasculaire chez ces patients qui peut survenir de façon précoce dans les 4 premiers mois [147]. Les événements ischémiques responsables de cette surmortalité cardio-vasculaire sont surtout les AVC et



l'infarctus du myocarde qui peuvent survenir à la phase initiale de la maladie [149-150]. Plus rarement on peut trouver la dissection aortique fatale qui peut révéler la maladie [151]. Le rôle de la corticothérapie dans la mortalité précoce est difficile à déterminer dans la mesure qu'il est peu dissociable des risques cardio-vasculaires que peuvent présenter ou développer les patients atteints. La mortalité durant la première année pourrait être imputable à la corticothérapie dans un tiers des cas et est principalement due aux infections [152]. A plus long terme le pronostic vital pourrait être lié à l'existence ou non d'une atteinte aortique [153]. L'aortite, si elle n'est pas découverte au décours d'une dissection initiale, est le plus souvent asymptomatique et peut se compliquer de dissection ou d'anévrisme. Le risque de dissection est estimé pour l'aorte thoracique de 5,4 et pour l'aorte abdominale de 0,6 pour 1000 patients/année et semble plus important au moment des poussées inflammatoires de la maladie [154]. Il existe une surmortalité avec une médiane de survie de 1,1 ans en cas de dissection thoracique [155]. Cette complication peut également survenir tardivement jusqu'à 8 ans après le diagnostic d'ACG [151]. L'anévrisme aortique est une complication tardive de l'aortite dans l'ACG et survient en moyenne 6 ans après le diagnostic initial de l'ACG [151, 154, 156]. Le risque de développer un anévrisme aortique est variable en fonction de la localisation de l'aortite initiale. Il est de 17,3 par rapport à la population générale en cas d'atteinte thoracique et de 2,4 en cas d'atteinte abdominale [76]. L'anévrisme aortique peut évoluer soit vers une dissection soit vers une rupture et constitue une cause anormalement élevée de mortalité (8,2%) pour certains auteurs [148].

Le pronostic fonctionnel est principalement lié aux complications ischémiques céphaliques et notamment oculaires. Bien que la corticothérapie ait permis de réduire le risque d'amaurose définitive d'un intervalle compris entre 30 et 60% des cas à un intervalle de 5 à 20 % des cas [144-145, 157-158], les chances de récupération visuelle après une amaurose permanente sous corticothérapie à fortes doses restent faibles comprises entre 0 et 15% [159-161]. Par ailleurs le risque de survenue d'une nouvelle amaurose est possible lors de la prise en charge thérapeutique initiale. Il est cependant faible, évalué entre 0% à 4% et survient le plus souvent dans la première semaine qui suit l'initiation de la corticothérapie [126, 162]. Une amaurose peut survenir plus tardivement notamment lors de la décroissance de la corticothérapie. Ce risque varie de 1 à 10% et peut survenir dans un délai allant de quelques semaines à plusieurs années après le début de la corticothérapie [145, 163-164].

## H. Lien entre artérite à cellules géantes et neurotrophines

Le remodelage vasculaire qui existe dans cette maladie semble donc inclure dans un premier temps, une destruction des CMLV, puis une prolifération et une migration de ces CMLV vers l'intima favorisant une hyperplasie intimale et enfin des phénomènes de néoangiogénèse venant compenser l'ischémie induite par la sténose ou la thrombose secondaire à la formation de la néointima. Le principal facteur trophique impliquée dans la prolifération et la migration cellulaire des CMLV dans l'ACG est le PDGF [44]. D'autres facteurs pourraient être impliqués dans ce remodelage vasculaire. Parmi ces facteurs, le système des neurotrophines pourrait jouer un rôle notamment dans la prolifération et la migration des CMLV. L'idée qu'un facteur trophique puisse être produit et interagir avec d'autres types cellulaires que ceux pour lesquels il ait été identifié initialement existe depuis longtemps. Le VEGF, initialement décrit comme un facteur de croissance produit et agissant sur l'endothélium vasculaire, peut être produit par les neurones et agir de façon autocrine et paracrine sur la survie neuronale [165]. Cette approche peut être applicable pour le lien qui existe entre le système des neurotrophines et le système cardio-vasculaire. Les neurotrophines et leurs récepteurs sont détectés *in vivo* par immunohistochimie au niveau des cellules endothéliales (CE) et des CMLV aortiques humaines de donneurs et de rat [7]. Après extraction protéique et d'ARN à partir de la culture des CMLV issus d'aortes humaines et de rat, il est identifié une expression protéique et des transcrits des quatre neurotrophines et des trois récepteurs Trk [7]. Par ailleurs, le NGF favorise la migration des CMLV, comparable à celle induite par le PDGF, mais pas leur prolifération [7, 166]. Enfin certaines NTs notamment NGF et BDNF et les trois récepteurs Trk sont impliqués dans l'hyperplasie intimale secondaire aux lésions aortiques induites par angioplastie au ballonnet chez le rat [7]. Il en est de même pour le récepteur P75<sup>NTR</sup> qui semble surexprimé parallèlement à une diminution de l'expression du NGF dans des lésions athéromateuses coronariennes [167]. La stimulation du récepteur P75<sup>NTR</sup> par le NGF, la NT-3 et à plus faible niveau par le BDNF induirait plutôt une apoptose des CMLV [168]. Ainsi le système des NTs joue un rôle important dans la régulation fonctionnelle des CMLV humaines mais aussi dans les situations pathologiques comme dans les lésions athéromateuses. L'implication de ce système dans la constitution d'une hyperplasie intimale induite expérimentalement ou observée dans l'athérosclérose justifie notre étude concernant le rôle de ce système dans la physiopathologie du remodelage vasculaire dans l'ACG.

## II. Les Neurotrophines et leurs récepteurs

Les neurotrophines (NTs) sont une famille de neuropeptides impliqués dans l'homéostasie cellulaire neuronale en agissant, entre autre, sur la survie, la prolifération, la différenciation, la croissance axonale et l'apoptose. La première description d'un de ces facteurs neurotrophines est due à Rita Levi-Montalcini en 1951. Elle découvre un peptide, dans les glandes salivaires de serpent, qui stimule la croissance neuritique de ganglions rachidiens sympathiques de poulet [169]. Trente ans plus tard dans les années 1980, Hofer et Barde identifient et purifient une protéine qu'ils nommèrent le brain-derived neurotrophic factor (BDNF) [170-171]. Comme le NGF, le BDNF favorise la survie des neurones sensoriels. Sur la base des homologues entre les structures primaires du NGF et du BDNF, Jones et Reichardt ont isolé un troisième membre de la famille des facteurs neurotrophiques, la neurotrophine-3 (NT-3) qui est également impliquée dans la survie neuronale et le développement embryonnaire du tube neural [172]. En plus du NGF, du BDNF et de la NT-3, trois autres NTs ont déjà été identifiées: la neurotrophine-4/5 (NT-4/5), également connue sous le terme de NT-4 [173] et les neurotrophines-6 [174] et -7 [175] (NT-6 et NT-7) seulement présentes chez les poissons.

Les NTs interagissent avec deux types de récepteurs :

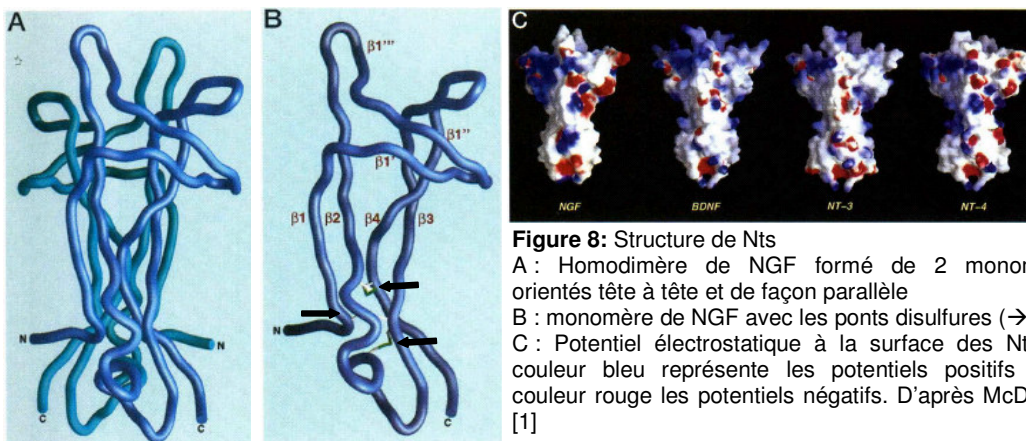
- Le récepteur p75 (p75<sup>NTR</sup>) [176] qui peut interagir avec toutes les neurotrophines mais sur lequel elles se fixent avec une faible affinité
- Les récepteurs à « tropomyosin-related kinase » (Trk), dits de haute affinité, qui sont au nombre de trois et qui sont plus ou moins spécifiques d'un ligand : le récepteur TrkA pour le NGF [177], le récepteur TrkB pour le BDNF [178] et la NT-4 et le récepteur TrkC [179] pour la NT-3.

Pour ce travail, nous étudierons plus spécifiquement les NTs NGF, BDNF et NT-3 ainsi que leurs récepteurs respectifs TrkA, TrkB, TrkC et le récepteur p75<sup>NTR</sup>

# I. Les neurotrophines

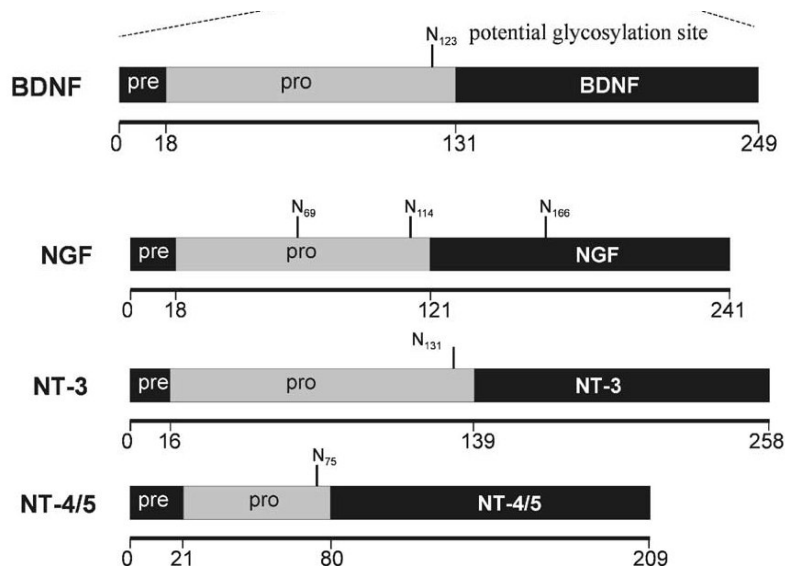
## 1. Structure des neurotrophines

À l'exception de NT-4/5, la structure des NTs reste hautement conservée dans l'échelle de l'évolution allant des poissons aux mammifères [180]. Les différents membres de la famille des NTs partagent ainsi une masse moléculaire (13,2 à 15,9 kDa) et des points isoélectriques similaires (gamme de 9-10) avec une structure moléculaire similaire composée d'un noeud de cystéine formé par trois ponts disulfure entrelacés avec une homologie de structure de 50% [181]. Dans leur forme biologiquement active, les NTs sont sous forme d'homodimères, formés par deux monomères disposés de manière parallèle. Par exemple le monomère de NGF a une structure allongée, avec la partie centrale de la molécule formée par deux paires de brins de  $\beta$  antiparallèles, des boucles en épingle à cheveux à une extrémité et un noeud de cystéine à l'autre extrémité (figure 8) [182-183]. Les NTs matures ont aussi la capacité de former des hétérodimères mixtes avec d'autres NTs [184]. Quatre régions de boucle en épingle à cheveux  $\beta$  sur la surface du dimère contiennent une grande proportion de résidus qui permettent une forte variabilité entre les différents membres de la famille des NTs. Cette variabilité permet d'obtenir une spécificité de chaque ligand pour son récepteur apparenté [185]. Par exemple, les acides aminés His4, Pro5, Phe7, His8, Val48, Pro49 et Gln96 et ceux présents au niveau des extrémités N et C-terminales favorisent une fixation spécifique du ligand NGF pour son récepteur TrkA [186-188]. En revanche, le NGF peut se lier au récepteur p75<sup>NTR</sup> par les résidus chargés positivement Lys32, Lys34 et Lys95 [189] et également par les résidus asp72, Lys74 et His75 [190]. Le motif de noeud de cystéine, formé par les trois ponts disulfures intra-chaîne, permet de stabiliser la molécule de NGF dans sa conformation active.



## 2. Synthèse des neurotrophines

Les NTs sont synthétisées selon un même processus de maturation. Les ARNm des NTs sont traduits en protéines immatures ou pré-pro-neurotrophines de 31 à 35 kDa. Ces pré-pro-NTs possèdent un peptide signal, un propeptide et la protéine mature (Figure 9). Il y a trois destins possibles pour ces pré-pro-NTs, (i) soit un clivage intracellulaire suivi de la sécrétion, (ii) soit la sécrétion suivie par un clivage extracellulaire ou soit (iii) la sécrétion de pro-NTs sans clivage ultérieur [191]. Le clivage intracellulaire peut être réalisé par différentes enzymes comme les furines et les proconvertases [181, 192-193]. Dans le milieu extracellulaire, on trouve la plasmine et certaines MMP notamment la MMP-3 et la MMP-7 [194]. Après excrétion les NTs et/ou les pro-NTs pourront se fixer sur leurs récepteurs de faible ou de forte affinité après homodimérisation [195].

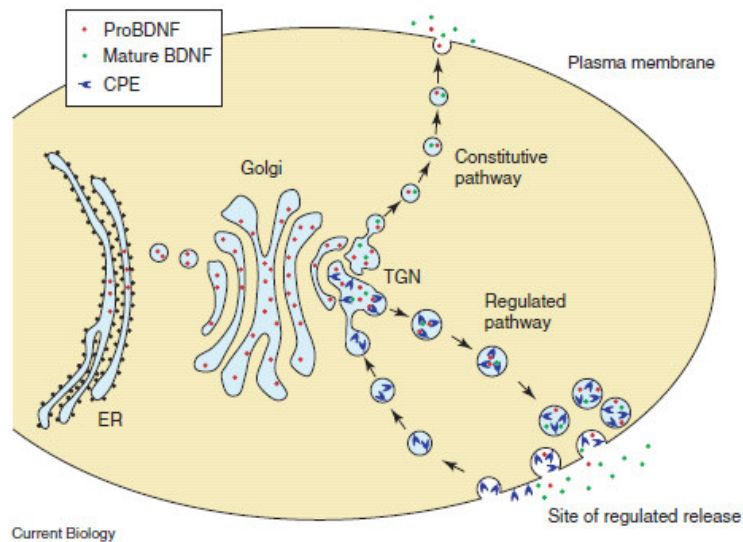


**Figure 9** : Structures primaires des 4 NTs :

Les pré-séquences composées de 16 à 21 aa sont clivées immédiatement après leur séquestration de réticulum endoplasmique. Deux situations sont alors possibles : soit la protéine mature de NT peut être excisée du précurseur par la furine ou des proconvertases intracellulaires soit la pro-NT est transportée et excrétée dans le milieu extra-cellulaire dans lequel elle peut avoir directement une action biologique ou être clivée en forme mature par la plasmine ou des métalloprotéases. D'après Lessmann et al. Prog Neurobiol, 2003 [195].

Les NTs et les pro-NTs peuvent être sécrétées dans le milieu extracellulaire par deux voies distinctes la voie constitutive et la voie contrôlée. La voie constitutive est la voie

conventionnelle d'exportation et ne nécessite pas de mécanisme de régulation. La voie contrôlée fait intervenir des protéines spécifiques, telle que la carboxypeptidase E, qui vont les guider vers les vésicules de sécrétion. Les voies de sécrétion varient en fonction des neurotrophines et de leur état de maturation. Dans les neurones les pro-neurotrophines sont secrétées principalement la voie contrôlée [181, 193]. Le NGF semble plutôt emprunter le plus souvent la voie constitutive tandis que le BDNF est exporté par la voie contrôlée [196-197] (figure 10). La NT-3 est exportée de manière équivalente par les deux voies en fonction de son niveau d'expression ou de la disponibilité des enzymes spécifiques intracellulaires [198].

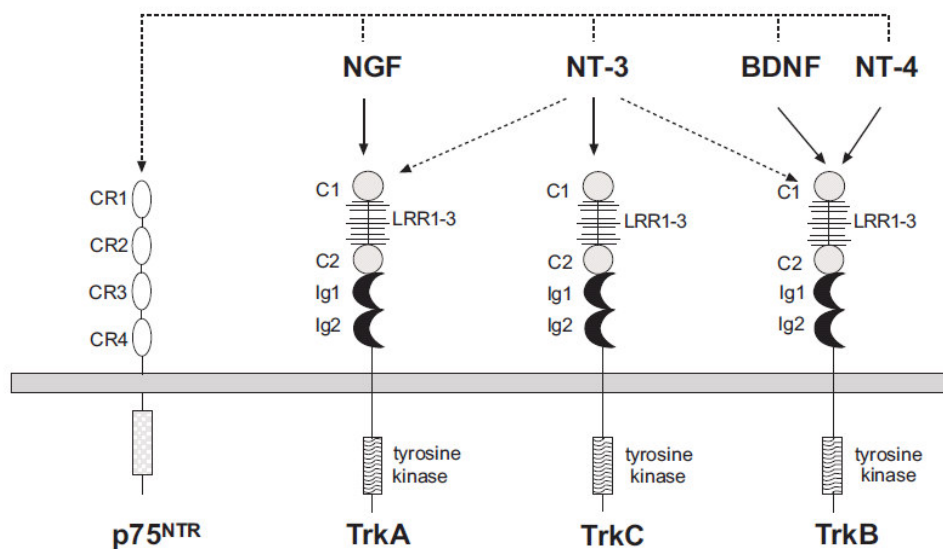


**Figure 10** : De la synthèse à la sécrétion : exemple du BDNF

L'ARNm du BDNF est traduit dans les ribosomes et le pré-pro-BDNF est séquestré dans le RE. Il est ensuite transporté sous forme de vésicules vers l'appareil de golgi puis au réseau trans-golgien. Les enzymes présents dans ce réseau pourront cliver la protéine immature et les formes matures seront secrétées selon la voie constitutive. Parallèlement les vésicules de pro-BDNF peuvent être relarguées via la voie contrôlée. Ces pro-NT peuvent être secondairement clivées dans le milieu extracellulaire. CPE : Carboxypeptidase E ; ER : réticulum endoplasmique TGN : réseau trans-golgien. (d'après Thomas et al. Curr Biol 2005)

### 3. Les récepteurs aux NTs

La recherche d'un récepteur pour les NTS a mené à la découverte de deux types de récepteurs bien distincts: le récepteur neurotrophine p75 ( $p75^{NTR}$ ) et les récepteurs à tropomyosine-kinase (Trk) [177, 199-201] (figure 11). Il est maintenant bien établi que la signalisation de survie est principalement associée à l'activation des récepteurs Trk. En revanche, le récepteur  $p75^{NTR}$ , à quelques exceptions près, a un rôle essentiel dans l'apoptose des cellules neuronales et non neuronales [191, 202].



**Figure 11** : Les NTs et leurs récepteurs

Le NGF se lie spécifiquement au récepteur TrkA, le BDNF et NT-4 au récepteur TrkB et NT-3 au récepteur TrkC. NT-3 peut aussi de lier à TrkA et à TrkB mais avec moins d'affinité. Toutes les NTs peuvent se lier au récepteur  $p75^{NTR}$ . CR1-CR4 : motifs riches en cystéine ; Ig1-Ig2 : domaines immunoglobuline-like ; LRR1-3 : motifs riche en leucine (d'après Skaper et al. CNS and neurologic disorders-Drug targets 2008 [203])

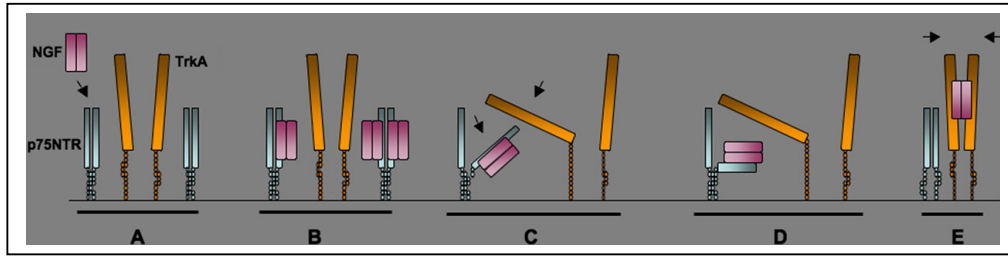
#### a. Le récepteur $p75^{NTR}$

Le récepteur  $p75^{NTR}$ , qui a été le premier récepteur identifié pour le NGF, appartient à la superfamille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale (TNF) [199]. Comme les autres membres de la superfamille des récepteurs du TNF, le  $p75^{NTR}$  contient quatre motifs riches en cystéine, un domaine transmembranaire et un domaine de mort intracellulaire. L'effet pro-apoptotique de  $p75^{NTR}$  n'est possible que lorsqu'il est dans sa forme monomérique car la dimérisation ou l'homomultimérisation supprime complètement

cet effet [204-205]. En outre, la conformation du domaine de mort de p75<sup>NTR</sup>, constitué par deux ensembles perpendiculaires de trois hélices contenus dans une structure globulaire, diffère de celle des autres membres de la famille du récepteur du TNF [206]. Il n'y a pas d'activité catalytique pour le domaine intracellulaire de p75<sup>NTR</sup> [202], et la majorité de la signalisation de p75<sup>NTR</sup> s'effectue par des interactions avec des protéines cytoplasmiques (voir ci-dessous). Par ailleurs, contrairement à d'autres récepteurs de mort, comme le récepteur Fas ou le récepteur p55 du TNF, p75<sup>NTR</sup> ne nécessite pas les molécules adaptatrices pro-apoptotiques comme FADD (Fas-associated death domain) ou TRADD (TNFR-associated death domain) pour induire l'apoptose dans les cellules neuronales [205]. En revanche, l'interaction entre p75<sup>NTR</sup> et TRADD est requise pour l'activation de NFκB, qui commande l'effet antiapoptotique du NGF dans des cellules du cancer du sein [207]. Contrairement à la spécificité des récepteurs trk, toutes les NTs peuvent se lier à p75<sup>NTR</sup> avec une affinité équivalente mais une cinétique distincte [208-209]. La fixation de NGF au domaine extracellulaire de p75<sup>NTR</sup> se fait sous la forme d'un complexe trimérique avec une stœchiométrie de 2 NGF : 1 p75<sup>NTR</sup>. L'interaction entre p75<sup>NTR</sup> et NGF entraîne des changements conformationnels de NGF, qui empêchent la formation de dimères de p75<sup>NTR</sup> [210].

Le récepteur p75<sup>NTR</sup> peut interagir avec le récepteur TrkA de différentes manières (Figure 12). Il a été rapporté que p75<sup>NTR</sup> et TrkA pourraient se lier au NGF avec une stœchiométrie de 01:02:01 (1 trkA: 2 NGF: 1 p75<sup>NTR</sup>). Ce complexe ternaire, dans lequel les récepteurs sont disposés dans des orientations opposées, nécessite que les domaines extracellulaires des deux récepteurs soient disposés de telle façon qu'elles chevauchent le NGF [211]. Dans les cellules neuronales, p75<sup>NTR</sup> et les récepteurs trk sont souvent co-exprimés pour former un complexe qui peut être immunoprécipité [212]. L'association de p75<sup>NTR</sup> et du récepteur TrkA conduit à la formation d'un site de liaison de haute affinité pour le NGF [213]. Cette haute affinité disparaît lors de mutations dans les domaines cytoplasmiques ou transmembranaires de l'un des deux récepteurs [214]. L'affinité entre les NTs et les récepteurs Trk est donc modulée par p75<sup>NTR</sup>, ce qui en fait augmente la spécificité des récepteurs trk par leur ligand respectif [212, 215-216]. Enfin l'action de p75<sup>NTR</sup> est modulée par son association à un co-récepteur, la sortiline. Ce complexe p75<sup>NTR</sup>/sortiline fixe avec une grande affinité les pro-NTs et induit le plus souvent un signal pro-apoptotique (voir ci-dessous). Ainsi p75<sup>NTR</sup> apparaît comme un récepteur dont la signalisation est dépendante du ligand et du co-récepteur auxquels il peut être associé. Il permet d'induire tantôt une signalisation pro-apoptotique, tantôt une signalisation de survie [207, 217].





**Figure 12 :** Interactions de p75<sup>NTR</sup> avec TrkA et NGF

(A) En l'absence de neurotrophine, p75<sup>NTR</sup> existe sous forme de dimères préformés, mais les chaînes TrkA ne forment pas d'homo ou d'hétérodimères.

(B) Le NGF se lie à p75<sup>NTR</sup> avec une cinétique rapide, les deux configurations présentées sont possibles. La liaison de NGF à p75<sup>NTR</sup> ne perturbe pas le dimère de p75<sup>NTR</sup>

(C) Le NGF lié à p75<sup>NTR</sup> dispose d'une interface de liaison pour interagir avec TrkA.

(D) Le NGF est présenté au TrkA dans une conformation qui favorise la liaison rapide avec la tyrosine kinase du récepteur.

(E) Le NGF se lie à une seconde chaîne de TrkA pour permettre au récepteur de former un homodimère actif (d'après Baeker et al. Neuron 2007 [218])

## b. Les récepteurs à activité tropomyosine kinase

Les récepteurs trk A, B, et C sont des récepteurs avec une activité tyrosine. Le premier récepteur cloné a été TrkA [177, 200], suivi ensuite par le récepteur trkB et trkC [177, 219]. Initialement, les différentes NTs étaient supposées se lier préférentiellement à leurs récepteurs trk spécifiques : NGF à TrkA, BDNF et NT-4/5 à trkB et NT-3 à trkC. Cependant, NT-3 peut également se lier à trkA et trkB [220-221] (Figure 10). La spécificité de liaison au ligand peut être influencée par des variantes d'insertion dans le domaine extracellulaire de TrkA et TrkB. Des variants d'épissage ont été décrits pour les trois récepteurs Trk. Il peut s'agir de délétions dans le domaine extracellulaire ou d'un aspect tronqué du domaine intracellulaire à tyrosine kinase [222]. Fait intéressant, les variants de l'épissage responsable de récepteurs Trk tronqués agissent sur la signalisation Trk avec un effet négatif [223-224]. Pour les récepteurs Trk, les domaines à tyrosine kinase sont hautement conservés avec une identité de l'ordre de 80% pour les acides aminés alors que les domaines extra-cellulaires sont plus différents avec une homologie de l'ordre de 30% pour les acides aminés. Le domaine extracellulaire du récepteur trk est composé de trois motifs riches en leucine flanqués de deux pôles de cystéine, de deux domaines d'immunoglobuline de type C2 (Ig-C2), d'un domaine transmembranaire et d'une région cytoplasmique à activité tyrosine kinase. La liaison des NTs aux récepteurs Trk s'effectue principalement grâce aux domaines Ig-C2, aidé par le domaine transmembranaire [225-226]. Comme pour les autres récepteurs à tyrosine kinase, la phosphorylation de la tyrosine intracytoplasmique des récepteurs Trk

permet de réguler leur activité et le recrutement de molécules adaptatrices qui interviennent dans l'initiation de la signalisation [227].

### C. La sortiline

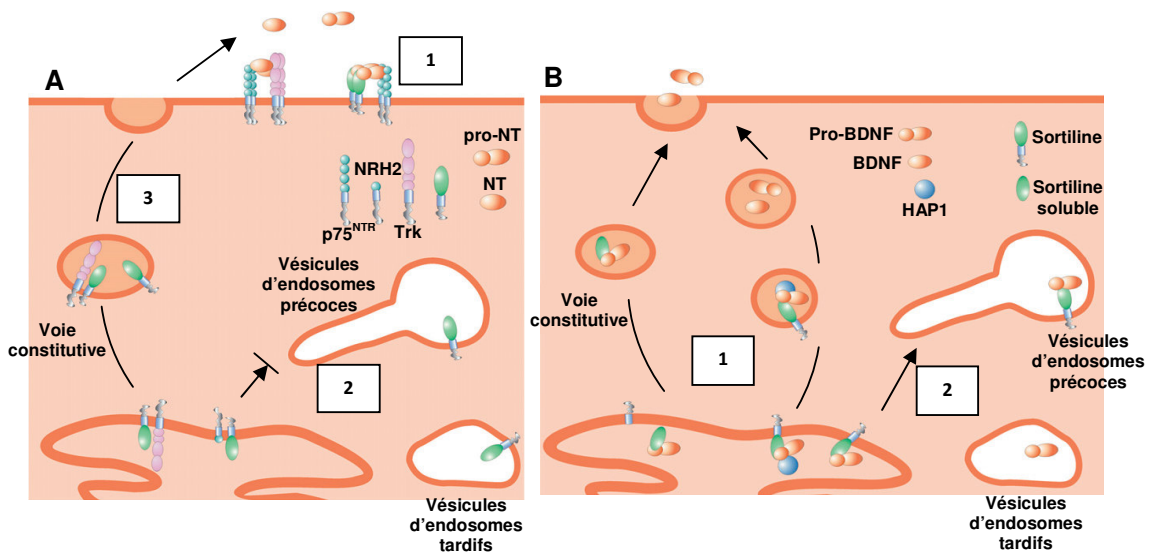
Elle appartient à la famille des récepteurs de type I. Elle possède un domaine extracellulaire large et un domaine transmembranaire non couplé à une protéine G. Le domaine extracellulaire possède une grande homologie avec le domaine Vps10p de la carboxypeptidase Y de la levure. Elle ne possède pas de domaine intracytoplasmique, ce qui empêche la transmission d'un signal qui n'apparaît que lorsqu'elle est associée à un autre récepteur transmembranaire [228]. La majeure partie (90%) du stock intracellulaire de sortiline est située dans l'appareil de Golgi, sa fonction de récepteur membranaire ne mobilisant qu'environ 10% de ce stock. La sortiline a donc deux fonctions principales : une fonction de co-récepteur membranaire et une fonction de protéine de transport et d'adressage de nombreuses protéines vers différents compartiments intracellulaires.

Sa fonction de co-récepteur lui permet d'accroître l'affinité de liaison de certaines protéines notamment les pro-NTs qui se fixent à un complexe qu'elle forme le plus souvent avec p75<sup>NTR</sup> (figure 13A1). Sa mobilisation vers la surface cellulaire est d'autant plus facilitée par la présence de la *neurotrophin receptor homolog-2* (NRH2) qui empêche la dégradation lysosomale de la sortiline (figure 13A2). Il a été démontré que, en présence de la sortiline un mutant de pro-NGF, dont la mutation induit une résistance au clivage par la furine, se lie à p75<sup>NTR</sup> avec cinq fois plus d'affinité que le NGF mature, tandis que le même mutant n'a pas d'affinité pour le récepteur TrkA [194, 229]. Par ailleurs, en présence de sortiline, le pro-BDNF se lie avec une plus grande affinité à p75<sup>NTR</sup> mais pas à TrkB [230]. Par l'intermédiaire de p75<sup>NTR</sup> ces deux pro-NTs, le pro-NGF et le pro-BDNF, vont induire l'apoptose [194, 230]. Ce phénomène a également été rapporté récemment pour la pro-NT-3 [231]. Ainsi si les pro-NTs ont une forte affinité de liaison au complexe p75<sup>NTR</sup>/sortiline, ce complexe participe activement à la liaison au pro-domaine du pro-NGF ou du pro-BDNF. La présence ou l'absence de sortiline semble déterminer si p75<sup>NTR</sup> agit comme un récepteur de mort ou non [230]. Des données récentes montrent que le déficit en sortiline n'affecte pas les mécanismes pro-apoptotiques dans les neurones sympathiques mais ralentit leur dégénérescence liée à l'âge, suggérant ainsi que la sortiline possède également un rôle à part entière dans la signalisation pro-apoptotique [232].

La deuxième fonction principale de la sortiline est celle de protéine de transport et d'adressage de pro-NTs et mais aussi des récepteurs aux NTs vers la membrane cellulaire ou vers d'autres compartiments intracellulaires. Dans l'exemple du BDNF, la

sortiline peut contrôler la sécrétion du pro-BDNF mais aussi de la forme mature du BDNF. La sortiline se lie avec le pro-BDNF dans le réseau trans-golgien. Elle peut ensuite acheminer le pro-BDNF vers la membrane cellulaire de deux façons : soit en perdant son ecto-domaine et en devenant un sortiline soluble, elle entre ainsi dans la voie constitutive de la sécrétion de la pro-NT, soit par l'intermédiaire de vésicules de sécrétion en nécessitant dans ce cas l'aide d'une protéine appelée *Huntington-associated protein 1* (HAP1) [233-234]. Dans ces vésicules le pro-BDNF peut être converti en BDNF mature (Figure 13B1). Le complexe sortiline/pro-BDNF peut également, en l'absence d'HAP1, se diriger vers des endosomes pour subir une dégradation lysosomale (figure 13B2) [234-235]. La sortiline permet également le transport des récepteurs aux NTs notamment des Trk vers la surface cellulaire en empruntant la voie constitutive (figure 13A3) [235]

En résumé, les NTs matures se lient plutôt aux récepteurs Trk seuls ou complexés avec p75<sup>NTR</sup> pour initier la signalisation de survie. Les pro-NTs se lient exclusivement à p75<sup>NTR</sup>, en association ou non avec la sortiline, et activent plutôt une signalisation pro-apoptotique. Ainsi le ratio récepteurs Trk/récepteur p75<sup>NTR</sup>, le processus protéolytique de pro-NTs et leur capacité à se lier à un co-récepteur sont des événements essentiels régissant la vie et la mort des cellules neuronales et non-neuronales.



**Figure 13 :** Différentes fonctions de la sortiline

**A :** 1 : La sortiline se mobilise vers la membrane et s'associe à  $p75^{NTR}$  pour se lier à des pro-NTs ; 2 : Cette action est facilitée par la présence de NRH2 qui empêche sa dégradation lysosomale dans les vésicules d'endosomes ; 3 : la sortiline assure le transport des récepteurs Trk via la voie constitutive vers le milieu où ils pourront s'associer à  $p75^{NTR}$  pour fixer des NTs matures

**B :** 1 : La sortiline assure le transport des pro-BDNFs vers le milieu extracellulaire soit par la voie constitutive sous forme de sortiline soluble, soit grâce à des vésicules de sécrétion en association avec HAP1. Dans ces vésicules le pro-BDNF peut être clivé en BDNF ; 2 : Sans HAP1 le complexe sortiline/pro-BDNF peut subir une dégradation lysosomale dans des vésicules d'endosomes précoces et tardifs. D'après Nykjaer et al. Trends in Neurosci. 2012 [228].

## 4. La signalisation des récepteurs aux neurotrophines

### a. La signalisation du récepteur $p75^{NTR}$

La signalisation principalement identifiée pour  $p75^{NTR}$  est l'engagement vers une voie pro-apoptotique. La première preuve de cette signalisation repose sur des expérimentations de surexpression de ce récepteur qui est responsable d'apoptose de cellules neuronales [236] en présence mais aussi en l'absence de ligand. L'orientation vers un processus d'apoptose via  $p75^{NTR}$  dépendante ou non du ligand se fait en fonction du micro-environnement cellulaire et de la présence ou non de récepteurs Trk et/ou de protéines adaptatrices [217]. Les mécanismes de signalisation via  $p75^{NTR}$  restent imprécis. Le manque d'activité catalytique dans le domaine intra-cytoplasmique de  $p75^{NTR}$  suggère que les protéines qui interagissent avec  $p75^{NTR}$  sont impliquées dans la signalisation de ce récepteur. Deux régions sont cruciales sur le récepteur  $p75^{NTR}$  pour

l'interaction protéine-protéine : le domaine de mort [237] et le domaine juxta-membranaire intra-cytoplasmique nommé "chopper" [238]. Plusieurs molécules avec ou sans activité catalytique interagissent avec p75<sup>NTR</sup> [239-240]. Les molécules sans activité catalytique comprennent la cavéoline-1, NADE (*p75<sup>NTR</sup>- associated cell death executor*) et les *TNF receptor-associated factor* (TRAF) 4 et 6. Certains facteurs de transcription comme *NT receptor interacting factor 1/2* (NRIF 1/2), le *schwann cell factor 1* (SC-1) et NRAGE (*neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog*) peuvent également se lier au domaine intracellulaire de p75<sup>NTR</sup>. Les molécules ayant une activité catalytique comprennent les kinases sérine-thréonine impliquées dans la signalisation d'interleukine ou de NFκB, tels que *l'interleukine-1-receptor-associated kinase* (IRAK) et le *receptor-interacting protein-2* (RIP2), la *protein tyrosine phosphatase Fas-associated phosphatase-1* (FAP-1) et la small GTPase RhoA. Enfin, la protéine *brain-expressed X-linked 1* (Bex-1) semble interagir avec p75<sup>NTR</sup> en compétition avec RIP2 [240]. Une des caractéristiques dans l'apoptose induite par p75<sup>NTR</sup> est l'activation de la cascade de signalisation de *c-Jun N-terminal protein kinase* (JNK) [241]. En aval de JNK, on note l'activation de p53, la phosphorylation directe de Bad, la libération du cytochrome c mitochondrial et l'activation des caspases -9, -6 et -3 [242-243]. La délétion du gène de TRAF6 empêche la signalisation JNK, inhibant ainsi l'apoptose dans les neurones sympathiques induite par p75<sup>NTR</sup> [244]. NRIF semble interagir avec TRAF6 pour induire l'activation de la signalisation JNK [245-246]. Par ailleurs TRAF-6 semble également être impliqué dans l'activation de NFκB induite par p75<sup>NTR</sup> [247]. NRAGE interagit avec p75<sup>NTR</sup> pour induire la mort cellulaire grâce à un mécanisme qui implique l'arrêt du cycle cellulaire, l'activation de JNK et l'activation des caspases [248]. Il semble que la liaison du NGF induit internalisation de p75<sup>NTR</sup> et son association ultérieure avec NRAGE pour un recyclage dans les vésicules d'endosomes [249]. L'interaction de p75<sup>NTR</sup> avec NADE semble également induire l'apoptose [250] avec probablement une modulation par l'interaction entre NADE et la protéine 14-3-3 [251].

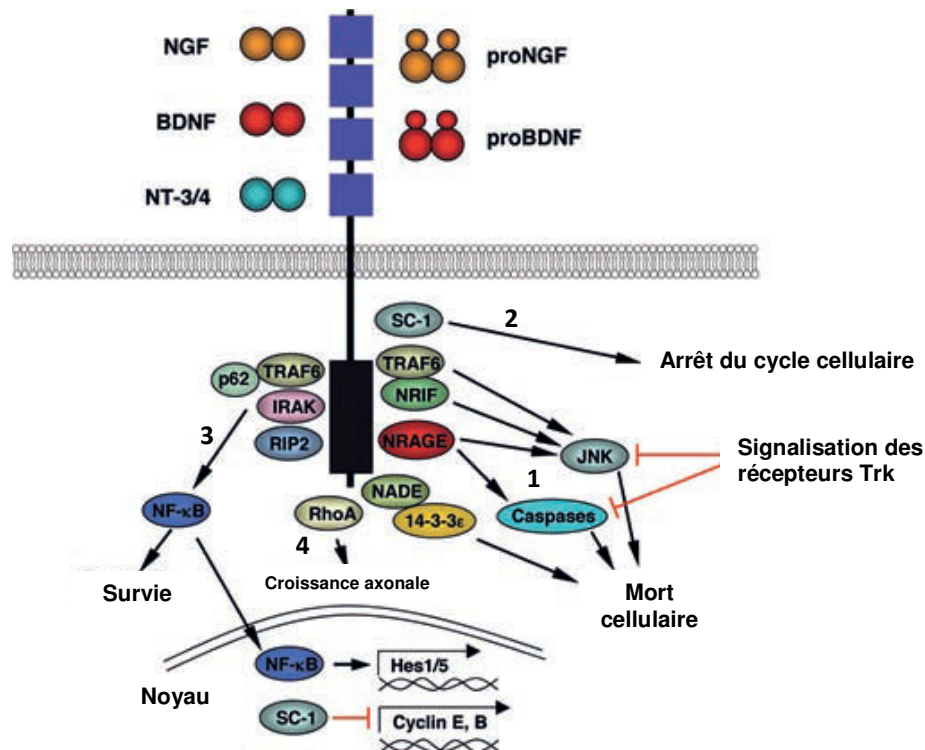
SC-1 et Bex-1 ont été impliqués dans la régulation de p75<sup>NTR</sup> sur le cycle cellulaire. Après fixation du NGF à p75<sup>NTR</sup>, SC-1 effectue une translocation vers le noyau et induit l'arrêt du cycle cellulaire [252]. Une étude a montré que SC-1 forme un complexe avec des histone-désacétylases afin de réguler le niveau de cyclines E et B en réponse à l'activation par le NGF [253]. La fonction exacte de Bex-1 n'est pas claire. Il semblerait que la variation du niveau de Bex-1 au cours du cycle cellulaire puisse contribuer à l'arrêt de ce cycle après activation du récepteur p75<sup>NTR</sup>. Ce phénomène serait indépendant de la liaison du NGF à p75<sup>NTR</sup> [240].

La signalisation de p75<sup>NTR</sup> vers la survie cellulaire a été rapportée par plusieurs auteurs et serait due à l'activation de NFκB [254-255] [241, 256]. Cette voie de

signalisation est activée par le NGF, mais pas par le BDNF ni la NT-3 [254], et nécessite plusieurs protéines parmi lesquelles on trouve TRAF-6, p62, IRAK, et RIP2. Enfin p75<sup>NTR</sup> favorise l'hydrolyse de la sphingomyéline et la production de céramide [257]. Le céramide peut promouvoir à la fois les voies de signalisation pro-apoptotiques et de survie cellulaire initiées par l'activation de p75<sup>NTR</sup> [258].

Enfin, p75<sup>NTR</sup> module également une GTPase RhoA, membre de la famille des protéines Rho qui contrôlent l'organisation du cytosquelette d'actine. Dans les neurones, en l'absence de NTs, p75<sup>NTR</sup> interagit avec RhoA et l'active pour inhiber la croissance axonale. En revanche, la liaison de NTs provoque la dissociation de RhoA et p75<sup>NTR</sup>, bloquant ainsi l'activité de RhoA et favorisant la croissance axonale [259]. En l'absence de NTs, l'association de RhoA et p75<sup>NTR</sup> est maintenue par RhoGDI (Rho GDP-dissociation inhibitor), permettant ainsi à RhoA d'être activée. La protéine RhoA activée interagit ensuite avec des protéines inhibitrices telle que la Rho kinase (ROCK) qui inhibe la croissance et la régénération axonales [260].

En résumé la liaison des NTs ou des pro-NTs au récepteur p75<sup>NTR</sup> peut induire quatre voies de signalisation pour les cellules neuronales (figure 14) : la voie JNK, la signalisation se faisant vers l'apoptose du neurone ; l'activation de SC-1 entraînant l'arrêt du cycle cellulaire ; l'activation de NFκB, p75<sup>NTR</sup> favorisant plutôt la survie cellulaire ; la modulation de la protéine RhoA, p75<sup>NTR</sup> induisant l'inhibition de la croissance axonale.



**Figure 14 :** Voies de signalisation du récepteur p75<sup>NTR</sup>

La liaison des NTs matures ou des pro-NTs induit l'activation de différentes voies de signalisation : Elles peuvent conduire vers l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire, la survie cellulaire ou la croissance axonale.

**1 :** Les protéines adaptatrices NRAGE et NRIF induisent l'activation de la signalisation JNK, puis la phosphorylation des facteurs pro-apoptotiques Bim, Bid, Bax et p53 stimulant la libération de cytochrome c à partir des mitochondries, et ainsi l'activation des caspases -9,-6 et -3 qui conduit à l'apoptose ; **2 :** L'activation de SC-1 mène vers l'arrêt du cycle cellulaire ; **3 :** Le NGF induit la l'activation de NFκB par l'intermédiaire de protéines adaptatrices comme TRAF-6, p62, IRAK, et RIP2 ; **4 :** en l'absence de NTs, p75<sup>NTR</sup> active RhoA pour inhiber la croissance axonale. En revanche, la liaison de NTs provoque la dissociation de RhoA et p75<sup>NTR</sup>, bloquant ainsi l'activité de RhoA et favorisant la croissance axonale. Adapté d'après Arevalo et al. Cell Mol Life Sci.2006 [261]. Cyto-c : cytochrome c ; IRAK : interleukine-1-receptor-associated kinase; MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase; JNK: c-Jun N-Terminal Kinase ; NRIF: Neurotrophin-Receptor Interacting Factor ; NADE: Neurotrophin-Associated Cell Death Executor ; NRAGE : Neurotrophin-Receptor-Interacting MAGe Homolog; NFκB : Nuclear Factor-kappa B; RIP2 : receptor-interacting protein-2 ; SC-1: Schwann cell factor-1; TRAF6: TNF Receptor-Associated Factor 6.

## **b. La signalisation des récepteurs Trk**

Les récepteurs Trks agissent comme des récepteurs à tyrosine kinase classiques. Après interaction avec les NTs matures, ils sont activés par dimérisation et par phosphorylation en position trans [262]. Les récepteurs Trk ne sont pas activés par les pro-NTS [194]. Ainsi, les protéases qui contrôlent la maturation des pro-NTs régulent également l'activation des récepteurs Trk. Les domaines cytoplasmiques des récepteurs Trk contiennent cinq tyrosines (Y490, Y785, Y670, Y674, Y675 et) qui sont essentielles pour la signalisation des récepteurs. Lorsqu'elles sont phosphorylées, ces tyrosines constituent des sites de liaison pour les protéines adaptatrices qui sont des intermédiaires dans la cascade de signalisation intracellulaire [262]. Les tyrosines Y490 et Y785 recrutent respectivement la protéine Shc et la phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ). Les tyrosines Y670, Y674, Y675 peuvent s'associer à des protéines adaptatrices, comme la protéine SH2B, le *fibroblast growth factor receptor substrate 2* (Frs2) et le *growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2) [263-265]. Différentes voies sont activées par les récepteurs Trk. Il s'agit principalement de voies activatrices de la survie et prolifération cellulaires : la voie des Ras-MAP kinases (*mitogen-activated protein Kinases*) incluant les ERK (*extracellular signal-regulated*) kinases, la voie des (PI3K)-Akt, et la voie de la Phospholipase C(PLC)- $\gamma$  [262, 266]

### **i. La voie Ras/MAPK/ERK**

La phosphorylation de la tyrosine Y490 du récepteur TrkA par le NGF offre un site de liaison pour la protéine adaptatrice Shc (*Src homology*). Cette protéine Shc recrute le complexe Grb2/SOS qui active la protéine Ras (*rat sarcoma*) [267]. L'activation de Ras favorise plusieurs voies de signalisation telles que les voies PI3K, Raf, p38 MAPK [268]. La phosphorylation de la protéine Raf (*rapidly accelerated fibrosarcome*) déclenche l'activation séquentielle de MEK1 (*MAP (Mitogen-Activated Protein) Kinase/ERK Kinase*)1 et /ou de MEK2, puis la phosphorylation de Erk1 et de Erk2 par MEK1 ou MEK2 [269]. En revanche l'activation de MEK peut arrêter la signalisation de Ras par la phosphorylation de SOS qui dissocie le complexe Grb2-SOS [270]. L'activation de TrkA par le NGF favorise également le recrutement de Frs2 au niveau de la tyrosine Y490 phosphorylée. et offre ainsi des sites de liaison à d'autres protéines adaptatrices Grb2 et Crk [210] qui permettront, par une cascade de réaction en aval, une activation prolongée de MAPK [271]. L'activité de Shp2, en liaison avec Frs2, est également essentielle pour le maintien de l'activation de la voie MAPK en interférant avec la phosphatase de MAPK [272]. La cascade MAPK active différents facteurs de transcription qui sont essentiels pour la



différenciation et la survie cellulaire comme CREB (*cAMP response element-binding protein*) MEF2 (*Mads box transcription enhancer factor*) et Elk1 [273-274].

### **ii. PLC- $\gamma$**

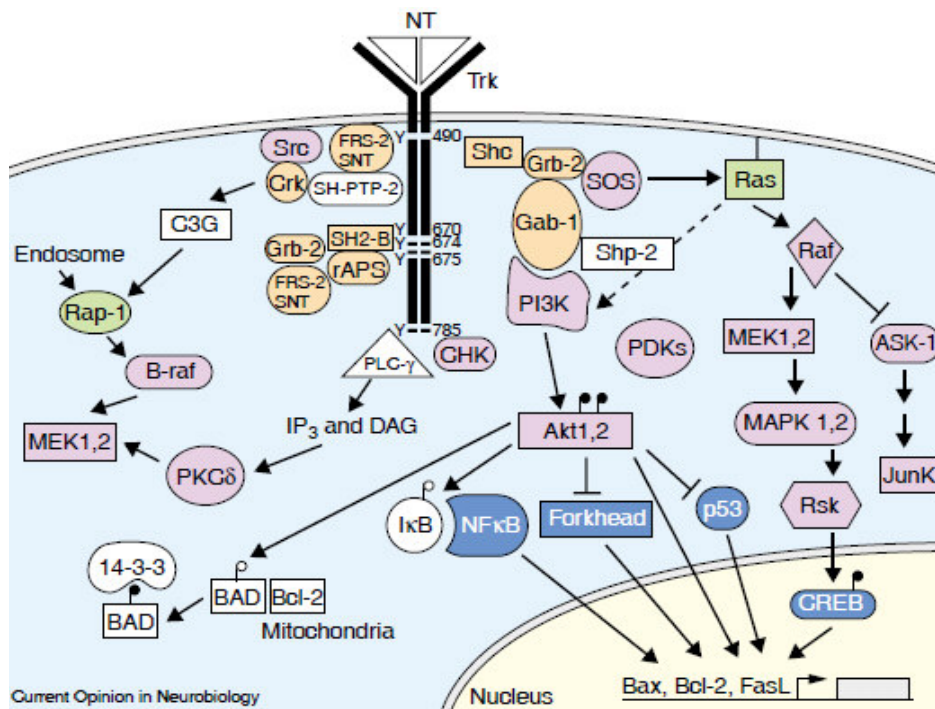
En réponse à l'activation des récepteurs Trk par les NTs, PLC- $\gamma$  est recrutée au niveau d'un site d'amarrage de la tyrosine Y785 phosphorylée pour TrkA ou au niveau de sites équivalents sur TrkB et TrkC. L'activation de PLC- $\gamma$  entraîne l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate et génère l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et le diacylglycerol (DAG) [275] avec en aval une stimulation de différents isoformes de la PKC et une mobilisation du calcium intracellulaire. Les protéines activées à la suite de la mobilisation de PLC- $\gamma$  comprennent PKC- $\delta$ , qui est nécessaire à l'activation de MEK1 et ERK1 / 2 induite par la fixation du NGF sur TrkA [276]. L'activation de PLC- $\gamma$ , par l'intermédiaire de l'activation de la PKC et de la mobilisation du calcium intracellulaire module la plasticité synaptique neuronale [277].

### **iii. PI3K-Akt**

La sérine-thréonine kinase Akt joue un rôle crucial dans l'action des NTs. Les protéines adaptatrices *Insulin receptor substrates* (IRS-1 and IRS-2) et *Grb-associated binder-1* (Gab-1) sont les principales protéines qui interviennent dans l'association et l'activation de la PI3K avec les récepteurs Trk. Par ailleurs, l'activation des récepteurs Trk recrute Shc, qui s'associe à Grb2. Le recrutement de Gab1 par la protéine Grb2 phosphorylée permet la liaison et l'activation de la PI3K [278]. De plus l'activation des récepteurs Trk agit directement sur la phosphorylation des protéines IRS qui recrutent et activent PI3K [279]. Une fois activée et localisée à la membrane cellulaire, PI3K phosphoryle le phosphoinositol et génère IP3. Ces lipides vont recruter des enzymes contenant des domaines PH comme la protéine Akt et la phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) au niveau la membrane plasmique. La protéine Akt est alors phosphorylée et activée par PDK1 [280]. À son tour, la protéine Akt va contrôler l'activité de plusieurs protéines impliquées dans l'apoptose qu'elle inactive par phosphorylation. Parmi ces protéines, la phosphorylation de Bad, de la caspase-9, d'I $\kappa$ B et des facteurs de transcription Forkhead Foxo est impliquée dans les effets anti-apoptotiques d'Akt [281-282].

En résumé la signalisation via les récepteurs Trk favorise la survie cellulaire avec l'activation de facteurs de transcription pour une différenciation cellulaire par l'intermédiaire de la voie Ras/MAPK/ERK ; la régulation de la plasticité neuronale via la

PLC- $\gamma$  et la promotion de facteurs anti-apoptotiques par activation de la voie PI3K-Akt (figure 15)



**Figure 15 :** Signalisation des récepteurs Trk

La protéine adaptatrice Shc se fixe sur la tyrosine Y490 phosphorylée du récepteur Trk et au complexe Grb2-SOS. La protéine SOS est un facteur d'échange nucléotidique qui va activer Ras en remplaçant le GTP par le GDP. La forme activée de Ras agit directement avec la protéine kinase sérine-thréonine Raf. La protéine Raf activée induit l'activation séquentielle de MEK, et de MAPK. MAPK effectue ensuite une translocation vers le noyau où il va induire la phosphorylation des facteurs de transcription, et activer des gènes de différenciation des cellules neuronales. L'activation de la PI 3-kinase par Ras ou Gab1 favorise la survie et la croissance des neurones. L'activation du PLC- $\gamma$  1 favorise la mobilisation de Calcium et l'activation de la signalisation par la protéine kinase C qui favorisent la plasticité synaptique neuronale. D'après Patapoutian et al. *Curr Opin Neurobiol* . 2001[282].

APS, adaptor molecule containing PH and SH2 domains; CHK, Csk homologue kinase; MEK, MAPK/ERK; BAD Bcl-2/Bcl-x-associated death promoter; CREB CRE-binding protein; ERK extracellular signal regulated kinase; FRS fibroblast growth factor receptor substrate; IRS insulin receptor substrate; MAPK mitogen-activated protein kinase; PDK 3-phosphoinositide-dependent kinase; PI3K phosphatidylinositol-3-OH kinase; PKC protein kinase C; PLC phospholipase C; Raf rapidly accelerated fibrosarcome; Ras Rat sarcoma, RSK ribosomal S6 kinase; Shc Src homology c; SH-PTP Src homology protein tyrosine phosphatase-2; SNT, suc-1-associated neurotrophic factor target; SOS son of Sevenless

### **III. Neurotrophines et cellules immunes**

L'implication des NTs dans la régulation de la réponse immune a tout d'abord été démontrée dans les phénomènes allergiques, *via* des modèles d'asthme murin, le NGF, le BDNF et la NT3 étant impliqués dans l'activation mastocytaire et éosinophile [283]. Par la suite, le champ d'action de ces neuropeptides s'est élargi à l'ensemble des effecteurs de la réponse immune. La figure 16 résume les interactions entre le NGF et le BDNF avec les lymphocytes B et T.

#### **A. Le NGF**

##### **1. NGF et environnement cytokinique**

La sécrétion neuronale de NGF est influencée par l'environnement cytokinique, l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  augmentant sa synthèse [284]. Ainsi, un environnement cytokinique inflammatoire pro-apoptotique au niveau neuronal induit la libération de NGF, neuroprotecteur dans des modèles d'ischémie cérébrale [285]. Cette stimulation de la sécrétion cellulaire du NGF par les cytokines pro-inflammatoires est également décrite au niveau des CE et fibroblastiques [286].

A l'inverse, le NGF est capable d'induire la libération de cytokines pro-inflammatoires, notamment d'IL-6 par les cellules stromales médullaires [287].

##### **2. NGF et lymphocyte B**

Les lymphocytes B murins et humains normaux expriment à leur membrane les récepteurs TrkA et p75<sup>NTR</sup> et produisent du NGF biologiquement actif dont la sécrétion autocrine est augmentée après activation mitogénique [288]. Cette dernière, de même que le stress, augmente l'expression membranaire de TrkA et de p75<sup>NTR</sup>, l'internalisation de ces 2 récepteurs étant induite par des concentrations croissantes de leur ligand [289]. Le NGF exogène exerce, *via* sa liaison à TrkA, un effet prolifératif dose-dépendant et synergique de l'IL-2 et de l'IL-4, sur les lymphocytes B normaux humains et murins [290-291].

Le NGF constitue un facteur autocrine de survie des cellules B mémoires humaines, sa neutralisation, *via* un Ac antagoniste, induit la disparition de l'expression intracellulaire de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Cette apoptose induite par la neutralisation endogène du NGF est plus marquée pour les cellules B IgG (s $\gamma$ <sup>+</sup>) ou IgA (s $\alpha$ <sup>+</sup>) positives [288, 292-293]. Le NGF exogène diminue également l'apoptose des LB exposés à un sérum anti-IgM *via* le récepteur TrkA et l'activation de la phosphokinase C $\zeta$  (PKC $\zeta$ ) et de la Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) [294].

Parallèlement le NGF constitue, *in vitro*, un facteur anti-apoptotique et prolifératif des lignées B matures et plasmocytaires humaines, également par sa liaison à TrkA et indépendamment de l'utilisation d'un anti-IL6 [288, 295].

Le NGF est capable d'induire après stimulation mitogénique et/ou en condition de coculture lymphocytaire T la production d'IgG, notamment d'IgG4, par les lymphocytes murins et humains indépendamment de la voie du CD40/CD40L mais ne participe pas à la commutation isotypique [290, 295].

### 3. NGF et lymphocytes T

Les lymphocytes T humains circulants normaux et notamment les Th2 possèdent les récepteurs TrkA et p75<sup>NTR</sup>, l'expression de TrkA étant majoritairement membranaire tandis que p75<sup>NTR</sup> apparaît séquestré en intra-cytoplasmique [290, 296-298].

Le NGF est également capable d'induire *in vitro* la prolifération des LT, d'augmenter l'expression du récepteur à l'IL-2 à leur surface [296].

Les relations entre T régulateurs, Th17 et NGF n'ont été que peu étudiées ; cependant, il a été récemment démontré que l'IL-17 était capable de stimuler la production de NGF par les PBMC de sujets sains mais non de patients atteints de SEP qu'ils aient été traités ou non préalablement par  $\beta$ -interféron [299]. De même, le traitement par un anti-NGF neutralisant améliore le bronchospasme dans un modèle murins, la neutralisation de cette NT s'accompagnant d'une expansion des lymphocytes Th1 et T régulateurs et d'une diminution des LT Th2 et Th17 [300].

### 4. NGF et cellules dendritiques

Les DC humaines immatures produisent faiblement le NGF, la synthèse de cette NT et l'expression de ces 2 récepteurs p75<sup>NTR</sup> et TrkA étant induite par la stimulation par le

LPS. Le NGF exogène augmente l'expression membranaire d' HLA-DR, CD40, CD80, CD83, CD86, CCR7 ainsi que la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF-alpha) induite par le LPS [301]. La maturation des DC induites par le NGF *via* sa liaison à p75<sup>NTR</sup> est dépendante de l'expression du TLR-4, le NGF étant sans effet dans la maturation des DC de souris KO pour ce récepteur [302].

## **B. Le BDNF**

### **1. BDNF et lymphocytes B**

Le BDNF, produit par les cellules stromales médullaires, est indispensable à la maturation des lymphocytes B. En effet, les souris inactivées pour le gène BDNF ont une maturation lymphocytaire B bloquée au stade pré-BII [303].

Les lymphocytes B humains matures expriment TrkB et produisent du BDNF en culture, cette production étant augmentée après stimulation mitogénique, mais non influencée par l'IL-6 ou le TNF- $\alpha$  [304-305] [306]. Le BDNF permet d'augmenter la production d'IgE de lymphocytes B isolés du sang périphérique de sujets allergiques sans influencer celle d'IgG4 ou d'IgA [307]. L'induction par le BDNF de la synthèse d'IgE est neutralisée *in vitro* par les cytokines Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-12) [307].

Le BDNF constitue un facteur autocrine de survie des lignées B humaines, du stade pro-B au stade plasmocytaire [308-309]. La régulation de cette boucle autocrine de survie a été particulièrement étudiée au niveau de lignées myélomateuses : ainsi le BDNF, par sa liaison à TrkB, induit l'activation des voies de survie (MEK-ERK et PI3K/AKT), l'action anti-apoptotique du BDNF mature étant contre-balançée par la sécrétion conjointe de pro-BDNF et sa liaison à l'hétérodimère p75<sup>NTR</sup>/sortiline [308-309]. Le BDNF ainsi produit diminue l'apoptose induite par la privation sérique, l'activation de Fas, la dexaméthasone ou le bortesomib [308-309].

Le BDNF induit également, *in vivo*, la migration des cellules myélomateuses ainsi que la sécrétion de VEGF par les cellules du stroma médullaire, facilitant ainsi la dissémination tumorale [310-311].

## 2. BDNF et lymphocytes T

Les lymphocytes T murins et humains expriment la forme tronquée (95kDa) de TrkB et produisent du BDNF, cette production étant augmentée *in vitro* par le LPS, les anti-CD3 ou l'activation de la voie CD40 [304, 312]. La production lymphocytaire T de BDNF est également augmentée par les cytokines pro-inflammatoires dans des modèles murins d'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE)[313].

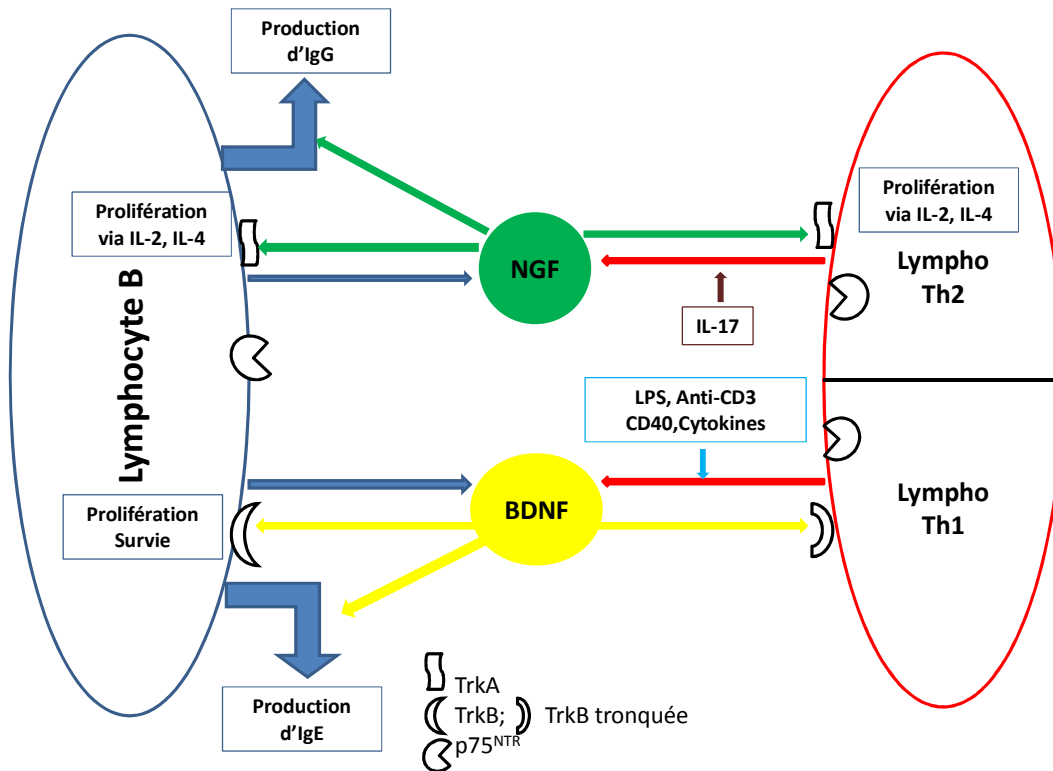
Dans ce même modèle, le traitement immunomodulateur par laquinimod restaure l'expression neuronale de BDNF et induit la sécrétion de BDNF par des cellules T dont plus de 58% sont Foxp3 positive [314]. Les Treg sont également capable d'induire la sécrétion neuronale de BDNF dans un autre modèle murin d'encéphalite à VIH [315].

## 3. BDNF et cellules dendritiques

Les DC humaines produisent également du BDNF, le rôle de cette NT dans la maturation et l'activation de ces cellules, restant non étudié à ce jour [316].

### C. NT3

Les données concernant la NT 3 et les cellules immunes restent extrêmement limitées. La NT3 constitue un facteur anti-apoptotique des plasmocytes alvéolaires murins dans un modèle allergique [317]. Une seule étude est en faveur d'une expression membranaire de TrkC au niveau des lymphocytes B humains circulants normaux non stimulés [318]. Des transcrits codant pour TrkC sont détectables au niveau de clones T humains Th1 mais également au niveau de lymphocytes T normaux stimulés par un anticorps agoniste anti-CD3 [319]. Une expression membranaire de TrkC est détectable par cytométrie en flux au niveau des T circulants humains [318].



**Figure 16 :** Interactions entre le NGF et le BDNF avec les lymphocytes B et T :

Les lymphocytes B produisent du NGF et du BDNF et expriment à leur surface les récepteurs TrkA et TrkB. En se fixant à leur récepteur spécifique, le NGF et le BDNF favorise la prolifération et la survie du lymphocyte B de façon indépendante ou via l'IL-2 et l'IL-4. Le NGF et le BDNF sont capables d'induire, après stimulation mitogénique, la production d'IgG et d'IgE respectivement.

Les lymphocytes Th2 produisent plutôt le NGF et son récepteur spécifique alors que les lymphocytes Th1 synthétisent plutôt du BDNF et une forme tronquée de TrkB. Cette production est facilitée par l'IL-17 pour le NGF et le LPS, un Ac anti-CD3, le CD40 ligand et les cytokines pro-inflammatoires pour le BDNF. Le NGF favorise la prolifération des LT de façon comparable à son action sur les LB. Les LB et les LT produisent tous deux le récepteur p75<sup>NTR</sup> mais le rôle de ce récepteur dans ces types cellulaires restent à déterminer

## **IV. Les neurotrophines et le système cardio-vasculaire**

### **A. Neurotrophines et développement cardio-vasculaire**

Les NTs et leurs récepteurs sont présents lors du développement du système cardio-vasculaire [320-322] et leur implication au cours de ce développement a été démontrée à partir de modèles de souris KO. En effet un déficit en BDNF entraîne une perte de contact des CE entre elles responsables, dès l'état embryonnaire, d'hémorragies intraventriculaires et de défaut de contractilité cardiaque [323]. Par ailleurs, les souris KO pour le gène du récepteur TrkB présentent une réduction importante de la densité vasculaire et une apoptose marquée au niveau de la région épicaudique au cours du développement cardiaque [324]. Les souris KO pour le gène de NT-3 ou celui de TrkC développent des malformations cardiaques congénitales majeures identiques à celles retrouvées chez l'homme comme la tétralogie de Fallot, une communication interventriculaire ou interauriculaire [325-326]. Certaines de ces anomalies apparaissent au 10<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire, avant l'apparition de l'innervation cardiaque chez la souris, suggérant l'existence d'une régulation directe des NTs sur le développement cardiovasculaire [327]. Ces anomalies cardiovasculaires sont également présentes chez des souris transgéniques surexprimant une forme tronquée du récepteur TrkC qui inhibe l'action de NT-3 [328]. Ainsi, ces différentes études introduisent le concept que les NTs ont des effets directs sur les cellules du système cardiovasculaire qui expriment des récepteurs Trk.

Au cours du développement embryonnaire, le récepteur p75<sup>NTR</sup> est présent dans les CE et les CMLV des gros vaisseaux [329]. Différents modèles de souris ont été réalisés mais ne permettent pas d'apporter d'éléments majeurs sur la fonction de p75<sup>NTR</sup> au niveau vasculaire. L'inactivation de l'exon IV du gène de p75<sup>NTR</sup> s'accompagne du développement de souris non viables, par rupture de la paroi artérielle aortique qui est anormalement fine. Ce modèle génétique a cependant été critiqué en raison de la synthèse d'une protéine aberrante liée à la construction du modèle, comportant un fragment de la protéine p75<sup>NTR</sup> contenant une partie du domaine extracellulaire et les



domaines transmembranaire et intracellulaire. Cette protéine aberrante activait une signalisation pro-apoptotique résultant de la phosphorylation de JNK et du clivage de la pro-caspase-3 [330]. Un modèle de souris KO pour l'exon III du gène de p75<sup>NTR</sup> a ensuite été utilisé [331]. Cependant ce modèle n'avait toujours pas permis de comprendre l'implication de ce récepteur dans le développement cardiovasculaire car l'expression d'une protéine aberrante liée à un épissage alternatif de p75<sup>NTR</sup> persistait dans ce modèle [329-330].

Les souris KO pour le gène de TrkA ou de NGF sont viables à la naissance mais sont plus petites et meurent plus tôt probablement en raison des anomalies neurologiques qu'elles présentent [332-333]. Cependant leur phénotype cardiovasculaire n'a pas été étudié. Des souris transgéniques exprimant un anticorps neutralisant contre le NGF ne présentent pas d'anomalie phénotypique à la naissance mais développent plus tard une dystrophie des muscles squelettiques, un phénomène d'apoptose splénique et une neurodégénérescence précoce identique à la maladie d'Alzheimer [334-335]. Malheureusement, une analyse ciblée du développement du système cardio-vasculaire n'a pas été réalisée dans ce modèle. Néanmoins, un modèle de souris transgéniques surexprimant le NGF a montré une hypertrophie cardiaque qui permet d'évoquer que les NTs pourraient indirectement influencer le développement cardio-vasculaire via leur action sur le système nerveux, en raison d'une innervation accrue du myocarde [336].

En résumé les NTs et leurs récepteurs semblent intervenir dans le développement du système cardio-vasculaire, leur absence ou leur surexpression entraînant des anomalies du développement parfois létales.

## **B. Neurotrophines, angiogenèse et cellules endothéliales**

L'angiogenèse est un processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. La prolifération, la survie et la migration/ invasion des CE sont tous indispensables dans ce processus. Il peut être activé chez l'adulte lors de situations pathologiques nécessitant la réparation et la cicatrisation des tissus. Ce phénomène est bien décrit, entre autre, dans la maladie cancéreuse et les maladies inflammatoires [337]. L'angiogenèse est régulée par des facteurs angiogéniques bien connus parmi lesquels on peut trouver le VEGF, le « *fibroblast growth factor-2* » (FGF-2), les « *transforming growth factors* » (TGFs), le PDGF et l'angiotensine [338]. D'autres peptides ont probablement un effet pro-angiogénique, notamment dans des situations pathologiques, comme l'érythropoïétine (EPO), l'angiotensine (ANG)-II, les endothélines,

l'adrénomédulline, la leptine, l'adiponectine, le neuropeptide-Y, le peptide intestinal vasoactif (VIP) et la substance P [339]. Nous détaillerons dans ce chapitre les liens entre les NTs et leurs récepteurs et l'angiogénèse chez l'adulte.

Le NGF est la première NT décrite dans l'angiogénèse chez l'adulte [340]. Le NGF et ses récepteurs TrkA et p75<sup>NTR</sup> ont été détectés au niveau transcriptionnel dans les CE de la veine ombilicale humaine (HUVEC) et d'aorte de porc [341-342], cependant le niveau d'expression p75<sup>NTR</sup> reste faible dans les HUVEC en culture [343] et dans les CE de capillaires musculaires de pattes de souris saines [344]. Plusieurs fonctions du NGF ont été décrites au niveau vasculaire : (i) une action proliférante a été mise en évidence dans les CE humaines de la microcirculation dermique [345], dans les HUVEC [341], les CE de la choroïde [346] et celles de cerveau de rat [347]. Cette prolifération dépend du récepteur TrkA, via l'activation de Erk [341] (ii) une interaction de cette activation avec le VEGF-A est déduite de l'augmentation de sa concentration dans le surnageant de CE en culture et de la surexpression de ses ARNm dans les CE exposées au NGF [344, 348-349]. (iii) De plus, le NGF induit la migration des CE aortiques humaines et porcines [342, 350] par l'activation simultanée des voies de signalisation PI3K/Akt et Erk [342]. Des modèles expérimentaux adaptés à l'étude de l'angiogénèse pathologique, inflammatoire et tumorale, [351] ont permis de confirmer cette action angiogénique qu'il s'agisse du modèle de la membrane chorioallantoïdienne (CAM) d'embryon de poulet ou celui de la cornée avasculaire de rat. Ils ont montré que la réponse angiogénique du NGF est dose-dépendante [352] et stimule la croissance des vaisseaux sanguins au niveau de la CAM [341]. Cette néovascularisation induite par le NGF au niveau de la CAM est partiellement inhibée par un anticorps anti-VEGF-A, suggérant ainsi l'implication du VEGF-A dans l'angiogénèse induite par le NGF [341, 353].

En effet, cette fonction est attestée par la détection d'une augmentation du niveau d'expression de VEGF-A [348, 354-356] et probablement des récepteurs du VEGF [355]. Son action est liée à la voie de signalisation PI3K-Akt menant à la production de NO et l'expression de MMP-2 [342, 348, 357]. L'angiogénèse induite par le NGF est diminuée par l'inhibition de la NO synthase (par L-NAME) ou le transfert d'un mutant négatif pour Akt [348] de façon similaire à celle d'un anticorps neutralisant le VEGF-A. Un modèle murin d'ischémie artérielle de membre a permis de préciser la fonction du NGF et de ses récepteurs dans l'angiogénèse [348]. Dans ce modèle, le NGF est un facteur autocrine pro-angiogénique qui est surexprimé avec son récepteur TrkA dans les 24 heures qui suivent l'ischémie afin de favoriser la croissance de nouveaux capillaires dans les muscles ischémiés. L'inhibition du NGF endogène par un Ac neutralisant perturbe l'angiogénèse, apparue en réponse à l'ischémie musculaire tandis que l'administration d'un NGF exogène améliore la formation des capillaires et des artérioles dans les

muscles ischémiés. De plus, l'action du NGF dans les muscles ischémiés correspond également à un effet anti-apoptotique observé dans les CE des capillaires ainsi que dans les myocytes du muscle squelettique [344, 348].

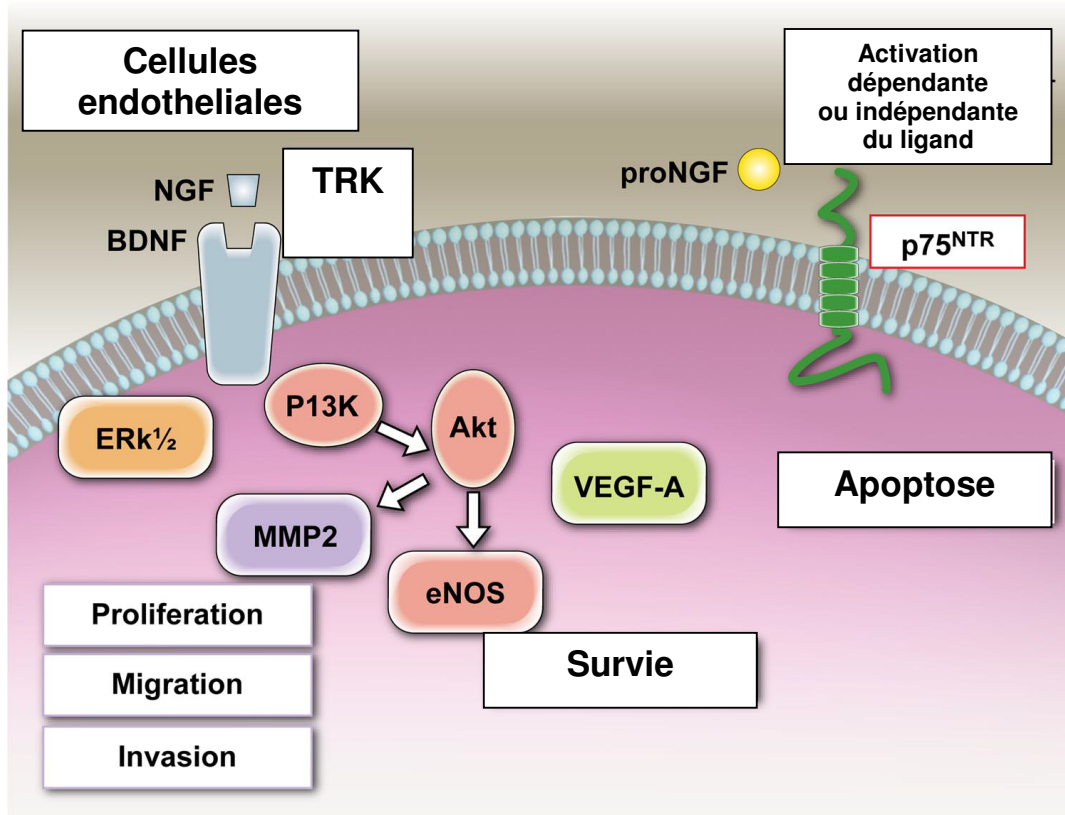
Contrairement aux actions des récepteurs Trk, l'activation du récepteur p75<sup>NTR</sup> induit l'apoptose des CE [358]. De plus l'activation de ce récepteur inhibe les capacités angiogéniques, prolifératives et migratrices des HUVEC [343].

D'autres NTs sont produites par les CE. Les protéines et les transcrits du BDNF ont été détectés dans les HUVEC [359]. Une autre équipe [358] a confirmé la synthèse du BDNF mais aussi du récepteur TrkB dans les CE. Il semble également que le niveau d'expression du BDNF soit activé par l'hypoxie, confortant ainsi l'action pro-angiogénique du BDNF. Dans un modèle de CE de l'endothélium microvasculaire cérébral de souris, l'hypoxie augmente la synthèse et la libération de BDNF dans le surnageant du milieu de culture. Le BDNF endogène favorise la survie des CE tandis le BDNF exogène stimule l'angiogenèse *in vitro* via la signalisation PI3K-Akt [358]. De même que le NGF, le BDNF augmente également le niveau d'expression VEGF-A. Cet effet serait lié à l'activation de la voie par PI3K et à l'*hypoxia-inducible factor 1 alpha* (HIF-1 $\alpha$ ). Le VEGF-A augmente également le niveau d'expression des transcrits du BDNF comme cela a été observé dans les CE de la microcirculation myométriale [360]. L'interaction BDNF-VEGF est également attestée par l'inhibition du récepteur VEGF-R2 qui diminue significativement le niveau d'expression du BDNF dans les CE cérébrales [361]. Ainsi, comme le VEGF-A, via la phosphorylation de la NO synthase par Akt, stimule la production de NO dans la CE [362] [363] et que le NO augmente l'expression du BDNF [364], il est possible que NO soit impliqué dans l'augmentation du BDNF induite par le VEGF-A. Le modèle murin d'ischémie artérielle de membre, montre que l'augmentation de l'expression du BDNF est associée à la phosphorylation des récepteurs TrkB [365]. De plus, la surexpression du gène du BDNF augmente la densité capillaire du muscle ischémié et favorise sa revascularisation.

Contrairement au NGF, les actions pro-angiogéniques du BDNF ne sont pas entravées par un anticorps neutralisant le VEGF. En outre le BDNF semble augmenter la densité capillaire mais n'a aucun effet sur les artérioles ou les petites artères bien que cette constatation soit difficile à concilier avec la revascularisation induite par le BDNF [348, 365]. Une autre différence existe entre le NGF et le BDNF. En effet ce dernier n'induit pas d'angiogenèse dans le modèle de la cornée avasculaire. Ceci peut s'expliquer par l'absence de récepteur TrkB dans ce tissu [352].

La première description du rôle de NT-3 sur l'endothélium vasculaire a été rapporté sur des CE de la microcirculation cérébrale de rat [366]. Le récepteur TrkC était présent sur ces CE mais aussi sur des CE de capillaires de souris. [367]. En revanche il était

absent des CE d'aorte de rat [366] et des HUVEC [322]. A partir d'un modèle d'HUVEC surexprimant le récepteur TrkC, la NT-3 augmente les capacités des CE à proliférer, à migrer et à former un réseau vasculaire [367]. Cet effet pro-angiogénique de NT-3 a été confirmé dans une étude récente, [368] par la constatation de la formation accrue d'un réseau vasculaire sur modèle synthétique. Cet effet emprunte la voie de signalisation PI3K-Akt-eNOS [366, 369] dans les CE puisque les inhibiteurs pharmacologiques de PI3K (LY294002) et NOS (L-NAME) perturbe la formation de réseau vasculaire dans le matrigel [367]. Toujours à partir du modèle d'ischémie artérielle de membre de souris la surexpression de NT-3 favorise une néovascularisation du membre ischémié [367] L'effet pro-angiogénique de NT-3 peut être aussi indirect. Ainsi cette NT peut favoriser la synthèse par les cellules souches mésenchymateuses de facteurs directement pro-angiogéniques comme le NGF, BDNF et le VEGF [369]. La figure 16 résume l'action des NTs sur les CE

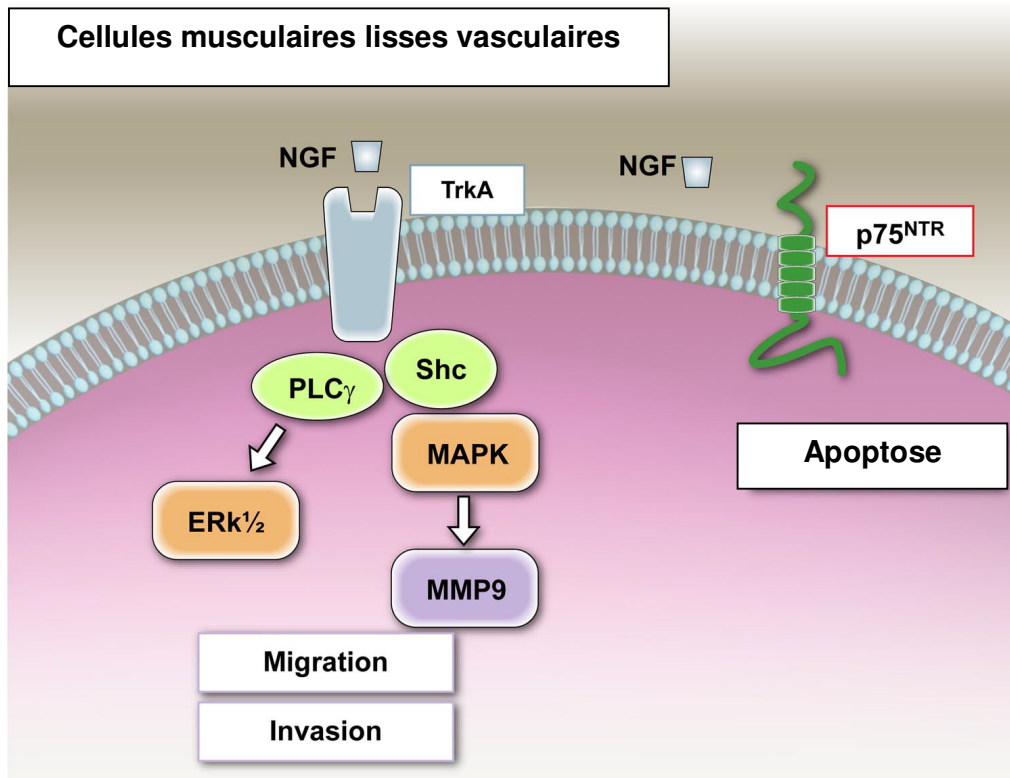


**Figure 17 :** Actions des NTs sur les CE

L'activation des récepteurs TrK met en jeu les voies de signalisation MAPK/ERK et PI3K/Akt. La voie MAPK/ERK va stimuler la prolifération, la migration et l'invasion des CE. La voie PI3K/Akt va favoriser la survie cellulaire mais aussi le phénomène d'invasion par l'induction de la synthèse de MMP-2. Par ailleurs les NTs stimulent la production de VEGF-A. L'activation du récepteur p75<sup>NTR</sup>, dépendant ou indépendant du ligand, entraîne un arrêt du cycle cellulaire et une apoptose. eNOS endothelial nitric oxide synthase ; ERK extracellular signal regulated kinase; MMP-2 Métalloproatéase matricielle-2 ; PI3K phosphatidylinositol 3-kinase VEGF-A : vascular endothelial growth factor. Adapté de Caporali et al. *Physiol rev* 2009 [322].

## C. Neurotrophines et cellules musculaires lisses vasculaires

L'expression des NTs au cours du développement révèle que le NGF, le BDNF, et la NT-3 sont exprimés dans la paroi aortique et l'artère pulmonaire du rat au stade embryonnaire et après la naissance. Le niveau de NT-3 dans les vaisseaux reste relativement constant à l'âge adulte tandis que l'expression du BDNF augmente et que celle du NGF diminue [321]. Les CMLV humaines et de rat en culture expriment les NTs et leurs récepteurs et produisent des NTs [7, 370-372]. Les CMLV possèdent des pro-convertases (PC) comme la furine, la PC5 et la PC7 qui interviennent dans le processus de maturation des pro-NTs en NTs [373]. Le NGF ne stimule pas la prolifération des CMLV d'aorte humaine mais favorise plutôt leur migration de façon autocrine [7, 374]. Ce phénomène de migration est dépendant de la furine qui convertit le pro-NGF en NGF. Ce dernier stimulera la migration via son récepteur TrkA [374]. En aval cette migration fait probablement intervenir la signalisation dépendante de la voie de la PLC- $\gamma$  [166] et du PI3K-Akt [374] car les inhibiteurs pharmacologiques de la PI3K comme la wortmannine ou le LY294002 bloquent cette migration [166]. Parallèlement l'activation du couple NGF/TrkA favorise la phosphorylation de la paxilline, une protéine du cytosquelette impliquée dans la migration cellulaire des CMLV. L'inhibition simultanée du récepteur TrkA et de la voie PI3K/Akt altère la phosphorylation de la paxilline et la migration cellulaire [374]. La signalisation associée à la voie Shc/MAPK induite par le couple NGF/TrkA augmente de façon significative l'expression de la MMP-9 dans CMLV aortiques de rat et dans une lignée de CMLV surexprimant TrkA. Cette surexpression de MMP-9 favorise la migration des CMLV [375] (figure 17). Le récepteur p75<sup>NTR</sup> est faiblement exprimé par les CMLV humaines et de rat en culture dans les conditions basales. Son expression est induite dans des conditions pathologiques comme l'ischémie, l'athérosclérose et le diabète [168, 341, 343-344]. L'activation du récepteur p75<sup>NTR</sup> par le NGF, la NT-3 et dans une moindre mesure le BDNF favorise une signalisation pro-apoptotique et l'arrêt du cycle cellulaire [168] [343]. Le rôle de TrkA dans l'apoptose des CMLV reste encore controversé [168, 376].



**Figure 18** : Actions des NTs sur les CMLV : exemple du NGF

L'activation de TrkA par le NGF fait intervenir les voies de signalisation PLC- $\gamma$  mais aussi PI3K-Akt favorisant la migration et l'invasion cellulaire. De plus le couple NGF/TrkA active la voie de signalisation Shc/MAPK qui induit la production de MMP-9 qui facilite également l'invasion des CMLV à travers la matrice extra-cellulaire et la membrane basale des CE. La stimulation du récepteur p75<sup>NTR</sup> par le NGF active une signalisation pro-apoptotique. ERK extracellular signal regulated kinase; MAPK MAPK mitogen-activated protein kinase; MMP9 Métalloprotéase matricielle-9 ; PLC $\gamma$  phospholipase C- $\gamma$ ; Shc Src homology c. D'après Caporali et al. *Physiol rev* 2009 [322].

## **V. Neurotrophines et pathologies inflammatoires et cardio-vasculaires.**

### **A. Neurotrophines, maladies inflammatoires chroniques et auto-immunes**

L'implication des NTs dans les maladies auto-immunes, les maladies inflammatoires et les vascularites a tout d'abord été suggérée par la constatation de concentrations sanguines élevées de ces neuropeptides au cours de celles-ci.

Plus récemment, l'implication des NTs dans la dérégulation de la balance inflammatoire cytokinique (profil Th1, Th2) et cellulaire (Treg / Th17) a été démontrée au cours des maladies allergiques [300], les quelques données expérimentales disponibles suggérant la même dérégulation au cours des MAI et des maladies inflammatoires.

Cependant, les données de la littérature concernent quasi-exclusivement le NGF, les propriétés immuno-modulatrices du BDNF et de la NT3 notamment sur l'activation et l'apoptose lymphocytaire B ayant été décrites plus récemment [309, 317].

### **1. Neurotrophines et maladies auto-immunes systémiques**

#### **a. Lupus érythémateux systémique**

Des concentrations sériques élevées de NGF [377-378] (Fauchais et al.2013, données non publiées) et de BDNF (Fauchais et al. 2013, données non publiées) ont été mises en évidence chez des enfants et des adultes atteints de LES, l'augmentation de ces concentrations étant corrélée [377-378] ou non (Fauchais et al.2013, données non publiées) à celle du SLEDAI.

Les travaux émanant de notre laboratoire ont mis en évidence une augmentation nette des concentrations sériques de NT-3 dans les formes graves de LES (SLEDAI>9) caractérisées par des lésions de vascularites actives (Fauchais et al.2013, données non publiées)



D'autres données suggèrent que ces NTs ont un rôle actif dans la dérégulation de la réponse immune au cours du lupus :

- la seule étude expérimentale disponible (souris NZW B/W) met en évidence que l'augmentation des taux sériques de NGF croit parallèlement à l'intensité de la glomérulonéphrite d'une part, et à la diminution du débit de filtration glomérulaire d'autre part [379].
- l'augmentation des concentrations sériques de NGF est inversement corrélée à la baisse des lymphocytes T régulateurs (CD25<sup>+</sup>foxP3<sup>+</sup>) (Fauchais et al.2013, données non publiées), corrélation négative également mise en évidence dans des modèles murins d'asthme [300].
- Il existe également une production lymphocytaire B de BDNF et de NGF augmentée au cours du LES, corrélée à la baisse du CH50 (Fauchais et al.2013, données non publiées)

### **b. Syndrome de Goujerot Sjögren primitif (SGSp)**

Les concentrations sériques de NGF et de BDNF sont également augmentées au cours du SGSp, notamment dans les formes avec manifestations systémiques [380-381]. Le rôle des NTs dans la réponse immune pathologique au cours du SGSp est suggérée par les corrélations existant d'une part, entre l'augmentation des concentrations sériques de NGF et l'hypergammaglobulinémie et d'autre part, entre l'augmentation respective des concentrations sériques de NGF et de BDNF et le degré d'activation lymphocytaire T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (expression membranaire d'HLA-DR) [380].

### **c. Sclérodémie systémique(ScS)**

Les concentrations sériques de NGF sont augmentées au cours de la sclérodémie systémique (ScS) [382-384] et ce notamment en cas d'hypergammaglobulinémie, rejoignant ainsi les données obtenues au cours du SGSp [380] et les données plus fondamentales démontrant le rôle de cette NT dans l'induction de la production d'immunoglobulines, cette stimulation apparaissant CD40-ligand indépendante [288].

Par ailleurs, l'expression cutanée du NGF, augmentée au cours de la ScS, est corrélée au degré de perméabilité capillaire pulmonaire [385-386]. Le lien entre vasculopathie et NGF au cours de la ScS reste cependant incertain, l'augmentation des concentrations sériques de cette NT apparaissant indépendante de la sévérité du phénomène de Raynaud, de l'existence d'ulcérations digitales ou d'une HTAP [383-384].

A l'inverse de ce qui a été observée dans le LES et le SGSp, les concentrations sériques de BDNF sont diminuées au cours de la ScS, notamment chez les patients présentant une HTAP ou une forme diffuse de la maladie [384].

#### **d. Rhumatismes inflammatoires**

Des concentrations sériques élevées de pro-NGF [387] et de NGF [388] sont retrouvées respectivement au cours de la PR et des arthrites juvéniles. Une seule étude rapporte une augmentation des concentrations sériques de BDNF chez des patients atteints de PR [389]; celles-ci diminuent après traitement par anti-TNF mais la diminution des concentrations sériques de BDNF n'est ni corrélée à l'amélioration des paramètres inflammatoires (CRP) ou à celle du DAS-28 [389]. Les concentrations synoviales de NGF sont augmentées au cours de la PR, de la SPA et du rhumatisme psoriasique [390-392], par rapport à celles retrouvées chez des volontaires sains [393] ou d'atteintes articulaires non inflammatoires [391].

Les NTs semblent impliquées dans la destruction articulaire au cours des rhumatismes inflammatoires *via* une activation lymphocytaire et fibroblastique synoviale, les lymphocytes T et les fibroblastes synoviaux étant à la fois les cibles et les cellules productrices de cette NT [391-392]. Ainsi, les lymphocytes T intra-synoviaux au cours de la PR et du rhumatisme psoriasique libèrent du NGF qui va activer, *via* sa liaison à TrkA et la phosphorylation d'Akt, leur prolifération ainsi que celle des cellules fibroblastiques synoviales [391-392]. Cette expression membranaire de TrkA est restreinte aux lymphocytes T infiltrant le pannus inflammatoire, les lymphocytes T synoviaux de prélèvements arthroscopiques n'exprimant pas le récepteur de haute affinité au NGF [392].

Les fibroblastes synoviaux produisent également du NGF et expriment son récepteur à haute affinité TrkA, l'expression de cette NT et de son récepteur étant augmentée par le TNF $\alpha$  et IL1- $\beta$  [394-395]. Cependant, si le traitement par un anti-NGF diminue la douleur dans un modèle d'arthrite inflammatoire murine, la destruction articulaire radiologique n'était pas améliorée à J24 [396]. Par contre, aucune analyse immunohistochimique synoviale de l'expression des récepteurs aux NT ou des cytokines pro-inflammatoires n'a été réalisée dans cette étude [396].

La transcription de BDNF et de NT3 est également augmentée chez des patients atteints de SPA [397]. Au cours de la PR, la surexpression fibroblastique et macrophagique de BDNF est corrélée à l'intensité de la dégénérescence des fibres nerveuses synoviales [398].

Les études immuno-histochimiques complètent ces données, la surexpression synoviale de TrkA et de p75<sup>NTR</sup> étant respectivement corrélée à l'infiltrat lymphocytaire et

à l'intensité de la néo-vascularisation synoviale au cours de la SPA [397]. Si le traitement par anti-TNF (inliximab) réduit l'expression synoviale de ces 2 récepteurs [397], il est en revanche sans effet sur les concentrations sériques de BDNF et de NGF [389].

## **2. Neurotrophines et maladies inflammatoires**

### **a. Sarcoïdose**

Au cours de la sarcoïdose pulmonaire, les concentrations de NGF dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) sont multipliées par dix par rapport aux sujets sains ou atteints de pneumoconiose [399]. L'augmentation des concentrations de NGF dans le LBA est par ailleurs corrélée à l'expression de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$ , d'IL-2 et d'IL-6 [399].

L'analyse histologique confirme l'hyperproduction de NGF, mais également de BDNF et de NT-3 par les cellules géantes multi-nucléées des granulomes mais également par les macrophages et les lymphocytes T alvéolaires [400-401]. L'expression lymphocytaire de ces NTs apparaît corrélée à l'importance de l'atteinte interstitielle radiologique [401].

### **b. Maladie de Crohn**

Il existe une surexpression de NGF et de son récepteur TrkA au sein des muqueuses coliques de patients atteints de maladie de Crohn, notamment au niveau des cellules mastocytaires et des polynucléaires. Cette expression conjointe du NGF et de son récepteur suggère l'implication d'une boucle autocrine dans l'inflammation entérique de la maladie de Crohn [402]. Les données expérimentales murines confirment la surexpression précoce du NGF et de la NT-3 au cours des colites inflammatoires expérimentales induite par l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS), avec une sécrétion accrue de ce neuropeptide à la fois par les cellules mastocytaires et par les cellules épithéliales [403-404]. Ces 2 NTs ont une action anti-inflammatoire locale puisque leur neutralisation à l'aide d'Ac bloquants aggrave à la fois le nombre d'ulcérations digestives et le score histologique de gravité [404]. Parallèlement, la production de NGF et de BDNF par les cellules mastocytaires coliques diminue l'apoptose entérique [402, 405-406].

### **c. Affections cutanées et psoriasis**

Les données les plus solides concernant l'implication des NT dans les processus inflammatoires tissulaires émanent des travaux sur le psoriasis. Cette affection cutanée

inflammatoire chronique est caractérisée par une prolifération et une différenciation accrue des kératinocytes dans un contexte d'angiogenèse accélérée [407].

Au niveau cutané, le NGF est produit par les kératinocytes, les fibroblastes, les CE de la microvascularisation dermique et les kératinocytes sains et pathologiques [345, 408-409]. Une xénogreffe de peau humaine de patient ayant un psoriasis non traité, à une souris immunodéprimée ayant un déficit immunitaire combiné sévère (SCID), montre une surexpression de NGF par les kératinocytes, associée à une prolifération des CE et à l'induction de l'expression membranaire de la molécule d'adhérence *intercellular adhesion molecular* (ICAM)-1 [410]. La neutralisation du NGF par un anticorps ou l'inhibition des récepteurs Trk par un inhibiteur pharmacologique, le K252a, améliore les lésions de psoriasis et l'infiltrat des lymphocytes CD4 et CD8 intra-épidermiques [411].

Dans un modèle murin d'escarres, le NGF favorise l'angiogenèse permettant ainsi d'accélérer la cicatrisation [349]. Un effet identique du NGF a été rapporté lors d'expérimentations avec des plaies cutanées réalisées chez la souris. Une application de crème à base de NGF a permis une cicatrisation plus rapide [412]. Par ailleurs, le NGF augmente l'expression de la substance P [413], qui est inductrice de l'angiogenèse [414] et impliquée dans le psoriasis [411]. Ces résultats confortent la fonction du NGF *via* TrkA dans les phénomènes d'angiogenèse associés au psoriasis. Néanmoins, ce phénomène peut être contrôlé par une autre voie, activée par le précurseur du NGF, le pro-NGF, qui en activant le complexe p75<sup>NTR</sup>/sortiline, favorise l'apoptose des kératinocytes de patients atteints de psoriasis [415].

Outre leurs fonctions sur l'angiogenèse, les NTs en activant la synthèse de substances nociceptives comme la substance P et la sérotonine [416] participent aux phénomènes algiques. L'inhibition directe du NGF ou par l'intermédiaire de ses récepteurs [417] semble être une piste thérapeutique intéressante pour contrôler les douleurs des pathologies articulaires inflammatoires mais aussi dégénératives [416]

### **3. Neurotrophines et vascularites**

Les données concernant l'implication des NTs dans les vascularites systémiques sont actuellement très limitées. Une seule étude témoigne de l'augmentation des concentrations sériques de NGF au cours de la maladie de Kawasaki [418], aucune étude n'ayant été effectuée dans les vascularites de l'adulte jusqu'à ce jour.

Il existe un cas rapporté d'augmentation des concentrations plasmatiques de BDNF au cours d'une périartérite noueuse, les concentrations plasmatiques diminuant rapidement après le début de la corticothérapie [406].

D'autres travaux parcellaires se sont intéressés à l'implication des NTs dans les neuropathies associées aux vascularites. Si ceux-ci se focalisent sur les relations existant entre la dégénérescence axonale et la production locale de neuropeptides, les analyses immuno-histochimiques effectuées mettent en évidence une production de NTs par les cellules lymphocytaires et macrophagiques péri-axonales [419-420].

Ainsi, l'analyse immuno-histochimique et par hybridation *in situ* des biopsies surales de 5 patients atteints de micropolyangéite, préalablement à la mise en route de tout traitement immunosuppresseur, confirme la surexpression de NGF au niveau de l'épinerve et de l'endonerve, notamment des cellules de Schwann, des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> et des macrophages infiltrant le nerf périphérique, cette expression étant corrélée à la dégénérescence axonale [419]. Une surexpression de NGF est également décrite au niveau de la paroi vasculaire [419]. Toutefois, ce travail ne concerne que le NGF, l'analyse histochimique est focalisée sur les lésions nerveuses sans description fine des lésions endothéliales vasculaires ; aucune comparaison n'a été faite entre l'expression du NGF dans le groupe de micropolyangéite et le groupe contrôle (neuropathie périphérique d'origine non vascularitique) [419].

Une autre étude réalisée par RT-PCR sur les biopsies nerveuses de 22 patients atteints de vascularites nécrosantes a révélé une surexpression de NGF, de p75<sup>NTR</sup> chez les patients présentant des douleurs neuropathiques [420].

## 4. NTs, angiogénèse et maladies inflammatoires

L'implication des NTs dans les maladies inflammatoires a été également démontrée *via* les phénomènes d'angiogénèse notamment dans les rhumatismes inflammatoires et le psoriasis, la modulation de l'angiogénèse par les NTs ayant été parallèlement démontrée dans des modèles non inflammatoires.

Le **NGF** présente, *in vitro*, *via* l'activation de TrkA et de la phosphorylation de Erk, un effet pro-angiogénique au niveau des CE du derme (HDMEC), des veines ombilicales (HUVEC) ou de la choroïde [341, 345-347]. Les cellules HUVEC produisent du NGF, cette production étant augmentée dans un contexte pro-apoptotique par privation de SVF

[341]. La neutralisation du NGF autocrine diminue la prolifération de ces CE, et ce, de manière VEGF indépendante [341].

Au niveau cérébral, le NGF produit de manière autocrine par les CE capillaires (BCEC) augmente leur prolifération, la sécrétion de NGF étant majorée dans un contexte pro-inflammatoire (IL-1 $\beta$  + LPS) [347].

Cette action pro-angiogénique du NGF est confirmée *in vivo* dans des modèles de membrane chorioallantoïdienne de poulet (CAM), ou d'ischémie murine (ligature artérielle du membre postérieur) [341, 348]. Dans ce dernier modèle, la neutralisation du NGF endogène inhibe la néovascularisation capillaire, induite par l'ischémie, l'adjonction continue de cette NT provoquant, à l'inverse, une augmentation de la densité capillaire, une diminution de l'apoptose endothéliale et des fibres musculaires lisses [348]. Dans ce modèle d'ischémie artérielle murine non inflammatoire, l'action pro-angiogénique du NGF est, à l'inverse de ce qui est observé au niveau des cellules HUVEC, VEGF dépendante, la neutralisation de ce dernier ou le blocage de la voie Akt supprimant l'effet pro-angiogénique du NGF [348, 421]. Le lien existant entre NGF et activation de la voie VEGF semble dépendante du modèle utilisé ; en effet, le NGF active la production de VEGF par les CE rétinienne *via* la phosphorylation de TrkA et l'activation de la voie Pi3K/Akt ou par stimulation du facteur HIF-1 (Hypoxia-inducible factor 1) au niveau neuronal [422-423].

L'ensemble de ces données confirment l'existence d'une possible régulation de l'angiogénèse *via* la voie NGF/TrkA, celle-ci étant stimulée dans des contextes ischémiques ou pro-inflammatoires [341, 348, 422-423]. D'autres données confirment l'implication du NGF dans l'induction de l'angiogénèse dans des modèles de cancers solides [424].

La liaison du ***BDNF*** à son récepteur de haute affinité TrkB induit une activité pro-angiogénique [368]. Dans les cellules HUVEC qui synthétisent le BDNF et expriment son récepteur TrkB, la production et la sécrétion de cette NT est majorée par l'hypoxie [358, 425]. Le BDNF augmente également la production de VEGF par les CE, *via* l'activation d'HIF-1  $\alpha$  [425]. Par ailleurs, l'expression du BDNF est majorée par l'adjonction de statines dans un modèle murin d'hémorragie intra-cérébrale [426].

Enfin, des données récentes confirment l'implication de la ***NT-3*** dans l'angiogénèse, l'adjonction de cette NT induisant une croissance capillaire dans un modèle d'ischémie cutanée [368].

## VI. Neurotrophines, athérosclérose et remodelage vasculaire

La réaction inflammatoire est un élément majeur de la constitution des lésions d'athérosclérose, marquées par des épaissements focaux asymétriques de l'intima. Les étapes qui sous tendent la constitution de l'athérome comprennent l'activation des CE par des cytokines pro-inflammatoires et des lipoprotéines, l'adhérence des monocytes à un endothélium vasculaire lésé et la migration des CMLV vers l'intima. L'accumulation de lipides et l'influence des protéines de la matrice extracellulaire (en particulier les métalloprotéases matricielles) sur le phénotype des cellules présentes vont favoriser le développement de la plaque d'athérosclérose qui va obstruer progressivement la lumière artérielle [427-428]. Une angioplastie transluminale percutanée, dans le but de reperméabiliser la lumière artérielle, peut endommager l'endothélium vasculaire et la LEI. Ceci peut entraîner une transformation des CMLV d'un phénotype contractile vers un phénotype prolifératif et sécrétoire. Elles vont ensuite migrer vers de la lumière artérielle favorisant ainsi la formation d'une néo-intima et la sténose artérielle [429]. Les CMLV humaines et de rat expriment les NTs et leurs récepteurs *in vivo* et en culture [7, 166, 168]. Lors de la constitution expérimentale de lésions artérielles chez le rat, les niveaux d'expression du NGF, du BDNF, des récepteurs TrkA et TrkB augmentent de façon spectaculaire et persistent pendant la formation de la néo-intima [7]. On note également une surexpression de BDNF, NT-3, NT-4/5, des récepteurs TrkB, TrkC et p75<sup>NTR</sup> dans les CMLV de lésions d'athérosclérose [7, 430] suggérant une implication des NTs et de leurs récepteurs dans la régulation de la réponse des CMLV après une lésion vasculaire. Cette hypothèse est renforcée par les études montrant que le NGF favorise la migration des CMLV via le récepteur TrkA [7, 430] alors qu'il induit une signalisation pro-apoptotique quand il se fixe sur le récepteur p75<sup>NTR</sup> [168, 430]. En outre, le NGF induit l'expression de la MMP-9 dans les CMLV [375] qui a une action lytique importante contre les composants de la membrane basale et qui est rapidement activée lors d'une lésion mécanique [429].

Le croisement d'une souris hétérozygote pour le gène de TrkB (TrkB<sup>+/-</sup>) avec une souris KO pour le gène de l'apolipoprotéine E (Apo<sup>-/-</sup>) montre que la signalisation via TrkB réduit les dépôts lipidiques intra-artérielles et l'hyperplasie intimale même dans un contexte de régime pro-athérogène [431]. Ceci est indépendant de l'expression de MMP-9 qui reste identique dans les lésions artérielles chez les souris TrkB<sup>+/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> et chez les souris TrkB<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> [431]. Néanmoins, la fonction du BDNF, ligand de TrkB, n'est pas démontrée dans ce processus. Une étude récente a montré que des souris Apo<sup>-/-</sup> avec

une délétion du gène de BDNF au niveau des CE, ne présentaient pas de lésions d'athérosclérose plus importantes que des souris contrôles après 16 semaines de régime pro-athérogène [432]. Parallèlement, le couple BDNF/TrkB active une voie de signalisation de survie pour les CE et l'intégrité des CE est fondamentale pour éviter l'adhérence des monocytes et maintenir les CMLV dans un phénotype contractile plutôt que prolifératif et sécrétoire [358]. Par conséquent, le rôle du couple BDNF/TrkB dans le remodelage vasculaire et l'athérosclérose reste encore à préciser. A notre connaissance Il n'y a pas d'étude référencée concernant l'implication de NT-3 dans l'athérosclérose.



# Objectifs de la thèse

Bien que l'ACG soit la vascularite primitive la plus fréquente du sujet de plus 50 ans et qu'elle fasse l'objet de nombreuses publications tant sur le plan de la recherche clinique que fondamentale, de nombreuses questions restent en suspens.

Même si les examens d'imagerie, montrant une aortite et/ou une artérite des gros vaisseaux, permettent d'orienter fortement vers le diagnostic d'ACG, aucune recommandation n'existe à ce sujet et la certitude diagnostique de cette maladie reste encore histologique. Jusqu'ici, aucun marqueur biologique ne permet d'orienter et encore moins de confirmer ce diagnostic. C'est dans ce contexte que nous avons entrepris de rechercher un bio-marqueur au cours de cette maladie.

Par ailleurs, malgré les multiples investigations expérimentales menées sur la physiopathologie de cette maladie, les mécanismes qui sous tendent la constitution de l'hyperplasie intimale et le remodelage vasculaire restent encore imprécis. Il semblait ainsi pertinent de travailler directement avec les cellules impliquées dans ce remodelage, ce d'autant que nous avons identifié des autoanticorps dirigés contre les CMLV et notre choix s'est porté sur les CMLV issues d'artère temporale de patients suspects d'ACG pour tenter de comprendre plus précisément leur rôle dans la pathogénie du remodelage vasculaire de l'ACG.

Ainsi dans une première partie de ce travail, effectué dans l'unité INSERM U1016, CNRS UMR 8104 à l'Institut Cochin, du Pr Luc Mouthon, nous nous sommes focalisés sur la recherche d'un bio-marqueur et la constitution d'une collection biologique à partir de biopsie d'artère temporale de patients suspects d'ACG. L'hypothèse que ce bio-marqueur pourrait être un auto-anticorps reposait sur la découverte, dans le sérum des patients atteints d'ACG, d'IgG dirigées contre les CMLV et les CE. Les cibles antigéniques de ces auto-anticorps ont été identifiées et ont fait l'objet d'une publication [433]. Nous avons ensuite tenté de confirmer les résultats d'une étude portant sur l'intérêt du dosage d'anticorps dirigés contre la chaîne lourde de la ferritine pour le diagnostic de l'ACG. Ce travail a fait l'objet d'une seconde publication [104].

La deuxième partie de ce travail a été effectuée dans l'équipe d'accueil EA 3042 « Homéostasie Cellulaire et Pathologies » dont la thématique de recherche concerne

l'implication des Neurotrophines, en auto-immunité et cancérogenèse à la faculté de Médecine de Limoges. L'étude des neurotrophines est un axe de recherche privilégié de l'EA 3842 et la constatation de l'influence majeure des neurotrophines dans le développement et la régulation sur le système cardio-vasculaire et des pathologies cardio-vasculaires nous a convaincu de continuer notre l'étude par celle du remodelage vasculaire au cours de l'ACG, en axant ce projet sur l'implication potentielle des neurotrophines dans la physiopathologie de cette maladie. Ainsi, nous avons mis en évidence une augmentation de la synthèse protéique et des transcrits des NTs et de leurs récepteurs chez les patients atteints d'ACG. Par ailleurs, ces patients présentent une concentration sérique circulante de NGF supérieure à celle des sujets contrôles. Enfin, l'étude de la fonctionnalité de NTs exogènes au niveau des CMLV obtenues à partir de BAT de patients suspects d'ACG a montré que le NGF et le BDNF stimulaient de façon significative la migration cellulaire des patients comparativement à celle des contrôles. *(Manuscrit soumis pour publication).*

# Matériels et méthodes

## I. Cohorte de patients de Limoges

Dans le service de Médecine Interne A du CHU de Limoges, les patients pour qui le diagnostic d'ACG a été posé, soit sur la positivité de la BAT, soit sur les critères de l'ACR pour l'ACG [100] ont fait l'objet d'un recueil de données prospectif depuis janvier 1976. Pour chaque patient, ce recueil des données a été réalisé à partir d'un cahier spécifique comportant 174 items cliniques et paracliniques. A partir de toutes ces données, nous avons regardé si certains items (complications ischémiques, syndrome inflammatoire et ses marqueurs, modalités de la corticothérapie) pouvaient être corrélés par les résultats que nous avons obtenus sur l'étude du remodelage vasculaire.

## II. Matériel biologique

### A. Collection biologique Cochin-Limoges

A l'initiative du Pr Luc Mouthon, équipe « Neutrophiles et Vascularites », unité INSERM U1016, CNRS UMR 8104 de l'Institut Cochin, nous avons mis en place une collection biologique à partir de janvier 2010. Elle est enregistrée au ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche avec le numéro de déclaration suivant : DC-2010-1079. L'investigateur principal est le Pr Luc MOUTHON et le responsable scientifique le Dr Kim Heang LY.

Elle a pour objectif de recueillir prospectivement des données cliniques, biologiques et thérapeutiques de patients suspects ou atteints d'ACG. Parallèlement, elle permet de constituer une collection de sérums, plasmas et cellules mononucléées du sang périphérique et de CMLV et de fibroblastes obtenues à partir d'un fragment d'artère temporale de patients suspects ou atteints d'ACG.

Cette collection s'est constituée sur deux sites, à Paris et à Limoges. A Paris, le recrutement des patients suspects ou atteints d'ACG est effectué dans le service de Médecine Interne de l'hôpital Cochin du Pr Loïc Guillevin et dans le service de Médecine interne du Pr. Claire Le Jeune de l'hôpital Hôtel-Dieu. A Limoges, ce recrutement est effectué dans le service de Médecine Interne A du Pr Elisabeth Vidal et dans le service de rhumatologie du Pr Philippe Bertin, au CHU de Limoges.

Après signature de la notice d'information et du consentement éclairé par le patient, les prélèvements sanguins sont réalisés dans les services de Médecine Interne où est recruté le patient. Ce dernier est ensuite adressé au service d'Ophtalmologie du Pr Antoine Brézin à Paris et du Pr Jean-Paul Adenis à Limoges, pour une évaluation ophtalmologique initiale et la réalisation de la BAT. La BAT sera séparée en deux pièces, une pour l'analyse histologique classique dans le service d'anatomo-pathologie et l'autre pour la collection. Cette deuxième pièce biopsique sera conservée dans un milieu de culture spécifique (Milieu RPMI ou DMEM) pour l'acheminement du bloc d'ophtalmologie vers l'équipe «Neutrophiles et Vascularites » unité INSERM U1016 à Paris ou l'EA 3842 à Limoges.

Le fragment d'artère temporale, subira ensuite plusieurs étapes techniques pour l'isolement des CMLV :

- Digestion tissulaire enzymatique
- Recueil des cellules sur un tamis cellulaire
- Ensemencement des cellules recueillies dans un milieu de culture spécifique pour fibroblastes et CMLV
- Après 15 jours de culture, séparation des fibroblastes et des CMLV
- Recueil des CMLV à partir du 3ème passage dans des aliquotes de 1 mL dans un milieu adapté pour la cryopréservation pour congélation à – 80° C ou dans de l'azote liquide.

## **B. Artères temporales congelées et incluses dans un bloc de paraffine**

Si la taille du fragment d'artère temporale destiné au service d'anatomie-pathologique de Limoges le permet, des échantillons millimétriques sont congelés directement dans de l'azote liquide. Les blocs de paraffine d'artère temporale de patients suspects ou atteints d'ACG provenant du service d'anatomie-pathologie du Pr François Labrousse, ont été utilisés pour la réalisation des expérimentations d'immunohistochimie afin d'identifier les protéines des NTs et de leurs récepteurs.

### **III. Recherche d'anticorps sériques dirigés contre les CMLV isolées d'artère au cours de l'ACG :**

***Expérimentations réalisées à l'unité INSERM U1016, CNRS UMR 8104 de l'Institut Cochin***

#### **A. Cultures cellulaires**

Après prélèvement du fragment d'artère temporale au bloc opératoire d'ophtalmologie, ce dernier est disséqué de façon stérile. À l'aide de pinces, l'adventice est séparée de la média. Puis la portion d'artère dépourvue d'adventice est fragmentée en morceaux à l'aide de ciseaux stériles. Quelques fragments millimétriques sont déposés directement dans un puits d'une plaque à douze puits, les autres sont déposés dans un tube de 15 mL contenant 5 mL de DMEM Glutamax II (Gibco®, Invitrogen™, USA) avec de la collagénase de type I (Gibco®, Invitrogen™, USA) à une concentration de 500 unités /mL pour une digestion enzymatique de 3h à 37°C sous agitation douce. Le milieu de digestion contenant les cellules dissociées par la collagénase est ensuite centrifugé à 1200 rpm pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est repris dans un milieu de culture spécifique et les cellules ainsi obtenues sont mises en culture dans un puits de plaque de culture de 12 puits. Le milieu de culture utilisé est le *Muscle Cell Growth* (PromoCell® GmbH, Germany) dans lequel ont été ajoutés, 5% de SVF, 5mL de Pénicilline (10 000 U/mL) et Streptomycine (10 000 µg/mL) (*Penicillin Streptomycin*, Gibco®, Invitrogen™, USA), et 1 % de Fungizone (Amphotericin B, 250 g/mL, Invitrogen™, USA). Les cellules sont ensuite cultivées dans un incubateur à 37 °C dans une atmosphère humide en présence de 5 % de CO<sub>2</sub>. Après le deuxième passage, le milieu de culture utilisé est le DMEM Glutamax II dans lequel est ajouté 10% de SVF, de la pénicilline, de la streptomycine et de la fungizone selon les mêmes modalités que celles décrites ci-dessus.

## **B. Prise en charge des échantillons de sérum, plasma et des cellules mononucléées du sang périphérique**

### **1. Sérums et plasmas**

Les sérums (2 tubes de 7 mL) et les plasmas (2 tubes de 7 mL) sont centrifugés à 2000 rpm pendant 5 mn et le surnageant est placé dans 2 ou 3 cryotubes de 2 mL puis congelés à  $-80\text{ C}^{\circ}$

### **2. Cellules mononucléées du sang périphérique**

Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) de patients sont isolées, par FICOLL afin de constituer une cellulothèque. Ce polysaccharide hydrophile permet de dissocier les composants du sang total en différentes phases. On dépose 5 mL de FICOLL dans un tube de 15 mL (BD) puis on dépose délicatement le long de la paroi du tube les 6 à 7 mL de sang périphérique en évitant de mélanger le sang et le FICOLL. Après une centrifugation à 1600 rpm de 25 minutes, le sérum de l'échantillon est prélevé et l'anneau de PBMC sera lavé dans 50 mL de PBS. Après une nouvelle centrifugation de 1600 rpm pendant 5 mn, les PBMC sont congelées à  $-80\text{ C}^{\circ}$  puis dans de l'azote liquide avec 90% de sérum de l'échantillon et 10% de DMSO.

## **C. Immunofluorescence indirecte**

### **1. Identification du phénotype des cellules de biopsie d'artère temporale de patients suspects d'ACG**

L'identification du phénotype des CMLV a été réalisée par une immunofluorescence indirecte sur lame Labtek II à quatre puits (*Chamber slider system*, Thermo Scientific Nunc, USA). Les cellules provenant d'une artère temporale sontensemencées à raison de 10000 cellules par puits et incubées 48 heures avec du milieu de culture *Smooth Muscle Cell Growth* (Promocell). Le milieu de culture est ensuite retiré et les cellules sont

fixées avec une solution de PFA à 4% (Sigma Aldrich) pendant 10 minutes. Une perméabilisation des cellules est réalisée par une solution de Triton X-100 à 0,2% (Invitrogen) pendant 10 minutes. Les sites de fixation non spécifiques des cellules sont ensuite bloqués par une saturation de deux heures à température ambiante avec une solution d'albumine bovine (*Bovin Serum Albumin* ou BSA) (Sigma Aldrich) à 3% en PBS. L'identification du phénotype des CMLV est faite par un anticorps monoclonal (IgG de souris) anti-actine  $\alpha$  musculaire lisse (anti- $\alpha$  *smooth actin*) dilué au 1/400<sup>ème</sup> (Sigma Aldrich) et un anti-fibroblaste anti-CD90 (anticorps monoclonal IgG de souris) dilué au 1/200<sup>ème</sup> (Dianova, Hambourg, Allemagne) dans la solution de saturation. L'incubation des anticorps primaires est réalisée à 4°C pendant une nuit. L'anticorps secondaire obtenu chez le lapin anti-IgG de souris, dilué à 1/500<sup>ème</sup> dans du PBS, couplé à un fluorochrome FITC (Invitrogen) est incubé pendant 1 heure à température ambiante. Le montage des lames avec une lamelle est ensuite réalisé avec du milieu de montage Vectashield (Vector Labs) avant la lecture des lames par microscopie en fluorescence.

## **2. Recherche d'auto-anticorps anti-CMLV par immunofluorescence indirecte**

Pour rechercher l'existence d'anticorps anti-CMLV dans le sérum des patients atteints d'ACG ou des contrôles, des cellules d'aorte (Promocell) sontensemencées à raison de 10 000 cellules par puits et incubées pendant 48 heures avec du milieu de culture *Muscle Cell Growth*. Le protocole de fixation, de perméabilisation et de saturation des sites non spécifiques est identique au protocole décrit ci-dessus pour le phénotypage des cellules d'artère temporale. Le sérum des patients ou des contrôles, est utilisé à la dilution de 1/200<sup>ème</sup>. L'anticorps secondaire, de chèvre anti-IgG humaine couplé à un fluorochrome FITC (Invitrogen) dilué à 1/1000<sup>ème</sup> dans du PBS, est incubé pendant 1 heure à température ambiante. Une coloration de l'actine est réalisée avec la phalloïdine couplée à la rhodamine (Invitrogen) diluée à 1/800<sup>ème</sup> lors d'une incubation de 20 minutes à température ambiante. Le noyau est ensuite contre-coloré au Hoescht (dilué à 1µg/mL, incubation de 15 minutes). Le montage des lames est ensuite effectué comme précédemment avant analyse en microscopie à fluorescence.

### 3. Recherche d'auto-anticorps anti-CMLV par ELISA

Afin de pouvoir quantifier les anticorps anti-CMLV présents dans le sérum des patients ou des contrôles nous avons mis au point un test ELISA conditionné par des CMLV en plaque de 96 puits à fond plat (Nunc). Les CMLV d'aorte (Promocell) sont déposées à raison de 8000 à 10 000 cellules par puits dans du milieu *Smooth Muscle Cell Growth* (Promocell) et incubées pendant 48 heures à 37°C. Les étapes de fixation, de perméabilisation et de saturation sont identiques au protocole d'immunofluorescence indirecte. Le sérum du patient ou du contrôle est déposée au 1/100 et incubé à 4°C la nuit. Un anticorps secondaire anti-IgG humaine obtenu chez la chèvre, dilué au 1/1000, couplée à la phosphatase alcaline (Sigma Aldrich) est ensuite ajouté et incubé une heure. Secondairement, la réaction colorimétrique est obtenue par ajout du substrat de la phosphatase alcaline (Sigma Aldrich) et les densités optiques sont lues au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 405 nm.



## **IV. Etude des facteurs de croissance neurotrophiques et de leurs récepteurs dans les biopsies d'artères temporales**

*Travaux réalisés dans L'EA 3842*

### **A. Culture cellulaire et phénotypage des cellules étudiées**

La culture des cellules obtenues après dissection et digestion enzymatique d'un fragment d'artère temporale ainsi que le phénotypage par immunofluorescence indirecte des CMLV et des fibroblastes sont réalisées de façon identique aux protocoles élaborés à l'unité INSERM U1016 de l'Institut Cochin.

### **B. Expression protéique des NTs et de leurs récepteurs**

L'étude de l'expression protéique des NTs et de leurs récepteurs par les CMLV a été effectuée par immunohistochimie sur des fragments d'artères temporales incluses dans des blocs de paraffine et par Western Blot à partir de protéines extraites de CMLV provenant de Cochin ou de Limoges.

#### **1. Immunohistochimie**

Les blocs de paraffine de fragment d'artère temporale ont été fournis par le service d'anatomie pathologique et provenaient de patients suspects ou atteints d'ACG. Tous les patients atteints d'ACG étaient suivis en Médecine interne, ce qui permettait d'accéder au cahier de recueil de données pour chaque patient. Vingt deux patients atteints d'ACG et vingt et un sujets contrôles ont été sélectionnés. Pour faciliter les expérimentations d'IHC nous avons adopté l'approche des « *tissue micro array* ». Dans le bloc de paraffine du fragment d'AT du patient ou du contrôle, une à trois carottes de tissu de 0,6 à 2 mm de diamètre sont prélevées dans les zones définies par le pathologiste. Ces carottes de tissu sont alors insérées dans un bloc de paraffine vierge pouvant contenir 10 à 12 échantillons. À partir de ce bloc « TMA », de nouvelles lames sont coupées et traitées

comme des lames histologiques conventionnelles. Des coupes de 4 µm d'épaisseur sont réalisées au microtome. Les lames ont préalablement été maintenues à l'étuve à 56 °C pendant 24h puis à 37°C. Le déparaffinage des tissus a été fait par des bains successifs de Toluène pur (PROLABO®, VWR®). La réhydratation, la perméabilisation des membranes et le démasquage des antigènes a été effectué grâce à des bains successifs d'Ethanol absolu (PROLABO®, VWR®) et de PBS (Gibco®, Invitrogen™, USA), et enfin par immersion des lames dans une solution de tampon citrate (200 µM d'acide citrique dans 9,8 mM de citrate de sodium). L'inhibition des peroxydases endogènes a été réalisée avec du Méthanol-5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (PROLABO®, VWR®). La saturation des sites antigéniques aspécifiques a été réalisée par incubation des lames dans du PBS-BSA 3 % (*Bovine Serum Albumin*, Fraction V, Euromedex®, USA) pendant 30 min. Les anticorps primaires dilués dans du PBS-BSA 3 % ont été incubés pendant une nuit (Tableau 3). L'incubation avec un Ac secondaire couplé à la *Horseradish Peroxidase* (HRP) (Dako®, USA) (Tableau 3) est réalisée pendant 30 min à température ambiante. Après lavages au PBS, une incubation de 5 min avec la DAB (Diaminobenzidine), le substrat de l'HRP, (Chromogen System, Dako®, USA), a été réalisée. La contre-coloration des tissus a été obtenue avec une solution d'Hémalum de Mayer (, MERCK®, Allemagne) et de carbonate de lithium saturé (SIGMA-ALDRICH ®, Gibco®, USA) afin d'améliorer le contraste. La déshydratation des lames a été effectuée par des bains successifs d'Éthanol absolu et de Toluène pur. Les lames ont été étudiées par microscopie optique (Leica®). Une analyse semi-quantitative de l'immunomarquage a été réalisée par deux opérateurs indépendants, en comptant le pourcentage de cellules marquées sur trois zones distinctes d'une coupe d'artère temporale

## **2. Western Blot**

### **a. Extraction protéique**

Après un lavage en PBS, 1 à 1,5 10<sup>6</sup> cellules sont lysées à l'aide d'une aiguille 25 G dans 150 à 200 µL de tampon de lyse (constitué de 5 M NaCl, 1 % NP40, 100 mM NaVO<sub>3</sub>, 100 mM PMSF, 0,5 mM EDTA, 5 mM de tampon Chaps, pH 7,6) pendant 30 minutes sur glace. Le lysat est ensuite centrifugé pendant 10 min à 4°C à 13 000 g. Le surnageant, constitué des protéines cellulaires totales, est conservé à - 80°C.

### **b. Dosage protéique**

Cinq µL de chaque échantillon protéique sont retenus pour l'analyse de la concentration protéique totale selon la méthode colorimétrique de Bradford (Sigma Aldrich). Une gamme étalon est réalisée à partir d'albumine bovine (BSA, Euromedex,

Mundolsheim, France). La réaction colorimétrique est lue à 595 nm (spectrophotomètre Thermo Scientific Multiskan® FC).

### **c. Séparation des protéines par électrophorèse et transfert sur membrane**

Un échantillon de 30 µg de protéines est dilué dans du tampon de Laemmli (Biorad, Marne-la-Coquette, France) puis dénaturé durant 5 min à 95°C. Le mélange obtenu est déposé dans chaque piste. Un marqueur moléculaire (Prestained Protein Ladder Plus, Euromedex) couplé à un chromophore bleu est utilisé comme référence. Les protéines dénaturées sont séparées par électrophorèse selon leur masse moléculaire, dans un gel de polyacrylamide contenant du Sodium Dodecyl Sulfate (SDS-PAGE, Polyacrylamide Gel Electrophoresis). La concentration des gels de polyacrylamide (10 à 12 %) est choisie selon la masse moléculaire de la protéine recherchée. La migration s'effectue à ampérage (30 mA) et voltage constants (150V) pendant 1 heure dans un tampon de migration (Biorad) contenant 25 mM de Tris-base, 192 mM de glycine, et 10 % de SDS (Biorad) à pH 8,3. Après migration les gels sont déposés sur une membrane de PVDF et l'ensemble placé en sandwich entre des feuilles de papier Whatman imbibées de tampon de transfert contenant 25 mM de Tris-base, 192 mM de glycine, et 20% de méthanol. Le transfert est effectué pendant 1h à 20V (Transblot® SD, Semi-dry transfert cell, Bio-Rad).

### **d. Saturation, détection et révélation des protéines d'intérêt**

Afin de bloquer les sites de fixation non spécifique des Ac primaires, les membranes sont incubées dans une solution de saturation (PBS-Tween 0,1 % contenant 5 % de lait écrémé) pendant une heure à température ambiante. Les anticorps primaires sont déposés sur les membranes et incubés 12 heures à 4°C (Tableau 3). Après 3 lavages au TBS-Tween 0,1 %, les membranes sont incubées durant 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire correspondant couplé à la horse radish peroxydase (HRP) (Tableau 3). Après 3 lavages en TBS, les membranes sont révélées à l'aide d'une solution chimiluminescente (Enhanced ChemiLuminescente, ECL reagent, Amersham Life Science, France). Elles sont ensuite scannées et enregistrées à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images (Genesnap, Syngene, Cambridge, UK). La détection de l'actine est systématiquement effectuée afin de comparer les dépôts protéiques de chaque piste. Elle est obtenue avec un Ac monoclonal anti-actine, dilué au 1/10000 (Sigma Aldrich) incubé 30 minutes à température ambiante, et révélé après trois lavages en TBS, par un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris, au 1/1000, incubé 30 minutes.

	Hôte	Epitopes ou cibles	Fournisseur	Référence	Dilution		
					IHC	WB	IFI
<b>Anticorps Primaires Neurotrophines</b>							
NGF (H-20)	Lapin	Pro-NGF (27 kDa) et mature (13 kDa)	Santa Cruz	sc-548	1/100	1/200	
BDNF (N-20)	Lapin	Pro-BDNF (32 kDa) et mature (14 kDa)	Santa Cruz	sc-546	1/100	1/200	
NT3 (N-20)	Lapin	Neurotrophine 3 mature (35kDa)	Santa Cruz	sc-547	1/100	1/200	
<b>Récepteurs aux NTs</b>							
TrkA (763)	Lapin	Extrémité C terminale de TrkA (145 kDa)	Santa Cruz	sc-118	1/100	1/200	
TrkB (H-181)	Lapin	Domaine extra-cellulaire de TrkB (95 et 145 kDa)	Santa Cruz	sc-8316	1/100	1/200	
TrkC (H-300)	Lapin	Extrémité N terminale de TrkC (145 kDa)	Santa Cruz	sc-14025	1/100	1/200	
P75 <sup>NTR</sup> extracellulaire (H-92)	Lapin	Extrémité N terminale de p75NTR (75 kDa)	Santa Cruz	sc-5634	1/100	1/200	
Sortiline	Lapin	Domaine cytoplasmique de la sortiline	Abcam	ab75172	1/150		
Sortiline (C-20)	Chèvre	Extrémité N terminale de la sortiline (95 kDa)	Santa Cruz	sc-25055		1/100	
<b>Phénotypage et contrôles</b>							
$\alpha$ -smooth actine	Souris	Extrémité N-terminale de l' $\alpha$ -smooth actin	Sigma Aldrich	F3777			1/500
CD 90	Souris	CD 90 (thy-1)	Dianova	DIA 120			1/200
Actine	Souris	Extrémité N-terminale de l'actine	Sigma Aldrich	A5441		1/10000	
<b>Anticorps secondaires couplés HRP</b>							
	Chèvre	anti-Ig souris	Dako		1/250	1/1000	
	Chèvre	anti-Ig lapin	Dako		1/100	1/1000	
	Lapin	anti-Ig chèvre	Dako		1/100		

**Tableau 4 :** Anticorps primaires et secondaires utilisés en immunofluorescence indirecte, en immunohistochimie et Western Blot

## C. Expression des transcrits des NTs et de leurs récepteurs

### 1. Extraction d'ARNm

L'extraction des ARN totaux à partir de culots cellulaires a été réalisée grâce au kit SV Total Isolation System (Promega®, USA) et à l'utilisation de  $\beta$ -mercaptoéthanol. Le culot a été remis en suspension dans 30 $\mu$ L d'eau *RNase free*. La pureté et la quantification des échantillons ont été mesurées par spectrophotométrie (Nanodrop®, ND 1000) à partir de l'absorbance. Les échantillons d'ARN ont ensuite été conservés au congélateur à -80 °C.

## 2. RT-PCR

Nous avons synthétisé de l'ADNc à partir des échantillons d'ARN afin d'analyser et de quantifier l'expression des gènes des :

- NTs : NGF, BDNF et NT-3
- Des récepteurs des NTs : TrkA, TrkB, TrkC, p75<sup>NTR</sup> et Sortiline

Le tableau 4 montre les couples d'oligonucléotides utilisés pour la RT-PCR.

Le volume d'ARN à prélever a été calculé de façon à obtenir pour chaque échantillon. une concentration finale de 1000 ng/μL pour un volume final de 20μL. La réaction de la transcriptase inverse a été préparée selon le *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems®, USA) (MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50U/μL) et réalisée grâce à un thermocycleur (UnoCycler, VWR™, UK). Les ADNc obtenus ont été directement utilisés pour les PCR ou conservés à -20 °C jusqu'à utilisation.

## 3. Électrophorèses

Les électrophorèses des produits de PCR ont été réalisées avec un gel d'agarose (SeaKem®LE Agarose Lonza, USA) à 2 %, avec du tampon 10X TAE Buffer (Ambio®, USA) et 1μL de BET (*Ethidium Bromide solution*, 10mg/ml, Invitrogen™, USA). Marqueurs de tailles utilisés : 4μL (un puits) de GeneRuler 100bp DNA Ladder (0,1μg/mL) (Fermentas, France). Du bleu de bromophénol 6X (Promega, USA) 4μL par piste a été ajouté aux 20 μl d'échantillon. La migration s'est faite sous une tension de 100 Volts pendant 40 min. La révélation au BET a été obtenue par une exposition aux rayonnements ultraviolets à l'aide de l'appareil G : BOX (SYNGENE®, OZYME™, France).

## 4. PCR quantitative (qRT-PCR)

Des qRT-PCR ont été réalisées avec des plaques 96 puits conditionnées avec des amorces et des sondes lyophilisées (TaqMan® Array 96 – Well FAST Plate). Les qRT-PCR ont été faites dans un volume réactionnel de 10μL composé de : 2 μL d'ADNc et 8 μL de Master Mix (TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix [2X], No AmpErase®UNG, Applied Biosystems®, USA). Une sonde TaqMan® (sonde fluorescente 5'FAM (6-carboxyfluorescein)-3'MGB (*Minor groove binding*) (Applied biosystems®, USA) a été

utilisée. Les amorces ont été établies par le fournisseur Applied biosystems® (NGF : Hs.2561 ; BDNF : Hs 00380947\_m1 ; NT-3 : Hs.99171 ; TrkA : Hs.406293 ; TrkB145: Hs 01093096\_m1 ; TrkC : Hs.410969 ; p75<sup>NTR</sup>: Hs 00609976\_m1 ; Sortiline: Hs 00907094\_m1; 18s : Hs99999901\_s1 ; GAPHD : Hs.544577, HPRT : Hs02800695\_m1) Les plaques ont été analysées avec le système Step One Real Time PCR (Applied Biosystems®). Chaque échantillon a été analysé en duplicate. Conditions de qRT-PCR : 95°C-10min (1cycle) / 94°C-15sec, 55°C-30sec, 72°C-30sec (40cycles) / 72°C-10min (1cycle) suivi par une courbe de fusion, les réactions ont été maintenues à 4°C jusqu'à analyse des résultats. L'analyse de la fluorescence a permis de déterminer le cycle seuil (Ct). La quantification relative des produits de PCR pour chaque échantillon a été déterminée grâce aux valeurs des Ct. Les valeurs ont été normalisées par rapport à celles du gène HPRT qui a servi de contrôle interne. Ces valeurs de Ct entre patients atteints d'ACG et sujets contrôles ont ensuite été comparées, et l'expression des gènes d'intérêt a été calculée selon la méthode comparative utilisant la formule  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Oligonucléotides	Nom du gène	Séquences	Taille du fragment amplifié (pb)	HT (°C)
<b>BDNF forward</b>	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>	5'-TACTTTGGTTGCATGAAGGCTGCC-3'	266	58
<b>BDNF reverse</b>		5'-ACTTGACTACTGAGCATCACCTG-3'		
<b>TrkB 145 forward</b>	<i>Tropomyosin-related kinase B</i>	5'-AGGGCAACCCGCCACGGAA-3'	571	62,6
<b>TrkB 145 reverse</b>		5'-GGATCGGTCTGGGGAAAAG-3'		
<b>TrkB 95 forward</b>		5'-GTTTCATAAGATCCCCTGGA-3'	261	58
<b>TrkB 95 reverse</b>		5'-TGCTGCTTAGCTGCCTGAGAG-3'		
<b>GAPDH forward</b>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	5'-GGGTGGAATCATATTGGAACATG-3'	150	58
<b>GAPDH reverse</b>		5'-GTCGGAGTCAACGGATTGG-3'		
<b>NGF forward</b>	<i>Nerve growth factor</i>	5'-ATACAGGCGGAACCACACTC-3'	313	58
<b>NGF reverse</b>		5'-TGCTCCTGTGAGTCTCTGTTG-3'		
<b>TrkA forward</b>	<i>Tropomyosin-related kinase A</i>	5'-TCAACAAATGTGGACGGAGA-3'	197	58
<b>TrkA reverse</b>		5'-GTGGTGAACACAGGCATCAC-3'		
<b>NT-3 forward</b>	<i>Neurotrophin-3</i>	5'-TGGCATCCAAGGTAACAACA-3'	229	58
<b>NT-3 reverse</b>		5'-GGTGTCATTGCAATCACTG-3'		
<b>TrkC forward</b>	<i>Tropomyosin-related kinase C</i>	5'-ACTTCCGTCAGGGACACAAC-3'	219	58
<b>TrkC reverse</b>		5'-CCTCCCTCTGAAATCCTTC-3'		
<b>p75<sup>NTR</sup> forward</b>	<i>p75 neurotrophin receptor</i>	5'-GTGGGACAGAGTCTGGGTGT-3'	200	60
<b>p75<sup>NTR</sup> reverse</b>		5'-AAGGAGGGGAGGTGATAGGA-3'		

**Tableau 5** : Couples d'oligonucléotides utilisés en RT- PCR

Les séquences des transcrits des neurotrophines et de leurs récepteurs, la température d'hybridation (HT : *hybridation temperature*) ainsi que la taille du produit de PCR sont présentés dans ce tableau.

## D. Quantification du NGF et BDNF par technique ELISA.

Les concentrations du NGF et du BDNF dans le sérum des patients atteints d'ACG ont été mesurées et comparées à celles des sujets contrôles. Ces mesures ont été également réalisées dans le surnageant des CMLV des patients en culture entre P3 et P8 à 80% de confluence et comparées à celui des sujets contrôles dans les mêmes conditions. Nous avons utilisé la méthode immunoenzymatique « Emax ® Immunoassay System » (Promega) selon les protocoles du fournisseur. Ce procédé permet une détection sensible et spécifique de ces NTs par la méthode ELISA « sandwich ». Le seuil de détection de ces deux tests est respectivement de 4 et 15 pg/mL avec une réactivité croisée inférieure à 3 %. Les deux méthodes sont identiques et diffèrent par la spécificité des anticorps utilisés pour l'ELISA : anticorps anti-NGF ou anticorps anti-BDNF pour les dosages de NT correspondante. La sensibilisation des plaques, Nunc Maxisorp, à 96 puits (VWR Fontenay sous-Bois, France) est obtenue avec une solution de tampon carbonate (sodium bicarbonate 0,025 M, sodium carbonate 0,025 M, Sigma Aldrich) contenant soit un Ac polyclonal anti-NGF soit un Ac monoclonal anti-BDNF pendant 12 heures à 4°C. Après 4 lavages en TBS-0,1 % Tween, les plaques sont incubées en tampon de saturation « *block and sample buffer* » à température ambiante pendant une heure. Les échantillons, dilués au 1/100, sont analysés en duplicate et comparés aux courbes d'étalonnage effectuées pour le NGF et le BDNF standard. Après 6 heures d'incubation à température ambiante sous agitation douce et 4 lavages en TBS-0,1 % Tween, la plaque est incubée soit avec un Ac monoclonal anti-NGF soit avec un Ac polyclonal anti-BDNF à 4°C pendant 12 heures puis lavée 5 fois en TBS-0,1 % Tween. Une nouvelle incubation avec un Ac secondaire conjugué à la peroxydase est réalisée pendant 2 heures 30 à température ambiante sous agitation douce suivie de 5 lavages en TBS-0,1 % Tween. La révélation est obtenue par une solution de tétraméthylbenzidine (TMB), substrat de la peroxydase, en 10 à 40 minutes à l'obscurité, jusqu'à l'obtention de la réaction colorimétrique. La réaction est ensuite arrêtée par l'ajout de 100 µL d'acide chlorhydrique molaire (SigmaAldrich). L'absorbance est mesurée à 450 nm par spectrophotométrie (Thermo Scientific Multiskan® FC).



## E. Etude de la fonctionnalité des NTs

### 1. Test de viabilité cellulaire par XTT

Ce test colorimétrique permet de mesurer la viabilité cellulaire en déterminant l'activité des déshydrogénases mitochondriales. Le test est basé sur la réduction d'un sel de tétrazolium (XTT) par les déshydrogénases mitochondriales, libérant un sel coloré, le formazan. Les cellules sont déposées à la densité de 5000 cellules/puits en plaque 96 puits dans différentes conditions pendant 48 H en duplicate : 1) milieu DMEM sans SVF seul ou 2) avec du NGF exogène (Alamone), 3) du BDNF exogène humain (Promega), 4) du PDGF (R&D Systems) 5) avec un inhibiteur pharmacologique des récepteurs Trk des neurotrophines, le K252a (0,1 mg, Alamone labs®, UK), 6) un anticorps bloquant de p75<sup>NTR</sup> (Alamone) (anti-p75<sup>NTR</sup>). Une gamme de concentrations a été effectuée pour chacune des conditions étudiées. Cinquante µL de substrat colorimétrique (Cell Proliferation Xit II, XTT Roche) sont ajoutés dans chaque puits et laissés au contact des cellules pendant 4 heures. L'intensité de la réaction colorimétrique est mesurée à 450 nm par spectrophotométrie (Thermo Scientific Multiskan® FC).

### 2. Test de prolifération cellulaire par BrdU

Un test de prolifération cellulaire des CMLV de patients et de sujets contrôles a été réalisé en plaque de 96 puits, par la détection de la quantité de 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporée dans l'ADN au cours de la phase S, selon les recommandations du fournisseur (*BrdU Cell Proliferation Assay Kit*, Cell Signaling Technology®, USA). Au préalable, 5000 cellules ont été déposées par puits et cultivées à 37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub> pendant 48, 72 et 96 heures selon les conditions d'activation ou d'inhibition suivantes : 1) milieu DMEM sans SVF seul ou 2) avec du NGF exogène (Alamone), 3) du BDNF exogène humain (Promega), 4) du PDGF (R&D Systems) 5) avec l'inhibiteur pharmacologique des récepteurs Trk, K252a (0,1 mg, almone labs®, UK), 6) l'Ac inhibiteur de p75<sup>NTR</sup> (anti-p75<sup>NTR</sup>) (Alamone), ou une combinaison concomitante de NTs et d'inhibiteurs des récepteurs aux NTs : 8) NGF+K252a ; 9) NGF+anti-p75<sup>NTR</sup> ; 10) BDNF+K252a ; 11) BDNF+anti-p75<sup>NTR</sup>. Le BrdU a été ajouté et incubé pendant 4 heures à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub> pour chacune de ces conditions. Après retrait du milieu contenant

le BrdU et un lavage avec la solution fournie, les cellules sont fixées et l'ADN dénaturé après une incubation de 30 mn à température ambiante. Un anticorps anti-BrdU de souris dilué au 1/100 est ajouté et incubé pendant une heure à température ambiante. Après trois lavages, un Ac secondaire couplé à la HRP dilué au 1/100 est ajouté pendant 30 mn à température ambiante. La révélation s'effectue avec une solution de TMB incubée 15 à 30 mn jusqu'à l'obtention de la réaction colorimétrique qui sera arrêtée par la solution fournie. La lecture de la densité optique est réalisée par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450 nm (Thermo Scientific Multiskan® FC).

### 3. Test de migration cellulaire

Pour ce test nous avons utilisé les chambres de Boyden « *Matrigel Invasion Chambers* » (BD) en plaque de 24 puits dont les puits sont recouverts d'un filtre poreux (pores de 8µm de diamètre) contenant du matrigel et délimitant un compartiment supérieur et inférieur. Les CMLV des patients ou des sujets contrôles sont déposées à raison de 10 000 cellules dans le compartiment supérieur des chambres. La partie inférieure contenait soit du DMEM sans SVF seul (500µL) ou avec une solution chémoattractante : i) NGF exogène (Alamone) à 10 ng/mL, ii) du BDNF exogène humain (Promega) à 200 ng/mL, iii) du PDGF à 40 ng/mL (R&D Systems) en duplicate. Après une incubation de 24 à 48H, 8µl d'acetoxymethyl ester de calcéine couplée à un colorant fluorescent (*calcein AM fluorescent dye*, BD) sont ajoutés et incubés pendant 15 mn dans le milieu du compartiment inférieur. Le milieu du compartiment supérieur est retiré et les CMLV qui n'ont pas migré, déposées à la partie supérieure du filtre poreux sont délicatement retirées. La calcéine incorporée dans les CMLV est hydrolysée par des estérases intracellulaires libérant ainsi une fluorescence visible au microscope à fluorescence à une longueur d'onde de 488 nm. Les CMLV en migration sont celles présentes dans la partie inférieure du filtre poreux ou piégées dans les pores. La migration est quantifiée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 494 / 517 nm.

# Résultats

## I. Caractérisation d'anticorps anti-CMLV dans le sérum des patients atteints d'ACG

L'idée de rechercher des auto-Ac dans l'ACG repose sur plusieurs constats. La découverte dans le sérum de patients atteints d'ACG, lors d'une analyse du répertoire B, d'anticorps dirigés contre certaines protéines comme la lamine C, la cytokératine 15 ou la sous-unité II du cytochrome oxidase mitochondrial [3] suggérait déjà une autoimmunité possible dans cette maladie. L'existence d'Acs anti-cardiolipine dans le sérum de ces patients a été rapportée dans plusieurs publications [4-5, 101-102, 434]. Leur présence serait plutôt réactionnelle aux lésions endothéliales survenant au cours de l'ACG [5]. Par ailleurs l'activation des CE par le processus inflammatoire favorise l'expression de phospholipides anioniques à leur membrane facilitant ainsi l'induction d'une auto-immunité. La pathogénicité des ces Acs reste discutée. En effet des anticorps induits secondairement peuvent s'avérer être pathogènes *in vitro* comme pour les Acs anti-Fas détectés au cours de la sclérose latérale amyotrophique ([435]. De plus Prasad et al. avaient montré que des Acs anti-Fas, présents dans des préparations d'immunoglobulines intraveineuses obtenues à partir d'IgG de sujets sains, pouvaient induire l'apoptose de lymphocytes et de monocytes [436]. Ainsi du fait des phénomènes d'apoptose qui touchent les CMLV et les CE au sein de l'artère temporale des patients atteints d'ACG, il paraissait pertinent de rechercher, des Acs dirigées contre les CMLV et les CE et d'essayer par la suite d'identifier leurs cibles antigéniques (article 1). Par ailleurs la recherche d'un bio-marqueur est un enjeu majeur dans l'ACG. Il pourrait aider au diagnostic et permettre dans certains cas de différer la BAT. Dans les vascularites nécrosantes, l'apport diagnostique des anticorps anti-cytoplasmes des polynucléaires est devenu majeur même si une confirmation histologique d'angéite nécrosante reste nécessaire. Nous avons voulu confirmer les données d'une étude récente [103] qui semblait identifier les anticorps dirigés contre la chaîne lourde de la ferritine comme marqueur spécifique de l'ACG (article 2).

## **A. Article 1:** «Identification of target antigens of anti-endothelial cell

and anti-vascular smooth muscle cell antibodies in patients with giant cell arteritis: a proteomic approach. Régent A, Dib H, Ly KH, Agard C, Tamby MC, Tamas N, Weksler B, Federici C, Broussard C, Guillevin L, Mouthon L. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(3): R107 »

### **Résumé :**

L'objectif de ce travail était d'identifier des anticorps dirigés contre les cellules endothéliales (CE) et contre les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) chez des patients atteints d'ACG et de caractériser les cibles antigéniques en utilisant des techniques d'immunoblotting après électrophorèses mono- et bidimensionnelle et analyses en spectrométrie de masse.

Les sources d'antigènes provenaient de protéines extraites de CE de veine ombilicale humaine (HUVEC) et de CMLV d'artères mammaires internes. Les sérums de 15 patients atteints d'ACG ont été testés sous forme de 5 pools de 3 sérums et comparé à un pool de 12 sérums de sujets sains. Les Ac anti-CE et anti-CMLV ont été recherchés à l'aide d'une technique d'immunoblot en 1 puis en 2 dimensions suivie d'une identification des cibles antigéniques par spectrométrie de masse.

Il a été mis en évidence des réactivités IgG nombreuses dont certaines très intenses et spécifiques de sérums de patients testés en immunoblot 1 D. En immunoblot 2D, les IgG des pools de sérums de patients atteints d'ACG reconnaissent en moyenne  $163 \pm 3$  et  $100 \pm 17$  spots protéiques d'HUVEC et de CMLV respectivement, contre 79 et 94 chez les sujets sains. Pour les HUVEC, 30 spots protéiques ont été reconnus par au moins 2/3 des IgG des pools de sérums de patients atteints d'ACG. Pour les CMLV, 3/5 des IgG des pools de sérums de patients ont reconnu 19 spots protéiques. Aucune de ces réactivités protéiques d'HUVEC ou de CMLV reconnues par les sérums de patients n'étaient reconnues par ceux de sujets sains. Parmi tous ces spots protéiques, certains ont été identifiés par spectrométrie de masse. Il s'agissait de protéines impliquées dans le métabolisme énergétique et la signalisation cellulaire, parmi lesquelles ont été identifiées la vinculine, la lamine A/C, la protéine du Canal Anionique Voltage-Dépendant 2 (VDAC2) et l'annexine V. En utilisant le logiciel « Ingenuity pathway analysis », qui réalise un traitement bio-informatique permettant de transformer une liste linéaire de protéines identifiées en sous-ensembles classés par fonctions et interactions, il semble que la plupart des cibles antigéniques identifiées interagissent avec la protéine adaptatrice de facteur de croissance Grb2 « Growth factor Receptor-Bound protein 2 »

Certaines cibles antigéniques des IgG anti-CE et anti-CMLV au cours de l'ACG ont été identifiées. Ces protéines semblent impliquées dans l'homéostasie et la signalisation cellulaire. Le rôle de ces protéines dans la physiopathologie de l'ACG reste encore à préciser.

---

---

**B. Article 2:** "Contribution of anti-ferritin antibodies to diagnosis of giant cell arteritis. Régent A, Ly KH, Blet A, Agard C, Puéchal X, Tamas N, Le-Jeune C, Vidal E, Guillevin L, Mouthon L. Ann Rheum Dis. 2013 Apr 10. Epub ahead of print »

**Résumé :**

Des anticorps dirigés contre un peptide de la chaîne lourde de la ferritine humaine (FTH1) ont été récemment identifiés chez 92% des patients ayant une ACG contre 1 % des donneurs de sang [103]. L'objectif de ce travail était d'évaluer l'intérêt diagnostique et/ou pronostique du dosage des anticorps anti-FTH1 dans une cohorte de patients suspects d'ACG.

Nous avons utilisé les sérums de 122 patients consécutifs suspects d'ACG prélevés au moment de la BAT issus de la cohorte incluse dans la collection biologique Cochin-Limoges. Le diagnostic retenu était une ACG avec (ACG+BAT+) ou sans (ACG+BAT-) preuve histologique chez 40 et 29 patients, respectivement, une pseudo-polyarthrite rhizomélitique sans ACG chez 6 patients et un autre diagnostic que l'ACG chez 47 patients (groupe ACG-). Quarante sérums provenant de donneurs de sang ont été utilisés comme contrôle négatif. Les IgG dirigées contre un peptide comprenant les acides aminés 19-45 de FTH1 ont été recherchés par technique ELISA. La présence ou non d'anticorps anti-FTH1 a été analysée en comparaison avec les données clinico-biologiques des patients atteints d'ACG. Le délai médian et moyen entre le début de la corticothérapie systémique et la réalisation de la BAT était respectivement de 0 et 3,9 jours.

Un seuil de densité optique moyenne des sujets sains placé à +2 DS a été utilisé. Avec ce seuil, nous avons détecté des anticorps anti-FTH1 chez 72,5%, 41,3%, 31,9% et 2,5% des patients des groupes ACG+BAT+, ACG+BAT-, ACG- et des sujets sains, respectivement. Chez les patients ACG+BAT+ n'ayant pas reçu de corticoïdes avant la BAT, 82% d'entre eux avaient des anticorps anti-FTH1 contre 34% des patients ACG-. La valeur prédictive positive et négative de ce test était respectivement de 71.9% et 56.9% chez l'ensemble des patients atteints d'ACG (ACG+BAT+ et ACG+BAT-). Aucune corrélation entre la présence de ces anticorps et les manifestations cliniques n'a été observée. Chez les patients atteints d'ACG positifs pour les anticorps anti-FTH1, la vitesse de sédimentation et la CRP semblent plus élevés ( $p=0.003$  et  $p=0.01$  respectivement) et le taux d'hémoglobine plus bas ( $p=0.01$ ).

Ces résultats diffèrent de ceux de Baerlecken et al. En effet, avec environ 32 % de positivité dans le groupe ACG-, la contribution de ce test dans le diagnostic d'ACG paraît limitée.

## **II. Etude de l'implication des NTs et de leurs récepteurs dans la pathogénie du remodelage vasculaire de l'ACG**

Nous avons dans la première partie de ce travail identifié des autoanticorps dirigés contre les CMLV. En utilisant des banques de données informatisées (Ingenuity Pathway), nous avons identifié que les cibles de ces autoanticorps étaient impliquées dans la prolifération des CMLV et le remodelage vasculaire. Parmi elles on peut citer des protéines entrant dans la constitution des points focaux d'adhésion comme la vinculine ou la paxilline. Ces dernières interagissent communément avec la protéine adaptatrice Grb2. Cela nous a tout naturellement amené à mettre en place une collection biologique de CMLV mises en culture à partir de BAT effectuées dans le cadre du diagnostic d'ACG, afin de mieux comprendre les mécanismes participant à ces phénomènes de remodelage vasculaire et le lien entre nos cibles antigéniques identifiées et les facteurs de croissance présents au sein de l'artère avec comme chef de file, le PDGF. En effet ce dernier stimule la prolifération de CMLV de rat en activant la protéine Grb2. Cette activation est dépendante de la protéine de signalisation Shc [437]. Par ailleurs Grb2 peut être activée par d'autres facteurs de croissance comme le Fibroblast growth factor (FGF) ou le NGF. Contrairement au PDGF, le FGF et le NGF peuvent activer le complexe Grb2/Sos en association avec la tyrosine phosphorylée Frs2 et faciliter ainsi une signalisation Ras/MAPK essentielle pour la prolifération de lignées cellulaires de fibroblastes (NIH-3T3), de myoblastes (L6) ou de phéochromocytome de rat (PC 12) [438]. De plus le NGF peut stimuler la phosphorylation de la paxilline dans les cellules PC12 [439] et dans les lymphocytes B [440]. Le NGF n'agit pas que sur la paxilline mais aussi sur les autres protéines des points focaux d'adhésion comme la vinculine [441]. Ces différentes protéines ainsi activées par le NGF participent la croissance neuronale des PC12 [441]. Au vu de ces résultats il semblait donc intéressant d'étudier l'implication des neurotrophines dans le remodelage vasculaire au cours de l'ACG, du fait de leurs interactions avec les cibles antigéniques que nous avons identifiées. Cette partie du travail de thèse repose en grande partie sur les CMLV cultivées à partir de patients suspects d'ACG pour qui une BAT a été réalisée. Entre janvier 2010 et février 2013, cent cinquante-sept patients ont subi une BAT pour une suspicion de GCA. La culture de CMLV a été possible pour 57 sujets. Parmi eux il y avait 14 patients atteints d'ACG avec



une BAT positive, 8 patients ACG avec une BAT négative et 35 sujets contrôles. Malheureusement, seulement 23 échantillons étaient exploitables pour réaliser les expérimentations de cette thèse qui ont donc porté sur 6 patients ACG BAT+ et 10 sujets contrôles. Les CMLV de patients ACG BAT- n'ont pas été étudiées dans ce travail. Parmi les patients atteints d'ACG BAT+, la culture était plus souvent positive chez ceux présentant une CRP élevée (125 mg/L contre 74 mg/L  $p=0,04$ ). Dans ce groupe, aucune autre corrélation avec une culture positive n'a été observée que ce soit pour les manifestations cliniques, la survenue de complications ischémiques les paramètres biologiques autres que la CRP. La corticothérapie débutée avant la réalisation de la BAT n'a pas eu d'influence sur la culture des CMLV d'artères temporales. Ainsi à partir de ces CMLV nous avons pu entreprendre les expérimentations qui ont permis d'élaborer l'article 3.

**A. Article 3:** "Neurotrophins are involved in vascular remodeling of giant cell arteritis. Kim Heang Ly, Alexis Régent, Elsa Molina, Philippe Sindou, Claire Le-Jeune, Antoine Brezin, Véronique Witko-Sarsat, François Labrousse, Pierre-Yves Robert, Anne-Laure Fauchais, Elisabeth Vidal, Luc Mouthon, Marie-Odile Jauberteau » (manuscript soumis pour publication)

**Résumé:**

Dans le système cardio-vasculaire, les NTs et leurs récepteurs sont impliqués dans le développement cardiovasculaire, la croissance des vaisseaux et la régulation des fonctions des CMLV et des cardiomyocytes [322]. Les NTs et leurs récepteurs sont détectés *in vivo* et *in vitro* dans les CMLV aortiques et les CE humaines et de rat [7]. Dans ce contexte le NGF favorise la migration des CMLV mais pas leur prolifération [7] [166]. Le NGF, le BDNF et leurs deux récepteurs Trk spécifiques sont impliqués dans l'hyperplasie intimale aortique expérimentale induite chez le rat [7]. En outre, le récepteur  $p75^{\text{NTR}}$  est surexprimé dans les lésions athéroscléreuse coronaires [167] et l'activation de  $p75^{\text{NTR}}$  par le NGF, la NT-3 et dans une moindre mesure, le BDNF, induit l'apoptose des CMLV [168]. Ainsi, les NTs jouent un rôle important dans la régulation fonctionnelle des CMLV notamment dans des conditions pathologiques telles que l'athérosclérose.

A partir d'une collecte prospective de CMLV issues de biopsie d'artère temporale (TASMC) chez des patients suspects d'ACG, nous avons étudié l'implication des NTs et de leurs récepteurs dans la physiopathologie du remodelage vasculaire de l'ACG.

Nous avons montré qu'en immunohistochimie, les NTs et leurs récepteurs étaient surexprimés dans les artères temporales de patients atteints d'ACG (n=22) par rapport à

celles des sujets contrôles (n=21). Cette surexpression concernait le NGF, le BDNF, le TrkB et la sortiline. Sur le plan semi-quantitatif elle était plus intense dans l'adventice ( $76,2 \pm 19\%$  contre  $35,4 \pm 22\%$ ,  $p = 0,0018$ ) et la média ( $59,6 \pm 25\%$  contre  $26 \pm 22\%$ ,  $p = 0,004$ ) pour le NGF ; dans la média ( $82 \pm 21\%$  contre  $26,5 \pm 27\%$ ,  $p < 0,0001$ ) et l'intima ( $78 \pm 20$  contre  $36 \pm 27$ ,  $p = 0,0007$ ) pour le BDNF ; dans la média ( $80 \pm 13\%$  contre  $40 \pm 40\%$ ,  $p=0,04$ ) et l'intima ( $70 \pm 14\%$  contre  $28 \pm 32\%$ ,  $p=0,01$ ) pour TrkB et dans l'adventice ( $31 \pm 28\%$  contre  $2 \pm 4\%$ ,  $p = 0,0036$ ) et l'intima ( $41 \pm 14\%$  contre  $27 \pm 14\%$ ,  $p = 0,02$ ) pour la sortiline. Les récepteurs TrkA et TrkC n'ont été détectés dans aucune des artères temporales des deux groupes. Enfin seules les artères temporales des patients atteints d'ACG exprimaient la NT3 et le récepteur p75<sup>NTR</sup>. Nous avons découvert également que la surexpression de TrkB semble être corrélée avec la survenue de complications ischémiques (AVC, amaurose, ou cécité) avec une surexpression significative au niveau de média et l'intima ( $p=0,04$  et  $p=0,015$  respectivement) dans le groupe des patients ACG avec complications ischémiques.

Nous avons ensuite étudié l'expression des NTs et de leurs récepteurs sur les TASM de 6 patients atteints d'ACG avec BAT+ et 10 sujets contrôles. Par Western Blot, le NGF, le BDNF, les récepteurs TrkB, p75<sup>NTR</sup> et la sortiline sont été détectés dans les TASM de deux groupes contrairement aux récepteurs TrkA et TrkC. En revanche, la protéine NT-3 n'est détectée que chez les patients atteints d'ACG. Parallèlement nous avons confirmé par RT-PCR que l'ARNm du NGF, de BDNF, de TrkB et de p75<sup>NTR</sup> étaient présents mais pas celui de TrkA. Du fait de discordance entre l'expression protéique et d'ARNm de certaines NTs notamment la NT-3 et son récepteur TrkC, nous avons réalisé une PCR quantitative qui a montré que la NT-3, les récepteurs TrkB, TrkC et la sortiline étaient plus de cinq fois plus exprimés dans les TASM de patients atteints d'ACG que dans les patients contrôles; toutefois cette différence n'est pas significative.

Les effets sur la prolifération et sur la migration cellulaire induites par les NTs ont ensuite été évalués par méthode de viabilité cellulaire (XTT), d'étude de la synthèse d'ADNc (incorporation de BrdU) et méthode de chambre de Boyden. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes concernant l'effet prolifératif des NTs. En revanche le BDNF semble activer la migration des TASM de patients atteints d'ACG par rapport à celle des contrôles après une exposition de 24 h ( $p = 0,0119$ ). Par ailleurs les TASM de patients atteints d'ACG présentent une migration plus importante en présence de SVF 10% et de PDGF en comparaison au groupe contrôle ( $p=0,0175$  et  $p<0,0001$  respectivement). L'effet de migration cellulaire induite par le BDNF, observé après une exposition de 24h, disparaît après 48h d'incubation. Aucune différence n'a été notée entre les deux groupes concernant l'effet du NGF exogène sur la migration cellulaire.

Enfin nous avons dosé le NGF, le BDNF et la NT-3 dans le sérum et la surnageant des TASMIC chez les deux groupes. Les patients atteints d'ACG (n=30) avaient une plus forte concentration sérique de NGF que les sujets contrôles (n=48) ( $177 \pm 67,6$  pg / mL vs  $145,5 \pm 66$  pg / ml,  $p = 0,04$ ) alors qu'il n'existait aucune différence pour les concentrations sériques du BDNF. Nous n'avons pas trouvé de corrélation entre les concentrations sériques du NGF ou du BDNF et les complications ischémiques ou le syndrome inflammatoire. Dans le surnageant des TASMIC, la concentration de NGF a tendance à être plus élevée chez les patients ( $p = 0,06$ ) alors qu'aucune différence n'a été notée pour le BDNF.

En conclusion notre étude montre que les NTs et leurs récepteurs sont impliqués dans le remodelage vasculaire de l'ACG. Ils sont surexprimés au sein des artères temporales des patients atteints d'ACG. Cette surexpression est présente au niveau des CMLV dont la migration, de la média vers l'intima, est facilitée notamment par le BDNF. Cet effet semble être corrélé avec la survenue de complications ischémiques par l'intermédiaire de la surexpression de TrkB dans la média et l'intima. Des investigations complémentaires sont nécessaires pour comprendre plus précisément les mécanismes qui sous tendent le remodelage vasculaire dépendant des neurotrophines.

### **III. Résultats complémentaires**

En plus des 2 axes de recherche décrits précédemment, la recherche d'un biomarqueur et de l'implication des NTs dans le remodelage vasculaire de l'ACG, nous avons exploré au cours de ce travail de thèse d'autres pistes prometteuses dans le but d'appréhender au mieux la physiopathologie de l'ACG. Nous avons ainsi exploré plus en avant :

- Le rôle de l'endothéline et de ses récepteurs dans le remodelage vasculaire de l'ACG
- Les effets de l'interleukine-1 $\beta$  sur les CMLV des patients atteints d'ACG
- L'implication des exosomes dans la pérennisation de la réponse inflammatoire au sein de l'artère temporale pathologique

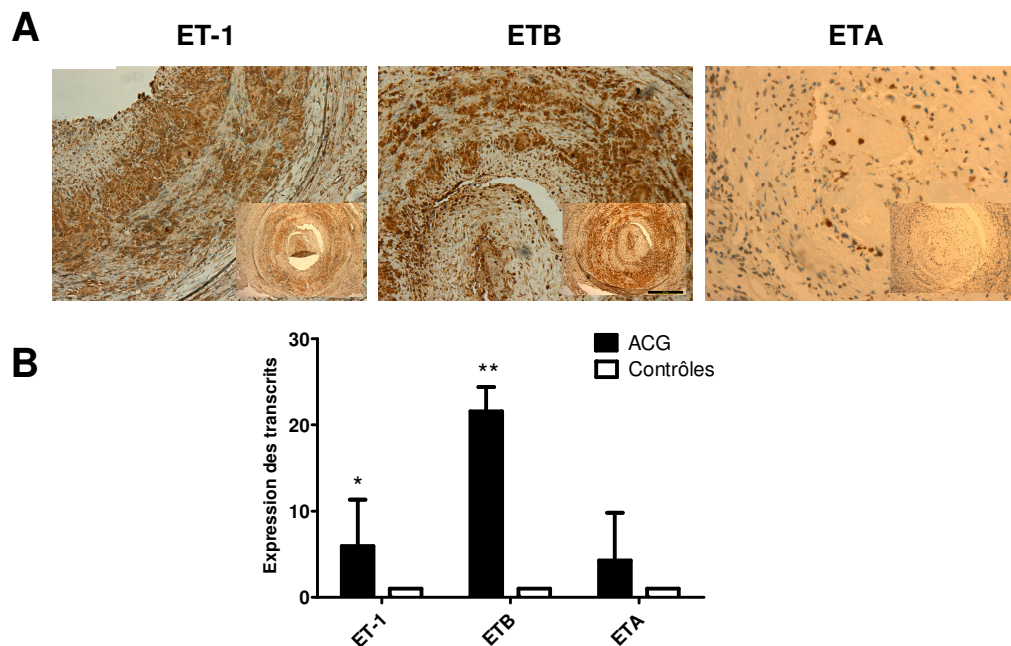
#### **A. Rôle de l'endothéline et de ses récepteurs dans le remodelage vasculaire de l'ACG**

Les endothélines appartiennent à une famille de peptides de 21 acides aminés ayant une action vasoconstrictrice puissante et durable. L'endothéline-1 (ET-1) est l'isopeptidique prédominante produite par l'endothélium vasculaire et est également produite par les macrophages activés et les CMLV [442-443]. Les mammifères possèdent deux récepteurs principaux à l'ET-1: i) le récepteur B à l'ET (ETB) qui se trouve principalement sur les CE et qui induit une vasodilatation transitoire via la voie du monoxyde d'azote et protège de l'apoptose ii) le récepteur A à l'ET (ETA) qui se trouve principalement sur les CMLV et qui induit une vasoconstriction, une prolifération et une migration [444-445]. Divers stimuli modulent l'expression et la libération de l'ET-1, comme le transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), l'IL-1, l'angiotensine II et les contraintes de cisaillement [442, 446]. L'ET-1 interagit avec les cellules dans le sang périphérique car elle est un facteur chimiotactique pour les macrophages; elle stimule l'adhérence des neutrophiles et l'agrégation des plaquettes [442, 446]. L'ET-1 stimule la production de certaines cytokines ou facteurs de croissance comme le TNF- $\alpha$  ou le VEGF et renforce les effets du TGF- $\beta$  et du PDGF sur les CMLV [447-450]. L'endothéline et ses récepteurs sont également impliqués dans l'athérosclérose où la concentration d'ET-1 est élevée au sein de l'artère pathologique avec une action autocrine et paracrine sur les CMLV [451].

Ainsi le bosentan, qui est un antagoniste des récepteurs ETA et ETB empêche la constitution d'une hyperplasie intimale expérimentale chez le rat [452]. L'ET-1 et son récepteur ETB seraient surexprimés dans les artères temporales des patients atteints d'ACG [453]. La concentration sérique d'ET-1 serait augmentée chez ces patients [454] et semble corrélée avec la survenue de complications ischémiques [455].

Nos travaux préliminaires sur le rôle du système de l'ET-1 dans l'ACG confirment la surexpression de l'ET-1 et du récepteur ETB au niveau de toutes les couches artérielles avec une faible expression du récepteur ETA (Figure 18A). Par ailleurs à partir de TSMCs de 6 patients et de 6 contrôles, nous avons montré une surexpression des transcrits d'ET-1, du récepteur ETA et surtout du récepteur d'ETB ( $p=0,02$ ) chez les patients comparativement aux contrôles (Figure 18B).

Ainsi le système de l'endothéline participe probablement à la constitution de l'hyperplasie intimale dans l'ACG. Des études fonctionnelles sur les TSMCs sont nécessaires pour mieux comprendre le rôle de ce système dans ce contexte. Le blocage des récepteurs ETA et ETB pourrait permettre une régulation de la prolifération et de la migration des CMLV chez les patients atteints d'ACG.



**Figure 19 :** Etude de l'expression protéique et des transcrits du système de l'endothéline-1. (A). Expression de l'ET-1 et des récepteurs ETB et ETA en immunohistochimie sur des coupes d'artères temporales de patients atteints d'ACG (n=3) (x100 et x200). (B). Analyse en PCR quantitative de l'expression des transcrits de l'ET-1 et des récepteurs ETB et ETA à partir de TSMCs de patients (n=6) et de sujets

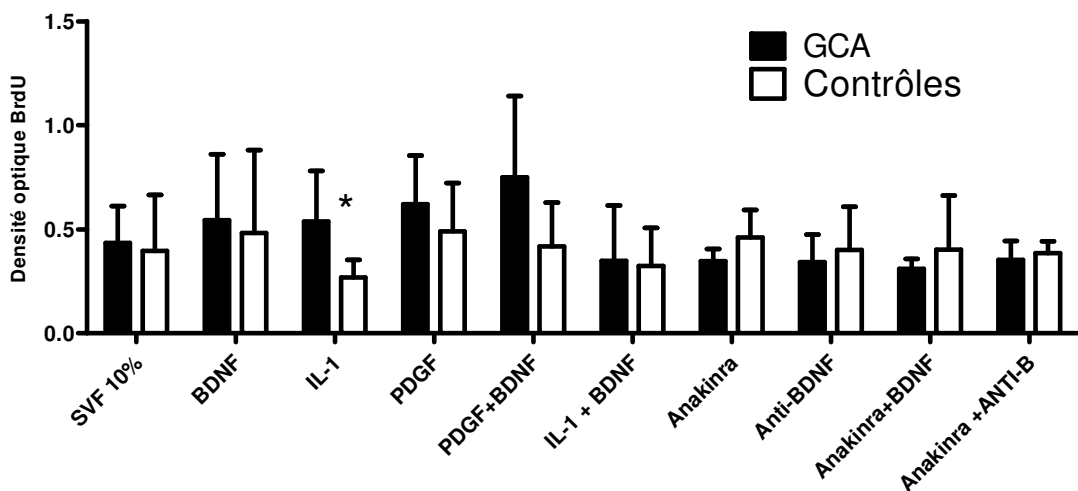
contrôles (n=6) normalisée par l'expression du gène HPRT. Les valeurs sont exprimées en moyenne par rapport à celles des sujets contrôles ramenées à 1. \*p<0,05

## **B. Effets de l'interleukine-1 $\beta$ sur les CMLV des patients atteints d'ACG**

Le taux systémique et local d'IL-1 est plus élevé chez les patients atteints d'ACG par rapport aux sujets contrôles et surtout chez les patients ayant un syndrome inflammatoire marqué [456-457]. L'appellation IL-1 correspond en fait à deux protéines : l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  qui partagent un même récepteur l'IL-1R1 et une même protéine antagoniste de l'IL-1R1, l'IL-1Ra [458]. L'IL-1 $\beta$  est produite par les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes B et les cellules NK mais aussi par les fibroblastes et les CMLV [459]. De façon constitutive les CMLV contiennent peu de transcrite d'IL-1 alors qu'après stimulation bactérienne elles produisent de l'IL-1 $\alpha$ , de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-1Ra qui vont agir de façon autocrine sur leur propre synthèse [459-460]. Les CMLV, prétraitées 48 h auparavant par de l'IL-1 $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$ , vont proliférer de façon plus importante que des CMLV non traitées et l'analyse du surnageant des CMLV traitées montre un taux plus élevé d'IL-6 [461]. Les souris déficientes en IL-1 $\beta$  ne développent pas de fièvre ni de syndrome inflammatoire et n'ont pas d'IL-6 circulante détectable après induction d'une infection [462-463]. Cette réponse est identique à celle retrouvée lors du blocage de l'IL-1R par un anticorps spécifique chez la souris sauvage [464]. Ces études démontrent le rôle majeur de l'IL-1 $\beta$  dans l'inflammation locale et systémique. L'IL-1Ra a un rôle antagoniste pur. Il se fixe sur l'IL-1R1 et bloque indifféremment l'action de l'IL-1 $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  [458]. Les souris déficientes pour le gène d'IL-1Ra sont moins fertiles et présentent un retard de croissance. Il existe un taux élevé de protéines inflammatoires et d'IL-6 dans leur plasma [463]. Elles peuvent présenter ensuite des lésions psoriasiformes [465], un tableau de polyarthrite mimant une PR [466] et pour certaines d'entre elles un tableau de vascularite systémique [467]. Dans cette dernière situation, les lésions histologiques artérielles retrouvées chez ces souris sont quasi-identiques à celles présentes dans l'ACG. L'aorte de ces souris est infiltrée de cellules dendritiques, de macrophages et de lymphocytes CD4<sup>+</sup> produisant de l'IFN- $\gamma$ . Cependant on note l'absence de cellule géante ainsi que l'absence d'activation des CE. La suppression du gène de l'IL-1R1 chez ces souris empêche le développement de l'aortite soulignant le rôle majeur du taux élevé d'IL-1 dans la constitution de la vascularite [468].

Ces données nous ont motivé à tester l'effet de l'interleukine-1 $\beta$  et de son blocage sur les TSMCs de patients atteints d'ACG et de sujets contrôles. Pour évaluer la prolifération des TSMCs de patients (n=4) comparée à celle des contrôles (n=6) nous avons étudié utilisé un test de prolifération par incorporation de Brdu après 48h d'incubation des TSMCs sous différentes conditions : 1) SVF 10%, 2) BDNF, 3) IL-1 $\beta$ , 4) PDGF, 5) PDGF+ BDNF, 6) IL-1 $\beta$ +BDNF, 7) anakinra, un antagoniste du récepteur de l'IL-1 8) antagoniste du BDNF (anti-BDNF) 9) anakinra+BDNF et 10) anakinra + anti-BDNF. L'IL-1 $\beta$  favorise la prolifération des TSMCs des patients atteints d'ACG avec une différence significative par rapport aux contrôles (p=0,03) (Figure 19). L'association de l'IL-1 $\beta$  et du BDNF n'augmente pas de façon significative la prolifération. L'anakinra tend à diminuer la prolifération des TSMCs mais sans différence significative entre les deux groupes. L'adjonction de l'anti-BDNF ne diminue la prolifération induite par l'anakinra.

Ces résultats suggèrent que l'IL-1 $\beta$  pourrait jouer un rôle important dans la prolifération des TSMCs des patients atteints d'ACG. D'autres investigations, notamment avec des souris déficientes pour le gène de l'IL-Ra, sont nécessaires pour déterminer le potentiel thérapeutique du blocage de l'activité de l'IL-1 $\beta$



**Figure 20 :** Effets de l'IL-1 $\beta$  et du blocage de son récepteur sur les TSMCs de patients (n=4) et de sujets contrôles (n=6). L'étude de la prolifération est effectuée après 48h d'incubation avec différents stimulants ou inhibiteurs. Les produits associés sont déposés simultanément. L'IL-1 $\beta$  est utilisé à une concentration de 20 ng/mL [469] et l'anakinra à 100 ng/mL. Les résultats sont exprimés en moyenne sur deux expérimentations indépendantes. \* p<0,05

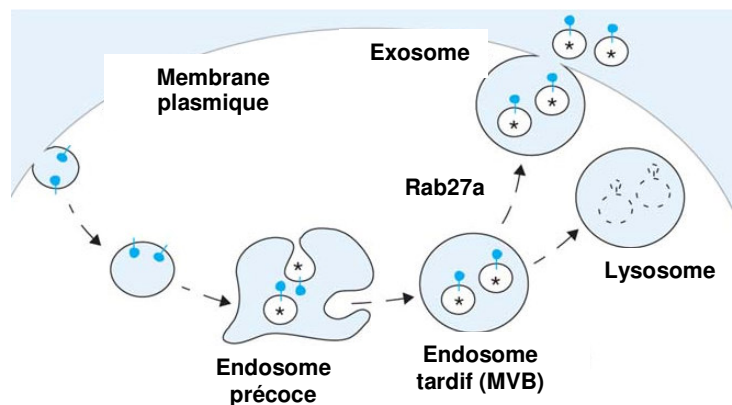
## **C. Implication des exosomes dans la réponse inflammatoire locale dans l'ACG**

Les exosomes sont des vésicules sphériques, de 30 et 100 nanomètres de diamètre, constituées d'une bicouche lipidique et contenues dans un organite appelé l'endosome multivésiculaire (MVE). A l'intérieur de la MVE, elles constituent les vésicules intraluminales. La biogénèse des exosomes suit différentes étapes (Figure 20) : 1) le processus d'endocytose, permet la capture et l'internalisation de différentes macromolécules présentes dans le milieu extérieur et/ou dans la membrane. 2) les molécules internalisées sont ensuite dirigées vers les différents compartiments endosomaux. 3) l'endosome va subir une étape de maturation permettant son passage d'un état d'endosome précoce pour devenir un endosome tardif qui sera à l'origine de l'endosome multivésiculaire (MVE). 4) la MVE peut : i) fusionner avec les lysosomes aboutissant à la dégradation du contenu endosomal, ii) fusionner à la membrane plasmique permet la libération de leur contenu, les vésicules intraluminales (ILV) qui prennent le nom d'exosomes dans le milieu extérieur [470-471] [472]. Les exosomes sont sécrétés par tous les types cellulaires aussi bien en conditions physiologiques que pathologiques (mastocytes, lymphocytes, cellules dendritiques, plaquettes, adipocytes, réticulocytes, astrocytes, neurones, cellules épithéliales....) De ce fait, ils sont présents dans les différents systèmes circulatoires et peuvent être isolés à partir de nombreux fluides biologiques (sérum/plasma, urine, bile, liquide céphalorachidien...) [473]. La lumière des exosomes est une fraction cytosolique, dépourvue d'organelles comme les mitochondries, les lysosomes, le réticulum endoplasmique, noyau ou encore l'appareil de Golgi [474]. Préalablement considérés comme transporteurs des déchets cellulaires (élimination des protéines mal conformées ou obsolètes), les exosomes sont de plus en plus considérés comme des vésicules intervenant dans la communication intercellulaire et dans les processus immunologiques de présentation d'antigènes [475-477]. Des chercheurs ont montré que le contenu exosomal contiendrait moins de 100 protéines et moins de 10000 nucléotides constitutifs des ARNms et des microARNs (miRNAs)) [478] tandis qu'une autre étude estime qu'un exosome pourrait contenir environ 1000 mRNAs [479]. Il n'y a pas donc de limite concernant la nature du contenu des exosomes leur permettant d'influer sur toutes les fonctions d'une cellule notamment la prolifération et la différenciation cellulaire. Dans le cas du cancer du sein, les exosomes sécrétés par les cellules cancéreuses seraient capables d'inhiber à la fois la différenciation des monocytes en macrophages et des précurseurs myéloïdes en cellules dendritiques, permettant ainsi aux cellules cancéreuses d'échapper au système immunitaire [480]. Les



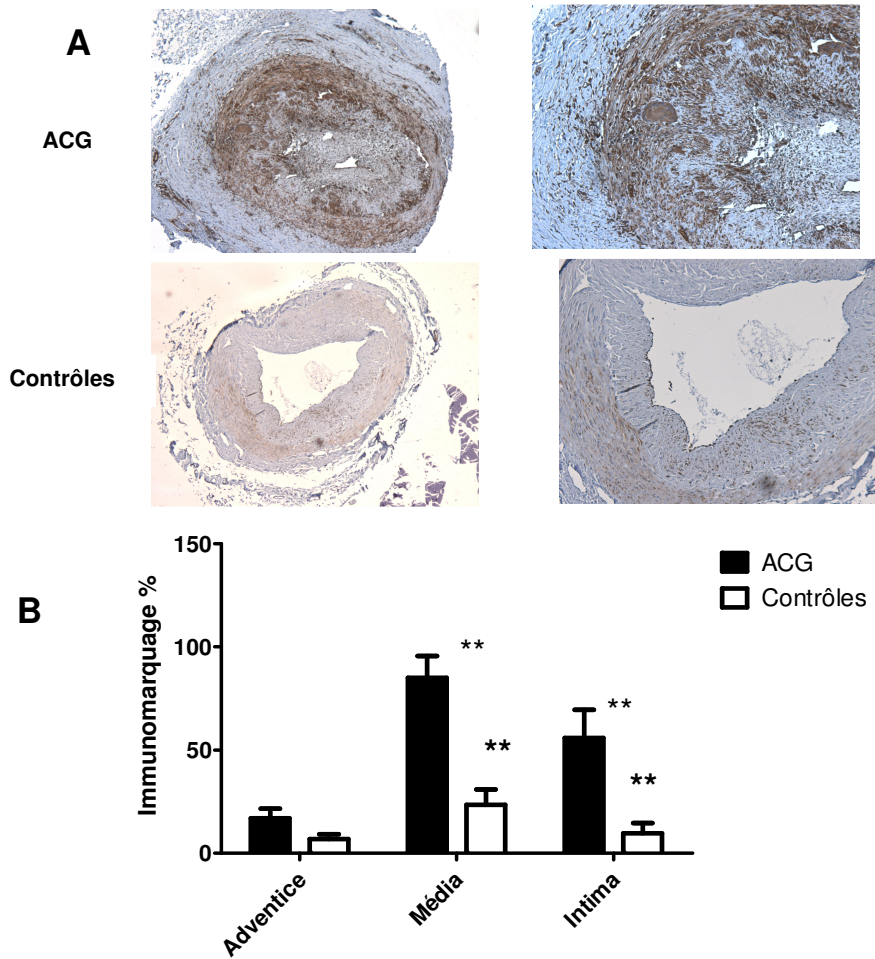
exosomes sécrétés par les cellules cancéreuses gastriques sont capables de promouvoir la prolifération des cellules tumorales via l'activation des voies PI3K/Akt et MAP kinases [481] et d'induire la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, permettant la formation de métastases [482]. Enfin des HUVEC contenant des miRNA 143/145, peuvent les transférer à des CMLV favorisant ainsi le passage du phénotype contractile vers un phénotype sécrétoire nécessaire à leur prolifération et leur migration [483].

Les protéines Rab ne participent pas à proprement parler à la formation des exosomes, mais jouent plutôt un rôle dans la fusion des MVE avec la membrane plasmique (Figure 20) en particulier les protéines Rab27a et Rab27b [484-485]. La protéine Rab27a permet de faire le lien entre les MVE et les moteurs moléculaires nécessaires au déplacement des MVE le long des filaments d'actine. L'absence de la protéine Rab27a conduit à une augmentation de la taille des MVE, due à une accumulation des ILV non libérées. La protéine Rab27b permet le transfert des MVE situés au niveau des microtubules aux filaments d'actine, qui vont permettre sa localisation au niveau de la membrane plasmique. L'absence de la protéine Rab27b entraîne une localisation périnucléaire des MVE, empêchant ainsi sa fusion à la membrane plasmique [484].



**Figure 21** : Biogénèse des exosomes. Les molécules présentes dans le milieu extra cellulaire sont internalisées par endocytose. Elles fusionnent avec un endosome précoce qui peut contenir d'autres molécules (\*). L'endosome précoce subit une maturation en endosome tardif qui devient l'endosome multivésiculaire (MVB). Ce dernier peut fusionner avec un lysosome et le contenu de la MVB est dégradé. Le MVB peut également fusionner avec la membrane plasmique et libérer les exosomes. La protéine Rab27a permet ce processus de libération des exosomes. MVB : multivesicular bodies. Adapté de Siomi et al, Nat Cell Biol. 2009 [486]

Dans le cadre de l'EA 3842, où une partie de l'équipe travaille sur le rôle de certains exosomes dans l'oncogénèse, nous avons étudié par immunohistochimie l'expression de Rab27a au niveau de coupes d'artères temporales de patients atteints d'ACG (n=22) et de contrôles (n=10). On note une surexpression de la protéine Rab27a chez les patients, avec une différence significative par rapport aux contrôles (Figure 21). En immunohistochimie de la protéine Rab27a semble principalement localisée au niveau de la média et l'intima ( $p < 0,001$ ). Il est difficile sur ces résultats préliminaires de conclure sur les types cellulaires qui expriment cette protéine, cependant ils suggèrent indirectement que les exosomes pourraient être impliqués dans l'inflammation locale en facilitant les communications intercellulaires. Des expérimentations complémentaires sont nécessaires pour identifier ces exosomes et déterminer leur fonction exacte au sein de l'artère pathologique d'un patient atteint d'ACG.



**Figure 22** : Expression de la protéine Rab27a en immunohistochimie dans les artères temporales de patients atteints d'ACG et contrôles.

(A). Immunomarquage de la protéine Rab27a sur des coupes de paraffine d'artères temporales de patients atteints d'ACG (n=22) et de contrôles (n=10) (x100 et x200). (B). Analyse semi-quantitative exprimée en % de zones marquées au niveau des trois couches artérielles. Les résultats sont exprimés en moyenne avec les erreurs standards.\*\*p<0,001.

## Discussion générale

Ce travail de thèse a porté sur la compréhension des mécanismes du remodelage vasculaire dans l'ACG. Nous avons effectué ce travail en deux parties.

La première partie de ce travail a été consacrée à la recherche d'un marqueur biologique spécifique. Ce marqueur pourrait correspondre à des anomalies protéiques consécutives au remaniement vasculaire qui siège au sein de l'artère temporale d'un patient atteint d'ACG ou d'un facteur déclenchant pouvant être responsable d'une activation des CMLV favorisant leur prolifération et leur migration pour constituer l'hyperplasie intimale. En comparant les sérums de 15 patients et de 15 sujets contrôles nous avons montré, dans cette première partie, que les patients atteints d'ACG possédaient de nombreux anticorps dirigés contre des protéines extraites d'HUVEC et de CMLV [487]. L'analyse du répertoire de ces anticorps montrait que certains pouvaient également être présents chez les sujets contrôles mais que d'autres étaient uniquement retrouvés chez les patients. Grâce à la spectrophotométrie de masse, nous avons pu identifier la cible de ces anticorps spécifiques des patients. Il s'agissait de la vinculine, de la lamine A/C, de la protéine VDAC « voltage-dependent anion-selective channel protein » de l'annexine V, de la « far upstream element binding protein 2 » et d'autres protéines impliquées dans le métabolisme énergétique et la signalisation cellulaire. L'analyse par le logiciel « Ingenuity pathway analysis » a permis de trouver que le lien commun entre ces protéines était la protéine Grb2 qui facilite l'activation des protéines Ras GTPase-dépendante par les tyrosines kinases et ainsi la transduction d'une signalisation de croissance et de différenciation cellulaire [488].

Par ailleurs, dans la perspective d'identifier un marqueur biologique dans l'ACG, nous avons voulu confirmer les résultats d'une étude portant sur la détection d'anticorps dirigés contre la chaîne lourde de la ferritine, qui semblait spécifique de l'ACG [103]. Dans cette étude, les anticorps anti-ferritine étaient plus fréquemment observés chez les patients atteints d'ACG comparés aux sujets témoins (55 % vs. 1 % ;  $p < 0,01$ ). En outre, la présence de ces anticorps constituerait un marqueur d'activité de la maladie puisqu'ils étaient présents dans 92 % des cas au diagnostic, dans 69 % des cas lors des poussées et dans seulement 13 % des cas lors des rémissions. Dans notre étude [104], nous avons recherché ces anticorps chez 122 patients chez qui le diagnostic d'ACG était suspecté. En considérant les critères de classification de l'ACG de l'ACR [100] il y avait parmi eux 40 patients ACG avec une BAT positive (ACG BAT+), 29 patients ACG avec une BAT négative (ACG BAT-), 6 patients avec une PPR et 49 patients pour lesquels un

autre diagnostic a été porté. Quarante volontaires sains ont également été inclus dans l'étude. Ces Ac étaient présents chez 72,5% et 41,3% des patients, respectivement ACG BAT+ et ACG BAT-. En revanche les 49 patients contrôles présentaient ces anticorps dans 32% des cas et les sujets sains dans 2,5% des cas. Enfin la valeur prédictive de ce test était calculée à 56,4% pour tous les patients atteints d'ACG. Ainsi l'intérêt du dosage de ces anticorps dans le diagnostic de l'ACG semble limité.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés au remodelage vasculaire lui-même, en recherchant s'il existait d'autres facteurs trophiques pouvant participer de façon synergique à la formation d'une néo-intima. Nous avons ainsi recherché si certains facteurs de croissance neuronaux, les neurotrophines, pouvaient participer au remodelage vasculaire observé dans l'ACG. Nous avons montré que le système des neurotrophines (ligands et récepteurs) était surexprimé au sein de l'artère temporale de patient atteint d'ACG et que cette surexpression était corrélée, pour le récepteur TrkB, à la survenue d'une complication ischémique. Cette surexpression protéique était en partie corrélée avec celle des transcrits des NTs et de leurs récepteurs. A partir de CMLV issues d'artères temporales de patients et de sujets contrôles, nous avons observé que le BDNF favorisait la migration des CMLV mais pas leur prolifération. Enfin la concentration du NGF a été retrouvée plus élevée chez les patients comparativement aux contrôles. Ces résultats suggèrent que le système des NTs participe activement à la migration des CMLV et donc contribue à la constitution de l'hyperplasie intimale.

La recherche d'un bio-marqueur dans l'ACG reste un enjeu important. Même si les critères de classification de l'ACR [100] permettent d'homogénéiser les études sur cette maladie, le diagnostic de certitude pour un patient donné repose sur la BAT. Ce geste, même s'il est réalisé sous anesthésie locale et bien toléré, reste encore invasif et sujet à discussion dans sa réalisation et son interprétation [489]. L'idée de rechercher un marqueur biologique d'origine immunologique repose sur certaines constatations concernant l'implication du système immunitaire humoral dans la physiopathologie de l'ACG. Même s'ils ne sont pas nombreux, les lymphocytes B sont présents dans les AT de patients atteints d'ACG [17, 490] et siègent principalement dans l'adventice [17]. Dans cette couche artérielle, on peut également trouver des plasmocytes et ces derniers semblent plus fréquemment détectés chez les patients ayant une perte visuelle permanente [18]. La présence des plasmocytes et donc la production d'anticorps peut être consécutive à une agression de la paroi artérielle par un agent pathogène ou un auto-antigène. Elle peut être aussi réactionnelle à des modifications protéiques de la surface des cellules agressées lors du remodelage vasculaire comme les CE ou les CMLV. Dans ce contexte on peut trouver des anticorps anti-cardiolipine (ACL) à un taux

faible dans 20% à 50% des cas de patients atteints d'ACG [5, 102, 434]. Leur présence ne semble pas associée à un risque accru d'événements ischémiques [5, 102, 491] et ces anticorps disparaissent 3 mois après l'initiation de la corticothérapie [101, 434]. En revanche l'anticorps anti- $\beta 2$  glycoprotéine I n'a pas été détecté dans ce contexte [492]. Par ailleurs, les anticorps anti-CE sont présents chez 33% des patients atteints d'ACG [493] mais peuvent être observés chez les sujets sains [494] et chez des patients atteints par d'autres maladies auto-immunes [495]. Ils ne semblent donc pas spécifiques de l'ACG [496].

Bien que cela n'ait jamais été publié chez l'homme, la présence d'anticorps anti-CMLV a déjà été rapportée dans un modèle de souris [6]. L'injection à des souris, de CMLV auparavant cultivées avec des lymphocytes spléniques syngéniques va induire le développement d'une vascularite. Le sérum de ces souris présente des anticorps anti-CMLV. Des souris déficientes en lymphocytes B recevant le sérum de ces souris vont développer une vascularite, alors que les souris (Rag2<sup>-/-</sup>) déficientes en lymphocytes T et B n'en développent pas. Ceci suggère que les lymphocytes T et B coopèrent pour contribuer au développement de la vascularite dans ce modèle. Ainsi, des auto-anticorps ciblant le protéome des CMLV pourraient jouer un rôle dans la survenue d'une vascularite et leurs fonctions nécessitent des investigations complémentaires.

L'analyse du répertoire lymphocytaire B des patients atteints d'ACG et de PPR a révélé la présence d'immunoglobulines G (IgG) dirigées contre des antigènes ubiquitaires comme la lamine A/C, la cytokératine et la sous-unité II de la cytochrome oxydase [3]. Certaines de ces cibles antigéniques, comme la lamine A/C, ont été également détectées dans notre étude. Les lamines A et C sont tous les deux codées par le gène LMNA et représentent des constituants majeurs de la membrane nucléaire interne. Des mutations du gène LMNA ont été identifiées dans de nombreuses maladies dont la progéria [497]. La mutation la plus fréquemment retrouvée dans cette maladie produit la progérine qui est une forme tronquée de la lamine A et qui s'accumule dans les noyaux des CMLV. Ce phénomène peut, en partie, expliquer la survenue prématurée d'accidents cardiovasculaires au cours de cette maladie [498]. Par ailleurs, d'autres mutations du gène LMNA peuvent favoriser une athéromatose accélérée associée à un syndrome dysmétabolique avec un hyperinsulinisme, une dyslipidémie, une HTA et un diabète [499]. Cependant le rôle de la lamine A/C reste à déterminer dans le remodelage vasculaire de l'ACG.

Parmi les cibles antigéniques protéiques communes aux HUVECs et aux CMLV reconnues par le sérum des patients, la vinculine a été identifiée. Il s'agit d'une protéine du cytosquelette, ubiquitaire, et qui joue un rôle dans l'adhérence de la cellule à la matrice extracellulaire et au niveau des jonctions intercellulaires, en se fixant aux

microfilaments d'actine [500]. La vinculine constitue avec la taline, l'actine, la paxilline et les intégrines les composants des points focaux d'adhérence. Une diminution de l'expression de la vinculine et d'autres protéines impliquées dans le cytosquelette favorise le passage du phénotype contractile vers celui de type sécrétoire des CMLV issues de coronaires athéroscléreuses. Cette modification phénotypique augmente la motilité cellulaire, ce qui favorise la migration des CMLV de la média vers l'intima [501-502]. La « far upstream element binding protein 2 » est également la cible antigénique d'anticorps anti-CMLV reconnus par les cinq pools de sérums de patients atteints d'ACG. Cette protéine est une protéine activatrice de la transcription de c-myc, un proto-oncogène, qui joue un rôle clé dans la régulation de la croissance cellulaire, la prolifération et la différenciation cellulaire [503]. De façon intéressante, le point commun entre ces cibles antigéniques est la protéine Grb2 avec qui elles interagissent. Cette protéine adaptatrice de facteur de croissance facilite l'activation de la protéine Ras par les récepteurs à tyrosine kinase et est impliquée dans la prolifération des CMLV. Elle semble nécessaire au développement d'une néointima en réponse à une lésion vasculaire [504]. Le rôle pathogène d'ACS secondairement induits a déjà été rapporté dans la SLA [435]. Ainsi, Grb2 pourrait être surexprimé et/ou activés dans les CE et les CMLV des patients atteints d'ACG et pourraient stimuler le processus de remodelage vasculaire.

Ces résultats nous ont permis d'envisager que des anticorps anti-CMLV sont présents dans le sérum de patients mais que leur fonction restait à déterminer. Plusieurs possibilités peuvent être discutées : i) leur induction peut être la conséquence de la destruction des CMLV lors de la réaction inflammatoire locale, jouant ainsi plutôt un rôle de témoin des modifications structurelles subies par les CMLV ou ii) après leur induction, ces anticorps pourraient participer à la pérennisation du remodelage vasculaire en ciblant des protéines clés de la prolifération, de la migration et de la régulation de l'homéostasie cellulaire.

Pour essayer d'apporter une réponse à ces questions, nous avons entrepris de cultiver prospectivement les CMLV à partir de BAT de patients suspects d'ACG. Le but de ce travail était d'étudier les particularités que pouvaient présenter les CMLV des patients atteints d'ACG par rapport à celles des sujets contrôles, pour qui la BAT ne confirmait pas le diagnostic d'ACG. Lors de cette étude, nous nous sommes heurtés à plusieurs problèmes et interrogations. Premièrement les sujets dits « contrôles » ne sont pas indemnes de pathologies et la maladie qui a justifié la réalisation de la BAT peut modifier le comportement des CMLV issues de leur artère temporale. Deuxièmement, nous avons rencontré plusieurs problèmes au cours de la culture primaire des CMLV. Nous avons tout d'abord essayé de reproduire la technique de culture cellulaire de

l'équipe de Maria C. Cid qui fut la première en 2008 à rapporter la possibilité d'une culture cellulaire de CMLV à partir de BAT de patients suspects d'ACG [469] sur un support de matrigel à partir d'une coupe millimétrique d'un fragment d'artère temporale. L'application de cette technique a été un échec et nous avons préféré utiliser une technique de digestion enzymatique classique [505] qui nous a permis d'obtenir des CMLV provenant de patients à BAT positive, à BAT négative et de sujets contrôles. Dans le modèle de culture cellulaire sur matrigel, les cellules obtenues à partir d'une section d'artère sont étiquetés CMLV en utilisant un marquage en cytométrie en flux avec un anticorps anti-« alpha smooth-actin » ( $\alpha$ SMA) et avec par la détection des transcrits du collagène de type I par RT-PCR [455, 469]. Cependant, les cellules ainsi obtenues peuvent provenir de la média (CMLV) mais aussi de l'adventice où siègent des fibroblastes adventitiels. Or le fibroblaste activé devient un myofibroblaste et peut également exprimer l' $\alpha$ SMA. Pour réduire le risque de contamination par des fibroblastes dans les flasques de culture, nous avons d'abord séparé mécaniquement l'adventice de la média, avant la digestion enzymatique. Ensuite, en plus de l' $\alpha$ SMA, nous avons choisi de réaliser un deuxième marquage par le CD-90 qui est un marqueur assez spécifique des fibroblastes permettant de constater que les cultures de cellules exprimant le phénotype des CMLV sont obtenues avec une pureté de plus de 90% [506].

Nous avons constaté que la culture des CMLV était plus aisée quand les patients présentaient un taux de CRP élevé. La production d'IL-6, parallèle à celle de la CRP, pourrait expliquer ce résultat puisque cette cytokine semble favoriser la prolifération des CMLV comme le fait l'IL-1 $\beta$  [461] ce d'autant que ces deux cytokines sont présentes au sein de l'artère temporale des patients [457] mais également dans le surnageant de CMLV issues de fragment d'artère temporale de patients [507]. Toutefois, seulement 6/13 de nos échantillons de patients atteints d'ACG ont pu être exploités. Cette difficulté à cultiver les CMLV des patients pourrait s'expliquer par la destruction des CMLV lors de la phase granulomateuse de la maladie avec, au sein de la paroi artérielle, des phénomènes d'apoptose des CMLV et de nécrose fibrinoïde [16, 18].

Nous avons ensuite recherché si les neurotrophines étaient exprimées par les CMLV des patients atteints d'ACG et s'ils pouvaient participer à la constitution de l'hyperplasie intimale. Par méthode immunohistochimique, nous avons tout d'abord observé que certaines NTs et leurs récepteurs étaient exprimés aussi bien chez les patients que chez les sujets contrôles. Il s'agissait du NGF, du BDNF, du récepteur TrkB et de la sortiline, protéine de transport des NTs et co-récepteur de p75<sup>NTR</sup>. Aucun fragment d'artère temporale n'exprimait les récepteurs TrkA et TrkC quel que soit le groupe. Enfin seuls les patients atteints d'ACG présentaient une immunoréactivité pour la NT-3 et le récepteur



p75<sup>NTR</sup>. L'absence des récepteurs TrkA et TrkC a été confirmée dans les deux groupes par Western Blot alors que les transcrits de ces récepteurs ne sont que faiblement détectés par RT-PCR et PCR quantitative. Nos résultats sont discordants avec ceux de Donovan et al. qui montraient que les CMLV provenant d'aorte humaine expriment toutes les NTs et leurs récepteurs [7]. La faible expression des récepteurs TrkA et TrkC est peut être liée à la nature de l'artère que nous étudions.

L'absence de la NT-3 et du récepteur p75<sup>NTR</sup> dans le groupe des sujets contrôles s'explique par le fait que p75<sup>NTR</sup> est rarement exprimé dans les conditions basales, son expression étant plus importante dans les lésions athéromateuses [168, 344]. Il en est de même pour NT-3 dont l'expression est également présente surtout dans les situations pathologiques [367].

Nous avons observé une différence d'expression des NTs et des récepteurs exprimés dans les deux groupes. Une surexpression du NGF, du BDNF, de TrkB et de la sortiline est ainsi détectée chez les patients. Ces résultats pourraient être liés aux phénomènes inflammatoires locaux qui résident au sein de l'artère pathologique. En effet, le NGF est surexprimé dans les CE et les kératinocytes des patients atteints de psoriasis [508], de même que le NGF et le BDNF dans les articulations touchées de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde [391] [509]. Au cours de l'asthme ou de la sarcoïdose, les NTs sont détectés dans les cellules musculaires lisses bronchiques [400, 510]. Par ailleurs certaines cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$  et l'IFN- $\gamma$  favorisent l'expression des transcrits du NGF et du BDNF et leur synthèse dans le surnageant de ces CML bronchiques [511-512]. Dans un autre modèle, le TNF- $\alpha$  augmente l'expression du BDNF dans les neurones [513].

En outre, il a été démontré que l'ischémie pouvait contribuer à la surexpression de certaines NTs et de leurs récepteurs spécifiques comme nous l'avons observé dans notre étude où le récepteur TrkB est abondamment présent dans la média et l'intima de l'artère temporale des patients ayant présenté une complication ischémique. En effet, dans un modèle expérimental d'ischémie provoquée chez la souris, une augmentation de la synthèse de NGF, de BDNF et de leurs récepteurs spécifiques est détectée dans le membre ischémié [7]. Dans les lésions humaines d'athérosclérose, le BDNF, la NT-3, le récepteur TrkB et TrkC et p75<sup>NTR</sup> sont également surexprimés [7, 514]. De plus, dans un modèle expérimental murin d'athérosclérose (souris apolipoprotéine -/-), le BDNF et son récepteur TrkB sont surexprimés au niveau des lésions néointimales, tandis que la diminution de TrkB chez ces souris (souris hétérozygote pour TrkB-/+ ) réduit les lésions d'athérosclérose [431].

Ainsi, la surexpression de NTs et de leurs récepteurs dans les artères temporales des patients atteints d'ACG pourrait être liée d'une part, à la présence abondante de

cytokines pro-inflammatoires *in situ* et d'autre part à l'hypoxie induite localement par l'hyperplasie intimale apparaissant au cours de cette maladie.

Nous avons également noté une augmentation de l'expression de la sortiline dans l'adventice et l'intima dans ce contexte d'ACG. Ces données pourraient être corrélées avec la surexpression TrkB au niveau de l'intima. En effet la sortiline peut agir comme un transporteur protéique intracellulaire facilitant l'acheminement des NTs immatures vers la membrane cellulaire ainsi que celui des récepteurs Trk dans les neurones [228, 515]. Par ailleurs, elle contrôle la régulation du trafic du BDNF et sa libération [235]. En outre, la sortiline est aussi le co-récepteur de p75<sup>NTR</sup> dont l'expression n'a été observée que chez les patients atteints d'ACG. Le couple sortiline/p75<sup>NTR</sup> pourrait lier les NTs immatures favorisant ainsi une signalisation pro-apoptotique [194, 230]. Comme, dans notre étude, l'anticorps antagoniste de p75<sup>NTR</sup> a plutôt tendance à augmenter la survie et la prolifération des CMLV d'artères temporales de patients, l'hypothèse d'une telle régulation de l'hyperplasie intimale dans l'ACG pourrait être envisagée. Ainsi la sortiline pourrait être impliquée dans les lésions artérielles de l'ACG en facilitant l'expression du BDNF et de son récepteur et en favorisant une apoptose des CMLV en se liant à p75<sup>NTR</sup>.

Les effets des NTs sur la prolifération des CML non vasculaires ont bien été décrites notamment pour les CML bronchiques [516-517] et concernent le NGF et le BDNF. Concernant les CMLV, les effets prolifératifs rapportés pour ces deux NTs, concernent principalement des modèles animaux [373] [518]. Chez nos patients atteints d'ACG, nous avons démontré que le NGF et surtout le BDNF favorisaient la migration des CMLV plutôt que leur prolifération. Du fait de l'absence d'expression de TrkA dans les CMLV étudiées et de la surexpression de BDNF et de son récepteur TrkB, il est probable que, dans notre étude, le BDNF active la migration des CMLV de nos patients par l'intermédiaire de l'activation de TrkB. Nos données sont cohérentes avec les études précédentes sur les effets des NTs dans la migration des CMLV humaines et de rongeurs [7] Kraemer, 1999 # 6113} [374]. De plus dans notre étude, l'effet du BDNF sur la migration cellulaire est comparable à celui induit par le PDGF comme décrit précédemment [166] et était plus important que celui observé avec le NGF. L'absence de l'expression du récepteur TrkA dans les deux groupes pourrait expliquer cette différence. Cependant, le NGF entraîne malgré tout un effet sur la migration cellulaire dans notre étude, ce qui suggère que la signalisation responsable de cette migration pourrait emprunter une voie différente de celle du couple NGF/TrkA. En effet, il a été rapporté que le NGF pouvait induire une signalisation de survie en activant la transcription de NF- $\kappa$ B. Cette signalisation se ferait par l'intermédiaire de l'activation du complexe sortiline/p75<sup>NTR</sup> dans un modèle de cellules de cancer du sein [207, 255].

Les voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la migration des CMLV sont classiquement la voie de la PLC- $\gamma$  [166] et PI3K-Akt [374]. L'activation du couple NGF/TrkA permet également d'activer par phosphorylation la paxilline, une protéine impliquée dans le cytosquelette et les points focaux d'adhésion. L'intégrine  $\alpha 9\beta 1$  est un récepteur présent sur le CML bronchiques et son activation entraîne une diminution de leur contraction [519]. Dans un modèle cellulaire de cancer du colon, l'intégrine  $\alpha 9\beta 1$  peut fixer le NGF, le BDNF et la NT-3. Cette liaison active une migration cellulaire par phosphorylation et activation de la paxilline [520].

En résumé dans notre étude la migration des CMLV induite par les NTs pourrait s'expliquer de plusieurs manières : i) Activation de la signalisation du couple BDNF/ TrkB, ii) Signalisation de survie par l'intermédiaire de l'activation du couple p75<sup>NTR</sup>/sortiline par le NGF et enfin iii) activation de la paxilline par la fixation du NGF et du BDNF sur l'intégrine  $\alpha 9\beta 1$ .

Des études complémentaires à celles des NTs ont également été effectuées pour explorer l'endothéline-1, l'IL-1 $\beta$  et les exosomes afin de préciser leurs implications potentielles dans la physiopathologie de l'ACG. Ces résultats préliminaires sont intéressants et nous motivent à explorer plus en avant ces pistes.

L'endothéline-1 (ET-1) et ses récepteurs (ETA et ETB) jouent un rôle clé dans la physiopathologie de l'hypertension artérielle pulmonaire en favorisant la prolifération incontrôlée des CMLV [521]. En plus de son effet prolifératif, elle induit une contraction des CMLV et la relaxation de ses dernières s'effectue via l'activation de son récepteur ETB. Ce phénomène a déjà été étudié au niveau des CMLV d'artères temporales non pathologiques [522]. Le lien entre le système de l'endothéline et les cytokines pro-inflammatoires a déjà été rapporté. Le pré-traitement combiné par du TNF- $\alpha$  et de l'IFN- $\gamma$  de CMLV d'artère mammaire humaine non pathologique favorise l'expression des transcrits des formes matures et immatures de l'ET-1 ainsi que la synthèse d'ET-1 dans le surnageant du milieu de culture des CMLV [523]. Cette surexpression de l'ET-1 semble être possible par l'existence de l' « endothelin-Converting Enzyme » qui permet la conversion intracellulaire des formes immatures d'ET-1. Par ailleurs l'interleukine-1 $\beta$  renforce l'effet de contraction induite par l'ET-1 sur le même modèle de CMLV d'artères temporales saines [524]. Cet effet de contraction des CMLV via l'ET-1 est également observé avec l'adjonction d'autres cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  mais pas avec l'interleukine-6. Cependant l'effet contractile des autres cytokines est observée à des concentrations plus élevées [524]. Ainsi dans la régulation des CMLV des artères temporales un lien assez étroit existe entre les cytokines pro-inflammatoires notamment l'IL-1 $\beta$  et l'ET-1. Ce lien est d'autant plus intéressant pour notre étude que

l'ET-1 peut jouer un rôle neurotrophique et interagir activement avec les NTs. En effet l'ET-1 qui est produite par les CMLV permet la survie de neurones sympathiques en l'absence de NGF lors d'expérimentations de co-cultures CMLV/neurones. L'administration d'un antagoniste non spécifique des récepteurs de l'ET-1 entraîne une diminution de la survie neuronale. Cet effet sur la survie, via l'ET-1 produite par les CMLV, n'est pas retrouvé avec les CE en co-culture avec les neurones [525]. Par ailleurs, l'ET-1 permet une surexpression protéique et des transcrits du NGF dans les cardiomyocytes. Cet effet survient en 30 minutes et est dépendant de la concentration. L'activation de la synthèse du NGF dépend du récepteur ETA. Ces résultats ne sont pas observés avec les fibroblastes cardiaques suggérant que cette signalisation ET-1/NGF est dépendante de la cellule cible [526]. De plus, la surexpression du NGF dans les cardiomyocytes permet le développement des ganglions sympathiques des souris étudiées comme l'atteste la réduction du développement des fibres nerveuses des ganglions sympathiques chez les souris déficientes en ET-1. Par ailleurs, dans un autre modèle, l'ET-1 stimule l'expression des transcrits de NT-3 et sa libération dans le surnageant de cultures d'astrocytes. L'injection intracérébrale d'ET-1 entraîne une surexpression de NT-3 dans différentes régions cérébrales. Cet effet est similaire avec l'utilisation d'un agoniste de l'ETB et inhibé par un antagoniste de l'ETB. Cette production de NT-3 dépendante de la signalisation ET-1/ETB est aussi dépendante de la phosphorylation de Erk [527].

Outre son lien avec l'ET-1, l'intérêt que l'on pourrait porter à l'implication de l'interleukine-1 $\beta$  dans la physiopathologie de l'ACG, repose sur la publication en 2000 d'un modèle de vascularite des gros vaisseaux chez la souris [467] [468]. Ce modèle repose sur l'inactivation du gène fonctionnel de l'IL-1Ra (IL-1rn), la protéine soluble naturelle, antagoniste de l'IL-1. Ces souris déficientes à l'état homozygote pour le gène de l'IL-1Ra (IL1rn $^{-/-}$ ) vont décéder dans 93% des cas (51/55) avec un âge médian de 159 jours contre seulement 16% des souris hétérozygotes (6/37). L'autopsie de 46 souris IL1rn $^{-/-}$  montre une artérite des gros vaisseaux chez 43 d'entre elles (93%). L'artérite touche l'aorte et ses branches en épargnant les veines, les artères de petits calibre et les capillaires. Elle se développe au niveau des zones de turbulence du flux sanguin car elle touche préférentiellement la crosse de l'aorte, l'aorte thoracique et abdominale mais aussi la bifurcation iliaque. L'artérite est le siège d'un infiltrat inflammatoire constitué de macrophages et de lymphocytes T CD4 $^{+}$ . Les CMLV ont un phénotype sécrétoire et la LEI est détruite. Il n'y a pas de cellule géante. L'IL-1 $\beta$  est surtout détectée au niveau des macrophages et des lymphocytes T CD4 $^{+}$ .

Les CMLV présents au sein de cette artérite ont un phénotype sécrétoire donc sont prompts à proliférer et à migrer. L'IL-1 ne semble pas induire directement la prolifération

des CMLV. Son action s'effectue par l'intermédiaire de l'induction du gène du PDGF [528]. En revanche, l'action de l'IL-1 sur la migration cellulaire des CMLV est dose dépendante et nécessite l'activation de la métalloprotéase matricielle (MMP) 2 [529]. Dans l'ACG la MMP-2 mais surtout la MMP-9 produite par les CMLV favorise la destruction de la LEI mais contribue également à l'hyperplasie intimale et à l'angiogénèse [39].

Pour confirmer que l'IL-1 $\beta$  est bien responsable de cette artérite, la même équipe a croisé ces souris *IL1rn*<sup>-/-</sup> avec des souris dont le gène du récepteur de l'IL-1 (IL-1 R1) a été inactivé (*IL1r1*<sup>-/-</sup>). Aucune des souris double KO (*IL1Rrn*<sup>-/-</sup> *IL1r1*<sup>-/-</sup>) n' a présenté d'artérite contre 10/12 des souris KO uniquement pour le gène de l'IL-1Ra (*IL1rn*<sup>-/-</sup> *IL1r1*<sup>+/+</sup>) [468]. Ce résultat démontre l'implication de la signalisation IL-1 $\beta$ /IL-1R1 dans la genèse de l'artérite. Par ailleurs, l'infiltrat de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> était principalement constitué de lymphocytes qui exprimaient l'IFN- $\gamma$ , donc avec une polarisation Th1. Les lymphocytes T jouent un rôle majeur dans la genèse de cette artérite puisque le transfert adoptif de lymphocytes T de souris *IL1rn*<sup>-/-</sup> à des souris *Nude* ou de cellules de moëlle osseuse à des souris irradiées, entraîne l'apparition d'une artérite. De plus, le rôle du TNF- $\alpha$  est également important puisque le croisement d'une souris *IL1rn*<sup>-/-</sup> avec une souris *TNF $\alpha$* <sup>-/-</sup> empêche l'apparition de l'artérite [530], ce qui n'est pas le cas lorsque le gène de l'IL-6 est inactivé. Néanmoins, chez des souris *IL1rn*<sup>-/-</sup> qui développent également une arthrite inflammatoire, on observe très précocement une concentration élevée d'IL-17 dans le sérum et le liquide synovial au même titre que l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ . Ceci concorde avec la prépondérance des lymphocytes Th17 par rapport aux lymphocytes Th1 chez ces souris *IL1rn*<sup>-/-</sup>, comparées aux souris sauvages. Enfin, l'administration d'un anticorps neutralisant de l'IL-17 bloque le développement de l'arthrite, cet effet est également obtenu par la neutralisation de IL-1, qui s'accompagne d'une diminution du nombre de lymphocytes Th17, alors que la neutralisation du TNF ne bloque pas l'évolution de l'arthrite [531]. Le rôle des lymphocytes Th17 est primordial dans la pathogénèse de l'ACG. Ils sont présents dans le sang circulant des patients atteints d'ACG et infiltrent la jonction entre l'adventice et la média des artères temporales des patients [32]. Le lien entre l'IL-1 et les TH17 a clairement été rapporté dans différents modèles de maladies auto-immunes [532-535] où l'IL-1 va favoriser la polarisation Th17 et l'afflux des Th17 au niveau du site inflammatoire. Ainsi les interactions entre l'IL-1 et les Th17 dans l'ACG sont probables mais restent à confirmer par des investigations complémentaires.

Le lien entre les lymphocytes T et les NTs a été rapporté récemment [300, 536]. Dans un modèle murin d'inflammation bronchique, un traitement bloquant le NGF permet une

diminution de l'inflammation bronchique induite par l'ovalbumine. Cet effet s'accompagne d'une diminution des transcrits des cytokines comme IL-4, IL-17A et du TNF- $\alpha$  et d'une augmentation de l'IFN $\gamma$ , de l'IL-10 et du TGF $\beta$  exprimés au niveau pulmonaire. Parallèlement il existe une augmentation des lymphocytes Th1 et Tregs avec une diminution des lymphocytes Th2 et Th17 dans les ganglions médiastinaux des souris traitées. Ces résultats suggèrent qu'un traitement bloquant le NGF peut moduler la réponse cellulaire T dans l'inflammation bronchique [300]. Inversement les lymphocytes T peuvent jouer un rôle dans la réparation axonale. En effet dans un modèle murin de lésion de moëlle épinière, le transfert adoptif par injection intrapéritonéale de lymphocytes Th1, mais pas Th2 ou Th17, améliore la réparation axonale de souris traitées. Cet effet dépendrait de l'activation de certains macrophages et pourrait être aussi lié à la présence de NTs et notamment la NT-3 dont l'expression est augmentée dans les lymphocytes Th1 par rapport aux Th2 et Th17 [536].

L'IL-1 peut favoriser dans des conditions pathologiques neurologiques et le plus souvent dans des modèles murins, une expression des transcrits de NGF [537] de BDNF, de NT-3 [538] et des récepteurs Trk et p75<sup>NTR</sup> [539].

En résumé nous avons montré que les NTs et leurs récepteurs étaient impliqués dans la constitution de l'hyperplasie intinale de l'ACG. L'expression des neurotrophines peut être secondaire à la synthèse d'ET-1 dont l'expression peut elle-même être induite par les cytokines pro-inflammatoires et notamment l'IL-1. Cette dernière peut également être responsable directement de la synthèse des NTs.

Ainsi l'ensemble de ces constatations nous permettent d'envisager de nouvelles pistes d'explorations pour mieux comprendre la physiopathologie de l'ACG et en particulier le remodelage vasculaire.

# Conclusion et perspectives

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à deux aspects encore peu explorés de la physiopathologie de l'ACG : la recherche de bio-marqueur et les mécanismes du remodelage vasculaire.

Dans une première partie nous avons mis en évidence que le sérum des patients atteints d'ACG présentait des Ac dirigés contre des cibles protéiques extraites de CMLV. Ces cibles antigéniques étaient constituées de protéines intervenant dans le métabolisme énergétique de la cellule et dans la régulation de l'homéostasie cellulaire.

Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle potentiel des neurotrophines, en tant que facteur trophique, dans la physiopathologie du remodelage vasculaire de l'ACG. Nous avons montré, chez les patients atteints d'ACG, la surexpression protéique du NGF, du BDNF, du récepteur TrkB et de la sortiline. Il était intéressant de noter que la surexpression de TrkB était corrélée avec la survenue de complications ischémiques chez ces patients. De plus le NGF et en particulier le BDNF favorisaient une migration des CMLV dans les 24 premières heures de stimulation. Enfin, la concentration sanguine de NGF était plus élevée chez les patients par rapport aux contrôles.

Ces résultats confortent l'idée que les mécanismes responsables du remodelage vasculaire dans l'ACG sont multiples et que de nombreuses investigations sont nécessaires pour mieux les comprendre. Une meilleure compréhension de ces mécanismes permettra de mieux définir les cibles thérapeutiques afin d'améliorer l'épargne cortisonique et diminuer les complications ischémiques liées à l'hyperplasie intimale.

Ce travail a permis de dégager des perspectives qui pourraient permettre d'étayer les mécanismes physiopathologiques de l'ACG. La compréhension de ces mécanismes permettra d'envisager la mise en place d'études thérapeutiques reposant sur des molécules qui pourraient agir sur le remodelage vasculaire afin de limiter l'hyperplasie intimale et par là même les complications ischémiques.

## Neurotrophines et ACG

Nous souhaitons poursuivre notre recherche sur l'implication des NTs dans l'hyperplasie intimale de l'ACG. Afin de comprendre les phénomènes qui sous tendent la migration cellulaire induite par les neurotrophines, la stimulation des CMLV de patients et

de contrôles par les NTs, NGF, BDNF et NT-3 et l'analyse comparative de l'expression transcriptomique (qRT-PCR) et protéique (Western blot, protéome array), d'acteurs cellulaires impliqués dans la migration, l'activation cellulaire (PDGF, Akt, Erk, MMP-9...) et le rétrocontrôle potentiel de protéines régulatrices telles que Grb2 et la paxilline, identifiées chez les patients soit par l'induction d'auto-anticorps (Grb2), soit par leur surexpression dans les CMLV de patients (paxilline). Ces données expérimentales pourront être complétées par inactivation transitoire (siRNA, small interfering RNA) ou stable par shRNA (short hairpin RNA) du récepteur TrkB, de p75<sup>NTR</sup> ou de la sortiline dans les CMLV de patients et de contrôles et étudier la migration de ces cellules par rapport à celles des CMLV où l'expression de ces gènes est conservée.

### **Endothéline-1 et ACG**

Nous émettons l'hypothèse que l'ET-1 participe à la pathogénie de la GCA et que le blocage des récepteurs ETA et ETB pourrait participer à la régulation de la prolifération et la migration des CMLV chez les patients atteints d'ACG. Ainsi, le blocage des récepteurs à l'ET-1 pourrait réduire les risques de thrombose vasculaire et permettre une épargne cortisonique par diminution des phénomènes inflammatoires systémiques et locaux.

Nous proposons d'étudier les effets des inhibiteurs des récepteurs de l'ET-1 au niveau des CMLV de patients atteints d'ACG et de contrôles. Les effets seront évalués par l'étude de la prolifération (BrdU) et de la migration cellulaire (Chambre de Boyden) par étude comparative des CMLV de patients et de contrôles en présence ou non d'antagonistes des récepteurs de l'ET-1 (ARE). Nous pourrions ensuite étudier l'expression de l'ET-1 et des récepteurs ETA et ETB à la surface des CMLV des patients et des contrôles en l'absence et en présence de corticoïdes en immunofluorescence indirecte ou par Western Blot. Une étude de l'expression des gènes de l'ET-1, des récepteurs ETA et ETA, et de gènes associés à la migration cellulaire ainsi qu'à ceux des NTs et de leurs récepteurs, sera réalisée par une étude transcriptomique (qRT-PCR, Taqman Low Density Array, TLDA) dans les CMLV de patients avant et après traitement par un ARE, pour définir les interactions potentielles de ces différents acteurs. Pour ce projet, nous avons obtenu, par le laboratoire Actélion®, du principe actif sous forme de poudre d'un ARE non encore commercialisé, le macitentan. Nous sommes en discussion avec les laboratoires Pfizer® et GSK® pour obtenir du principe actif des produits qu'ils commercialisent, respectivement, l'ambrisentan et le sildénafil, deux molécules agissant sur la prolifération et la migration des CMLV et commercialisés dans le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire.



## **IL-1 et GCA**

Nous émettons également l'hypothèse que l'IL-1 $\beta$  participe activement aux mécanismes constitutifs du remodelage vasculaire de l'ACG et que le blocage de l'action de l'IL-1 $\beta$  par l'anakinra, anticorps monoclonal humanisé bloquant l'IL-1 $\beta$  circulante, pourrait améliorer les lésions artérielles observées au cours de cette maladie. Ainsi à partir de souris knock-out pour le gène de l'IL-1ra, nous étudierons la cinétique de constitution de l'inflammation et de l'hyperplasie intimale des lésions artérielles par immunohistochimie après euthanasie des souris à différents âges. Nous mettrons au point la culture primaire des CMLV et des fibroblastes obtenus à partir de l'aorte de ces différentes souris pour pouvoir en étudier le sécrétome. Dans le but d'évaluer l'effet de l'anakinra dans ce contexte, nous pourrions comparer un groupe de souris l'IL-1 $rn^{-/-}$  traitées par injection intrapéritonéale d'anakinra à un groupe de souris l'IL-1 $rn^{-/-}$  traitées par un placebo. Après sacrifice des souris à différents âges, des études immunohistochimiques permettront d'évaluer l'effet de l'anakinra au niveau des lésions artérielles. Pour ce projet de recherche, nous disposons d'une boîte de seringues d'anakinra fournie par le laboratoire SOBI. Des tests de prolifération cellulaire des CMLV de patients et de contrôles ont déjà été réalisés en présence ou en absence d'anakinra.

Nos données sur la participation des exosomes dans les communications intercellulaires existantes au sein d'une artère temporale d'un patient atteint d'ACG sont très parcellaires. Il sera intéressant par la suite d'étudier le rôle des exosomes et notamment de la protéine Rab27a dans la physiopathologie de cette maladie.

L'ensemble de ces travaux devrait nous permettre de définir les liens potentiels entre les NTs, l'endothéline, l'IL-1 et le relargage des NTs par des exosomes dans la constitution des lésions inflammatoires de l'ACG.

# Références

- [1] McDonald NQ, Chao MV. Structural determinants of neurotrophin action. *J Biol Chem.* 1995;270:19669-72.
- [2] Ly KH, Regent A, Tamby MC, et al. Pathogenesis of giant cell arteritis: More than just an inflammatory condition? *Autoimmun Rev.* 2010;9:635-45.
- [3] Schmits R, Kubuschok B, Schuster S, et al. Analysis of the B cell repertoire against autoantigens in patients with giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Clin Exp Immunol.* 2002;127:379-85.
- [4] Espinoza LR, Jara LJ, Silveira LH, et al. Anticardiolipin antibodies in polymyalgia rheumatica-giant cell arteritis: association with severe vascular complications. *Am J Med.* 1991;90:474-8.
- [5] Duhaut P, Berruyer M, Pinede L, et al. Anticardiolipin antibodies and giant cell arteritis: a prospective, multicenter case-control study. *Groupe de Recherche sur l'Arterite a Cellules Geantes. Arthritis Rheum.* 1998;41:701-9.
- [6] Baiu DC, Barger B, Sandor M, et al. Autoantibodies to vascular smooth muscle are pathogenic for vasculitis. *Am J Pathol.* 2005;166:1851-60.
- [7] Donovan MJ, Miranda RC, Kraemer R, et al. Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cells. Regulation of expression in response to injury. *Am J Pathol.* 1995;147:309-24.
- [8] Horton BT, Magath, TB, Brown, GE. An undescribed form of arteritis of the temporal vessels. *Proc Staff Meet Mayo Clinic.* 1932;7:700-1.
- [9] Jennings GH. Arteritis of the temporal vessels. *Lancet.* 1938;1:428-8.
- [10] Cooke WT, Cloake PC, et al. Temporal arteritis; a generalized vascular disease. *Q J Med.* 1946;15:47-75.
- [11] Paulley JW, Hughes JP. Giant-cell arteritis, or arteritis of the aged. *Br Med J.* 1960;2:1562-7.
- [12] Dhotel Y. [Forestier-Certonciny Syndrome and Abrami-Parlier Syndrome]. *Rev Rhum Mal Osteoartic.* 1964;31:599-600.
- [13] Alestig K, Barr J. Giant-cell arteritis. A biopsy study of polymyalgia rheumatica, including one case of Takayasu's disease. *Lancet.* 1963;1:1228-30.
- [14] Hamrin B, Jonsson N, Landberg T. Involvement of Large Vessels in Polymyalgia Arteritica. *Lancet.* 1965;1:1193-6.
- [15] Henriet JP, Marin J, Gosselin J, et al. [The history of Horton's disease or ... 10 centuries of a fascinating adventure]. *J Mal Vasc.* 1989;14 Suppl C:93-7.
- [16] Liozon F, Catanzano G. [Horton's temporal arteritis. Anatomopathologic study using light microscopy. Apropos of 123 temporal biopsies]. *Rev Med Interne.* 1982;3:295-301.
- [17] Lavignac C, Jauberteau-Marchan MO, Liozon E, et al. [Immunohistochemical study of lesions in Horton's temporal arteritis before and during corticotherapy]. *Rev Med Interne.* 1996;17:814-20.
- [18] Chatelain D, Duhaut P, Schmidt J, et al. Pathological features of temporal arteries in patients with giant cell arteritis presenting with permanent visual loss. *Ann Rheum Dis.* 2009;68:84-8.
- [19] Weyand CM, Hicok KC, Hunder GG, et al. Tissue cytokine patterns in patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Ann Intern Med.* 1994;121:484-91.
- [20] Emilie D, Liozon E, Crevon MC, et al. Production of interleukin 6 by granulomas of giant cell arteritis. *Hum Immunol.* 1994;39:17-24.
- [21] Ma-Krupa W, Jeon MS, Spoerl S, et al. Activation of arterial wall dendritic cells and breakdown of self-tolerance in giant cell arteritis. *J Exp Med.* 2004;199:173-83.
- [22] Blanco P, Palucka AK, Pascual V, et al. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008;19:41-52.
- [23] Deng J, Ma-Krupa W, Gewirtz AT, et al. Toll-like receptors 4 and 5 induce distinct types of vasculitis. *Circ Res.* 2009;104:488-95.

- [24] Krupa WM, Dewan M, Jeon MS, et al. Trapping of misdirected dendritic cells in the granulomatous lesions of giant cell arteritis. *Am J Pathol.* 2002;161:1815-23.
- [25] Weyand CM, Schonberger J, Oppitz U, et al. Distinct vascular lesions in giant cell arteritis share identical T cell clonotypes. *J Exp Med.* 1994;179:951-60.
- [26] Grunewald J, Andersson R, Rydberg L, et al. CD4+ and CD8+ T cell expansions using selected TCR V and J gene segments at the onset of giant cell arteritis. *Arthritis Rheum.* 1994;37:1221-7.
- [27] Brack A, Geisler A, Martinez-Taboada VM, et al. Giant cell vasculitis is a T cell-dependent disease. *Mol Med.* 1997;3:530-43.
- [28] Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:485-517.
- [29] Samson M, Lakomy D, Audia S, et al. [T(H)17 lymphocytes: induction, phenotype, functions, and implications in human disease and therapy]. *Rev Med Interne.* 2011;32:292-301.
- [30] Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med.* 2009;361:888-98.
- [31] Deng J, Younge BR, Olshen RA, et al. Th17 and Th1 T-cell responses in giant cell arteritis. *Circulation.* 2010;121:906-15.
- [32] Samson M, Audia S, Fraszczak J, et al. Th1 and Th17 lymphocytes expressing CD161 are implicated in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica pathogenesis. *Arthritis Rheum.* 2012;64:3788-98.
- [33] Ciccia F, Alessandro R, Rizzo A, et al. Expression of interleukin-32 in the inflamed arteries of patients with giant cell arteritis. *Arthritis Rheum.* 2011;63:2097-104.
- [34] Roche NE, Fulbright JW, Wagner AD, et al. Correlation of interleukin-6 production and disease activity in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Arthritis Rheum.* 1993;36:1286-94.
- [35] Weyand CM, Wagner AD, Bjornsson J, et al. Correlation of the topographical arrangement and the functional pattern of tissue-infiltrating macrophages in giant cell arteritis. *J Clin Invest.* 1996;98:1642-9.
- [36] Rittner HL, Kaiser M, Brack A, et al. Tissue-destructive macrophages in giant cell arteritis. *Circ Res.* 1999;84:1050-8.
- [37] Nikkari ST, Hoyhtya M, Isola J, et al. Macrophages contain 92-kd gelatinase (MMP-9) at the site of degenerated internal elastic lamina in temporal arteritis. *Am J Pathol.* 1996;149:1427-33.
- [38] Segarra M, Garcia-Martinez A, Sanchez M, et al. Gelatinase expression and proteolytic activity in giant-cell arteritis. *Ann Rheum Dis.* 2007;66:1429-35.
- [39] Rodriguez-Pla A, Bosch-Gil JA, Rossello-Urgell J, et al. Metalloproteinase-2 and -9 in giant cell arteritis: involvement in vascular remodeling. *Circulation.* 2005;112:264-9.
- [40] Borkowski A, Younge BR, Szweda L, et al. Reactive nitrogen intermediates in giant cell arteritis: selective nitration of neocapillaries. *Am J Pathol.* 2002;161:115-23.
- [41] Rittner HL, Hafner V, Klimiuk PA, et al. Aldose reductase functions as a detoxification system for lipid peroxidation products in vasculitis. *J Clin Invest.* 1999;103:1007-13.
- [42] Fingerle J, Johnson R, Clowes AW, et al. Role of platelets in smooth muscle cell proliferation and migration after vascular injury in rat carotid artery. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:8412-6.
- [43] Ferns GA, Raines EW, Sprugel KH, et al. Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science.* 1991;253:1129-32.
- [44] Kaiser M, Weyand CM, Bjornsson J, et al. Platelet-derived growth factor, intimal hyperplasia, and ischemic complications in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum.* 1998;41:623-33.
- [45] Kaiser M, Younge B, Bjornsson J, et al. Formation of new vasa vasorum in vasculitis. Production of angiogenic cytokines by multinucleated giant cells. *Am J Pathol.* 1999;155:765-74.
- [46] Hunder GG. Epidemiology of giant-cell arteritis. *Cleve Clin J Med.* 2002;69 Suppl 2:SII79-82.
- [47] Gonzalez-Gay MA, Vazquez-Rodriguez TR, Lopez-Diaz MJ, et al. Epidemiology of giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Arthritis Rheum.* 2009;61:1454-61.
- [48] Bielory L, Ogunkoya A, Frohman LP. Temporal arteritis in blacks. *Am J Med.* 1989;86:707-8.
- [49] Chaudhry IA, Shamsi FA, Elzaridi E, et al. Epidemiology of giant-cell arteritis in an Arab population: a 22-year study. *Br J Ophthalmol.* 2007;91:715-8.

- [50] Hu Z, Yang Q, Zeng S, et al. Giant cell arteritis in China: a prospective investigation. *Angiology*. 2002;53:457-63.
- [51] Kobayashi S, Yano T, Matsumoto Y, et al. Clinical and epidemiologic analysis of giant cell (temporal) arteritis from a nationwide survey in 1998 in Japan: the first government-supported nationwide survey. *Arthritis Rheum*. 2003;49:594-8.
- [52] Baldursson O, Steinsson K, Bjornsson J, et al. Giant cell arteritis in Iceland. An epidemiologic and histopathologic analysis. *Arthritis Rheum*. 1994;37:1007-12.
- [53] Haugeberg G, Paulsen PQ, Bie RB. Temporal arteritis in Vest Agder County in southern Norway: incidence and clinical findings. *J Rheumatol*. 2000;27:2624-7.
- [54] Salvarani C, Crowson CS, O'Fallon WM, et al. Reappraisal of the epidemiology of giant cell arteritis in Olmsted County, Minnesota, over a fifty-year period. *Arthritis Rheum*. 2004;51:264-8.
- [55] Smeeth L, Cook C, Hall AJ. Incidence of diagnosed polymyalgia rheumatica and temporal arteritis in the United Kingdom, 1990-2001. *Ann Rheum Dis*. 2006;65:1093-8.
- [56] Duhaut P, Pinede L, Demolombe-Rague S, et al. Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica: are pregnancies a protective factor? A prospective, multicentre case-control study. *GRACG (Groupe de Recherche sur l'Arterite a Cellules Geantes). Rheumatology (Oxford)*. 1999;38:118-23.
- [57] Larsson K, Mellstrom D, Nordborg E, et al. Early menopause, low body mass index, and smoking are independent risk factors for developing giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis*. 2006;65:529-32.
- [58] Duhaut P, Pinede L, Demolombe-Rague S, et al. Giant cell arteritis and cardiovascular risk factors: a multicenter, prospective case-control study. *Groupe de Recherche sur l'Arterite a Cellules Geantes. Arthritis Rheum*. 1998;41:1960-5.
- [59] Fietta P, Manganelli P, Zanetti A, et al. Familial giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica: aggregation in 2 families. *J Rheumatol*. 2002;29:1551-5.
- [60] Liozon E, Ouattara B, Rhaïem K, et al. Familial aggregation in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica: a comprehensive literature review including 4 new families. *Clin Exp Rheumatol*. 2009;27:S89-94.
- [61] Ly KH, Liozon E, Fauchais AL, et al. [Pathophysiology of giant cell arteritis.]. *Rev Med Interne*. 2013.
- [62] Liozon F. [Horton's disease]. *Ann Med Interne (Paris)*. 1989;140:122-41.
- [63] Bengtsson BA, Malmvall BE. Giant cell arteritis. *Acta Med Scand Suppl*. 1982;658:1-102.
- [64] Liozon E, Herrmann F, Ly K, et al. Risk factors for visual loss in giant cell (temporal) arteritis: a prospective study of 174 patients. *Am J Med*. 2001;111:211-7.
- [65] Gonzalez-Gay MA, Barros S, Lopez-Diaz MJ, et al. Giant cell arteritis: disease patterns of clinical presentation in a series of 240 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2005;84:269-76.
- [66] Salvarani C, Hunder GG. Musculoskeletal manifestations in a population-based cohort of patients with giant cell arteritis. *Arthritis Rheum*. 1999;42:1259-66.
- [67] Kermani TA, Warrington KJ. Polymyalgia rheumatica. *Lancet*. 2013;381:63-72.
- [68] Cantini F, Salvarani C, Olivieri I, et al. Shoulder ultrasonography in the diagnosis of polymyalgia rheumatica: a case-control study. *J Rheumatol*. 2001;28:1049-55.
- [69] Camellino D, Cimmino MA. Imaging of polymyalgia rheumatica: indications on its pathogenesis, diagnosis and prognosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2012;51:77-86.
- [70] Liozon E, Ly KH, Robert PY. [Ocular complications of giant cell arteritis.]. *Rev Med Interne*. 2013.
- [71] Ostberg G. Temporal arteritis in a large necropsy series. *Ann Rheum Dis*. 1971;30:224-35.
- [72] Klein RG, Hunder GG, Stanson AW, et al. Large artery involvement in giant cell (temporal) arteritis. *Ann Intern Med*. 1975;83:806-12.
- [73] Agard C, Barrier JH, Dupas B, et al. Aortic involvement in recent-onset giant cell (temporal) arteritis: a case-control prospective study using helical aortic computed tomodensitometric scan. *Arthritis Rheum*. 2008;59:670-6.
- [74] Prieto-Gonzalez S, Arguis P, Garcia-Martinez A, et al. Large vessel involvement in biopsy-proven giant cell arteritis: prospective study in 40 newly diagnosed patients using CT angiography. *Ann Rheum Dis*. 2012;71:1170-6.

- [75] Evans JM, Bowles CA, Bjornsson J, et al. Thoracic aortic aneurysm and rupture in giant cell arteritis. A descriptive study of 41 cases. *Arthritis Rheum.* 1994;37:1539-47.
- [76] Evans JM, O'Fallon WM, Hunder GG. Increased incidence of aortic aneurysm and dissection in giant cell (temporal) arteritis. A population-based study. *Ann Intern Med.* 1995;122:502-7.
- [77] Espitia O, Agard C. [Aortitis in giant cell arteritis and its complications.]. *Rev Med Interne.* 2013.
- [78] Assie C, Marie I. [Giant cell arteritis-related upper/lower limb vasculitis]. *Presse Med.* 2011;40:151-61.
- [79] Assie C, Janvresse A, Plissonnier D, et al. Long-term follow-up of upper and lower extremity vasculitis related to giant cell arteritis: a series of 36 patients. *Medicine (Baltimore).* 2011;90:40-51.
- [80] Schmidt WA, Kraft HE, Vorpahl K, et al. Color duplex ultrasonography in the diagnosis of temporal arteritis. *N Engl J Med.* 1997;337:1336-42.
- [81] Lie JT, Failoni DD, Davis DC, Jr. Temporal arteritis with giant cell aortitis, coronary arteritis, and myocardial infarction. *Arch Pathol Lab Med.* 1986;110:857-60.
- [82] Lin LW, Wang SS, Shun CT. Myocardial infarction due to giant cell arteritis: a case report and literature review. *Kaohsiung J Med Sci.* 2007;23:195-8.
- [83] Caselli RJ, Hunder GG, Whisnant JP. Neurologic disease in biopsy-proven giant cell (temporal) arteritis. *Neurology.* 1988;38:352-9.
- [84] Caselli RJ, Daube JR, Hunder GG, et al. Peripheral neuropathic syndromes in giant cell (temporal) arteritis. *Neurology.* 1988;38:685-9.
- [85] Larson TS, Hall S, Hepper NG, et al. Respiratory tract symptoms as a clue to giant cell arteritis. *Ann Intern Med.* 1984;101:594-7.
- [86] Valstar MH, Terpstra WF, de Jong RS. Pericardial and pleural effusion in giant cell arteritis. *Am J Med.* 2003;114:708-9.
- [87] Sujobert P, Fardet L, Marie I, et al. Mesenteric ischemia in giant cell arteritis: 6 cases and a systematic review. *J Rheumatol.* 2007;34:1727-32.
- [88] Litwack KD, Bohan A, Silverman L. Granulomatous liver disease and giant cell arteritis. Case report and literature review. *J Rheumatol.* 1977;4:307-12.
- [89] Liozon E, Loustaud-Ratti V, Soria P, et al. [Disease associations in 250 patients with temporal (giant cell) arteritis]. *Presse Med.* 2004;33:1304-12.
- [90] Bajocchi G, Zamorani G, Cavazza A, et al. Giant-cell arteritis of the female genital tract associated with occult temporal arteritis and FDG-PET evidence of large-vessel vasculitis. *Clin Exp Rheumatol.* 2007;25:S36-9.
- [91] Gonzalez-Gay MA, Lopez-Diaz MJ, Barros S, et al. Giant cell arteritis: laboratory tests at the time of diagnosis in a series of 240 patients. *Medicine (Baltimore).* 2005;84:277-90.
- [92] Salvarani C, Hunder GG. Giant cell arteritis with low erythrocyte sedimentation rate: frequency of occurrence in a population-based study. *Arthritis Rheum.* 2001;45:140-5.
- [93] Cid MC, Font C, Oristrell J, et al. Association between strong inflammatory response and low risk of developing visual loss and other cranial ischemic complications in giant cell (temporal) arteritis. *Arthritis Rheum.* 1998;41:26-32.
- [94] Narvaez J, Bernad B, Roig-Vilaseca D, et al. Influence of previous corticosteroid therapy on temporal artery biopsy yield in giant cell arteritis. *Semin Arthritis Rheum.* 2007;37:13-9.
- [95] Breuer GS, Neshet R, Neshet G. Effect of biopsy length on the rate of positive temporal artery biopsies. *Clin Exp Rheumatol.* 2009;27:S10-3.
- [96] Breuer GS, Neshet G, Neshet R. Rate of discordant findings in bilateral temporal artery biopsy to diagnose giant cell arteritis. *J Rheumatol.* 2009;36:794-6.
- [97] Esteban MJ, Font C, Hernandez-Rodriguez J, et al. Small-vessel vasculitis surrounding a spared temporal artery: clinical and pathological findings in a series of twenty-eight patients. *Arthritis Rheum.* 2001;44:1387-95.
- [98] Chatelain D, Duhaut P, Loire R, et al. Small-vessel vasculitis surrounding an uninfamed temporal artery: a new diagnostic criterion for polymyalgia rheumatica? *Arthritis Rheum.* 2008;58:2565-73.

- [99] Restuccia G, Cavazza A, Boiardi L, et al. Small-vessel vasculitis surrounding an uninflamed temporal artery and isolated vasa vasorum vasculitis of the temporal artery: two subsets of giant cell arteritis. *Arthritis Rheum*. 2012;64:549-56.
- [100] Hunder GG, Bloch DA, Michel BA, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of giant cell arteritis. *Arthritis Rheum*. 1990;33:1122-8.
- [101] Liozon F, Jauberteau-Marchan MO, Boutros-Toni F, et al. [Anticardiolipin antibodies and Horton disease]. *Ann Med Interne (Paris)*. 1995;146:541-7.
- [102] Liozon E, Roblot P, Paire D, et al. Anticardiolipin antibody levels predict flares and relapses in patients with giant-cell (temporal) arteritis. A longitudinal study of 58 biopsy-proven cases. *Rheumatology (Oxford)*. 2000;39:1089-94.
- [103] Baerlecken NT, Linnemann A, Gross WL, et al. Association of ferritin autoantibodies with giant cell arteritis/polymyalgia rheumatica. *Ann Rheum Dis*. 2012;71:943-7.
- [104] Regent A, Ly KH, Blet A, et al. Contribution of antiferritin antibodies to diagnosis of giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis*. 2013.
- [105] Karassa FB, Matsagas MI, Schmidt WA, et al. Meta-analysis: test performance of ultrasonography for giant-cell arteritis. *Ann Intern Med*. 2005;142:359-69.
- [106] Schmidt WA, Seifert A, Gromnica-Ihle E, et al. Ultrasound of proximal upper extremity arteries to increase the diagnostic yield in large-vessel giant cell arteritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47:96-101.
- [107] Marie I, Proux A, Duhaut P, et al. Long-term follow-up of aortic involvement in giant cell arteritis: a series of 48 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2009;88:182-92.
- [108] Bley TA, Weiben O, Uhl M, et al. Assessment of the cranial involvement pattern of giant cell arteritis with 3T magnetic resonance imaging. *Arthritis Rheum*. 2005;52:2470-7.
- [109] Bley TA, Reinhard M, Hauenstein C, et al. Comparison of duplex sonography and high-resolution magnetic resonance imaging in the diagnosis of giant cell (temporal) arteritis. *Arthritis Rheum*. 2008;58:2574-8.
- [110] Narvaez J, Narvaez JA, Nolla JM, et al. Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica: usefulness of vascular magnetic resonance imaging studies in the diagnosis of aortitis. *Rheumatology (Oxford)*. 2005;44:479-83.
- [111] Meller J, Strutz F, Siefker U, et al. Early diagnosis and follow-up of aortitis with [(18)F]FDG PET and MRI. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2003;30:730-6.
- [112] Both M, Ahmadi-Simab K, Reuter M, et al. MRI and FDG-PET in the assessment of inflammatory aortic arch syndrome in complicated courses of giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis*. 2008;67:1030-3.
- [113] Blockmans D, Maes A, Stroobants S, et al. New arguments for a vasculitic nature of polymyalgia rheumatica using positron emission tomography. *Rheumatology (Oxford)*. 1999;38:444-7.
- [114] Blockmans D, de Ceuninck L, Vanderschueren S, et al. Repetitive 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in giant cell arteritis: a prospective study of 35 patients. *Arthritis Rheum*. 2006;55:131-7.
- [115] Besson FL, Parienti JJ, Bienvenu B, et al. Diagnostic performance of (1)(8)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in giant cell arteritis: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2011;38:1764-72.
- [116] Blockmans D, Coudyzer W, Vanderschueren S, et al. Relationship between fluorodeoxyglucose uptake in the large vessels and late aortic diameter in giant cell arteritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47:1179-84.
- [117] Liozon E, Monteil J, Ly KH, et al. [Vasculitis assessment with [18F]FDG positron emission tomography]. *Rev Med Interne*. 2010;31:417-27.
- [118] Yun M, Jang S, Cucchiara A, et al. 18F FDG uptake in the large arteries: a correlation study with the atherogenic risk factors. *Semin Nucl Med*. 2002;32:70-6.
- [119] Walter MA, Melzer RA, Schindler C, et al. The value of [18F]FDG-PET in the diagnosis of large-vessel vasculitis and the assessment of activity and extent of disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2005;32:674-81.

- [120] Mukhtyar C, Guillevin L, Cid MC, et al. EULAR recommendations for the management of large vessel vasculitis. *Ann Rheum Dis.* 2009;68:318-23.
- [121] Dasgupta B, Borg FA, Hassan N, et al. BSR and BHPR guidelines for the management of giant cell arteritis. *Rheumatology (Oxford).* 2010;49:1594-7.
- [122] Chevalet P, Barrier JH, Pottier P, et al. A randomized, multicenter, controlled trial using intravenous pulses of methylprednisolone in the initial treatment of simple forms of giant cell arteritis: a one year followup study of 164 patients. *J Rheumatol.* 2000;27:1484-91.
- [123] Mazlumzadeh M, Hunder GG, Easley KA, et al. Treatment of giant cell arteritis using induction therapy with high-dose glucocorticoids: a double-blind, placebo-controlled, randomized prospective clinical trial. *Arthritis Rheum.* 2006;54:3310-8.
- [124] Proven A, Gabriel SE, Orces C, et al. Glucocorticoid therapy in giant cell arteritis: duration and adverse outcomes. *Arthritis Rheum.* 2003;49:703-8.
- [125] Hachulla E, Boivin V, Pasturel-Michon U, et al. Prognostic factors and long-term evolution in a cohort of 133 patients with giant cell arteritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2001;19:171-6.
- [126] Martinez-Lado L, Calvino-Diaz C, Pineiro A, et al. Relapses and recurrences in giant cell arteritis: a population-based study of patients with biopsy-proven disease from northwestern Spain. *Medicine (Baltimore).* 2011;90:186-93.
- [127] van der Veen MJ, Dinant HJ, van Booma-Frankfort C, et al. Can methotrexate be used as a steroid sparing agent in the treatment of polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis? *Ann Rheum Dis.* 1996;55:218-23.
- [128] Jover JA, Hernandez-Garcia C, Morado IC, et al. Combined treatment of giant-cell arteritis with methotrexate and prednisone. a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med.* 2001;134:106-14.
- [129] Hoffman GS, Cid MC, Hellmann DB, et al. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of adjuvant methotrexate treatment for giant cell arteritis. *Arthritis Rheum.* 2002;46:1309-18.
- [130] Mahr AD, Jover JA, Spiera RF, et al. Adjunctive methotrexate for treatment of giant cell arteritis: an individual patient data meta-analysis. *Arthritis Rheum.* 2007;56:2789-97.
- [131] De Silva M, Hazleman BL. Azathioprine in giant cell arteritis/polymyalgia rheumatica: a double-blind study. *Ann Rheum Dis.* 1986;45:136-8.
- [132] Sailler L, Pugnet G, Bienvenu B. [Treatment of giant cell arteritis.]. *Rev Med Interne.* 2013.
- [133] Hoffman GS, Cid MC, Rendt-Zagar KE, et al. Infliximab for maintenance of glucocorticosteroid-induced remission of giant cell arteritis: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2007;146:621-30.
- [134] Henes JC, Mueller M, Pfannenbergl C, et al. Cyclophosphamide for large vessel vasculitis: assessment of response by PET/CT. *Clin Exp Rheumatol.* 2011;29:S43-8.
- [135] de Boysson H, Boutemy J, Creveuil C, et al. Is there a place for cyclophosphamide in the treatment of giant-cell arteritis? A case series and systematic review. *Semin Arthritis Rheum.* 2013.
- [136] Liozon F, Vidal E, Bonnetblanc JM, et al. [Disulon in the treatment of Horton's disease. Experience with 20 patients]. *Ann Med Interne (Paris).* 1986;137:299-306.
- [137] Beyer C, Axmann R, Sahinbegovic E, et al. Anti-interleukin 6 receptor therapy as rescue treatment for giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis.* 2011;70:1874-5.
- [138] Seitz M, Reichenbach S, Bonel HM, et al. Rapid induction of remission in large vessel vasculitis by IL-6 blockade. A case series. *Swiss Med Wkly.* 2011;141:w13156.
- [139] Salvarani C, Magnani L, Catanoso M, et al. Tocilizumab: a novel therapy for patients with large-vessel vasculitis. *Rheumatology (Oxford).* 2012;51:151-6.
- [140] Unizony S, Arias-Urdaneta L, Miloslavsky E, et al. Tocilizumab for the treatment of large-vessel vasculitis (giant cell arteritis, Takayasu arteritis) and polymyalgia rheumatica. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2012;64:1720-9.
- [141] Vinit J, Bielefeld P, Muller G, et al. Efficacy of tocilizumab in refractory giant cell arteritis. *Joint Bone Spine.* 2012;79:317-8.
- [142] Neshler G, Berkun Y, Mates M, et al. Low-dose aspirin and prevention of cranial ischemic complications in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50:1332-7.

- [143] Lee MS, Smith SD, Galor A, et al. Antiplatelet and anticoagulant therapy in patients with giant cell arteritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54:3306-9.
- [144] Gonzalez-Gay MA, Blanco R, Rodriguez-Valverde V, et al. Permanent visual loss and cerebrovascular accidents in giant cell arteritis: predictors and response to treatment. *Arthritis Rheum.* 1998;41:1497-504.
- [145] Salvarani C, Cimino L, Macchioni P, et al. Risk factors for visual loss in an Italian population-based cohort of patients with giant cell arteritis. *Arthritis Rheum.* 2005;53:293-7.
- [146] Mackie SL, Dasgupta B, Hordon L, et al. Ischaemic manifestations in giant cell arteritis are associated with area level socio-economic deprivation, but not cardiovascular risk factors. *Rheumatology (Oxford).* 2011;50:2014-22.
- [147] Nordborg E, Bengtsson BA. Death rates and causes of death in 284 consecutive patients with giant cell arteritis confirmed by biopsy. *BMJ.* 1989;299:549-50.
- [148] Matteson EL, Gold KN, Bloch DA, et al. Long-term survival of patients with giant cell arteritis in the American College of Rheumatology giant cell arteritis classification criteria cohort. *Am J Med.* 1996;100:193-6.
- [149] Gonzalez-Gay MA, Blanco R, Abaira V, et al. Giant cell arteritis in Lugo, Spain, is associated with low longterm mortality. *J Rheumatol.* 1997;24:2171-6.
- [150] Uddhammar A, Eriksson AL, Nystrom L, et al. Increased mortality due to cardiovascular disease in patients with giant cell arteritis in northern Sweden. *J Rheumatol.* 2002;29:737-42.
- [151] Liu G, Shupak R, Chiu BK. Aortic dissection in giant-cell arteritis. *Semin Arthritis Rheum.* 1995;25:160-71.
- [152] Neshet G, Sonnenblick M, Friedlander Y. Analysis of steroid related complications and mortality in temporal arteritis: a 15-year survey of 43 patients. *J Rheumatol.* 1994;21:1283-6.
- [153] Agard C, Espitia O, Neel A. [Prognosis of giant cell arteritis]. *Presse Med.* 2012;41:966-74.
- [154] Nueninghoff DM, Hunder GG, Christianson TJ, et al. Incidence and predictors of large-artery complication (aortic aneurysm, aortic dissection, and/or large-artery stenosis) in patients with giant cell arteritis: a population-based study over 50 years. *Arthritis Rheum.* 2003;48:3522-31.
- [155] Nueninghoff DM, Hunder GG, Christianson TJ, et al. Mortality of large-artery complication (aortic aneurysm, aortic dissection, and/or large-artery stenosis) in patients with giant cell arteritis: a population-based study over 50 years. *Arthritis Rheum.* 2003;48:3532-7.
- [156] Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrúa C, Pineiro A, et al. Aortic aneurysm and dissection in patients with biopsy-proven giant cell arteritis from northwestern Spain: a population-based study. *Medicine (Baltimore).* 2004;83:335-41.
- [157] Bengtsson BA, Malmvall BE. Prognosis of giant cell arteritis including temporal arteritis and polymyalgia rheumatica. A follow-up study on ninety patients treated with corticosteroids. *Acta Med Scand.* 1981;209:337-45.
- [158] Gordon LK, Levin LA. Visual loss in giant cell arteritis. *JAMA.* 1998;280:385-6.
- [159] Hayreh SS, Zimmerman B, Kardon RH. Visual improvement with corticosteroid therapy in giant cell arteritis. Report of a large study and review of literature. *Acta Ophthalmol Scand.* 2002;80:355-67.
- [160] Foroozan R, Deramo VA, Buono LM, et al. Recovery of visual function in patients with biopsy-proven giant cell arteritis. *Ophthalmology.* 2003;110:539-42.
- [161] Danesh-Meyer H, Savino PJ, Gamble GG. Poor prognosis of visual outcome after visual loss from giant cell arteritis. *Ophthalmology.* 2005;112:1098-103.
- [162] Hayreh SS, Zimmerman B. Management of giant cell arteritis. Our 27-year clinical study: new light on old controversies. *Ophthalmologica.* 2003;217:239-59.
- [163] Aiello PD, Trautmann JC, McPhee TJ, et al. Visual prognosis in giant cell arteritis. *Ophthalmology.* 1993;100:550-5.
- [164] Font C, Cid MC, Coll-Vinent B, et al. Clinical features in patients with permanent visual loss due to biopsy-proven giant cell arteritis. *Br J Rheumatol.* 1997;36:251-4.



- [165] Ogunshola OO, Antic A, Donoghue MJ, et al. Paracrine and autocrine functions of neuronal vascular endothelial growth factor (VEGF) in the central nervous system. *J Biol Chem.* 2002;277:11410-5.
- [166] Kraemer R, Nguyen H, March KL, et al. NGF activates similar intracellular signaling pathways in vascular smooth muscle cells as PDGF-BB but elicits different biological responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1041-50.
- [167] Chaldakov GN, Stankulov IS, Fiore M, et al. Nerve growth factor levels and mast cell distribution in human coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2001;159:57-66.
- [168] Wang S, Bray P, McCaffrey T, et al. p75(NTR) mediates neurotrophin-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol.* 2000;157:1247-58.
- [169] Levi-Montalcini R, Hamburger V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool.* 1951;116:321-61.
- [170] Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Sensory neurons in culture: changing requirements for survival factors during embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77:1199-203.
- [171] Hofer MM, Barde YA. Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death in vivo. *Nature.* 1988;331:261-2.
- [172] Jones KR, Reichardt LF. Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:8060-4.
- [173] Ip NY, Ibanez CF, Nye SH, et al. Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:3060-4.
- [174] Gotz R, Koster R, Winkler C, et al. Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature.* 1994;372:266-9.
- [175] Nilsson AS, Fainzilber M, Falck P, et al. Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. *FEBS Lett.* 1998;424:285-90.
- [176] Chao MV, Bothwell MA, Ross AH, et al. Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science.* 1986;232:518-21.
- [177] Kaplan DR, Hempstead BL, Martin-Zanca D, et al. The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science.* 1991;252:554-8.
- [178] Klein R, Parada LF, Coulier F, et al. trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *EMBO J.* 1989;8:3701-9.
- [179] Lamballe F, Klein R, Barbacid M. trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell.* 1991;66:967-79.
- [180] Hallbook F, Ibanez CF, Persson H. Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron.* 1991;6:845-58.
- [181] Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, et al. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem.* 2001;276:12660-6.
- [182] Bradshaw RA, Murray-Rust J, Ibanez CF, et al. Nerve growth factor: structure/function relationships. *Protein Sci.* 1994;3:1901-13.
- [183] McDonald NQ, Lapatto R, Murray-Rust J, et al. New protein fold revealed by a 2.3-A resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature.* 1991;354:411-4.
- [184] Robinson RC, Radziejewski C, Stuart DI, et al. Structure of the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 3 heterodimer. *Biochemistry.* 1995;34:4139-46.
- [185] Ilag LL, Lonnerberg P, Persson H, et al. Role of variable beta-hairpin loop in determining biological specificities in neurotrophin family. *J Biol Chem.* 1994;269:19941-6.
- [186] Drinkwater CC, Barker PA, Suter U, et al. The carboxyl terminus of nerve growth factor is required for biological activity. *J Biol Chem.* 1993;268:23202-7.
- [187] Woo SB, Neet KE. Characterization of histidine residues essential for receptor binding and activity of nerve growth factor. *J Biol Chem.* 1996;271:24433-41.
- [188] Kullander K, Kaplan D, Ebendal T. Two restricted sites on the surface of the nerve growth factor molecule independently determine specific TrkA receptor binding and activation. *J Biol Chem.* 1997;272:9300-7.

- [189] Kruttgen A, Heymach JV, Jr., Kahle PJ, et al. The role of the nerve growth factor carboxyl terminus in receptor binding and conformational stability. *J Biol Chem.* 1997;272:29222-8.
- [190] Ryden M, Ibanez CF. A second determinant of binding to the p75 neurotrophin receptor revealed by alanine-scanning mutagenesis of a conserved loop in nerve growth factor. *J Biol Chem.* 1997;272:33085-91.
- [191] Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6:603-14.
- [192] Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, et al. Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. *FEBS Lett.* 1996;379:247-50.
- [193] Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, et al. Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem J.* 1996;314 ( Pt 3):951-60.
- [194] Lee R, Kermani P, Teng KK, et al. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science.* 2001;294:1945-8.
- [195] Lessmann V, Gottmann K, Malsangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol.* 2003;69:341-74.
- [196] Mowla SJ, Pareek S, Farhadi HF, et al. Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 1999;19:2069-80.
- [197] Thomas K, Davies A. Neurotrophins: a ticket to ride for BDNF. *Curr Biol.* 2005;15:R262-4.
- [198] Farhadi HF, Mowla SJ, Petrecca K, et al. Neurotrophin-3 sorts to the constitutive secretory pathway of hippocampal neurons and is diverted to the regulated secretory pathway by coexpression with brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci.* 2000;20:4059-68.
- [199] Johnson D, Lanahan A, Buck CR, et al. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell.* 1986;47:545-54.
- [200] Klein R, Nanduri V, Jing SA, et al. The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell.* 1991;66:395-403.
- [201] Berg MM, Sternberg DW, Hempstead BL, et al. The low-affinity p75 nerve growth factor (NGF) receptor mediates NGF-induced tyrosine phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:7106-10.
- [202] Chao MV, Hempstead BL. p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci.* 1995;18:321-6.
- [203] Skaper SD. The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2008;7:46-62.
- [204] Rabizadeh S, Ye X, Sperandio S, et al. Neurotrophin dependence domain: a domain required for the mediation of apoptosis by the p75 neurotrophin receptor. *J Mol Neurosci.* 2000;15:215-29.
- [205] Wang JJ, Rabizadeh S, Tasinato A, et al. Dimerization-dependent block of the proapoptotic effect of p75(NTR). *J Neurosci Res.* 2000;60:587-93.
- [206] Liepinsh E, Ilag LL, Otting G, et al. NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J.* 1997;16:4999-5005.
- [207] El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, Dolle L, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein is involved in the neurotrophin receptor-mediated antiapoptotic activity of nerve growth factor in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2003;278:16952-6.
- [208] Rodriguez-Tebar A, Dechant G, Barde YA. Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron.* 1990;4:487-92.
- [209] Rodriguez-Tebar A, Dechant G, Gotz R, et al. Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J.* 1992;11:917-22.
- [210] Meakin SO, MacDonald JI, Gryz EA, et al. The signaling adapter FRS-2 competes with Shc for binding to the nerve growth factor receptor TrkA. A model for discriminating proliferation and differentiation. *J Biol Chem.* 1999;274:9861-70.
- [211] Wehrman T, He X, Raab B, et al. Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors. *Neuron.* 2007;53:25-38.
- [212] Bibel M, Hoppe E, Barde YA. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *EMBO J.* 1999;18:616-22.

- [213] Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, et al. High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature*. 1991;350:678-83.
- [214] Esposito D, Patel P, Stephens RM, et al. The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J Biol Chem*. 2001;276:32687-95.
- [215] Benedetti M, Levi A, Chao MV. Differential expression of nerve growth factor receptors leads to altered binding affinity and neurotrophin responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:7859-63.
- [216] Mischel PS, Smith SG, Vining ER, et al. The extracellular domain of p75NTR is necessary to inhibit neurotrophin-3 signaling through TrkA. *J Biol Chem*. 2001;276:11294-301.
- [217] Bredesen DE, Mehlen P, Rabizadeh S. Apoptosis and dependence receptors: a molecular basis for cellular addiction. *Physiol Rev*. 2004;84:411-30.
- [218] Barker PA. High affinity not in the vicinity? *Neuron*. 2007;53:1-4.
- [219] Barbacid M, Lamballe F, Pulido D, et al. The trk family of tyrosine protein kinase receptors. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1072:115-27.
- [220] Clary DO, Reichardt LF. An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:11133-7.
- [221] Strohmaier C, Carter BD, Urfer R, et al. A splice variant of the neurotrophin receptor trkB with increased specificity for brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J*. 1996;15:3332-7.
- [222] Shelton DL, Sutherland J, Gripp J, et al. Human trks: molecular cloning, tissue distribution, and expression of extracellular domain immunoadhesins. *J Neurosci*. 1995;15:477-91.
- [223] Ninkina N, Adu J, Fischer A, et al. Expression and function of TrkB variants in developing sensory neurons. *EMBO J*. 1996;15:6385-93.
- [224] Eide FF, Vining ER, Eide BL, et al. Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci*. 1996;16:3123-9.
- [225] Perez P, Coll PM, Hempstead BL, et al. NGF binding to the trk tyrosine kinase receptor requires the extracellular immunoglobulin-like domains. *Mol Cell Neurosci*. 1995;6:97-105.
- [226] Urfer R, Tsoulfas P, O'Connell L, et al. An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors. *EMBO J*. 1995;14:2795-805.
- [227] Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2000;103:211-25.
- [228] Nykjaer A, Willnow TE. Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends Neurosci*. 2012;35:261-70.
- [229] Nykjaer A, Lee R, Teng KK, et al. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*. 2004;427:843-8.
- [230] Teng HK, Teng KK, Lee R, et al. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci*. 2005;25:5455-63.
- [231] Tauris J, Gustafsen C, Christensen EI, et al. Proneurotrophin-3 may induce Sortilin-dependent death in inner ear neurons. *Eur J Neurosci*. 2011;33:622-31.
- [232] Jansen P, Giehl K, Nyengaard JR, et al. Roles for the pro-neurotrophin receptor sortilin in neuronal development, aging and brain injury. *Nat Neurosci*. 2007;10:1449-57.
- [233] Chen ZY, Ieraci A, Teng H, et al. Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. *J Neurosci*. 2005;25:6156-66.
- [234] Yang M, Lim Y, Li X, et al. Precursor of brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) forms a complex with Huntingtin-associated protein-1 (HAP1) and sortilin that modulates proBDNF trafficking, degradation, and processing. *J Biol Chem*. 2011;286:16272-84.
- [235] Evans SF, Irmady K, Ostrow K, et al. Neuronal brain-derived neurotrophic factor is synthesized in excess, with levels regulated by sortilin-mediated trafficking and lysosomal degradation. *J Biol Chem*. 2011;286:29556-67.
- [236] Rabizadeh S, Oh J, Zhong LT, et al. Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science*. 1993;261:345-8.
- [237] Wang X, Bauer JH, Li Y, et al. Characterization of a p75(NTR) apoptotic signaling pathway using a novel cellular model. *J Biol Chem*. 2001;276:33812-20.

- [238] Coulson EJ, Reid K, Baca M, et al. Chopper, a new death domain of the p75 neurotrophin receptor that mediates rapid neuronal cell death. *J Biol Chem.* 2000;275:30537-45.
- [239] Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, et al. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14:193-209.
- [240] Vilar M, Murillo-Carretero M, Mira H, et al. Bex1, a novel interactor of the p75 neurotrophin receptor, links neurotrophin signaling to the cell cycle. *EMBO J.* 2006;25:1219-30.
- [241] Yoon SO, Casaccia-Bonnet P, Carter B, et al. Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J Neurosci.* 1998;18:3273-81.
- [242] Bhakar AL, Howell JL, Paul CE, et al. Apoptosis induced by p75NTR overexpression requires Jun kinase-dependent phosphorylation of Bad. *J Neurosci.* 2003;23:11373-81.
- [243] Okuno S, Saito A, Hayashi T, et al. The c-Jun N-terminal protein kinase signaling pathway mediates Bax activation and subsequent neuronal apoptosis through interaction with Bim after transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci.* 2004;24:7879-87.
- [244] Yeiser EC, Rutkoski NJ, Naito A, et al. Neurotrophin signaling through the p75 receptor is deficient in *traf6*<sup>-/-</sup> mice. *J Neurosci.* 2004;24:10521-9.
- [245] Casademunt E, Carter BD, Benzel I, et al. The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75(NTR) and participates in programmed cell death. *EMBO J.* 1999;18:6050-61.
- [246] Gentry JJ, Rutkoski NJ, Burke TL, et al. A functional interaction between the p75 neurotrophin receptor interacting factors, TRAF6 and NRIF. *J Biol Chem.* 2004;279:16646-56.
- [247] Khursigara G, Orlinick JR, Chao MV. Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *J Biol Chem.* 1999;274:2597-600.
- [248] Kendall SE, Goldhawk DE, Kubu C, et al. Expression analysis of a novel p75(NTR) signaling protein, which regulates cell cycle progression and apoptosis. *Mech Dev.* 2002;117:187-200.
- [249] Bronfman FC, Tcherpakov M, Jovin TM, et al. Ligand-induced internalization of the p75 neurotrophin receptor: a slow route to the signaling endosome. *J Neurosci.* 2003;23:3209-20.
- [250] Mukai J, Shoji S, Kimura MT, et al. Structure-function analysis of NADE: identification of regions that mediate nerve growth factor-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2002;277:13973-82.
- [251] Kimura MT, Irie S, Shoji-Hoshino S, et al. 14-3-3 is involved in p75 neurotrophin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem.* 2001;276:17291-300.
- [252] Chittka A, Chao MV. Identification of a zinc finger protein whose subcellular distribution is regulated by serum and nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:10705-10.
- [253] Chittka A, Arevalo JC, Rodriguez-Guzman M, et al. The p75NTR-interacting protein SC1 inhibits cell cycle progression by transcriptional repression of cyclin E. *J Cell Biol.* 2004;164:985-96.
- [254] Carter BD, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, et al. Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science.* 1996;272:542-5.
- [255] Descamps S, Toillon RA, Adriaenssens E, et al. Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J Biol Chem.* 2001;276:17864-70.
- [256] Gentry JJ, Casaccia-Bonnet P, Carter BD. Nerve growth factor activation of nuclear factor kappaB through its p75 receptor is an anti-apoptotic signal in RN22 schwannoma cells. *J Biol Chem.* 2000;275:7558-65.
- [257] Dobrowsky RT, Jenkins GM, Hannun YA. Neurotrophins induce sphingomyelin hydrolysis. Modulation by co-expression of p75NTR with Trk receptors. *J Biol Chem.* 1995;270:22135-42.
- [258] Song MS, Posse de Chaves EI. Inhibition of rat sympathetic neuron apoptosis by ceramide. Role of p75NTR in ceramide generation. *Neuropharmacology.* 2003;45:1130-50.
- [259] Yamashita T, Tucker KL, Barde YA. Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron.* 1999;24:585-93.
- [260] Yamashita T, Tohyama M. The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci.* 2003;6:461-7.
- [261] Arevalo JC, Wu SH. Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci.* 2006;63:1523-37.

- [262] Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 2003;72:609-42.
- [263] MacDonald JI, Gryz EA, Kubu CJ, et al. Direct binding of the signaling adapter protein Grb2 to the activation loop tyrosines on the nerve growth factor receptor tyrosine kinase, TrkA. *J Biol Chem.* 2000;275:18225-33.
- [264] Qian X, Ginty DD. SH2-B and APS are multimeric adapters that augment TrkA signaling. *Mol Cell Biol.* 2001;21:1613-20.
- [265] Stephens RM, Loeb DM, Copeland TD, et al. Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron.* 1994;12:691-705.
- [266] Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006;361:1545-64.
- [267] Nimnual AS, Yatsula BA, Bar-Sagi D. Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science.* 1998;279:560-3.
- [268] Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, et al. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:535-602.
- [269] English J, Pearson G, Wilsbacher J, et al. New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp Cell Res.* 1999;253:255-70.
- [270] Kao S, Jaiswal RK, Kolch W, et al. Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *J Biol Chem.* 2001;276:18169-77.
- [271] Nosaka Y, Arai A, Miyasaka N, et al. CrkL mediates Ras-dependent activation of the Raf/ERK pathway through the guanine nucleotide exchange factor C3G in hematopoietic cells stimulated with erythropoietin or interleukin-3. *J Biol Chem.* 1999;274:30154-62.
- [272] Wright JH, Druceckes P, Bartoe J, et al. A role for the SHP-2 tyrosine phosphatase in nerve growth-induced PC12 cell differentiation. *Mol Biol Cell.* 1997;8:1575-85.
- [273] Lonze BE, Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron.* 2002;35:605-23.
- [274] Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001;22:153-83.
- [275] Obermeier A, Halfter H, Wiesmuller KH, et al. Tyrosine 785 is a major determinant of Trk--substrate interaction. *EMBO J.* 1993;12:933-41.
- [276] Corbit KC, Foster DA, Rosner MR. Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Mol Cell Biol.* 1999;19:4209-18.
- [277] Matsumoto T, Numakawa T, Adachi N, et al. Brain-derived neurotrophic factor enhances depolarization-evoked glutamate release in cultured cortical neurons. *J Neurochem.* 2001;79:522-30.
- [278] Yamada M, Ohnishi H, Sano S, et al. Brain-derived neurotrophic factor stimulates interactions of Shp2 with phosphatidylinositol 3-kinase and Grb2 in cultured cerebral cortical neurons. *J Neurochem.* 1999;73:41-9.
- [279] Holgado-Madruga M, Moscatello DK, Emler DR, et al. Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:12419-24.
- [280] Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007;129:1261-74.
- [281] Skaper SD, Floreani M, Negro A, et al. Neurotrophins rescue cerebellar granule neurons from oxidative stress-mediated apoptotic death: selective involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurochem.* 1998;70:1859-68.
- [282] Patapoutian A, Reichardt LF. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol.* 2001;11:272-80.
- [283] Nassenstein C, Braun A, Nockher WA, et al. Neurotrophin effects on eosinophils in allergic inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2005;5:204-11.
- [284] Gadiant RA, Cron KC, Otten U. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha synergistically stimulate nerve growth factor (NGF) release from cultured rat astrocytes. *Neurosci Lett.* 1990;117:335-40.

- [285] Wang Y, Cao M, Liu A, et al. Changes of inflammatory cytokines and neurotrophins emphasized their roles in hypoxic-ischemic brain damage. *Int J Neurosci*. 2013;123:191-5.
- [286] Takaoka K, Shirai Y, Saito N. Inflammatory cytokine tumor necrosis factor- $\alpha$  enhances nerve growth factor production in human keratinocytes, HaCaT cells. *J Pharmacol Sci*. 2009;111:381-91.
- [287] Rezaee F, Rellick SL, Piedimonte G, et al. Neurotrophins regulate bone marrow stromal cell IL-6 expression through the MAPK pathway. *PLoS One*. 2010;5:e9690.
- [288] Torcia M, Bracci-Laudiero L, Lucibello M, et al. Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell*. 1996;85:345-56.
- [289] Aloe L, Skaper SD, Leon A, et al. Nerve growth factor and autoimmune diseases. *Autoimmunity*. 1994;19:141-50.
- [290] Otten U, Ehrhard P, Peck R. Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:10059-63.
- [291] Brodie C, Gelfand EW. Functional nerve growth factor receptors on human B lymphocytes. Interaction with IL-2. *J Immunol*. 1992;148:3492-7.
- [292] Torcia M, De Chiara G, Nencioni L, et al. Nerve growth factor inhibits apoptosis in memory B lymphocytes via inactivation of p38 MAPK, prevention of Bcl-2 phosphorylation, and cytochrome c release. *J Biol Chem*. 2001;276:39027-36.
- [293] Melamed I, Kelleher CA, Franklin RA, et al. Nerve growth factor signal transduction in human B lymphocytes is mediated by gp140trk. *Eur J Immunol*. 1996;26:1985-92.
- [294] Kronfeld I, Kazimirsky G, Gelfand EW, et al. NGF rescues human B lymphocytes from anti-IgM induced apoptosis by activation of PKC $\zeta$ . *Eur J Immunol*. 2002;32:136-43.
- [295] Kimata H, Yoshida A, Ishioka C, et al. Nerve growth factor inhibits immunoglobulin production by but not proliferation of human plasma cell lines. *Clin Immunol Immunopathol*. 1991;60:145-51.
- [296] Thorpe LW, Perez-Polo JR. The influence of nerve growth factor on the in vitro proliferative response of rat spleen lymphocytes. *J Neurosci Res*. 1987;18:134-9.
- [297] Lambiase A, Bracci-Laudiero L, Bonini S, et al. Human CD4<sup>+</sup> T cell clones produce and release nerve growth factor and express high-affinity nerve growth factor receptors. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;100:408-14.
- [298] Ehrhard PB, Erb P, Graumann U, et al. Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor tyrosine kinase Trk in activated CD4-positive T-cell clones. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:10984-8.
- [299] Urshansky N, Mausner-Fainberg K, Auriel E, et al. Dysregulated neurotrophin mRNA production by immune cells of patients with relapsing remitting multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2010;295:31-7.
- [300] Shi Y, Jin Y, Guo W, et al. Blockage of nerve growth factor modulates T cell responses and inhibits allergic inflammation in a mouse model of asthma. *Inflamm Res*. 2012;61:1369-78.
- [301] Jiang Y, Chen G, Zhang Y, et al. Nerve growth factor promotes TLR4 signaling-induced maturation of human dendritic cells in vitro through inducible p75NTR 1. *J Immunol*. 2007;179:6297-304.
- [302] Jiang Y, Chen G, Zheng Y, et al. TLR4 signaling induces functional nerve growth factor receptor p75NTR on mouse dendritic cells via p38MAPK and NF- $\kappa$ B pathways. *Mol Immunol*. 2008;45:1557-66.
- [303] Schuhmann B, Dietrich A, Sel S, et al. A role for brain-derived neurotrophic factor in B cell development. *J Neuroimmunol*. 2005;163:15-23.
- [304] Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, et al. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med*. 1999;189:865-70.
- [305] Edling AE, Nanavati T, Johnson JM, et al. Human and murine lymphocyte neurotrophin expression is confined to B cells. *J Neurosci Res*. 2004;77:709-17.
- [306] Schulte-Herbruggen O, Nassenstein C, Lommatzsch M, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 regulate secretion of brain-derived neurotrophic factor in human monocytes. *J Neuroimmunol*. 2005;160:204-9.

- [307] Kimata H. Brain-derived neurotrophic factor selectively enhances allergen-specific IgE production. *Neuropeptides*. 2005;39:379-83.
- [308] Pearse RN, Swendeman SL, Li Y, et al. A neurotrophin axis in myeloma: TrkB and BDNF promote tumor-cell survival. *Blood*. 2005;105:4429-36.
- [309] Fauchais AL, Lalloue F, Lise MC, et al. Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival. *J Immunol*. 2008;181:3027-38.
- [310] Sun CY, Hu Y, Huang J, et al. Brain-derived neurotrophic factor induces proliferation, migration, and VEGF secretion in human multiple myeloma cells via activation of MEK-ERK and PI3K/AKT signaling. *Tumour Biol*. 2010;31:121-8.
- [311] Zhang L, Hu Y, Sun CY, et al. Lentiviral shRNA silencing of BDNF inhibits in vivo multiple myeloma growth and angiogenesis via down-regulated stroma-derived VEGF expression in the bone marrow milieu. *Cancer Sci*. 2010;101:1117-24.
- [312] Azoulay D, Urshansky N, Karni A. Low and dysregulated BDNF secretion from immune cells of MS patients is related to reduced neuroprotection. *J Neuroimmunol*. 2008;195:186-93.
- [313] Stadelmann C, Kerschensteiner M, Misgeld T, et al. BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: neuroprotective interactions between immune and neuronal cells? *Brain*. 2002;125:75-85.
- [314] Aharoni R, Saada R, Eilam R, et al. Oral treatment with laquinimod augments regulatory T-cells and brain-derived neurotrophic factor expression and reduces injury in the CNS of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2012;251:14-24.
- [315] Liu J, Gong N, Huang X, et al. Neuromodulatory activities of CD4+CD25+ regulatory T cells in a murine model of HIV-1-associated neurodegeneration. *J Immunol*. 2009;182:3855-65.
- [316] Noga O, Peiser M, Altenahr M, et al. Selective induction of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor by LPS and allergen in dendritic cells. *Clin Exp Allergy*. 2008;38:473-9.
- [317] Abram M, Wegmann M, Fokuhl V, et al. Nerve growth factor and neurotrophin-3 mediate survival of pulmonary plasma cells during the allergic airway inflammation. *J Immunol*. 2009;182:4705-12.
- [318] Nassenstein C, Dawbarn D, Pollock K, et al. Pulmonary distribution, regulation, and functional role of Trk receptors in a murine model of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118:597-605.
- [319] Besser M, Wank R. Cutting edge: clonally restricted production of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA by human immune cells and Th1/Th2-polarized expression of their receptors. *J Immunol*. 1999;162:6303-6.
- [320] Bernd P, Miles K, Rozenberg I, et al. Neurotrophin-3 and TrkC are expressed in the outflow tract of the developing chicken heart. *Dev Dyn*. 2004;230:767-72.
- [321] Scarisbrick IA, Jones EG, Isackson PJ. Coexpression of mRNAs for NGF, BDNF, and NT-3 in the cardiovascular system of the pre- and postnatal rat. *J Neurosci*. 1993;13:875-93.
- [322] Caporali A, Emanuelli C. Cardiovascular actions of neurotrophins. *Physiol Rev*. 2009;89:279-308.
- [323] Donovan MJ, Lin MI, Wiegand P, et al. Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development*. 2000;127:4531-40.
- [324] Wagner N, Wagner KD, Theres H, et al. Coronary vessel development requires activation of the TrkB neurotrophin receptor by the Wilms' tumor transcription factor Wt1. *Genes Dev*. 2005;19:2631-42.
- [325] Donovan MJ, Hahn R, Tessarollo L, et al. Identification of an essential nonneuronal function of neurotrophin 3 in mammalian cardiac development. *Nat Genet*. 1996;14:210-3.
- [326] Tessarollo L, Tsoulfas P, Donovan MJ, et al. Targeted deletion of all isoforms of the trkC gene suggests the use of alternate receptors by its ligand neurotrophin-3 in neuronal development and implicates trkC in normal cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:14776-81.
- [327] Tessarollo L. Pleiotropic functions of neurotrophins in development. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1998;9:125-37.
- [328] Palko ME, Coppola V, Tessarollo L. Evidence for a role of truncated trkC receptor isoforms in mouse development. *J Neurosci*. 1999;19:775-82.

- [329] von Schack D, Casademunt E, Schweigreiter R, et al. Complete ablation of the neurotrophin receptor p75NTR causes defects both in the nervous and the vascular system. *Nat Neurosci.* 2001;4:977-8.
- [330] Paul CE, Vereker E, Dickson KM, et al. A pro-apoptotic fragment of the p75 neurotrophin receptor is expressed in p75NTRExonIV null mice. *J Neurosci.* 2004;24:1917-23.
- [331] Lee KF, Li E, Huber LJ, et al. Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system. *Cell.* 1992;69:737-49.
- [332] Crowley C, Spencer SD, Nishimura MC, et al. Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell.* 1994;76:1001-11.
- [333] Smeyne RJ, Klein R, Schnapp A, et al. Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature.* 1994;368:246-9.
- [334] Ruberti F, Capsoni S, Comparini A, et al. Phenotypic knockout of nerve growth factor in adult transgenic mice reveals severe deficits in basal forebrain cholinergic neurons, cell death in the spleen, and skeletal muscle dystrophy. *J Neurosci.* 2000;20:2589-601.
- [335] Capsoni S, Ugolini G, Comparini A, et al. Alzheimer-like neurodegeneration in aged antinerve growth factor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:6826-31.
- [336] Hassankhani A, Steinhilber ME, Soonpaa MH, et al. Overexpression of NGF within the heart of transgenic mice causes hyperinnervation, cardiac enlargement, and hyperplasia of ectopic cells. *Dev Biol.* 1995;169:309-21.
- [337] Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature.* 2005;438:932-6.
- [338] Ribatti D, Vacca A. Models for studying angiogenesis in vivo. *Int J Biol Markers.* 1999;14:207-13.
- [339] Ribatti D, Conconi MT, Nussdorfer GG. Nonclassic endogenous novel [corrected] regulators of angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 2007;59:185-205.
- [340] Santos PM, Winterowd JG, Allen GG, et al. Nerve growth factor: increased angiogenesis without improved nerve regeneration. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1991;105:12-25.
- [341] Cantarella G, Lempereur L, Presta M, et al. Nerve growth factor-endothelial cell interaction leads to angiogenesis in vitro and in vivo. *FASEB J.* 2002;16:1307-9.
- [342] Rahbek UL, Dissing S, Thomassen C, et al. Nerve growth factor activates aorta endothelial cells causing PI3K/Akt- and ERK-dependent migration. *Pflugers Arch.* 2005;450:355-61.
- [343] Caporali A, Pani E, Horrevoets AJ, et al. Neurotrophin p75 receptor (p75NTR) promotes endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis: implications for diabetes-induced impaired neovascularization in ischemic limb muscles. *Circ Res.* 2008;103:e15-26.
- [344] Salis MB, Graiani G, Desortes E, et al. Nerve growth factor supplementation reverses the impairment, induced by Type 1 diabetes, of hindlimb post-ischaemic recovery in mice. *Diabetologia.* 2004;47:1055-63.
- [345] Raychaudhuri SK, Raychaudhuri SP, Weltman H, et al. Effect of nerve growth factor on endothelial cell biology: proliferation and adherence molecule expression on human dermal microvascular endothelial cells. *Arch Dermatol Res.* 2001;293:291-5.
- [346] Steinle JJ, Granger HJ. Nerve growth factor regulates human choroidal, but not retinal, endothelial cell migration and proliferation. *Auton Neurosci.* 2003;108:57-62.
- [347] Moser KV, Reindl M, Blasig I, et al. Brain capillary endothelial cells proliferate in response to NGF, express NGF receptors and secrete NGF after inflammation. *Brain Res.* 2004;1017:53-60.
- [348] Emanuelli C, Salis MB, Pinna A, et al. Nerve growth factor promotes angiogenesis and arteriogenesis in ischemic hindlimbs. *Circulation.* 2002;106:2257-62.
- [349] Graiani G, Emanuelli C, Desortes E, et al. Nerve growth factor promotes reparative angiogenesis and inhibits endothelial apoptosis in cutaneous wounds of Type 1 diabetic mice. *Diabetologia.* 2004;47:1047-54.
- [350] Dolle JP, Rezvan A, Allen FD, et al. Nerve growth factor-induced migration of endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;315:1220-7.
- [351] Hasan J, Shnyder SD, Bibby M, et al. Quantitative angiogenesis assays in vivo--a review. *Angiogenesis.* 2004;7:1-16.



- [352] Seo K, Choi J, Park M, et al. Angiogenesis effects of nerve growth factor (NGF) on rat corneas. *J Vet Sci.* 2001;2:125-30.
- [353] Lazarovici P, Gazit A, Staniszewska I, et al. Nerve growth factor (NGF) promotes angiogenesis in the quail chorioallantoic membrane. *Endothelium.* 2006;13:51-9.
- [354] Calza L, Giardino L, Giuliani A, et al. Nerve growth factor control of neuronal expression of angiogenic and vasoactive factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:4160-5.
- [355] Hansen-Algenstaedt N, Algenstaedt P, Schaefer C, et al. Neural driven angiogenesis by overexpression of nerve growth factor. *Histochem Cell Biol.* 2006;125:637-49.
- [356] Samii A, Unger J, Lange W. Vascular endothelial growth factor expression in peripheral nerves and dorsal root ganglia in diabetic neuropathy in rats. *Neurosci Lett.* 1999;262:159-62.
- [357] Park MJ, Kwak HJ, Lee HC, et al. Nerve growth factor induces endothelial cell invasion and cord formation by promoting matrix metalloproteinase-2 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway and AP-2 transcription factor. *J Biol Chem.* 2007;282:30485-96.
- [358] Kim H, Li Q, Hempstead BL, et al. Paracrine and autocrine functions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in brain-derived endothelial cells. *J Biol Chem.* 2004;279:33538-46.
- [359] Nakahashi T, Fujimura H, Altar CA, et al. Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Lett.* 2000;470:113-7.
- [360] Weston GC, Haviv I, Rogers PA. Microarray analysis of VEGF-responsive genes in myometrial endothelial cells. *Mol Hum Reprod.* 2002;8:855-63.
- [361] Chen J, Zhang C, Jiang H, et al. Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005;25:281-90.
- [362] Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature.* 1999;399:597-601.
- [363] Ackah E, Yu J, Zoellner S, et al. Akt1/protein kinase B $\alpha$  is critical for ischemic and VEGF-mediated angiogenesis. *J Clin Invest.* 2005;115:2119-27.
- [364] Chen J, Zacharek A, Zhang C, et al. Endothelial nitric oxide synthase regulates brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis after stroke in mice. *J Neurosci.* 2005;25:2366-75.
- [365] Kermani P, Rafii D, Jin DK, et al. Neurotrophins promote revascularization by local recruitment of TrkB+ endothelial cells and systemic mobilization of hematopoietic progenitors. *J Clin Invest.* 2005;115:653-63.
- [366] Takeo C, Nakamura S, Tanaka T, et al. Rat cerebral endothelial cells express trk C and are regulated by neurotrophin-3. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;305:400-6.
- [367] Cristofaro B, Stone OA, Caporali A, et al. Neurotrophin-3 is a novel angiogenic factor capable of therapeutic neovascularization in a mouse model of limb ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:1143-50.
- [368] Blais M, Levesque P, Bellenfant S, et al. Nerve Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor, Neurotrophin-3 and Glial-Derived Neurotrophic Factor Enhance Angiogenesis in a Tissue-Engineered In Vitro Model. *Tissue Eng Part A.* 2013.
- [369] Shen L, Zeng W, Wu YX, et al. Neurotrophin-3 accelerates wound healing in diabetic mice by promoting a paracrine response in mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.* 2012.
- [370] Tuttle JB, Etheridge R, Creedon DJ. Receptor-mediated stimulation and inhibition of nerve growth factor secretion by vascular smooth muscle. *Exp Cell Res.* 1993;208:350-61.
- [371] Nemoto K, Fukamachi K, Nemoto F, et al. Gene expression of neurotrophins and their receptors in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;245:284-8.
- [372] Nemoto K, Sekimoto M, Fukamachi K, et al. A possible mechanism of TPA-mediated downregulation of neurotrophin-3 gene expression in rat cultured vascular smooth muscle cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999;68:186-9.
- [373] Stawowy P, Marcinkiewicz J, Graf K, et al. Selective expression of the proprotein convertases furin, pc5, and pc7 in proliferating vascular smooth muscle cells of the rat aorta in vitro. *J Histochem Cytochem.* 2001;49:323-32.

- [374] Urban D, Lorenz J, Meyborg H, et al. Proprotein convertase furin enhances survival and migration of vascular smooth muscle cells via processing of pro-nerve growth factor. *J Biochem.* 2013;153:197-207.
- [375] Khan KM, Falcone DJ, Kraemer R. Nerve growth factor activation of Erk-1 and Erk-2 induces matrix metalloproteinase-9 expression in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2002;277:2353-9.
- [376] Bono F, Lamarche I, Herbert JM. NGF exhibits a pro-apoptotic activity for human vascular smooth muscle cells that is inhibited by TGFbeta1. *FEBS Lett.* 1997;416:243-6.
- [377] Bracci-Laudiero L, Aloe L, Levi-Montalcini R, et al. Increased levels of NGF in sera of systemic lupus erythematosus patients. *Neuroreport.* 1993;4:563-5.
- [378] Aalto K, Korhonen L, Lahdenne P, et al. Nerve growth factor in serum of children with systemic lupus erythematosus is correlated with disease activity. *Cytokine.* 2002;20:136-9.
- [379] Bracci-Laudiero L, Lundeberg T, Stenfors C, et al. Modification of lymphoid and brain nerve growth factor levels in systemic lupus erythematosus mice. *Neurosci Lett.* 1996;204:13-6.
- [380] Fauchais AL, Boumediene A, Lalloue F, et al. Brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor correlate with T-cell activation in primary Sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol.* 2009;38:50-7.
- [381] Seidel MF, Herguijuela M, Forkert R, et al. Nerve growth factor in rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum.* 2010;40:109-26.
- [382] Matucci-Cerinic M, Giacomelli R, Pignone A, et al. Nerve growth factor and neuropeptides circulating levels in systemic sclerosis (scleroderma). *Ann Rheum Dis.* 2001;60:487-94.
- [383] Klein-Weigel P, Gutsche-Petrak B, Humpel C, et al. Circulating nerve growth factor in primary and secondary Raynaud's syndrome - results of a pilot study. *Vasa.* 2009;38:39-45.
- [384] Fauchais AL, Martel C, Gondran G, et al. Immunological profile in primary Sjogren syndrome: clinical significance, prognosis and long-term evolution to other auto-immune disease. *Autoimmun Rev.* 2010;9:595-9.
- [385] Piga M, Passiu G, Carta P, et al. Increased pulmonary epithelial permeability in systemic sclerosis is associated with enhanced cutaneous nerve growth factor expression. *Eur J Intern Med.* 2000;11:156-60.
- [386] Tuveri MA, Passiu G, Mathieu A, et al. Nerve growth factor and mast cell distribution in the skin of patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol.* 1993;11:319-22.
- [387] Dicou E. High levels of the proNGF peptides LIP1 and LIP2 in the serum and synovial fluid of rheumatoid arthritis patients: evidence for two new cytokines. *J Neuroimmunol.* 2008;194:143-6.
- [388] Falcini F, Matucci Cerinic M, Lombardi A, et al. Increased circulating nerve growth factor is directly correlated with disease activity in juvenile chronic arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1996;55:745-8.
- [389] del Porto F, Aloe L, Lagana B, et al. Nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor levels in patients with rheumatoid arthritis treated with TNF-alpha blockers. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1069:438-43.
- [390] Raychaudhuri SK, Raychaudhuri SP. NGF and its receptor system: a new dimension in the pathogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1173:470-7.
- [391] Barthel C, Yeremenko N, Jacobs R, et al. Nerve growth factor and receptor expression in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:R82.
- [392] Raychaudhuri SP, Raychaudhuri SK, Atkuri KR, et al. Nerve growth factor: A key local regulator in the pathogenesis of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011;63:3243-52.
- [393] Halliday DA, Zettler C, Rush RA, et al. Elevated nerve growth factor levels in the synovial fluid of patients with inflammatory joint disease. *Neurochem Res.* 1998;23:919-22.
- [394] Pozza M, Guerra M, Manzini E, et al. A histochemical study of the rheumatoid synovium: focus on nitric oxide, nerve growth factor high affinity receptor, and innervation. *J Rheumatol.* 2000;27:1121-7.
- [395] Raychaudhuri SP, Raychaudhuri SK. The regulatory role of nerve growth factor and its receptor system in fibroblast-like synovial cells. *Scand J Rheumatol.* 2009;38:207-15.

- [396] Shelton DL, Zeller J, Ho WH, et al. Nerve growth factor mediates hyperalgesia and cachexia in auto-immune arthritis. *Pain*. 2005;116:8-16.
- [397] Rihl M, Kruithof E, Barthel C, et al. Involvement of neurotrophins and their receptors in spondyloarthritis synovitis: relation to inflammation and response to treatment. *Ann Rheum Dis*. 2005;64:1542-9.
- [398] Weidler C, Holzer C, Harbuz M, et al. Low density of sympathetic nerve fibres and increased density of brain derived neurotrophic factor positive cells in RA synovium. *Ann Rheum Dis*. 2005;64:13-20.
- [399] Dagnell C, Grunewald J, Idali F, et al. Increased levels of nerve growth factor in the airways of patients with sarcoidosis. *J Intern Med*. 2008;264:463-71.
- [400] Dagnell C, Grunewald J, Kramar M, et al. Neurotrophins and neurotrophin receptors in pulmonary sarcoidosis - granulomas as a source of expression. *Respir Res*. 2010;11:156.
- [401] Ricci A, Mariotta S, Saltini C, et al. Neurotrophin system activation in bronchoalveolar lavage fluid immune cells in pulmonary sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2005;22:186-94.
- [402] di Mola FF, Friess H, Zhu ZW, et al. Nerve growth factor and Trk high affinity receptor (TrkA) gene expression in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2000;46:670-9.
- [403] Stanzel RD, Lourenssen S, Blennerhassett MG. Inflammation causes expression of NGF in epithelial cells of the rat colon. *Exp Neurol*. 2008;211:203-13.
- [404] Reinshagen M, Rohm H, Steinkamp M, et al. Protective role of neurotrophins in experimental inflammation of the rat gut. *Gastroenterology*. 2000;119:368-76.
- [405] Steinkamp M, Schulte N, Spaniol U, et al. Brain derived neurotrophic factor inhibits apoptosis in enteric glia during gut inflammation. *Med Sci Monit*. 2012;18:BR117-22.
- [406] Yoshimura R, Saito K, Terada T, et al. Steroid psychosis in a polyarteritis nodosa patient successfully treated with risperidone: tracking serum brain-derived neurotrophic factor levels longitudinally. *Ann Gen Psychiatry*. 2012;11:2.
- [407] Creamer D, Sullivan D, Bicknell R, et al. Angiogenesis in psoriasis. *Angiogenesis*. 2002;5:231-6.
- [408] Anand P, Foley P, Navsaria HA, et al. Nerve growth factor levels in cultured human skin cells: effect of gestation and viral transformation. *Neurosci Lett*. 1995;184:157-60.
- [409] Raychaudhuri SP, Farber EM, Raychaudhuri SK. Role of nerve growth factor in RANTES expression by keratinocytes. *Acta Derm Venereol*. 2000;80:247-50.
- [410] Raychaudhuri SP, Dutt S, Raychaudhuri SK, et al. Severe combined immunodeficiency mouse-human skin chimeras: a unique animal model for the study of psoriasis and cutaneous inflammation. *Br J Dermatol*. 2001;144:931-9.
- [411] Raychaudhuri SP, Sanyal M, Weltman H, et al. K252a, a high-affinity nerve growth factor receptor blocker, improves psoriasis: an in vivo study using the severe combined immunodeficient mouse-human skin model. *J Invest Dermatol*. 2004;122:812-9.
- [412] Matsuda H, Koyama H, Sato H, et al. Role of nerve growth factor in cutaneous wound healing: accelerating effects in normal and healing-impaired diabetic mice. *J Exp Med*. 1998;187:297-306.
- [413] Lindsay RM, Harmar AJ. Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. *Nature*. 1989;337:362-4.
- [414] Ziche M, Morbidelli L, Masini E, et al. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J Clin Invest*. 1994;94:2036-44.
- [415] Truzzi F, Marconi A, Atzei P, et al. p75 neurotrophin receptor mediates apoptosis in transit-amplifying cells and its overexpression restores cell death in psoriatic keratinocytes. *Cell Death Differ*. 2011;18:948-58.
- [416] Seidel MF, Lane NE. Control of arthritis pain with anti-nerve-growth factor: risk and benefit. *Curr Rheumatol Rep*. 2012;14:583-8.
- [417] Iwakura N, Ohtori S, Orita S, et al. Role of low-affinity nerve growth factor receptor inhibitory antibody in reducing pain behavior and calcitonin gene-related Peptide expression in a rat model of wrist joint inflammatory pain. *J Hand Surg Am*. 2010;35:267-73.

- [418] Falcini F, Cerinic MM, Ermini M, et al. Nerve growth factor circulating levels are increased in Kawasaki disease: correlation with disease activity and reduced angiotensin converting enzyme levels. *J Rheumatol*. 1996;23:1798-802.
- [419] Mitsuma N, Yamamoto M, Iijima M, et al. Wide range of lineages of cells expressing nerve growth factor mRNA in the nerve lesions of patients with vasculitic neuropathy: an implication of endoneurial macrophage for nerve regeneration. *Neuroscience*. 2004;129:109-17.
- [420] Yamamoto M, Ito Y, Mitsuma N, et al. Pain-related differential expression of NGF, GDNF, IL-6, and their receptors in human vasculitic neuropathies. *Intern Med*. 2003;42:1100-3.
- [421] Turrini P, Gaetano C, Antonelli A, et al. Nerve growth factor induces angiogenic activity in a mouse model of hindlimb ischemia. *Neurosci Lett*. 2002;323:109-12.
- [422] Kim YS, Jo DH, Lee H, et al. Nerve growth factor-mediated vascular endothelial growth factor expression of astrocyte in retinal vascular development. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;431:740-5.
- [423] Nakamura K, Tan F, Li Z, et al. NGF activation of TrkA induces vascular endothelial growth factor expression via induction of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Mol Cell Neurosci*. 2011;46:498-506.
- [424] Campos X, Munoz Y, Selman A, et al. Nerve growth factor and its high-affinity receptor trkA participate in the control of vascular endothelial growth factor expression in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2007;104:168-75.
- [425] Nakamura K, Martin KC, Jackson JK, et al. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB induces vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1alpha in neuroblastoma cells. *Cancer Res*. 2006;66:4249-55.
- [426] Yang D, Han Y, Zhang J, et al. Statins Enhance Expression of Growth Factors and Activate the PI3K/Akt-mediated Signaling Pathway after Experimental Intracerebral Hemorrhage. *World J Neurosci*. 2012;2:74-80.
- [427] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-26.
- [428] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685-95.
- [429] Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev*. 2005;85:1-31.
- [430] Kraemer R. Reduced apoptosis and increased lesion development in the flow-restricted carotid artery of p75(NTR)-null mutant mice. *Circ Res*. 2002;91:494-500.
- [431] Kraemer R, Baker PJ, Kent KC, et al. Decreased neurotrophin TrkB receptor expression reduces lesion size in the apolipoprotein E-null mutant mouse. *Circulation*. 2005;112:3644-53.
- [432] Norata GD, Venu VK, Callegari E, et al. Effect of Tie-2 conditional deletion of BDNF on atherosclerosis in the ApoE null mutant mouse. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822:927-35.
- [433] Regent A, Dib H, Ly KH, et al. Identification of target antigens of anti-endothelial cell and anti-vascular smooth muscle cell antibodies in patients with giant cell arteritis: a proteomic approach. *Arthritis Res Ther*. 2011;13:R107.
- [434] Manna R, Latteri M, Cristiano G, et al. Anticardiolipin antibodies in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica: a study of 40 cases. *Br J Rheumatol*. 1998;37:208-10.
- [435] Yi FH, Lautrette C, Vermot-Desroches C, et al. In vitro induction of neuronal apoptosis by anti-Fas antibody-containing sera from amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neuroimmunol*. 2000;109:211-20.
- [436] Prasad NK, Papoff G, Zeuner A, et al. Therapeutic preparations of normal polyspecific IgG (IVIg) induce apoptosis in human lymphocytes and monocytes: a novel mechanism of action of IVIg involving the Fas apoptotic pathway. *J Immunol*. 1998;161:3781-90.
- [437] Benjamin CW, Jones DA. Platelet-derived growth factor stimulates growth factor receptor binding protein-2 association with Shc in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1994;269:30911-6.
- [438] Kouhara H, Hadari YR, Spivak-Kroizman T, et al. A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell*. 1997;89:693-702.

- [439] Khan MA, Okumura N, Okada M, et al. Nerve growth factor stimulates tyrosine phosphorylation of paxillin in PC12h cells. *FEBS Lett.* 1995;362:201-4.
- [440] Melamed I, Turner CE, Aktories K, et al. Nerve growth factor triggers microfilament assembly and paxillin phosphorylation in human B lymphocytes. *J Exp Med.* 1995;181:1071-9.
- [441] Huang C, Borchers CH, Schaller MD, et al. Phosphorylation of paxillin by p38MAPK is involved in the neurite extension of PC-12 cells. *J Cell Biol.* 2004;164:593-602.
- [442] Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988;332:411-5.
- [443] Ehrenreich H, Anderson RW, Fox CH, et al. Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. *J Exp Med.* 1990;172:1741-8.
- [444] Luscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation.* 2000;102:2434-40.
- [445] Rich S, McLaughlin VV. Endothelin receptor blockers in cardiovascular disease. *Circulation.* 2003;108:2184-90.
- [446] Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:2863-7.
- [447] Agui T, Xin X, Cai Y, et al. Stimulation of interleukin-6 production by endothelin in rat bone marrow-derived stromal cells. *Blood.* 1994;84:2531-8.
- [448] Ruetten H, Thiernemann C. Endothelin-1 stimulates the biosynthesis of tumour necrosis factor in macrophages: ET-receptors, signal transduction and inhibition by dexamethasone. *J Physiol Pharmacol.* 1997;48:675-88.
- [449] Matsuura A, Yamochi W, Hirata K, et al. Stimulatory interaction between vascular endothelial growth factor and endothelin-1 on each gene expression. *Hypertension.* 1998;32:89-95.
- [450] Yang Z, Krasnici N, Luscher TF. Endothelin-1 potentiates human smooth muscle cell growth to PDGF: effects of ETA and ETB receptor blockade. *Circulation.* 1999;100:5-8.
- [451] Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, et al. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med.* 1991;325:997-1001.
- [452] Okada K, Nishida Y, Murakami H, et al. Role of endogenous endothelin in the development of graft arteriosclerosis in rat cardiac allografts: antiproliferative effects of bosentan, a nonselective endothelin receptor antagonist. *Circulation.* 1998;97:2346-51.
- [453] Dimitrijevic I, Andersson C, Rissler P, et al. Increased tissue endothelin-1 and endothelin-B receptor expression in temporal arteries from patients with giant cell arteritis. *Ophthalmology.* 2010;117:628-36.
- [454] Pache M, Kaiser HJ, Haufschild T, et al. Increased endothelin-1 plasma levels in giant cell arteritis: a report on four patients. *Am J Ophthalmol.* 2002;133:160-2.
- [455] Lozano E, Segarra M, Corbera-Bellalta M, et al. Increased expression of the endothelin system in arterial lesions from patients with giant-cell arteritis: association between elevated plasma endothelin levels and the development of ischaemic events. *Ann Rheum Dis.* 2010;69:434-42.
- [456] Pountain G, Hazleman B, Cawston TE. Circulating levels of IL-1beta, IL-6 and soluble IL-2 receptor in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis and rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* 1998;37:797-8.
- [457] Hernandez-Rodriguez J, Segarra M, Vilardell C, et al. Tissue production of pro-inflammatory cytokines (IL-1beta, TNFalpha and IL-6) correlates with the intensity of the systemic inflammatory response and with corticosteroid requirements in giant-cell arteritis. *Rheumatology (Oxford).* 2004;43:294-301.
- [458] Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:519-50.
- [459] Libby P, Ordovas JM, Birinyi LK, et al. Inducible interleukin-1 gene expression in human vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1986;78:1432-8.
- [460] Beasley D, McGuiggin ME, Dinarello CA. Human vascular smooth muscle cells produce an intracellular form of interleukin-1 receptor antagonist. *Am J Physiol.* 1995;269:C961-8.

- [461] Norioka K, Hara M, Harigai M, et al. Pretreatment of human vascular smooth muscle cells with interleukin-1 enhances interleukin-6 production and cell proliferation (action of IL-1 on vascular smooth muscle cells). *Autoimmunity*. 1990;7:41-50.
- [462] Fantuzzi G, Sacco S, Ghezzi P, et al. Physiological and cytokine responses in IL-1 beta-deficient mice after zymosan-induced inflammation. *Am J Physiol*. 1997;273:R400-6.
- [463] Horai R, Asano M, Sudo K, et al. Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *J Exp Med*. 1998;187:1463-75.
- [464] Zheng H, Fletcher D, Kozak W, et al. Resistance to fever induction and impaired acute-phase response in interleukin-1 beta-deficient mice. *Immunity*. 1995;3:9-19.
- [465] Shepherd J, Little MC, Nicklin MJ. Psoriasis-like cutaneous inflammation in mice lacking interleukin-1 receptor antagonist. *J Invest Dermatol*. 2004;122:665-9.
- [466] Horai R, Saijo S, Tanioka H, et al. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J Exp Med*. 2000;191:313-20.
- [467] Nicklin MJ, Hughes DE, Barton JL, et al. Arterial inflammation in mice lacking the interleukin 1 receptor antagonist gene. *J Exp Med*. 2000;191:303-12.
- [468] Shepherd J, Nicklin MJ. Elastic-vessel arteritis in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice involves effector Th1 cells and requires interleukin-1 receptor. *Circulation*. 2005;111:3135-40.
- [469] Lozano E, Segarra M, Garcia-Martinez A, et al. Imatinib mesylate inhibits in vitro and ex vivo biological responses related to vascular occlusion in giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis*. 2008;67:1581-8.
- [470] Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:569-79.
- [471] Huotari J, Helenius A. Endosome maturation. *EMBO J*. 2011;30:3481-500.
- [472] Ludwig AK, Giebel B. Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44:11-5.
- [473] Corrado C, Raimondo S, Chiesi A, et al. Exosomes as intercellular signaling organelles involved in health and disease: basic science and clinical applications. *Int J Mol Sci*. 2013;14:5338-66.
- [474] Hu G, Drescher KM, Chen XM. Exosomal miRNAs: Biological Properties and Therapeutic Potential. *Front Genet*. 2012;3:56.
- [475] Thery C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:581-93.
- [476] Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:6328-33.
- [477] Pant S, Hilton H, Burczynski ME. The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochem Pharmacol*. 2012;83:1484-94.
- [478] Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, et al. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820:940-8.
- [479] Sverdlov ED. Amedeo Avogadro's cry: what is 1 microg of exosomes? *Bioessays*. 2012;34:873-5.
- [480] Yu S, Liu C, Su K, et al. Tumor exosomes inhibit differentiation of bone marrow dendritic cells. *J Immunol*. 2007;178:6867-75.
- [481] Qu JL, Qu XJ, Zhao MF, et al. Gastric cancer exosomes promote tumour cell proliferation through PI3K/Akt and MAPK/ERK activation. *Dig Liver Dis*. 2009;41:875-80.
- [482] Webber J, Steadman R, Mason MD, et al. Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. *Cancer Res*. 2010;70:9621-30.
- [483] Hergenreider E, Heydt S, Treguer K, et al. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat Cell Biol*. 2012;14:249-56.
- [484] Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol*. 2010;12:19-30; sup pp 1-13.
- [485] Pfeffer SR. Two Rabs for exosome release. *Nat Cell Biol*. 2010;12:3-4.

- [486] Siomi H, Siomi MC. RISC hitchhikes onto endosome trafficking. *Nat Cell Biol.* 2009;11:1049-51.
- [487] Regent A, Dib H, Agard C, et al. Identification of Target Antigens of Anti-Endothelial-Cell and Anti-Vascular-Smooth-Muscle-Cell Antibodies in Patients with Giant Cell Arteritis: a Proteomic Approach [abstract]. *Arthritis Rheum.* 2009;60:186.
- [488] Egan SE, Giddings BW, Brooks MW, et al. Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature.* 1993;363:45-51.
- [489] Mahr A, Saba M, Kambouchner M, et al. Temporal artery biopsy for diagnosing giant cell arteritis: the longer, the better? *Ann Rheum Dis.* 2006;65:826-8.
- [490] Banks PM, Cohen MD, Ginsburg WW, et al. Immunohistologic and cytochemical studies of temporal arteritis. *Arthritis Rheum.* 1983;26:1201-7.
- [491] Cid MC, Cervera R, Font J, et al. Late thrombotic events in patients with temporal arteritis and anticardiolipin antibodies. *Clin Exp Rheumatol.* 1990;8:359-63.
- [492] Liozon E, Roussel V, Roblot P, et al. Absence of anti-beta2 glycoprotein I antibodies in giant cell arteritis: a study of 45 biopsy-proven cases. *Br J Rheumatol.* 1998;37:1129-31.
- [493] Navarro M, Cervera R, Font J, et al. Anti-endothelial cell antibodies in systemic autoimmune diseases: prevalence and clinical significance. *Lupus.* 1997;6:521-6.
- [494] Servettaz A, Guilpain P, Tamas N, et al. Natural anti-endothelial cell antibodies. *Autoimmun Rev.* 2008;7:426-30.
- [495] Domiciano DS, Carvalho JF, Shoenfeld Y. Pathogenic role of anti-endothelial cell antibodies in autoimmune rheumatic diseases. *Lupus.* 2009;18:1233-8.
- [496] Guilpain P, Mouthon L. Antiendothelial cells autoantibodies in vasculitis-associated systemic diseases. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2008;35:59-65.
- [497] Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, et al. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature.* 2003;423:293-8.
- [498] McClintock D, Gordon LB, Djabali K. Hutchinson-Gilford progeria mutant lamin A primarily targets human vascular cells as detected by an anti-Lamin A G608G antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:2154-9.
- [499] Hegele RA. Premature atherosclerosis associated with monogenic insulin resistance. *Circulation.* 2001;103:2225-9.
- [500] Ziegler WH, Liddington RC, Critchley DR. The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol.* 2006;16:453-60.
- [501] Glukhova MA, Kabakov AE, Frid MG, et al. Modulation of human aorta smooth muscle cell phenotype: a study of muscle-specific variants of vinculin, caldesmon, and actin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:9542-6.
- [502] de la Cuesta F, Zubiri I, Maroto AS, et al. Deregulation of smooth muscle cell cytoskeleton within the human atherosclerotic coronary media layer. *J Proteomics.* 2013;82:155-65.
- [503] Duncan R, Bazar L, Michelotti G, et al. A sequence-specific, single-strand binding protein activates the far upstream element of c-myc and defines a new DNA-binding motif. *Genes Dev.* 1994;8:465-80.
- [504] Zhang S, Ren J, Khan MF, et al. Grb2 is required for the development of neointima in response to vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1788-93.
- [505] Proudfoot D, Shanahan C. Human vascular smooth muscle cell culture. *Methods Mol Biol.* 2012;806:251-63.
- [506] Kisselbach L, Merges M, Bossie A, et al. CD90 Expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures. *Cytotechnology.* 2009;59:31-44.
- [507] Corbera-Bellalta M, Garcia-Martinez A, Lozano E, et al. Changes in biomarkers after therapeutic intervention in temporal arteries cultured in Matrigel: a new model for preclinical studies in giant-cell arteritis. *Ann Rheum Dis.* 2013.
- [508] Raychaudhuri SP, Raychaudhuri SK. Role of NGF and neurogenic inflammation in the pathogenesis of psoriasis. *Prog Brain Res.* 2004;146:433-7.

- [509] Klein K, Aeschlimann A, Jordan S, et al. ATP induced brain-derived neurotrophic factor expression and release from osteoarthritis synovial fibroblasts is mediated by purinergic receptor P2X4. *PLoS One*. 2012;7:e36693.
- [510] Braun A, Lommatzsch M, Lewin GR, et al. Neurotrophins: a link between airway inflammation and airway smooth muscle contractility in asthma? *Int Arch Allergy Immunol*. 1999;118:163-5.
- [511] Kemi C, Grunewald J, Eklund A, et al. Differential regulation of neurotrophin expression in human bronchial smooth muscle cells. *Respir Res*. 2006;7:18.
- [512] Freund V, Pons F, Joly V, et al. Upregulation of nerve growth factor expression by human airway smooth muscle cells in inflammatory conditions. *Eur Respir J*. 2002;20:458-63.
- [513] Balkowiec-Iskra E, Vermehren-Schmaedick A, Balkowiec A. Tumor necrosis factor-alpha increases brain-derived neurotrophic factor expression in trigeminal ganglion neurons in an activity-dependent manner. *Neuroscience*. 2011;180:322-33.
- [514] Dang H, Chen Y, Liu X, et al. Antidepressant effects of ginseng total saponins in the forced swimming test and chronic mild stress models of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009;33:1417-24.
- [515] Vaegter CB, Jansen P, Fjorback AW, et al. Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling. *Nat Neurosci*. 2011;14:54-61.
- [516] Freund-Michel V, Bertrand C, Frossard N. TrkA signalling pathways in human airway smooth muscle cell proliferation. *Cell Signal*. 2006;18:621-7.
- [517] Aravamudan B, Thompson M, Pabelick C, et al. Brain-derived neurotrophic factor induces proliferation of human airway smooth muscle cells. *J Cell Mol Med*. 2012;16:812-23.
- [518] Kwapiszewska G, Chwalek K, Marsh LM, et al. BDNF/TrkB signaling augments smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension. *Am J Pathol*. 2012;181:2018-29.
- [519] Chen C, Kudo M, Rutaganira F, et al. Integrin alpha9beta1 in airway smooth muscle suppresses exaggerated airway narrowing. *J Clin Invest*. 2012;122:2916-27.
- [520] Staniszewska I, Sariyer IK, Lecht S, et al. Integrin alpha9 beta1 is a receptor for nerve growth factor and other neurotrophins. *J Cell Sci*. 2008;121:504-13.
- [521] Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2004;351:1425-36.
- [522] Lucas GA, White LR, Juul R, et al. Relaxation of human temporal artery by endothelin ETB receptors. *Peptides*. 1996;17:1139-44.
- [523] Woods M, Mitchell JA, Wood EG, et al. Endothelin-1 is induced by cytokines in human vascular smooth muscle cells: evidence for intracellular endothelin-converting enzyme. *Mol Pharmacol*. 1999;55:902-9.
- [524] White LR, Juul R, Skaanes KO, et al. Cytokine enhancement of endothelin ET(B) receptor-mediated contraction in human temporal artery. *Eur J Pharmacol*. 2000;406:117-22.
- [525] Damon DH. NGF-independent survival of postganglionic sympathetic neurons in neuronal-vascular smooth muscle cocultures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H1722-8.
- [526] Ieda M, Fukuda K, Hisaka Y, et al. Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression. *J Clin Invest*. 2004;113:876-84.
- [527] Koyama Y, Baba A, Matsuda T. Endothelins stimulate the expression of neurotrophin-3 in rat brain and rat cultured astrocytes. *Neuroscience*. 2005;136:425-33.
- [528] Raines EW, Dower SK, Ross R. Interleukin-1 mitogenic activity for fibroblasts and smooth muscle cells is due to PDGF-AA. *Science*. 1989;243:393-6.
- [529] Wang Z, Kong L, Kang J, et al. Interleukin-1beta induces migration of rat arterial smooth muscle cells through a mechanism involving increased matrix metalloproteinase-2 activity. *J Surg Res*. 2011;169:328-36.
- [530] Matsuki T, Isoda K, Horai R, et al. Involvement of tumor necrosis factor-alpha in the development of T cell-dependent aortitis in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice. *Circulation*. 2005;112:1323-31.



- [531] Koenders MI, Devesa I, Marijnissen RJ, et al. Interleukin-1 drives pathogenic Th17 cells during spontaneous arthritis in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice. *Arthritis Rheum.* 2008;58:3461-70.
- [532] Sutton C, Brereton C, Keogh B, et al. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 2006;203:1685-91.
- [533] Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, et al. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity.* 2009;31:331-41.
- [534] Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, et al. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity.* 2009;30:576-87.
- [535] Coccia M, Harrison OJ, Schiering C, et al. IL-1beta mediates chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A secreting innate lymphoid cells and CD4(+) Th17 cells. *J Exp Med.* 2012;209:1595-609.
- [536] Ishii H, Jin X, Ueno M, et al. Adoptive transfer of Th1-conditioned lymphocytes promotes axonal remodeling and functional recovery after spinal cord injury. *Cell Death Dis.* 2012;3:e363.
- [537] DeKosky ST, Styren SD, O'Malley ME, et al. Interleukin-1 receptor antagonist suppresses neurotrophin response in injured rat brain. *Ann Neurol.* 1996;39:123-7.
- [538] Gruber HE, Hoelscher GL, Bethea S, et al. Interleukin 1-beta upregulates brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin 3 and neuropilin 2 gene expression and NGF production in annulus cells. *Biotech Histochem.* 2012;87:506-11.
- [539] Song C, Zhang Y, Dong Y. Acute and subacute IL-1beta administrations differentially modulate neuroimmune and neurotrophic systems: possible implications for neuroprotection and neurodegeneration. *J Neuroinflammation.* 2013;10:59.