



**HAL**  
open science

# Création d'un nouveau modèle murin d'anévrisme de l'aorte abdominale

Fabien Lareyre

► **To cite this version:**

Fabien Lareyre. Création d'un nouveau modèle murin d'anévrisme de l'aorte abdominale. Médecine humaine et pathologie. Université Côte d'Azur, 2018. Français. NNT: 2018AZUR4073. tel-02357938

**HAL Id: tel-02357938**

**<https://theses.hal.science/tel-02357938>**

Submitted on 11 Nov 2019

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

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

# THÈSE DE DOCTORAT

## Création d'un nouveau modèle murin d'anévrisme de l'aorte abdominale

**Fabien LAREYRE**

Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M) – Nice Inserm U1065  
Équipe 9

**Présentée en vue de l'obtention**  
**du grade de docteur en** Sciences de la Vie et  
de la Santé  
**de l'Université Côte d'Azur**  
**Co-Dirigée par :** Giulia Chinetti / Ziad Mallat  
**Soutenue le :** 09 Octobre 2018

**Devant le jury, composé de :**  
Giuseppina Caligiuri, DR-MD-PhD,  
Université Paris Diderot  
Yann Gouëffic, PU-PH, Université de  
Nantes  
Réda Hassen-Khodja, PU-PH, Université  
Côte d'Azur  
Wilfried Le Goff, HDR-PhD, Université  
Pierre et Marie Curie Paris

# Création d'un nouveau modèle murin d'anévrisme de l'aorte abdominale

Jury :

Président du jury

Réda Hassen-Khodja, PU-PH, Université Côte d'Azur

Rapporteurs

Giuseppina Caligiuri, MD-PhD-DR, Université Paris Diderot

Wilfried Le Goff, PhD-HDR, Université Pierre et Marie Curie Paris

Examineurs

Yann Gouëffic, PU-PH, Université de Nantes

## **Titre : Création d'un nouveau modèle murin d'anévrisme de l'aorte abdominale**

---

### **Résumé**

L'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA) est associé à des taux élevés de morbidité et de mortalité. A l'heure actuelle, le seul traitement curatif de l'AAA est chirurgical, aucune approche pharmacologique n'ayant démontré une efficacité suffisante. Une meilleure compréhension des mécanismes aboutissant au développement de l'AAA permettrait d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Bien qu'utiles dans cette démarche, les modèles animaux expérimentaux actuels ne reproduisent pas parfaitement la physiopathologie humaine.

Les objectifs de ce travail étaient de : 1/ Créer et caractériser un nouveau modèle murin d'AAA associant application topique d'élastase et neutralisation systémique du TGF $\beta$ . 2/ Etudier le rôle de l'IL-1 $\beta$  dans ce modèle.

Nos résultats montrent que la neutralisation du TGF $\beta$  chez des souris C57Bl6j aggravait la dilatation anévrismale induite par l'application d'élastase et favorisait la rupture aortique. Ceci était associé à une dégradation accrue de la matrice extra-cellulaire, une infiltration de cellules inflammatoires au sein de la paroi aortique, la formation d'un thrombus intra-luminal ainsi qu'une augmentation de la néo-angiogénèse. L'utilisation de la technique d'imagerie par synchrotron a permis de montrer une destruction de la paroi aortique en l'absence de formation de dissection aboutissant à une rupture aortique transmurale fatale. L'expression génique de différentes cytokines, dont l'IL-1 $\beta$  était augmentée dans la paroi aortique. Afin d'étudier le rôle de l'IL-1 $\beta$ , deux modèles d'inactivation ont été utilisés : l'induction d'AAA chez des souris déficientes en IL-1 $\beta$  et l'injection systémique d'anticorps anti-IL-1 $\beta$ . Les souris IL-1 $\beta$ <sup>-/-</sup> étaient protégées du développement anévrismal et de la rupture après application d'élastase et neutralisation du TGF $\beta$ . En revanche, la neutralisation de l'IL-1 $\beta$  par injection d'anticorps à un temps plus tardif ne limitait pas la progression de l'AAA et aboutissait à la rupture anévrismale.

Cette étude a permis de créer un nouveau modèle murin d'AAA dont les caractéristiques sont proches de la physiopathologie humaine. L'inactivation génétique de l'IL-1 $\beta$ , et non la neutralisation systémique à un temps tardif, limitait la croissance et prévenait la rupture anévrismale suggérant le rôle de cette cytokine au cours des stades précoces du développement de l'AAA.

---

**Mots clés : anévrisme aorte, animal**

---

**Title: Creation of a new murine model of abdominal aortic aneurysm**

---

**Abstract**

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is associated with extremely high morbidity and mortality rates. The only curative treatment relies on surgery as no drug has proven yet its efficacy to cure the disease. A better understanding of pathophysiological mechanisms involved in AAA development would help to identify new therapeutic targets. Even though current experimental animal models are useful to address this question, none of them perfectly mimics human disease. The aim of this study was: 1/ Create and characterize a new murine model of AAA based on topic application of elastase associated with systemic TGF $\beta$  neutralization. 2/ Study the effect of IL-1 $\beta$  in this model.

We report that TGF $\beta$  neutralization in C57Bl6j male mice increased aneurysmal aortic dilatation induced by elastase and favored aortic rupture. This was associated with major vascular remodeling including the degradation of extracellular matrix, the infiltration of inflammatory cells in the aortic wall, the formation of an intraluminal thrombus and the increase of neoangiogenesis. Synchrotron-based ultrahigh ex-vivo resolution imaging revealed a wall disruption with no medial dissection culminating in fatal transmural aortic wall rupture. The gene expression of several cytokine including IL-1 $\beta$  was increased in the aortic wall. The effect of IL-1 $\beta$  was investigated using IL-1 $\beta$ <sup>-/-</sup> mice or using systemic injection of monoclonal anti-IL-1 $\beta$  antibody. IL-1 $\beta$ <sup>-/-</sup> mice were protected against aortic dilatation and aortic rupture after application of elastase associated with TGF $\beta$  neutralization. However, the injection of anti-IL-1 $\beta$  antibody did not limit the aortic dilatation and neither prevented the aortic rupture.

In this study, we created a new murine model of AAA which reproduces the main pathophysiological human features. The genetic invalidation of IL-1 $\beta$ , but not its blockade after disease initiation prevented AAA dilatation and rupture, suggesting the role of this cytokine in the early stages of AAA development.

---

**Keywords : aortic aneurysm, animal**

---

## **REMERCIEMENTS**

**Mes premiers remerciements s'adressent aux membres du jury**

**A M. le Professeur HASSEN-KHODJA,**

Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Vous avez été mon directeur de thèse de médecine et m'avez permis de dégager du temps pour réaliser mes projets de recherche afin de réaliser une nouvelle thèse. Merci pour vos enseignements et votre patience dans mon apprentissage de la chirurgie vasculaire et merci pour la confiance et le soutien que vous m'avez accordé. Veuillez trouver l'expression de ma profonde gratitude.

**A Mme. le Docteur CALIGIURI,**

Je vous remercie d'avoir accepté de siéger à ce jury et de juger mon travail de thèse.

**A M. le Docteur LE GOFF,**

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail.

**A M. le Professeur Yann GOUEFFIC,**

Je vous remercie de votre présence et d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Vous m'avez suivi depuis le début de ce projet en siégeant à la commission de Chirurgie expérimentale de la SCVE et vous êtes pour moi un exemple moderne de chirurgien-chercheur.

**A Mme le Professeur CHINETTI,**

Je vous remercie de m'avoir fait confiance depuis le début pour la réalisation de cette thèse de sciences. Votre disponibilité, vos conseils et votre écoute m'ont été hautement précieux. Notre collaboration sur nos projets de recherche clinique est très importante pour moi. Puissent-ils se poursuivre tout au long de ma carrière. Merci du temps que vous m'avez consacré et j'espère que nous aurons le plaisir de continuer à travailler ensemble.

**Mr le Professeur Ziad Mallat,**

Je peux le dire, tu as vraiment changé ma vie ! Je n'aurais jamais cru pouvoir intégrer un laboratoire aussi prestigieux que celui de Cambridge et tu m'as accepté pour mes premiers pas en sciences. Grâce à toi, j'ai découvert un autre monde, un autre environnement qui ne m'était pas familier. Tu es un moteur hors pair dans l'aboutissement de mes projets et ta carrière force le respect. Merci de me faire l'honneur d'être directeur de cette thèse.

**A mes maîtres et collaborateurs,**

**Mr le Professeur Van Obberghen,** merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire.

**Mr le Docteur Neels,** merci de me permettre d'intégrer et de continuer mes projets de recherche au sein de votre équipe.

**Mr le Docteur Marc Clément,** tu représentes pour moi l'exemple typique du scientifique brillant. Avec tout le travail que tu fournis, tu ne peux que réussir. Ton aide précieuse et ton implication pour l'aboutissement de ma thèse ne te rendent que plus exceptionnel. Merci de m'avoir appris les bases, merci de m'avoir accueilli au sein de ta famille et surtout merci pour tous les moments inoubliables que nous avons passé ensemble.

### **A mes collègues du laboratoire de Cambridge**

A Andy, Steve, Xuan, Yuning, Gemma, Mery, Dimitri, Minoru, Jane, Meg, Leanne, Allie, James et Eve, merci pour m'avoir accueilli et enseigné les bases de la recherche.

A Sara, ton sourire et ta bonne humeur vont me manquer.

### **A mes collègues de l'IRCAN et du C3M**

Claudine, ta rigueur et ta motivation dans la réalisation de nos projets feront de toi j'en suis sûr une excellente chercheuse, continue comme ça et ne change rien. Le travail au mérite est la plus belle des récompenses.

### **A mes collègues du Service de Chirurgie Vasculaire de Nice**

A Pierre, merci de m'avoir transmis la passion de notre Spécialité. Je te remercie pour ton grand soutien et ton aide précieuse au cours de mon parcours.

A Serge, j'ai beaucoup appris à tes côtés. Merci pour tout ce que tu m'as transmis dans notre spécialité.

A Elixène, je te remercie pour ta gentillesse, ton soutien, et ta disponibilité tout au long de mon parcours. Merci pour tout ce que tu m'as transmis et j'espère continuer à travailler à tes côtés.

A Sophie, merci pour ta bonne humeur et ton soutien tout au long de mon parcours.

A Nirvana, Aurélien, mes anciens co-internes et tous les membres paramédicaux, pour votre disponibilité, votre aide et votre expérience, veuillez trouver l'expression de ma profonde et respectueuse reconnaissance.



### **A mes collègues du Centre Cardio-Thoracique de Monaco**

A Mr Mialhe, merci d'avoir toujours cru en moi et merci de m'avoir aidé, tant sur le plan humain que professionnel, dans la réalisation de mes projets. Vous êtes un modèle de carrière et votre soutien est précieux.

### **A mes amis et ma famille**

A mes 2 petits, Alexandre et Clément qui me rendent la vie plus belle chaque jour.

Merci à Juliette de m'avoir soutenu et aidé depuis le début de nos études médicales.

Ta détermination, ta ténacité et ton implication pour que je réussisse dans mes projets ne te rendent que plus extraordinaire. Merci encore pour ton amour et ta gentillesse qui me rappellent chaque jour la chance que j'ai de partager ta vie. Après 12 ans de vie commune, de projets professionnels hors du commun et 2 enfants, nous avons tout l'avenir devant nous. Nous sommes jeunes et nous allons en profiter !

A mon père. Je ne trouve pas les mots pour te remercier tellement les sacrifices que tu as fait pour moi son immense. Simplement 4 mots : « Merci pour tout, papa ! »

Maman, tu ne seras pas là pour me voir soutenir cette thèse de sciences. Cette fois ci, tu ne pourras pas corriger mes fautes d'orthographe. Pas un jour ne se passe sans que je pense à toi et tu me manques énormément. Toi qui étais si fier de moi quand je travaillais à Monaco et à Cambridge, tu peux être sûre que je ne lâcherai rien et que j'irai jusqu'au bout de mes convictions. Je n'arrive pas à me dire que tu es parti sans voir mes 2 petits garçons, Alexandre et Clément. Depuis ton départ, ma vision des choses a changé et tu me donnes la force d'avancer à chaque obstacle que je rencontre. J'espère que tu es fière de moi : merci maman mille fois pour tous les sacrifices que tu as faits.

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

**AAA** : Anévrisme de l'Aorte Abdominale

**ACK** : Ammonium-Chloride-Potassium

**ACTA2** : Actin alpha 2 smooth muscle

**ADNc** : ADN complémentaire

**ANOVA** : Analysis of variance

**ARN** : Acide Ribonucléique

**CD** : Cluster de Différenciation

**CMLs** : Cellules Musculaires Lisses

**DOCA** : Acétate de desoxycorticostérone

**DQ**: Dye Quenched

**ED**: Echographie Doppler

**EDTA**: Ethylene-DiamineTetra-acetic Acid

**F4/80**: EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1

**FBN1**: fibrilline 1

**FBS**: Fetal Bovine Serum

**FSC**: Forward Scatter

**GWAS**: Genome Wide Association Studies

**HAS** : Haute Autorité de Santé

**HCl** : Acide Chlorhydrique

**HDL**: High Density Lipoproteins

**HTA** : Hypertension artérielle

**IFN $\gamma$**  : Interféron gamma

**IL-1 $\beta$**  : Interleukine bêta de type 1

**KO**: Knock-Out

**LAMP2** : Lysosomal-Associated Membrane Protein 2

**LDL**: Low Density Lipoproteins

**LTBP**: Latent TGF $\beta$  Binding Proteins

**Ly6C**: Lymphocyte antigen 6C

**MEC** : Matrice Extra Cellulaire

**MMPs** : Métalloprotéinases Matricielles

**MTT:** bromure de 3-(4,5-diMethylThiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tétrazolium

**MYH11:** Myosin Heavy Chain 11

**MYLK:** Myosin Light Chain Kinase

**NLRP3:** NOD-Like Receptor family, Pyrin domain containing 3

**O.C.T:** Optimal Cutting Temperature

**P/S:** Penicillin – Streptomycin

**PBS:** Phosphate Buffered saline

**PDC :** Produit de Contraste

**PFA:** Paraformaldéhyde

**PNN:** PolyNucléaires Neutrophiles

**PTFE:** PolyTetraFluoroEthylene

**qPCR:** PCR quantitative

**RPMI:** Roswell Park Memorial Institute medium

**RT-qPCR:** Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction

**SDS:** Sodium Dodecyl-Sulfate

**SMA:** Smooth Muscle Actine

**SMAD:** SMAD family member 3

**SSC:** Side Scatter

**TGFβR1:** Transforming growth factor bêta receptor 1

**TGFβR2:** Transforming growth factor bêta receptor 2

**TGFβ:** Transforming growth factor bêta

**TIL:** Thrombus intra-luminal

**TIMPs:** Tissue Inhibitors of MetalloProteinases

**TNFα :** Tumor Necrosis Factor alpha

**TOMCAT:** TOMographic Microscopy and Coherent rAdiology experimentTs

**tPA:** tissue Activator Plasminogen

**TUNEL:** Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling

**3D:** 3-Dimensions

## **PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS**

### **Publications acceptées**

« TGF $\beta$  blockade induces a human-like disease in a non-dissecting mouse model of abdominal aortic aneurysm »

**Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology** (IF: 6.6)

**F. Lareyre**, M. Clément, J. Raffort, S. Pohlod, M. Patel, B. Esposito, L. Masters, A. Finigan, M. Vandestienne, N. Stergiopulos, S. Taleb, B. Trachet, Z. Mallat  
*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017 Nov;37(11):2171-2181. doi:  
10.1161/ATVBAHA.117.309999. Epub 2017 Sep 14.

### **Communications orales**

**2017- Congrès annuel de la Société Française de Chirurgie Vasculaire, Toulouse – France**

« Le TGF $\beta$  protège de la rupture aortique dans le modèle murin d'anévrisme induit par l'élastase »

**F. Lareyre**, M. Clément, M. Patel, J. Raffort, R. Assil, A. Finigan, L. Master, R. Hassen-Khodja, Z. Mallat.

**2016- Charing Cross Symposium, Londres – Royaume-Uni**

«Neutralization of TGF-beta leads to aortic rupture in elastase induced abdominal aortic aneurysm in mice»

**F. Lareyre**, M. Clément, M. Patel, J. Raffort, R. Assil, A. Finigan, L. Master, Z. Mallat.

**2016- BHF Cambridge Centre of Excellence – Cardiovascular Event, Cambridge – Royaume-Uni**

« La neutralisation du TGF $\beta$  induit une rupture anévrysmale chez la souris. »

**F. Lareyre**, M. Patel, M. Clément, J. Raffort, R. Assil, A. Finigan, L. Master, Z. Mallat.

### **Communications affichées**

**2018- British Atherosclerosis Society- Cambridge- Royaume-Uni**

« TGF $\beta$  blockade induces a human-like disease in a non-dissecting mouse model of abdominal aortic aneurysm »

**F. Lareyre**, M. Clément, J. Raffort, S. Pohlod, M. Patel, B. Esposito, L. Masters, A. Finigan, M. Vandestienne, N. Stergiopulos, S. Taleb, B. Trachet, Z. Mallat

**2017- Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology - Peripheral Vascular Disease - Minneapolis – Etats-Unis:**

TGF $\beta$  blockade induces a human-like disease in a non-dissecting mouse model of abdominal aortic aneurysm

M. Clément, **F. Lareyre**, J. Raffort, S. Pohlod, M. Patel, B. Esposito, L. Masters, A. Finigan, M. Vandestienne, N. Stergiopulos, S. Taleb, B. Trachet, Z. Mallat

# **SOMMAIRE**

## **I/ INTRODUCTION**

### **1- Anévrisme de l'aorte abdominale**

1.1 Définition

1.2 Epidémiologie et dépistage

1.3 Imagerie

1.4 Traitement

### **2- Principaux mécanismes à l'origine des AAA**

2.1 Facteurs de risque cardiovasculaire

2.2 Mécanismes physiopathologiques

2.3 Rôle du TGF $\beta$

2.4 Rôle de l'IL1 $\beta$

### **3- Modèles expérimentaux d'AAA**

3.1 Modèles non disséquant

3.2 Modèles disséquant

### **4- Objectifs**

## **II/ MATERIEL ET METHODES**

### **1- Souris et nourriture**

### **2- Technique d'anesthésie**

### **3- Technique chirurgicale**

### **4- Collection des tissus**

### **5- Mesures non-invasives**

5.1 Echographie abdominale

5.2 Synchrotron à haute résolution d'images

5.3 Mesure de la tension artérielle

5.4 Suivi pondéral et suivi de l'état général

**6- Préparation de l'élastase**

**7- Histologie et immunofluorescence**

**8- Cytométrie en flux**

**9- Zymographie in situ**

**10- Biologie moléculaire**

**11- Cytokines plasmatiques**

**12- Analyse statistique**

### **III/ RESULTATS**

**1- Mise en place et caractérisation du nouveau modèle murin d'AAA associant application topique d'élastase et neutralisation du TGF $\beta$**

1.1 La neutralisation du TGF $\beta$  aggrave la dilatation anévrismale induite par l'élastase et favorise la rupture aortique

1.2 La neutralisation du TGF $\beta$  après application d'élastase induit un remodelage de la paroi aortique dont les caractéristiques sont proches de la physiopathologie humaine

1.3 La neutralisation du TGF $\beta$  après application d'élastase favorise la réponse inflammatoire au sein de la paroi aortique

**2- Rôle de l'IL-1 $\beta$  dans l'initiation et la progression de l'AAA**

### **IV/ DISCUSSION**

### **V/ CONCLUSION**

### **VI/ REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

### **VII/ ANNEXES**

**1- Annexe 1 : Protocole expérimental d'induction anévrismale chez la souris C57BL/6**

**2- Annexe 2 : Article publié dans "Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology"**

# **I/ INTRODUCTION**

## **1- L'anévrisme de l'aorte abdominale**

### **1.1 Définition**

L'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA) correspond à une perte du parallélisme des bords de la paroi artérielle entraînant une dilatation localisée d'un segment de l'aorte dans sa portion abdominale <sup>1,2</sup>. 80% des anévrismes sont localisés au niveau de la portion abdominale de l'aorte. Ils peuvent se prolonger sur les artères iliaques, d'où la dénomination d'anévrismes aorto-iliaques. Ils ont le plus fréquemment la forme d'un fuseau (80%), parfois la forme d'un sac (sacciforme). D'une manière générale, il est question d'anévrisme lorsque le calibre de l'aorte abdominale, dont la normale est d'environ 2 cm, mesure plus de 3cm ou une fois et demie son diamètre normal.

### **1.2 Epidémiologie et dépistage**

Affectant environ 4,3% des hommes et 1% des femmes de plus de 50 ans, l'AAA est le plus souvent asymptomatique et découvert de façon fortuite au cours d'un examen d'imagerie réalisé dans le cadre d'une autre pathologie <sup>3</sup>. Entre 2009 et 2010, l'incidence des anévrismes diagnostiqués et opérés était comprise entre 6000 et 7000 par an, avec une augmentation de 29% du nombre d'opérations d'AAA entre 2006 et 2010 <sup>4</sup>. Dans ce contexte, la mise en place d'un dépistage semblait pertinente. Actuellement, en France, la Haute Autorité de Santé (HAS) recommande le dépistage ciblé opportuniste unique des AAA chez les hommes répondant aux caractéristiques suivantes :

- Age compris entre 65 et 75 ans et tabagisme chronique actuel ou passé
- Age compris entre 50 et 75 ans et antécédents familiaux d'AAA

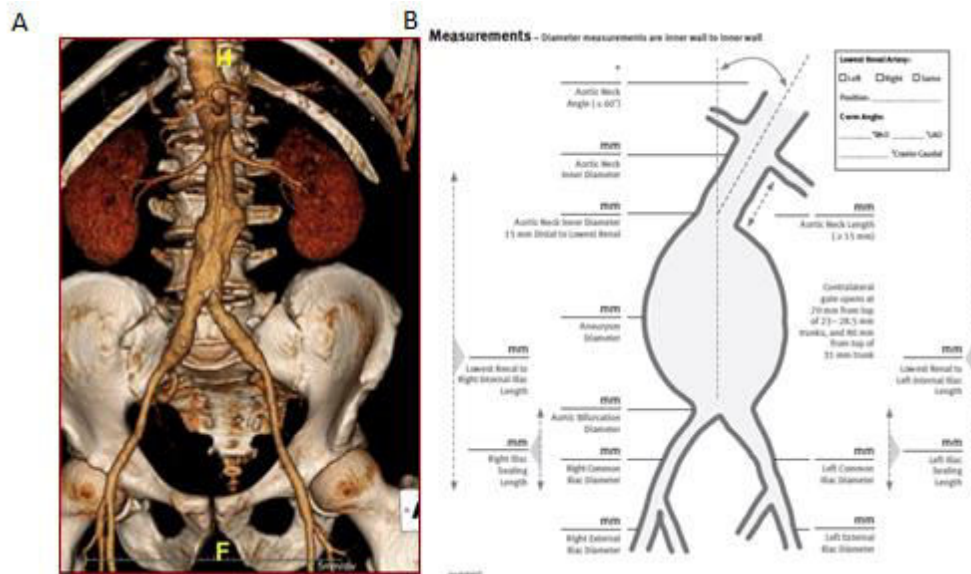
Ce dépistage ciblé est préconisé car la prévalence de l'AAA augmente avec l'âge. De plus, la mortalité liée aux AAA rompus est importante : 80% des patients décèdent avant hospitalisation alors que le taux de décès lors des interventions programmées est inférieur à 5%. Le dépistage permet donc une réduction significative de la mortalité liée à l'AAA à moyen et long terme.

L'examen de dépistage et de confirmation diagnostique est l'échographie-Doppler (ED) <sup>5</sup>. Examen rapide, non invasif, reproductible avec une bonne sensibilité et spécificité, il permet de calculer le diamètre maximal de l'aorte. Le suivi des sujets ayant un test de dépistage positif est variable selon le diamètre anévrismal. Entre 30 et 50 mm, une surveillance doit être instaurée par ED, avec un rythme de suivi établi en fonction du diamètre. En cas de diamètre > 50 mm, un avis spécialisé auprès d'un chirurgien vasculaire doit être pris. Aussi, le seul traitement curatif actuel repose sur la chirurgie qui peut être réalisée par voie ouverte conventionnelle ou par voie endovasculaire.

### **1.3 Imagerie**

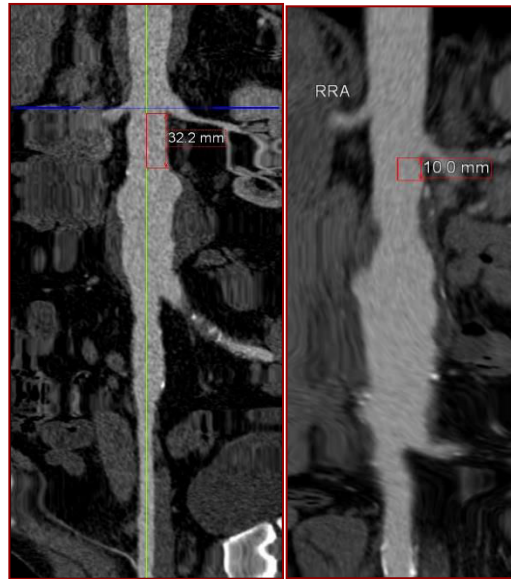
Si l'écho-doppler est l'examen de choix pour le dépistage des AAA, l'angioscanner représente l'examen de référence dans le cadre du bilan préopératoire. La possibilité d'obtenir des coupes millimétriques ainsi que des reconstructions dans plusieurs plans permet d'obtenir une image fine de l'anévrisme. Des clichés sont réalisés sans injection de produit de contraste (PDC) afin de bien visualiser les calcifications et une deuxième acquisition, injectée cette fois, va permettre de bien visualiser l'aorte et l'arbre artériel dans son ensemble (tortuosités, longueur, diamètre) et permettre une reconstruction en 3-Dimensions (3D) (Figure 1).





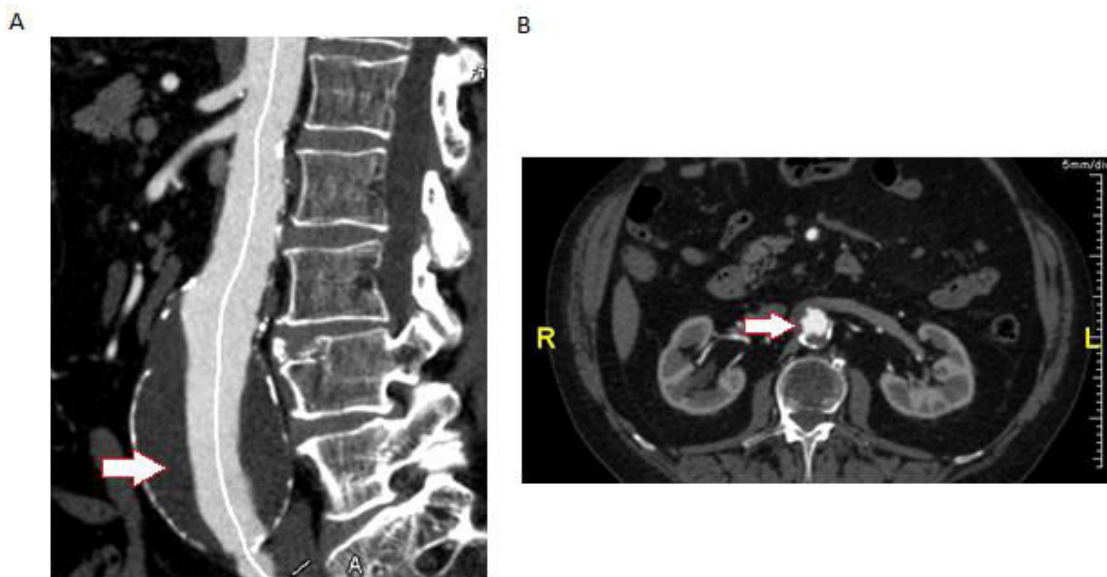
**Figure 1:** (A) Reconstruction à l'angioscanner en 3 dimensions d'un AAA. (B) Planche de « sizing » afin de mesurer les longueurs entre les différentes parties de l'anévrisme.

L'importance d'un scanner aortique bien injecté et bien réalisé est capitale car elle va permettre au chirurgien de pouvoir reconstruire sur des logiciels de mesure dit « sizing » l'anévrisme afin de pouvoir commander les endoprothèses adéquates, propre à chaque patient (Figure 1B). Parmi les mesures les plus importantes recueillies par le chirurgien figurent les mesures de diamètre (de paroi à paroi). La possibilité de formatage multi planaire va également permettre d'obtenir des reconstructions rectilignes afin de présenter le vaisseau dans un seul plan et obtenir des mesures fines prenant en compte les sinuosités artérielles (Figure 2).

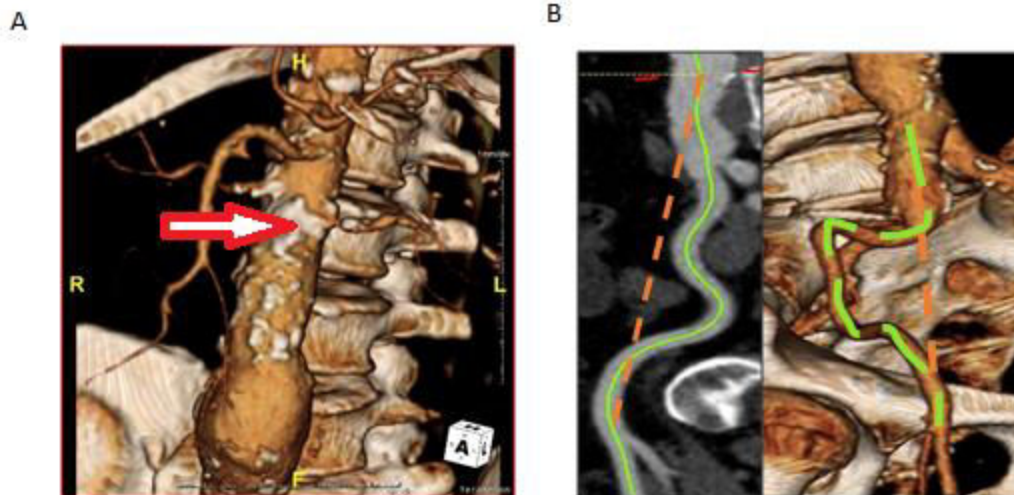


**Figure2:** (A) Reconstruction à l'angioscanner en 3 dimensions d'un AAA. (B) Planche de « sizing » afin de mesurer les longueurs entre les différentes parties de l'anévrisme.

Le scanner permettra également de mettre en évidence et de localiser les calcifications, le thrombus (Figure 3) ou encore les sinuosités artérielles (Figure 4), éléments important à prendre en compte pour guider le geste chirurgical.

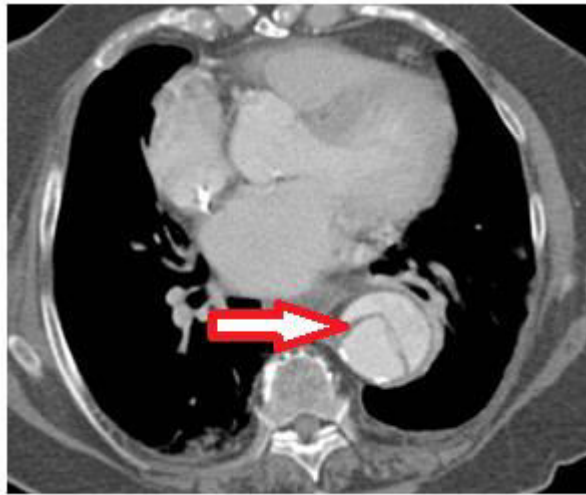


**Figure 3** : Image représentative d'un thrombus au scanner (flèche) sur une aorte en coupe sagittale (A) et axiale (B). Le thrombus apparaît hypodense alors qu'il existe une hyperdensité de la lumière aortique



**Figure 4** : Représentation à l'angioscanner en 3-dimensions de (A) calcification au niveau de l'aorte apparaissant en blanc (flèche rouge) et de (B) sinuosités artérielles (ligne verte)

Le diagnostic des AAA est réalisé grâce à l'imagerie. Celle-ci permet également de distinguer les diagnostics différentiels comme la dissection aortique. La dissection aortique correspond à une déchirure de l'intima qui va provoquer la pénétration du flux sanguin dans la paroi aortique, créant ainsi un faux chenal. Ce faux chenal, crée en parallèle à la vrai lumière aortique peut être circulant ou se thromboser. Il existe alors sur l'angioscanner une image de « flap intimal » bien visible (Figure 5).



**Figure 5:** Angioscanner en coupe axiale montrant une dissection aortique au scanner avec un aspect en balle de tennis de l'aorte (flèche rouge).

#### 1.4 Traitement

Le traitement curatif de l'AAA est un facteur important de réduction de la mortalité liée aux AAA, notamment en dehors de l'urgence. Une intervention chirurgicale doit être envisagée si <sup>1,6</sup>:

- Diamètre du sac anévrismal > 50 mm
- Vitesse de croissance de l'AAA > 10 mm/an
- Symptomatologie faisant craindre une fissuration

Actuellement, il existe 2 techniques de traitement des AAA <sup>1,6</sup>:

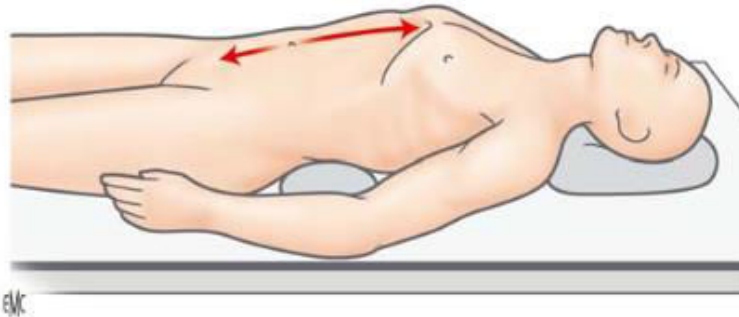
##### *La chirurgie conventionnelle par mise à plat-greffe*

La mise à plat-greffe des AAA consiste en une ouverture du sac anévrismal (endoanévrismorrhaphie) suivie par l'interposition d'une prothèse entre les extrémités de l'anévrisme.

Schématiquement, cette mise à plat-greffe peut être réalisée selon plusieurs voies d'abord :

- Voie transpéritonéale par laparotomie classique :

Le patient est en décubitus dorsal, un billot sous les omoplates. Une incision est faite depuis l'appendice xiphoïde jusqu'en sous-ombilical (Figure 6).

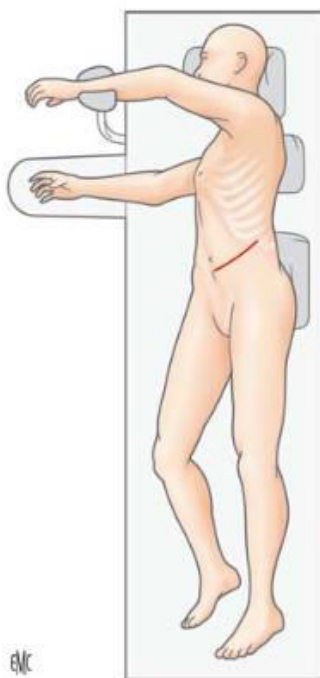


Abord par laparotomie médiane xiphopubienne. Installation du malade avec un billot transversal placé à la base du thorax.

**Figure 6** : Image représentative de la voie d'abord transpéritonéale par laparotomie classique.

- Voie rétro-péritonéale par lombotomie gauche :

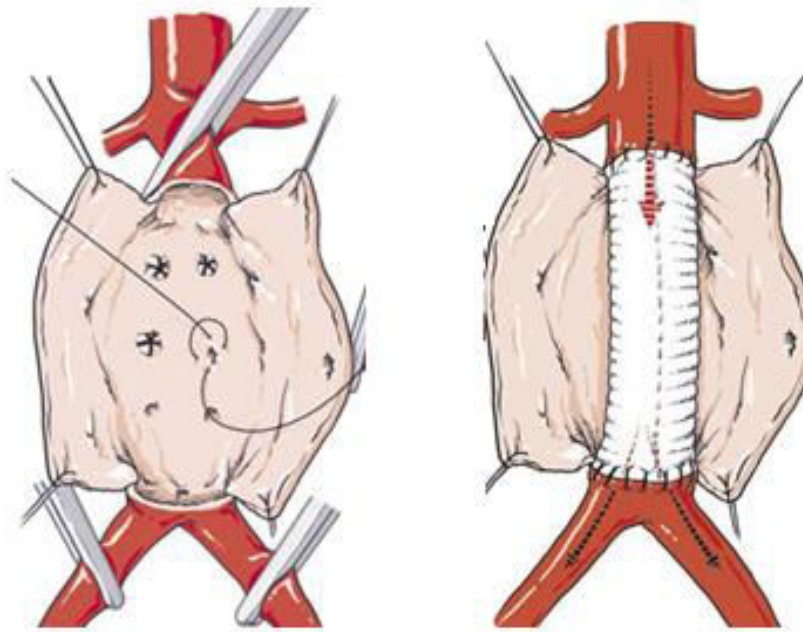
Le patient est en décubitus latéral, avec un billot transversal sous le rebord costal. L'incision est menée depuis la ligne axillaire moyenne jusqu'au rebord gauche du muscle grand droit (Figure 7).



Voie rétropéritonéale de Rob. Incision cutanée allant de la ligne médiane vers la pointe de la 11<sup>e</sup> côte.

**Figure 7** : Image représentative de la voie d'abord rétro-péritonéale par lombotomie gauche.

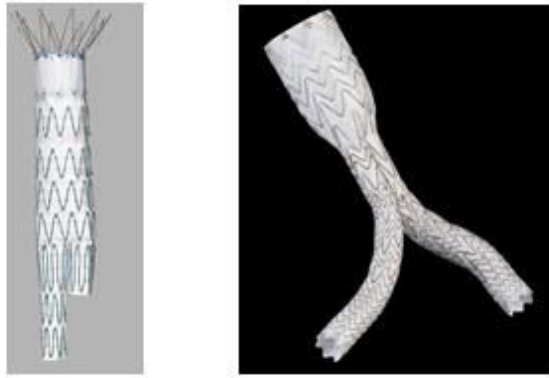
Le principe général de la mise à plat d'un AAA sous rénal se fait selon les étapes suivantes : clampage des artères iliaques primitives dans un premier temps puis clampage de l'aorte sous-rénale. Réalisation dans un second temps d'une ouverture longitudinale de l'anévrisme (Figure 8). Souvent, une, deux ou trois paires d'artères lombaires, ainsi que l'artère sacrée moyenne refluent de façon plus ou moins abondante dans la poche anévrismale, auquel cas, ces artères seront suturées par l'intérieur de l'anévrisme. Dans un troisième temps, il faudra réaliser l'anastomose proximale puis distale afin de remettre en charge rapidement le flux sanguin qui aura été interrompu par le clampage aortique. La dernière étape consistera à vérifier les hémostases, en particulier celles des artères lombaires et de l'artère sacrée moyenne puis à refermer la poche anévrismale sur la prothèse afin d'éviter le contact de cette dernière avec le tube digestif afin d'éviter une fistulisation tardive.



**Figure 8** : Image représentative de la mise à plat-greffe de l'AAA.

### *La chirurgie endovasculaire*

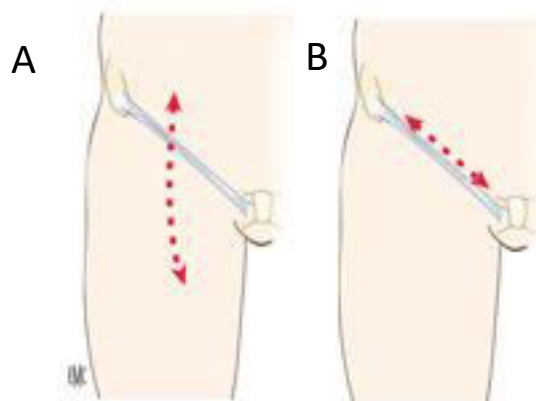
Le traitement endovasculaire des AAA repose sur le principe de l'exclusion de l'anévrisme par l'intermédiaire d'une endoprothèse (Figure 9). Cette technique récente date du début des années 1990. Avec les avancées technologiques et l'avènement de l'ère endovasculaire au sein de la chirurgie vasculaire, cette technique autrefois réservée aux patients dits inopérables tend à devenir un traitement de choix des AAA.



**Figure 9** : Images représentatives d'une endoprothèse.

Le traitement endovasculaire s'effectue sur une table d'opération radio-transparente aux rayons X sous anesthésie générale ou parfois locale. Deux types d'approche peuvent être réalisées :

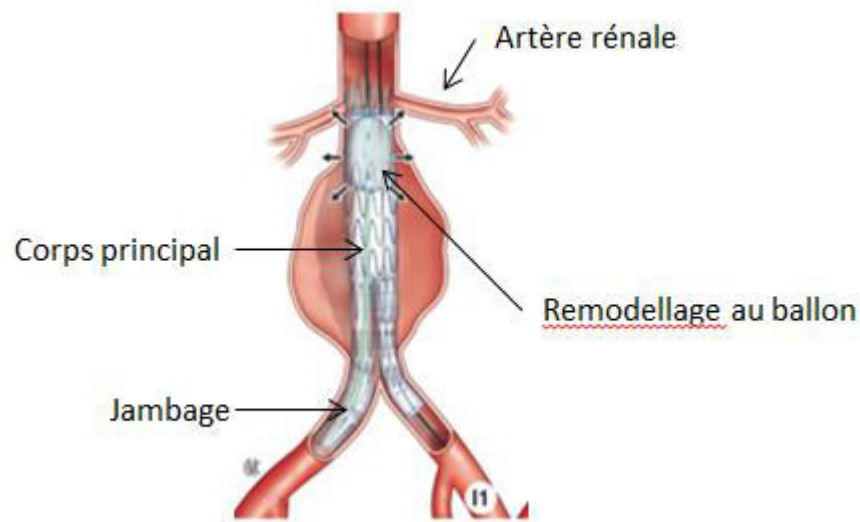
- Une approche percutanée : cela est rendue possible grâce à l'utilisation de dispositif de fermeture percutanée.
- Une approche par abord chirurgical des artères fémorales (Figure 10).



**Figure 10** : Voie d'abord chirurgicale par (A) incision verticale ou (B) parallèle au pli inguinal.



Après le choix de la voie d'abord, la mise en place de l'endoprothèse est réalisée. Le système de déploiement des endoprothèses est variable selon la société qui les confectionne. D'une manière générale, l'endoprothèse posée est bifurquée, avec un corps principal et des jambages. Cette dernière est larguée juste en dessous des artères rénales. A la fin de la procédure, un modelage au ballon du corps de la prothèse et des jambes est effectué (Figure 11).



**Figure 11** : Mise en place d'une endoprothèse bifurquée.

A la fin de l'intervention, une angiographie de contrôle est réalisée afin de vérifier le bon positionnement de l'endoprothèse et l'exclusion de l'anévrisme.

## 2- Principaux mécanismes à l'origine des AAA

### 2.1 Facteurs de risque cardiovasculaire

Les facteurs de risque d'AAA sont bien connus. Les 4 principaux sont l'âge de plus de 65 ans, le sexe masculin, le tabagisme chronique et les antécédents familiaux d'AAA. Sur l'ensemble de ces facteurs de risque, seul le tabagisme chronique est amendable.

#### Antécédents familiaux et génétiques

Approximativement 20% des patients ayant un AAA ont un antécédent familial d'anévrisme, suggérant un lien prédisposant <sup>7</sup>. Des études d'association pangénomiques (genome wide association studies, GWAS) ont montré qu'un variant nommé rs10757278 était associé avec les AAA et les anévrismes intra-craniens <sup>8</sup>. Ce variant était localisé sur le chromosome 9p21, dans une région voisine des gènes CDKN2A/CDKN2B qui sont d'importants régulateurs de la croissance cellulaire et de la survie. Un autre variant associé avec l'AAA, situé sur le chromosome 9q33, a été identifié et est également associé avec l'infarctus du myocarde, l'artériopathie des membres inférieurs et l'embolie pulmonaire <sup>8</sup>. Ce variant était localisé proche du gène DAB2IP, également impliqué dans la croissance cellulaire et la survie.

D'autre part, les gènes impliqués chez les patients ayant un anévrisme syndromique associé à la maladie de Marfan, le syndrome de Loeys-Dietz ou le syndrome anévrisme-ostéoarthrite ont été identifiés et sont les gènes codant pour la fibrilline 1 (FBN1), les récepteurs 1 et 2 du TGF $\beta$  (TGF $\beta$ R1 et TGF $\beta$ R2), le TGF $\beta$  2 (TGF $\beta$ 2) et la protéine SMAD family member 3 (SMAD3) <sup>9</sup>. Dans ces syndromes, l'anomalie génétique est responsable d'une modification de la voie de signalisation du TGF $\beta$ , à l'origine des lésions au niveau de l'aorte thoracique <sup>10-12</sup>.

Dans d'autres groupes de familles avec des anévrismes thoraciques, une anomalie génétique a été identifiée dans ce qui ont été nommés les anévrismes thoraciques familiaux non-syndromiques impliquant les gènes MYH11 (Myosin Heavy Chain 11), MYLK (Myosin Light Chain Kinase) ou ACTA2 (Actin alpha 2 smooth muscle) touchant le fonctionnement des cellules musculaires lisses (CMLs).

### Hypertension artérielle (HTA)

L'HTA est positivement associée à la présence d'AAA<sup>13</sup> et une récente méta-analyse basée sur 12 études épidémiologiques a montré que l'HTA était un facteur de risque d'AAA<sup>14</sup>. Takagi et al. ont récemment publié une méta-analyse étudiant le lien entre HTA et croissance anévrismale<sup>15</sup>. Basée sur 20 études incluant 6619 patients, aucune différence significative n'était observée entre HTA et croissance anévrismale. Cependant, une étude plus ancienne a montré que l'HTA est positivement associée au risque de rupture chez les patients ayant un anévrisme de petite taille<sup>16</sup>, suggérant le rôle complexe de ce facteur de risque dans la physiopathologie anévrismale.

### Dyslipidémies

Le rôle des dyslipidémies dans le développement des AAA est controversé. Alors que plusieurs études ont montré une association entre le cholestérol associé aux LDL (Low Density Lipoprotein) cholesterol ou aux HDL (High Density Lipoprotein) cholesterol et les AAA, d'autres n'ont pas retrouvé d'association<sup>17</sup>. L'hétérogénéité des résultats est en partie expliquée par les variations de définitions des dyslipidémies. Golledge et al. ont mis en évidence au cours

de leur méta-analyse l'absence d'association entre LDL-cholestérol et AAA mais une association positive entre HDL-cholestérol et anévrisme de petite taille <sup>17</sup>.

### Tabagisme

Le tabagisme est un facteur de risque majeur d'AAA. Les études épidémiologiques ont montré un risque fort d'AAA allant de 3 à 12 fois chez l'homme ou la femme fumeur <sup>18</sup>. De plus, il existe une relation importante entre la prévalence des AAA avec la durée et la quantité de tabac consommé <sup>19</sup>. En cas d'arrêt du tabac 10-19 ans plus tôt, le risque d'incidence d'AAA est 3 fois plus élevé que chez les non-fumeurs <sup>20</sup>. Enfin, le tabagisme est associé à une augmentation de la croissance anévrismale <sup>21</sup> et une méta-analyse réalisée par Sweeting et al. a également mis en évidence que le tabagisme était associé à un risque de rupture deux fois plus élevé <sup>22</sup>. Plusieurs études chez l'homme et chez l'animal ont mis en évidence que la nicotine ou la fumée de cigarette entraînent une augmentation de l'activité inflammatoire avec la production de métalloprotéinases matricielles (MMPs), une augmentation du tissu activator plasminogen (tPA) responsable de l'activation de protéases ou encore de modifications géniques <sup>18</sup>.

### Sexe

Comme la plupart des maladies cardiovasculaires, le sexe masculin représente un facteur de risque important. Les AAA sont plus fréquents chez l'homme que chez la femme avec un risque variant de 4 à 6 fois <sup>23</sup>. Cependant le risque de rupture est 4 fois plus élevé chez la femme même si la croissance anévrismale est similaire entre les deux sexes <sup>22</sup>. De nombreuses études chez l'homme et chez l'animal se sont penchées sur le rôle des hormones <sup>24</sup>. Les œstrogènes entraîneraient une diminution de la production des MMPs et auraient un rôle anti-

inflammatoire. Quant à la testostérone, elle provoquerait une augmentation de l'infiltrat inflammatoire avec une baisse du TGFβI. Le TGFβI est impliqué dans la stimulation de l'expression d'élastine et de collagène, la diminution de l'inflammation et l'inhibition des MMPs<sup>25</sup>. Cependant, la complexité du cycle menstruel et le peu d'études effectuées chez la femme soulignent le manque de connaissance des mécanismes physiopathologiques impliqués.

### Age

L'AAA est une pathologie touchant principalement les personnes âgées avec une prévalence augmentant avec l'âge<sup>26</sup>, notamment chez les personnes de plus de 65 ans pour lesquels un dépistage a été mis en place en France. Länne et al. ont montré il y a plusieurs années que le diamètre de l'aorte abdominale augmentait avec l'âge et que la compliance diminuait<sup>27</sup>.

### Diabète

Le diabète est négativement associé à l'AAA. L'incidence et la prévalence de l'AAA sont plus faibles chez les patients diabétiques par rapport aux sujets non diabétiques<sup>28-34</sup>. Les patients diabétiques présentent en moyenne des AAA de plus petite taille<sup>29,31,35,36</sup> et ils ont un risque de rupture plus faible par rapport aux patients non diabétiques<sup>37</sup>. Les mécanismes impliqués dans la relation négative entre diabète et AAA ne sont pas encore totalement élucidés<sup>38</sup>.

## 2.2 Mécanismes physiopathologiques

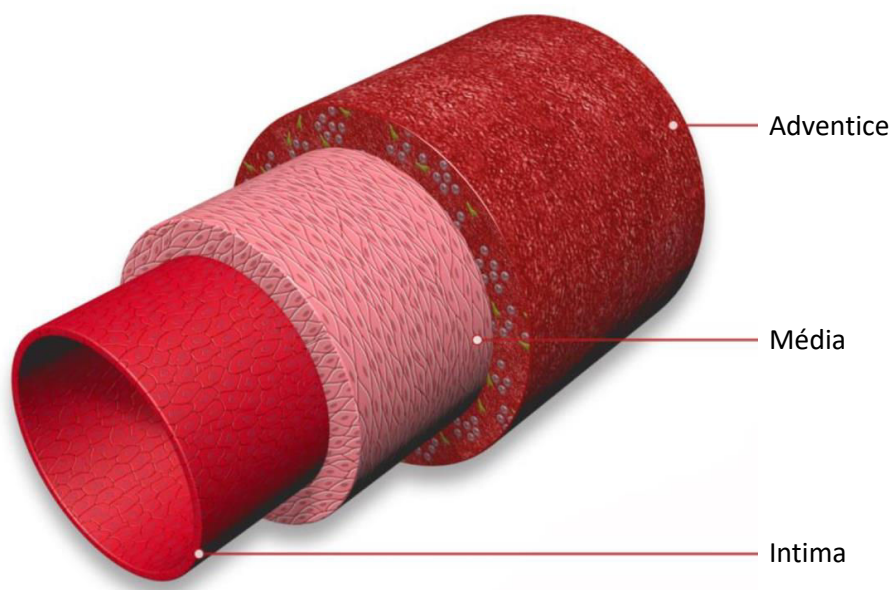
### Structure de la paroi aortique normale

L'aorte est composée de 3 tuniques principales : l'intima, la média et l'adventice (Figure 12).

- L'intima est la tunique la plus interne. Elle est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales ainsi que d'un tissu conjonctif sous endothélial. Elle est séparée de la média par la lame limitante élastique interne et joue un rôle d'interface entre le sang et la paroi artérielle.

- La média est la tunique intermédiaire de l'aorte, délimitée par deux lames limitantes élastiques (interne et externe). Elle est essentiellement composée d'une matrice extracellulaire (MEC) riche en élastine et en collagène produite par les CMLs. Ses propriétés élastiques et contractiles lui permettent de modifier le calibre et l'état de tension de l'aorte, lui conférant un rôle de modulation du niveau de pression sanguine.

- L'adventice est la tunique externe. Elle est composée d'un tissu conjonctif riche en fibres de collagène, principalement produites par des fibroblastes. On retrouve également des vaisseaux nourriciers (vasa vasorum), des terminaisons nerveuses ainsi que des cellules immunitaires. Couche la plus externe du vaisseau, l'adventice représente une tunique d'interface entre l'aorte et les tissus environnants.



**Figure 12** : Structure de la paroi aortique normale (adapté selon Raffort et al. <sup>39</sup>).

### Modification de la paroi aortique au cours de l'AAA

L'AAA est caractérisé par une dilatation du diamètre aortique de plus de 50% par rapport à son diamètre initial. Dans la plupart des cas, l'AAA est associé à des lésions liées à l'athérosclérose et son évolution est corrélée à un remaniement des 3 tuniques de la paroi artérielle. Ainsi, plusieurs processus sont impliqués dans la physiopathologie anévrismale (Figure 13).

### Dégradation de la matrice extra-cellulaire (MEC)

La dégénérescence protéolytique au sein de la MEC joue un rôle majeur dans la pathogénie anévrismale. En effet, l'augmentation de l'activité des protéinases est associée à une aggravation de la pathologie <sup>40</sup>. Parmi celles-ci, les métalloprotéinases matricielles (MMPs) participent activement au remodelage pathologique, favorisant la perte de l'élasticité et de la résistance de la paroi aortique <sup>41-43</sup>. Ainsi, l'augmentation accrue de leur activité au cours du développement anévrismal entraîne la destruction de la MEC, à l'origine du relargage de certains facteurs de croissance comme le TGFβ <sup>44</sup>. Au cours des AAA, les MMP-2 et MMP-9 sont particulièrement exprimées par les CMLs et les macrophages, favorisant la dégradation de l'élastine et du collagène <sup>45</sup>. L'activité des MMPs est physiologiquement régulée par des inhibiteurs nommés « Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase » ou TIMPs. Un modèle expérimental chez le rat a montré que la surexpression de TIMP-1 prévenait la rupture associée aux AAA, suggérant un rôle protecteur de ces inhibiteurs <sup>46</sup>. Au cours de l'évolution anévrismale, il existe une dérégulation du rapport MMPs et TIMPs en faveur d'une

augmentation des protéases. Ce déséquilibre favorise la dégradation de la MEC et est à l'origine de la mort des CMLs par anoikis (apoptose due à un défaut d'interaction entre les cellules et la MEC), empêchant la régénération tissulaire <sup>47</sup>.

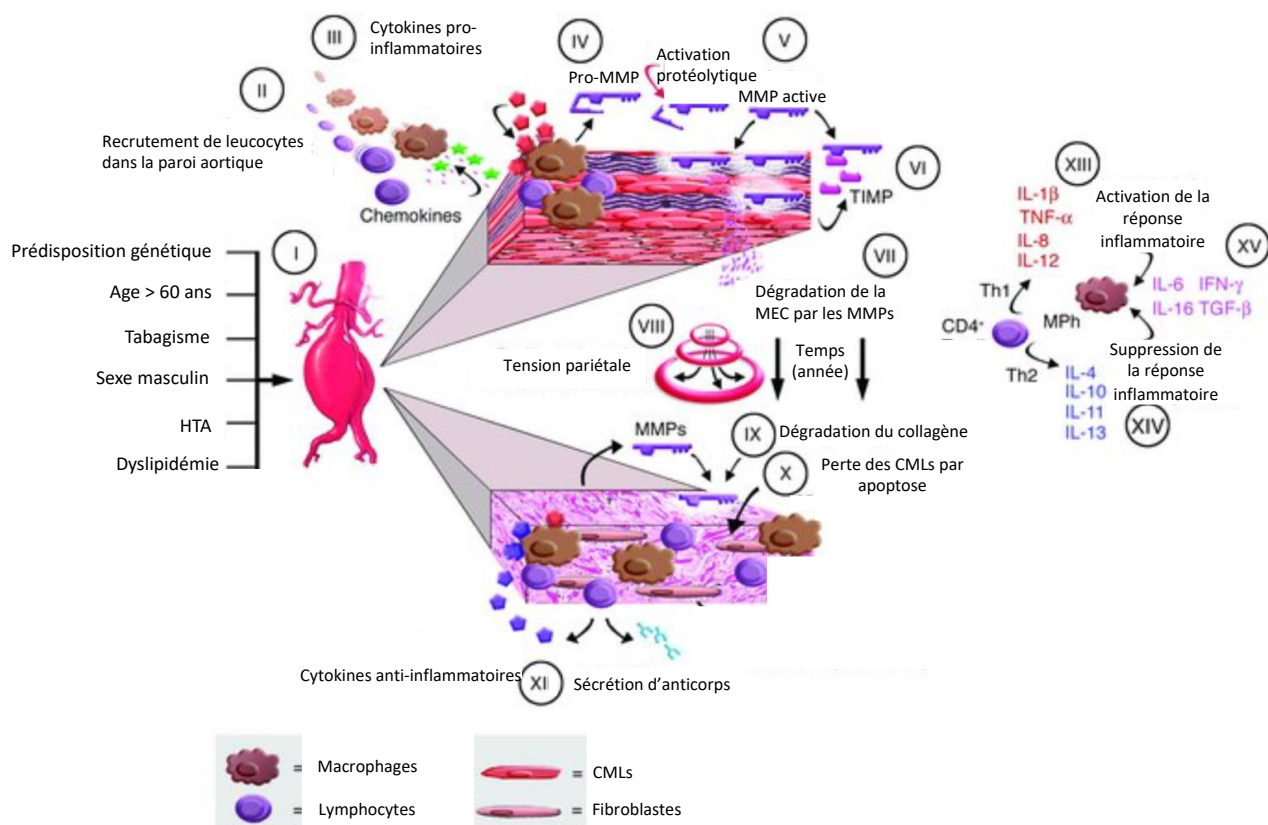
### Destruction des CMLs

Le rôle des CMLs dans la pathologie anévrismale est essentiel. Les cellules inflammatoires, par l'intermédiaire de perforines ou d'activation de signaux de mort (récepteurs Fas) induisent la mort des CMLs au cours de la pathologie anévrismale <sup>48</sup>. De plus, par la sécrétion de facteurs comme le  $TNF\alpha$ , l' $IL-1\beta$  ou l' $IFN\gamma$ , les cellules immunitaires entraînent une augmentation de l'apoptose des CMLs <sup>49</sup>. Enfin, la production accrue de MMPs et d'autres protéases causent une dégradation de la MEC également responsable de la mort des CMLs <sup>47</sup>.

### Réponse inflammatoire

Au cours de la pathologie anévrismale, il existe une infiltration importante de cellules immunitaires au sein de la paroi aortique <sup>50</sup>. En effet, par l'intermédiaire des *vasa vasorum* de l'adventice, les cellules immunitaires vont pénétrer au sein de la média et sécréter de nombreux facteurs inflammatoires comme des cytokines, des leucotriènes ou des chémokines <sup>51</sup>. Les lymphocytes T ainsi que les macrophages sont les cellules les plus représentées et jouent un rôle capital dans l'évolution anévrismale <sup>52</sup>. En effet, les lymphocytes T, par la production de nombreuses cytokines sont responsables de la mort des CMLs <sup>48</sup>. De plus, les macrophages sont impliqués dans la sécrétion de collagénase et d'élastase, ce qui provoque la destruction de la matrice extracellulaire <sup>53</sup>. Ainsi, la réponse inflammatoire qui se développe au sein de la paroi artérielle crée un environnement favorable à la dilatation aortique (Figure 13).



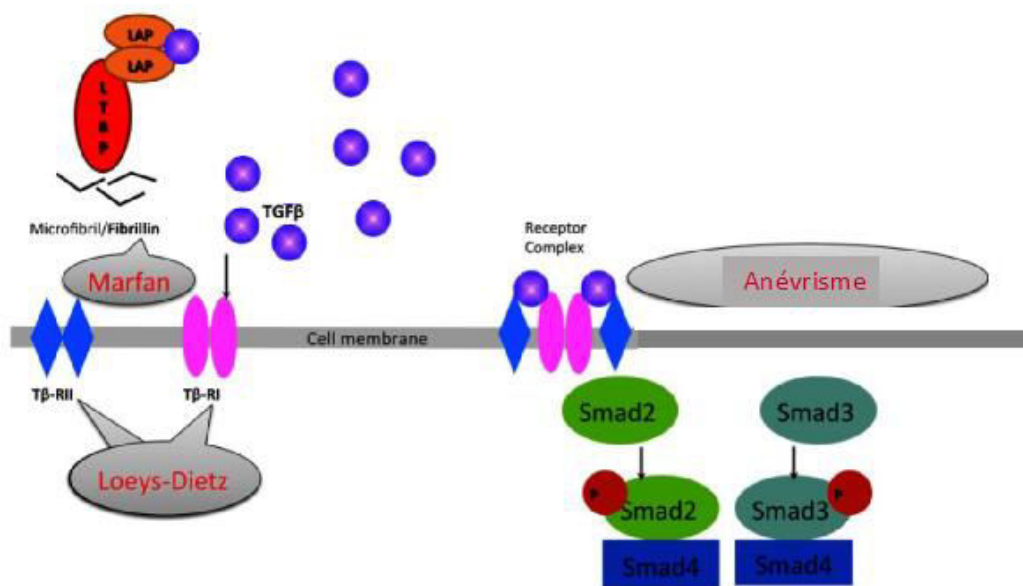


**Figure 13** : Principaux mécanismes impliqués dans le développement de l'AAA (adapté d'après Curci et al <sup>54</sup>).

Le développement de l'AAA est favorisé par différents facteurs de risque (I). Le remodelage de la paroi vasculaire implique la réponse inflammatoire avec le recrutement de cellules immunitaires (II) et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (III). Sous l'influence des protéases (IV, V) et de leurs inhibiteurs (VI), la MEC est remodelée (VII). A terme, cela entraîne une destruction des fibres de collagène (IX), aggravée par la tension pariétale (VIII). L'homéostasie des CMLs est altérée, contribuant à la diminution de leur densité dans la média (X). Ces modifications favorisent la sécrétion de cytokines et d'anticorps (XI) contribuant à amplifier la réponse inflammatoire (XIII, XIV, XV).

### 2.3 Rôle du TGFβ

Le facteur de croissance transformant beta (TGF $\beta$ ) est une cytokine jouant un rôle important dans la survenue des anévrismes syndromiques, notamment thoraciques. Ces anévrismes se distinguent des anévrismes liés à l'athérosclérose qui sont beaucoup plus fréquents. Depuis plus de 10 ans, de nombreux auteurs ont mis en avant que la mutation de la fibrilline-1 dans la maladie de Marfan était associée à une augmentation du TGF $\beta$  et favorisait la formation d'anévrisme<sup>55,56</sup>. Le TGF $\beta$  est synthétisé sous la forme d'un complexe latent qui interagit avec la fibrilline-1 par l'intermédiaire du LTBP (latent TGF $\beta$  binding proteins) (Figure 14). Lorsqu'il existe une mutation de la fibrilline-1, le TGF $\beta$  sous forme de complexe latent, n'est plus séquestré et va activer son récepteur. Les études sur les souris déficientes en fibrilline-1 ont montré en effet une hyper-activation du TGF $\beta$  dans la paroi aortique de ces souris et une activation de la signalisation TGF $\beta$  dépendante<sup>55,57</sup>. De plus, l'activation de la voie de signalisation Smad est corrélée avec le degré de fragmentation des lames élastiques ce qui fait penser à un lien entre le TGF $\beta$  et les MMPs<sup>58</sup>.



**Figure 14:** Voie de signalisation du TGF $\beta$  (adapté d'après De Backer et al.<sup>59</sup>).

Le TGF $\beta$  exerce son action en se liant à ses récepteurs membranaires (TGF $\beta$ -RI ou TGF $\beta$ -RII) et induit la voie de signalisation cellulaire impliquant les protéines Smad. Le TGF $\beta$  peut être séquestré sous la forme d'un complexe latent (LTBP : latent TGF $\beta$  binding proteins) qui interagit avec la fibrilline. La mutation du gène de la fibrilline ou du gène du récepteur au TGF $\beta$  sont responsables d'anévrismes syndromiques tels que le syndrome de Marfan et le syndrome de Loeys-Dietz.

Cependant, des travaux réalisés précédemment dans le laboratoire ont mis en évidence dans un modèle murin d'anévrisme induit par infusion d'angiotensine II que la neutralisation du TGF $\beta$  entraînait des dilatations et des ruptures aortiques <sup>60</sup>. De manière intrigante, le TGF $\beta$  induisait une diminution de l'infiltrat inflammatoire, notamment monocytaire associée à une diminution des MMPs. Dans ce modèle, le TGF $\beta$  jouait ainsi un rôle protecteur.

## **2.4 Rôle de l'IL-1 $\beta$**

L'IL-1 $\beta$  est une isoforme de l'IL-1 qui joue un rôle important dans l'inflammation et l'athérosclérose. Exprimée par de nombreux types cellulaires comme les cellules endothéliales, les CMLs, les cellules dendritiques ou les monocytes-macrophages, l'IL-1 $\beta$  est synthétisée sous la forme d'un précurseur inactif, le pro-IL-1 $\beta$ . L'activation de l'IL-1 $\beta$  passe par l'intermédiaire d'un complexe protéique oligomérique ; l'inflammasome, dont un des constituants, la protéine NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3) joue un rôle important. En effet, dans un modèle murin d'AAA induit par l'angiotensine II, l'inflammasome NLRP3 était impliqué dans le développement anévrisimal entraînant un relargage d'IL-1 $\beta$  par les macrophages <sup>61</sup>. De plus, l'IL-1 $\beta$  a été identifiée comme une cytokine importante dans le processus inflammatoire induisant la progression anévrismale dans un modèle murin à

l'élastase <sup>62</sup>. L'utilisation de souris knock-out (KO) pour l'IL-1 $\beta$  et/ou l'administration d'un récepteur antagoniste de l'IL-1 $\beta$  atténuaient la formation d'AAA <sup>62</sup>. L'IL-1 $\beta$  étant un régulateur clé de la réponse inflammatoire <sup>63</sup>, un récent essai clinique randomisé placebo-contrôle utilisant un anticorps anti-IL1 $\beta$  (canakinumab) a été développé. Néanmoins, il n'a pas été mis en évidence un effet bénéfique du canakinumab sur la progression anévrismale chez les patients ayant un anévrisme de petite taille (entre 40 et 50mm de diamètre).

### **3- Modèles expérimentaux d'AAA**

De nombreux modèles expérimentaux d'AAA ont été décrits afin de mieux comprendre la physiopathologie anévrismale. Ces modèles se sont attachés à reproduire les principales caractéristiques de la pathologie humaine, à savoir la dégradation de la MEC, l'inflammation, le thrombus intra-luminal ou encore la rupture. Cependant, peu de modèles arrivent à combiner simultanément toutes ces caractéristiques et aucun ne mime parfaitement la physiopathologie humaine. Actuellement, la plupart des modèles sont réalisés chez les rongeurs, particulièrement chez la souris, et peuvent être divisés en deux groupes <sup>64</sup>.

#### **3.1 Modèles non disséquant**

##### *Modèle sur rongeur*

Les modèles avec rongeurs sont actuellement les plus utilisés, que ce soit avec les lapins, les rats ou encore les souris. Les souris représentent le modèle le plus usité pour des questions de coût, de facilité technique ou encore de modification facile du génome.

##### Modèle à l'élastase

Décrit pour la première fois par Anidjar et al. <sup>65</sup>, ce modèle consiste à effectuer une perfusion d'élastase porcine pancréatique en intra-aortique, au niveau de l'aorte sous-rénale de rats.

La procédure chirurgicale consiste à réaliser une laparotomie sur des rats Wistar afin d'isoler 1 cm d'aorte sous rénale. Après anesthésie générale au penthobarbital, un cathéter est

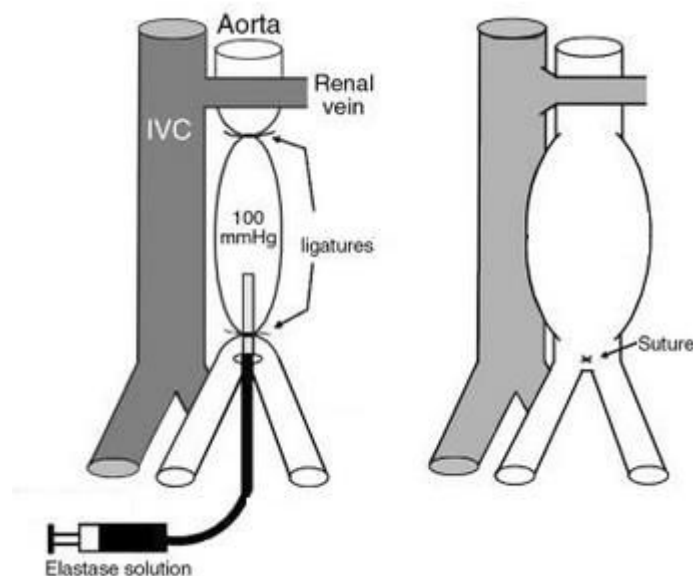
introduit par l'artère fémorale commune jusqu'au niveau de l'aorte sous rénale. La veine cave est disséquée de l'aorte et les collatérales de cette dernière sont ligaturées. Après clampage aortique au niveau de la veine rénale gauche, l'aorte abdominale est perfusée avec de l'élastase. La durée de perfusion était initialement de 2 heures mais une exposition courte donne des résultats similaires <sup>66</sup>. A la fin de la procédure et du déclampage aortique, le cathéter est enlevé et l'artère fémorale ligaturée. Enfin, après vérification de l'hémostase, la laparotomie est fermée. Après trois semaines post-opératoires, les rats sont de nouveau anesthésiés et une reprise de la cicatrice de laparotomie est réalisée afin d'effectuer une étude macroscopique de l'aorte. Un cathéter est de nouveau introduit dans l'aorte au niveau du carrefour aortique. Après nouveau clampage de l'aorte sous rénale en dessous de la veine rénale gauche et incision de la veine cave, l'aorte est perfusée à 120 mmHg avec une solution de Duboscq-Brazil pour fixer le tissu. L'aorte entière est ensuite prélevée et placée en paraffine pour analyse histologique.

Les principaux résultats ont montré une dilatation anévrismale macroscopique (>5 mm) seulement au niveau de la zone perfusée avec une augmentation du diamètre de 300- 400% au cours de la première semaine suite à la destruction des fibres élastiques. La quantité de fibres élastiques détruites était dépendante du nombre d'unités d'élastase utilisées. 6 unités d'élastase entraînaient une destruction significative des fibres, l'adjonction de plus d'unités donnant des résultats similaires. De plus, il existait un infiltrat inflammatoire important de leucocytes après 48 heures, incluant des macrophages, des lymphocytes T ou encore des polynucléaires neutrophiles (PNN) <sup>67</sup>. Aussi, ce modèle présente la formation d'un thrombus intra-luminal et Nchimi et al. ont montré que le thrombus précédait le pic de croissance anévrismale, ce dernier étant à l'origine de la production de protéases <sup>68</sup>.

Les principales limites de ce modèle reposent sur les difficultés techniques chirurgicales, nécessitant une intervention par un opérateur entraîné. Aussi, l'absence de rupture (exception

faite en phase précoce sur dégradation massive des fibres d'élastine et de collagène par l'élastase), la variabilité du diamètre aortique maximal et la difficulté à déterminer la bonne dose d'élastase engendrent une moindre spécificité et sensibilité.

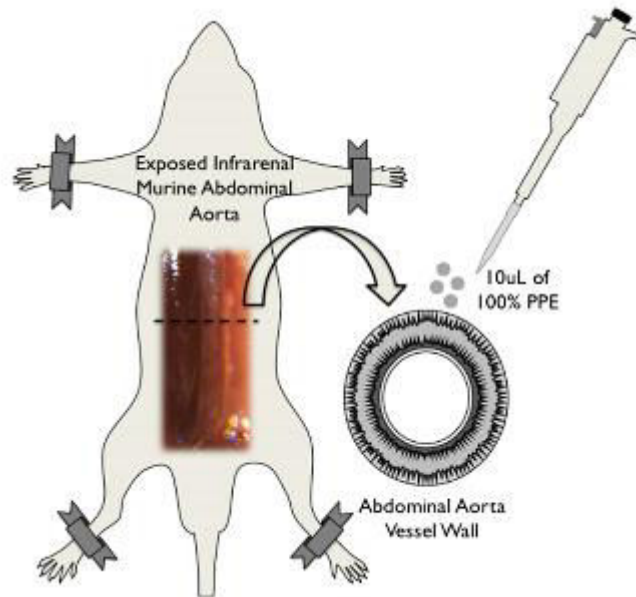
Du fait de l'utilisation de plus en plus fréquente de souris knockout, le modèle à l'élastase a été donc été transposé à cette espèce. Du fait du petit calibre des vaisseaux chez la souris, une artériotomie non pas au niveau de l'artère fémorale mais au niveau de la bifurcation aortique est réalisée <sup>69</sup> (Figure 15).



**Figure 15** : Perfusion d'élastase au niveau de la bifurcation aortique chez la souris (d'après Pyo et al. <sup>69</sup>).

Enfin, l'équipe de Bhamidipati et al. a trouvé une alternative aux difficultés techniques de la chirurgie (canulation, ligature de collatérales, sténose aortique post-suture, plaie de la veine cave) et de l'apprentissage chirurgical en proposant un modèle basé sur l'application topique d'élastase en péri-adventitial <sup>70</sup> (Figure 16). Ce modèle, simple, provoque la formation d'anévrisme avec une reproductibilité moindre que celle de la perfusion intra-aortique (de

l'ordre de 50-60%). Les principales limites de ce modèle sont l'absence de constitution de lésions d'athérosclérose ou de thrombus intra-luminal.



**Figure 16** : Application topique d'élastase en péri-adventiciel (d'après Bhamidipati et al. <sup>70</sup>).

PPE : élastase porcine pancréatique

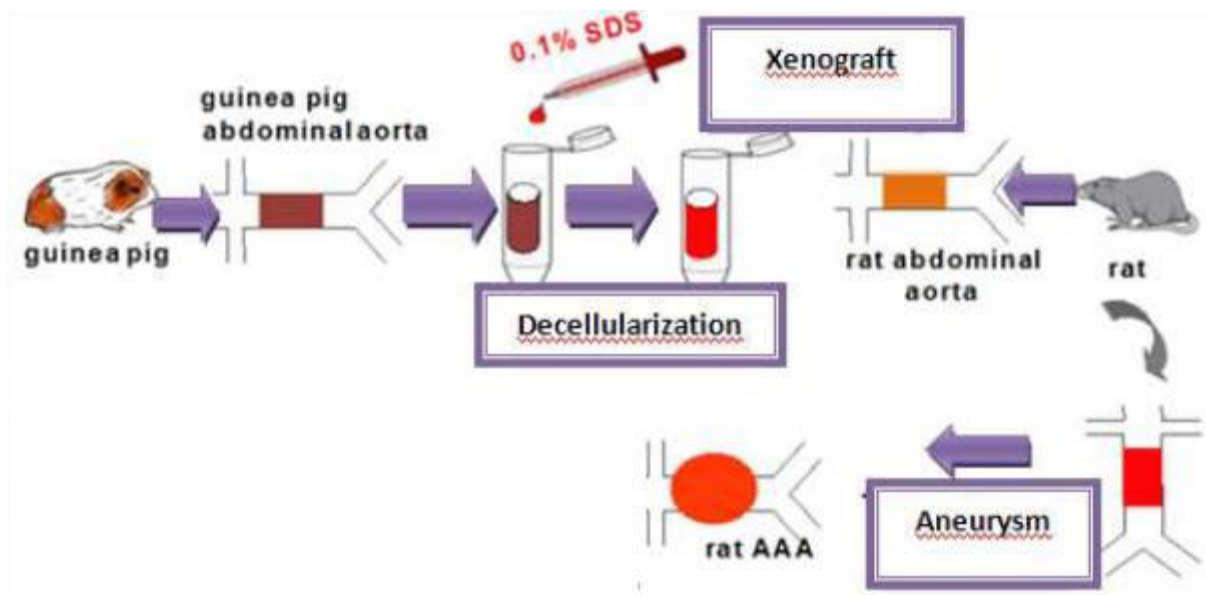
### Modèle de xéno greffe aortique décellularisée

Ce modèle a été décrit par Allaire et al. afin d'obtenir un anévrisme aortique basé sur l'inflammation et la destruction des CMLs après xéno greffe d'un segment d'aorte de cochon d'Inde greffé sur des aortes de rats <sup>71</sup> (Figure 17).

La procédure chirurgicale consiste à réaliser une explantation d'un segment d'aorte de cochon d'Inde et de le traiter avec du sodium dodecyl-sulfate (SDS). L'intérêt du SDS réside dans la décellularisation du tissu tout en préservant la matrice extracellulaire, à savoir l'élastine et le collagène. Après anesthésie au penthiobarbital, une laparotomie est effectuée chez le cochon d'Inde et le rat. L'aorte sous rénale est disséquée sur 1cm, prélevée et placée dans du sérum



salé 0.9%. Afin d'obtenir une décellularisation, les aortes sont ensuite incubées pendant 15h à 37°C dans une solution de 0.1% de SDS. Puis, elles sont ensuite rincées 5 fois dans du sérum salé 0.9%. La vérification de la décellularisation tissulaire est effectuée au microscope. Le segment aortique prélevé est ensuite placé en position orthotopique sur le rat en réalisant 2 anastomoses termino-terminales au nylon 10.0 sous microscope. Après vérification de l'hémostase, la laparotomie est fermée. Ce modèle, basé sur un processus de rejet de la xéno greffe entraîne la destruction de la média ayant pour conséquence une dilatation aortique chronique au bout de 8 semaines associée à un infiltrat inflammatoire.



**Figure 17:** Modèle de xéno greffe aortique décellularisée (d'après Eddhahak A et al. <sup>72</sup>).

### Modèle au chlorure de calcium

Initialement décrit au niveau carotidien <sup>73</sup> puis au niveau de l'aorte abdominale sous rénale <sup>74</sup> chez le lapin, ce modèle reproduit certains des mécanismes physiopathologiques retrouvés chez l'homme. La technique chirurgicale consiste à anesthésier des lapins blancs de Nouvelle Zélande avec de la fluanisone couplé à du fentanyl. 2 cm de l'aorte proximale sous rénale sont disséqués après laparotomie. Un coton tige imbibé d'une solution de chlorure de calcium est ensuite appliqué pendant 15 minutes au niveau de l'aorte. Après application, les viscères abdominaux sont repositionnés et l'incision refermée. Plusieurs expériences ont été réalisées en combinant à l'application de chlorure de calcium et de thioglycolate (activateur macrophagique) chez des lapins plus ou moins hyperlipidémiques. Ce modèle a montré une réduction des fibres de collagène et des macrophages, deux facteurs importants dans la physiopathologie anévrismale. Afin de pouvoir bénéficier des avantages de la création d'anévrisme sur petit animal, Chiou et al. ont utilisé le chlorure de calcium dans un modèle murin en utilisant des souris C57Bl/6J de 7-9 semaines <sup>75</sup>. De la même manière que l'intervention sur le lapin, le chlorure de calcium est appliqué en utilisant un coton tige pendant 10 minutes après séparation de l'aorte sous rénale de la veine cave. Deux semaines après traitement, une dilatation aortique significative par rapport au groupe contrôle était observée avec une augmentation des neutrophiles, des lymphocytes et des macrophages au niveau de l'intima et de la média.

Les modèles d'anévrisme sur petit animal présentent de nombreux avantages. Cependant, du fait de l'avènement des techniques endovasculaires, l'utilisation d'endoprothèses sur rongeurs représente un challenge technique. L'équipe de Rouer et al. a réalisé une exclusion endovasculaire d'un anévrisme induit après injection intra-aortique d'élastase en utilisant un stent coronarien couvert en polytetrafluoroethylene (PTFE) <sup>76</sup>. Cependant, cette technique est

associée à des taux élevés de thrombose aortique et nécessite un entraînement chirurgical important. Aussi, l'induction anévrismale sur de plus gros animaux prend tout son intérêt.

### *Modèle sur animaux larges*

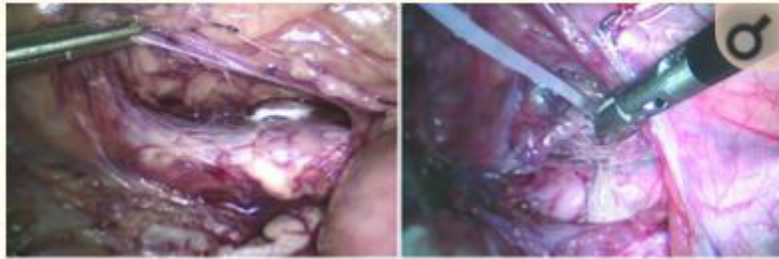
La création d'anévrisme de l'aorte abdominale sur des animaux plus gros peut être réalisée de plusieurs manières. D'une manière générale, la perfusion d'élastase ou la mise en place d'un patch aortique/interposition prothétique sont effectuées.

#### Modèles à l'élastase

L'obtention d'un anévrisme en utilisant la perfusion d'élastase peut être un challenge et Marinov et al. n'ont pas réussi à induire un AAA sur le modèle de cochon nain du Yucatan malgré une altération des fibres élastiques et d'une diminution du nombre de CMLs<sup>77</sup>. En revanche, en utilisant des spécimens de cochon plus grand, Lederman et al. ont réussi à obtenir une dilatation aortique<sup>78</sup>. La technique d'induction anévrismale à l'élastase est similaire à celle effectuée sur les rongeurs et le principe reste le même en ce qui concerne la procédure chirurgicale.

#### Modèle au chlorure de calcium

Gertz et al. ont réalisé une induction anévrismale au chlorure de calcium chez le cochon via une technique chirurgicale novatrice, la laparoscopie<sup>73</sup>. Sous anesthésie générale, après exposition de l'aorte sous rénale, une mèche de chlorure de calcium est appliquée pendant 20 minutes sur des cochons hyperlipidémiques. (Figure 18).



**Figure 18:** Induction d'AAA en appliquant du chlorure de calcium par laparoscopie (d'après Gertz et al. <sup>79</sup>).

Par ailleurs, d'autres équipes ont utilisé comme modèle le chien <sup>80,81</sup>. Boudghène et al. ont induit un anévrisme sous rénal à des Beagles afin de pouvoir l'exclure en utilisant un stent acier recouvert d'un composé synthétique, le Dacron <sup>80</sup>. La technique de pose de l'endoprothèse est réalisée par la mise en place d'un introducteur 12 French au niveau fémoral et largué en utilisant un ballon expansible. Les analyses *ex vivo* ont retrouvé une perte importante des lames élastiques et ont confirmé l'exclusion et la thrombose du sac anévrisimal.

#### Modèles avec patch (veineux ou prothétique) au niveau aortique

L'équipe de Boudghène et al ont également étudié l'intérêt d'un stent expansible sur ballon afin de prévenir la rupture aortique sur des moutons après induction d'anévrisme utilisant un segment de veine jugulaire. Piquet et al. ont préféré utiliser un patch de Dacron sur des cochons nains <sup>82</sup>. Après deux semaines, un stent couvert était déployé au niveau de l'anévrisme afin de l'exclure. La longueur du stent variait de 6 à 8 cm pour 10 mm de

diamètre. Ce dernier était introduit en utilisant également un introducteur 12 F au niveau de l'artère fémorale commune.

Les modèles d'anévrismes sur de larges animaux présentent comme principaux inconvénients l'absence de grands mécanismes physiopathologiques responsable des anévrismes humains comme l'athérosclérose ou encore l'infiltrat adventiciel inflammatoire important. Leurs principaux intérêts résident dans leur approche thérapeutique du fait de la possibilité de réaliser des traitements endovasculaires qui semblent très difficiles à mettre en place techniquement sur de plus petits animaux.

### **3.2 Modèles disséquant**

#### *Modèle sur rongeur*

##### Modèle de perfusion systémique d'angiotensine II

Le modèle à l'angiotensine est un des modèles chimiques d'induction anévrismale les plus utilisés. Basé sur la perfusion d'angiotensine II, ce peptide agit sur la régulation de la tension artérielle ou du volume des fluides.

Initialement décrit par Daugherty et al., l'induction anévrismale est réalisée sur des souris C57Bl/6j ApoE<sup>-/-</sup><sup>83</sup>. L'infusion d'angiotensine est réalisée sur des souris anesthésiées par kétamine/xylazine via une petite incision à la base du cou où est insérée une mini-pompe. Cette mini-pompe libère de l'angiotensine en sous-cutanée délivrant entre 500-1000ng/min/kg durant 28 jours. L'angiotensine II est un peptide déclenchant différentes voies de signalisation aboutissant à une réponse fonctionnelle immédiate (hypertension artérielle) ou encore à des

réponses pro-inflammatoires, notamment à l'adhésion leucocytaire <sup>84</sup>. Cette infusion d'angiotensine s'accompagne d'une dilatation modérée de l'aorte abdominale dans 10-20% des cas, sans rupture. Wang et al. ont montré que l'adjonction répétée d'anticorps anti-TGF $\beta$  entraînait un anévrisme dans 100% des cas, avec un taux élevé de rupture <sup>60</sup>. Ce modèle a démontré le rôle protecteur du TGF $\beta$  et l'importance des monocytes/macrophages via la production de MMPs.

Le modèle à l'angiotensine provoque cependant plus des lésions au-dessus de l'aorte rénale alors que la localisation la plus fréquente chez l'homme est sous rénale (80%). De plus, ce modèle représente, d'un point de vue physiopathologique, plus un modèle de dissection qu'un modèle d'anévrisme <sup>85</sup>.

#### Modèle de dysfonction de la lysyl-oxydase

La lysyl-oxydase (Lox) est une enzyme impliquée dans l'arrangement des fibres d'élastine et de collagène, essentielles pour l'élasticité et rigidité de la paroi aortique <sup>86</sup>. Maki et al. ont utilisé des souris inactivées pour le gène Lox et ont montré que les fœtus présentaient des anomalies au niveau de leur système cardiovasculaire aboutissant à la formation d'anévrisme <sup>86,87</sup>. Ces défauts d'organisation des fibres sont également associés à des dysfonctionnements au niveau respiratoire.

D'autre part, l'inhibition de l'activité des Lox peut résulter d'une mutation génétique chez l'homme ou être induit chez l'animal par l'administration de  $\beta$ -aminopropionil. Chez l'homme, cette mutation liée au chromosome X entraîne un dysfonctionnement au niveau du métabolisme du cuivre induisant des anomalies au niveau des fibres <sup>88</sup>. La souris « Blotchy », qui présente la même mutation est caractérisée par la présence d'anévrisme thoracique pouvant évoluer jusqu'à la rupture <sup>89</sup>.

### Modèle anévrismal induit par les agonistes du récepteur aux minéralocorticoïdes plus sel

Liu et al. ont utilisé des souris C57Bl/6j de 10 mois ayant reçu de l'acétate de desoxycorticostérone (DOCA), un agoniste des récepteurs aux minéralocorticoïdes ou de l'aldostérone <sup>90</sup>. L'activation des récepteurs aux minéralocorticoïdes dans les cellules inflammatoires et les CMLs par le DOCA en présence de sel induit une augmentation de l'infiltration de monocytes/macrophages, neutrophiles et lymphocytes T dans l'aorte avec une augmentation de la production de MMPs à l'origine de la dégradation de la MEC.

Les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale de kétamine et xylazine. Les pastilles de DOCA (50mg, délivrance continue pendant 21 jours) sont implantées en sous-cutanée au niveau dorso-latéral et une pompe osmotique contenant de l'aldostérone est implantée au niveau du flanc droit via une incision au niveau de la région scapulaire. Ce modèle provoque des dissections et anévrismes à l'étage supra rénal, pouvant aboutir à la rupture aortique.

#### *Modèle sur de larges animaux*

Le premier modèle de dissection a été initialement décrit chez le chien en 1959 en réalisant une incision de la paroi interne de l'aorte afin de suturer le flap intimal sur la paroi adjacente <sup>91</sup>. Ce modèle représente donc un modèle de dissection, physiopathologiquement différent de celui de l'anévrisme aortique. En effet, ce modèle induit une atteinte de l'aorte thoracique avec une absence de dégradation de la média et des fibres élastiques. L'intérêt de ce modèle réside dans la possibilité de pouvoir tester les thérapeutiques endovasculaires, peu accessibles sur les animaux de petite taille <sup>92</sup>.

<b>Animal</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<b>Souris</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peu coûteux</li> <li>- Utilisation en nombre important</li> <li>- Facile à manipuler</li> <li>- Manipulation génétique bien caractérisée</li> <li>- Mâles plus exposés aux anévrismes que les femelles avec l'angiotensine II</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Taille des vaisseaux</li> <li>- Technique chirurgicale</li> <li>- Modèle génétique coûteux</li> <li>- Faible quantité de tissus à analyser</li> </ul>
<b>Rat</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peu coûteux</li> <li>- Utilisation en nombre important</li> <li>- Vaisseaux larges</li> <li>- Grande quantité de tissus</li> <li>- Facile à manipuler</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Manipulation génétique difficile par rapport aux souris</li> </ul>
<b>Chien</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vaisseaux larges</li> <li>- Permission d'anesthésie prolongée</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mauvaise perception du public</li> <li>- Coût élevé</li> <li>- Utilisation de faible effectif</li> <li>- Induction d'anévrisme variable avec l'élastase</li> </ul>
<b>Porc</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Morphologie artérielle similaire à l'homme</li> <li>- Vaisseaux larges</li> <li>- Grande quantité de tissus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coût élevé permettant l'utilisation de faible effectif</li> <li>- Induction d'anévrisme variable avec l'élastase</li> <li>- Difficile à manipuler</li> </ul>
<b>Lapin</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peu coûteux</li> <li>- Facile à manipuler</li> <li>- Vaisseaux larges</li> <li>- Grande quantité de tissus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mauvaise perception du public</li> </ul>
<b>Mouton</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vaisseaux larges</li> <li>- Grande quantité de tissus</li> <li>- Système de coagulation proche de chez l'homme</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coût élevé permettant l'utilisation de faible effectif</li> </ul>



**Table 1** : Avantages et inconvénients des différents animaux utilisés pour créer un AAA (adapté d'après Trollope et al. <sup>93</sup>).

	Rupture	Dissection	Thrombus intra-mural	Thrombus intra-luminal	Athérosclérose	Inflammation	Dégradation média
Elastase	-	-	-	+	+	+	+
Angiotensine-II	+	+	+	-	+	+	+
CaCl <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	+	+
Xéno greffe	-	-	+	-	-	+	+
Lysyl-oxydase	+	+	-	-	-	-	+
Agoniste du récepteur aux minéralocorticoïdes	+	+	+	-	-	+	+

**Table 2** : Principaux mécanismes physiopathologiques reproduits selon les différents modèles (adapté d'après Trollope et al. <sup>93</sup> et Senemaud et al. <sup>64</sup>).

#### 4- Objectifs

L'AAA est associé à des taux élevés de morbidité et de mortalité. A l'heure actuelle, le seul traitement curatif de l'AAA est chirurgical et aucune approche pharmacologique n'a démontré une efficacité suffisante. Une meilleure compréhension des mécanismes aboutissant au développement de l'AAA permettrait d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Bien qu'utiles dans cette démarche, les modèles animaux expérimentaux actuels ne reproduisent pas parfaitement la physiopathologie humaine. Le rôle du TGF $\beta$  dans le développement de l'anévrisme n'est pas encore totalement élucidé, les différentes études menées jusqu'à présent rapportant des résultats hétérogènes.

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail étaient de :

- 1/ Créer et caractériser un nouveau modèle murin d'AAA associant application topique d'élastase et neutralisation du TGF $\beta$ .
- 2/ Etudier le rôle de l'IL-1 $\beta$  dans ce modèle.

## **II/ MATERIEL ET METHODES**

### **1- Souris et nourriture**

Les souris utilisées pour ce projet sont des mâles de la souche C57BL/6 (élevage mai 2015, Charles River Laboratoire®, Royaume-Uni) de 8 semaines, élevées en animalerie entre 22 et 24°C, avec un cycle nyctéméral de 12 heures. L'accès à l'eau et à la nourriture standard (Arie Block®, Woorden, Hollande) sont *ad libitum*. Les souris IL-1 $\beta$  KO provenaient de Yoichiro Iwakura de l'Université de Tokyo au Japon.

### **2- Technique d'anesthésie**

Les souris bénéficient d'une induction à l'isoflurane 2% couplé à l'oxygène 2%. Durant l'intervention chirurgicale, une administration de 1.6-1.8% d'isoflurane permet le maintien de l'anesthésie par l'intermédiaire d'un cône nasal adapté au nez de la souris. Un tapis chauffant est mis en place ainsi qu'un monitoring de la température rectale afin de contrôler toute hypothermie. La fréquence respiratoire est également contrôlée et le flux d'isoflurane régulé pour maintenir une respiration à environ 60 inspirations/minute.

### **3- Technique chirurgicale**

La technique chirurgicale d'induction d'anévrisme de l'AAA consiste à injecter de l'élastase en péri-adventitial au niveau de l'aorte abdominale sous rénale (protocole expérimental en Annexe 1).

Les instruments chirurgicaux sont gardés stériles. Sous anesthésie générale à l'isoflurane, les poils de l'abdomen de la souris sont rasés pour permettre de badigeonner la peau avec un antiseptique (Hibiscrub®). Dans un premier temps, une laparotomie est pratiquée. Le côlon transverse et l'intestin grêle sont extériorisés afin de pouvoir accéder au rétropéritoine. Après repérage du bord inférieur de la veine rénale gauche qui constitue la limite supérieure de la dissection, la séparation de l'aorte abdominale sous rénale de la veine cave sous microscope est effectuée sur une courte distance (1-2 cm). L'élastase porcine de type I (6UI/mg, Sigma Aldrich®) est déposée pendant 5 minutes en péri-adventiciel au niveau de l'aorte abdominale sous rénale. Après lavage au sérum physiologique de la cavité abdominale, des sutures à points séparés 6.0 sous-cutanées (Polysorb™, Covidien®) et 6.0 cutanées (Prolène™, Ethicon®) sont effectuées.

La première injection intrapéritonéale d'anticorps anti-TGFβ (100µg/souris, BioXcell®) est effectuée avant la fermeture de l'animal le jour de l'intervention. En fin de procédure, les souris sont placées en chambre de réveil pour une durée de 4 heures. Une injection sous-cutanée de buprénorphine (Temgesic®, 0.1 mg/kg) est administrée 2 fois par jour le jour de l'intervention puis une fois par jour pendant les 5 premiers jours. Les souris sont contrôlées 2 fois par jour et l'anticorps anti-TGFβ est injecté 3 fois/semaine pendant 14 jours.

Pour les souris déplétées en monocytes/macrophages, 150 µL d'une solution de liposomes « Phosphate Buffered saline » (PBS, Sigma Aldrich®) ou clodronate sont injectés en intraveineux au niveau de la queue le jour avant la chirurgie et répétée à 5 jours et 10 jours en intra-péritonéal. Pour bloquer l'IL-1β, les souris sont injectées avec 150 µg d'anticorps anti-IL-1β souris (Invivogen®, clone 7E3) à 7, 9 et 11 jours.

#### **4- Collection des tissus**

A 7 jours ou 14 jours, les souris sont sacrifiées et les organes prélevés afin d'être analysés. Le sang est prélevé par ponction intracardiaque (ventricule droit) et collecté sur un tube contenant de l'Éthylènediaminetétraacétique (EDTA) (plasma) ou sur un tube sec (sérum). L'oreillette droite est ouverte et le ventricule gauche est perfusé avec une solution tampon PBS (Sigma Aldrich®) à 4°C afin d'éliminer le sang et de conserver les tissus intacts. L'aorte est ensuite prélevée et fixée dans du paraformaldéhyde (PFA) 4% pour 12 heures maximum. Le lendemain, l'aorte est nettoyée puis incubée dans une solution de sucrose à 30% pour une durée de 10 heures avant d'être incluse dans de l'« Optimal Cutting Temperature compound » (O.C.T. Compound®, Leuven, Netherlands). Enfin, les aortes sont coupées au cryostat en sections de 10µm et conservées dans un congélateur à -80°C.

La rate est également prélevée et conservée dans du PBS à 4°C avant d'être analysée en cytométrie de flux.

#### **5- Imagerie et mesures non invasives**

##### **5.1 Echographie abdominale**

Le suivi échographique des souris est effectué avant la procédure, à 7 et à 14 jours. Pour l'étude, un écho-cardiographe Vevo 2100 (VisualSonics®) équipé d'une sonde MS550D 22–55 MHz est utilisé. Durant la réalisation de l'examen, une anesthésie générale à l'isoflurane 1.6-1.8% est administrée au moyen d'un cône nasal adapté. Après placement de la souris en supination sur une plateforme chauffante à 37°C, du gel échographique est utilisé comme

interface entre la sonde et la peau. Des coupes sagittales en mode B au niveau de l'aorte abdominale sont réalisées afin de permettre une mesure du diamètre aortique (en mm).

## **5.2 Synchrotron à haute résolution d'images**

Les aortes prélevées sont mises dans du PBS et sont envoyées à l'Institut Paul Scherrer (Villigen, Suisse) au « TOMCAT beamline of the Swiss Light Source ». Un scanner est réalisé avec augmentation du contraste après positionnement de détecteur à une certaine distance de l'échantillon (20588478). Le détecteur était positionné à 250 mm de l'échantillon. Les images obtenues grâce au « TOMographic Microscopy and Coherent rAdiology experimentTs » (TOMCAT) étaient réalisées avec une énergie X-ray des photons à 21.8 keV et avec une taille d'image de 1.625 pixels. Tous les échantillons d'aorte ont été scannés avec un scanner 180°. L'extraction d'images était réalisée en utilisant un algorithme précédemment décrit (12000561).

## **5.3 Mesure de la tension artérielle**

Le BP-2000 Blood Pressure Analysis System<sup>TM</sup> (Visitech Systems®) est utilisé afin de mesurer la tension artérielle systolique des souris au niveau de la queue. Les mesures sont effectuées 2 jours avant, puis la veille de l'intervention afin d'habituer les souris à la procédure, le but étant de réduire l'hypertension due au stress afin d'obtenir des résultats fiables. La queue des souris est inflatée puis déflatée automatiquement et 10 mesures de la tension artérielle systolique sont prises pour obtenir une moyenne. La procédure est répétée à 7 et 14 jours.

## **5.4 Suivi pondéral et suivi de l'état général**

Les souris sont pesées quotidiennement afin de pouvoir les surveiller après l'intervention chirurgicale. En cas de perte de poids supérieure à 20% de leur poids initial, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale ou exposition au monoxyde de carbone.

Une surveillance biquotidienne de l'état général est réalisée. En cas de pilo-érection chronique, d'absence de mobilité ou de signe de souffrance, les souris sont sacrifiées.

## **6- Préparation de l'élastase**

L'élastase porcine de type I (6UI/mg, Sigma Aldrich®) utilisée au cours de la chirurgie est préalablement filtrée à 0.45µm. Afin de la rendre inactive pour constituer le groupe contrôle, l'élastase est chauffée (30 minutes à 95°C) avant d'être de nouveau filtrée à 70 µm sur « Cell strainer ».

## **7- Histologie et immunofluorescence**

### **7.1 Histologie**

Après section des aortes au cryostat, des colorations à l'orcéine, au rouge Sirius, au Trichrome Masson et au Perls (tous de chez Sigma-Aldrich®) sont réalisées. Toutes les images sont prises à l'aide d'une caméra-vidéo Leica DFC340 FX (Leica Microsystems®) connectée à un microscope (Leica DMRB®, logiciel LAS version 2.8.1).

✓ *Coloration de l'élastine à l'orcéine*

**Protocole** de coloration à l'orcéine : Les lames avec les sections aortiques sont rincées à l'eau courante afin d'éliminer l'O.C.T avant de les plonger dans la solution d'orcéine (contenant 1% d'acide chlorhydrique (HCl) 2N, 70% d'éthanol et 2 grammes d'orcéine) pendant 15 minutes. Les lames sont de nouveau rincées à l'eau courante puis trempées dans de l'hématoxyline 2 minutes. Après un dernier rinçage à l'eau, les lames sont montées sur un milieu de montage aqueux « CC/Mount™ » (Sigma Aldrich®).

**Analyse** : Une classification a été établie afin de permettre l'analyse de l'atteinte de l'élastine. Grade 0 : élastine normale, Grade 1 : élastine fragmentée <25%, Grade 2 : élastine fragmentée entre 25-50% de la surface totale de la média, Grade 3 : élastine fragmentée >50% de la surface totale de la média.

✓ *Coloration du collagène au rouge Sirius*

**Protocole** de coloration au rouge Sirius : Les lames avec les sections aortiques sont rincées à l'eau courante afin d'éliminer l'O.C.T. Elles sont ensuite plongées dans la solution rouge Sirius (contenant 500 mL d'acide picrique et 0.5 g de rouge Sirius) pour une durée d'une heure maximum. Les lames sont de nouveau rincées avec de l'eau distillée puis déshydratées en réalisant plusieurs bains d'alcool pendant 5 minutes à respectivement 70%, 90% et 100% d'éthanol. Après, un dernier bain au xylène pendant 5 minutes, les lames sont montées avec résine.

**Analyse** : Le collagène de type I (fibres épaisses) est représenté en jaune-orange et orange en biréfringence et le collagène de type III (fibres fines) est représenté en jaune-vert et vert en



biréfringence au microscope en lumière polarisée (Leica DMRB®). L'aire et la densité de ces deux types de fibres sont analysées.

✓ *Coloration du fer par le Perls*

**Protocole** de la coloration de Perls : Après avoir fixé les lames avec les sections aortiques au PFA 4% pendant 10 minutes, elles sont rincées à l'eau distillée. Les coupes sont ensuite recouvertes d'un mélange contenant la solution de colorant Fer (contenant 4% de ferrocyanure de potassium et 1.2 mmol/l d'HCl) pendant 10 minutes. Après un nouveau rinçage à l'eau déionisée, les lames sont colorées dans une solution de pararosaniline 1% pendant 5 minutes puis déshydratées en réalisant plusieurs bains d'alcool pendant 5 minutes à respectivement 70%, 90% et 100% d'éthanol. Après, un dernier bain au xylène pendant 5 minutes, les lames sont montées avec une résine.

**Analyse** : Une classification a été établie afin de grader les dépôts ferreux relatifs aux microdissections de la paroi aortique. Grade 0 : absence de dépôts ferreux, Grade 1 : dépôts ferreux éparses, Grade 2 : dépôts ferreux éparses et peu confluents, Grade 3 : dépôts ferreux nombreux et confluents.

## 7.2 Immunofluorescence

✓ *Marquage «Terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt) UTP Nick End Labeling»  
(TUNEL)*

Un marquage TUNEL (Roche®) a été utilisé afin de détecter l'apoptose des cellules sur les coupes d'aortes.

**Protocole** : Après avoir rincé les lames dans du PBS afin d'éliminer l'O.C.T, une solution de perméabilisation contenant 0.1% de Triton X-100 et 0.1% de citrate de sodium est ajoutée sur les coupes d'aortes pendant 2 minutes. 50 µL de la solution de réaction « Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling » (TUNEL) sont ajoutés sur les aortes qui sont ensuite incubées à 37°C pendant 1 heure. Après un dernier rinçage au PBS, les lames sont analysées au microscope à fluorescence (Leica DMRB®, logiciel LAS version 2.8.1).

**Analyse** : Afin de pouvoir analyser les cellules positives au marquage TUNEL, les noyaux de toutes les populations cellulaires sont marqués au Hoeschst. Le nombre de noyaux TUNEL positifs par section est ensuite compté.

✓ *Marquage des lymphocytes T, neutrophiles, macrophages et CMLs*

**Protocole** : Après avoir rincé les lames dans du PBS afin d'éliminer l'O.C.T, une solution de perméabilisation contenant 0.1% de Triton X-100 et 0.1% de citrate de sodium est ajoutée sur les coupes d'aortes pendant 2 minutes. Après un nouveau rinçage au PBS, les coupes sont incubées avec l'anticorps primaire anti-macrophages (F4/80, anticorps rat anti-souris de ebioscience), anti-lymphocytes T (anti-CD3, anticorps lapin anti-Homme/souris de chez Dako®, référence A0542), anti-neutrophiles (Ly6G, anticorps rat anti-souris, ebioscience) et anti-CML (anti-SMA-Cy3, anticorps souris anti-souris de chez Sigma®, référence C6198-2ML) dilué au 1/200. Les sections aortiques sont ensuite incubées après lavage au PBS avec l'anticorps secondaire également dilué au 1/200.

**Analyse** : Afin de pouvoir mesurer le marquage F4/80, CD3, Ly6G et anti-SMA, un calcul du ratio de l'aire fluorescente après marquage à l'anticorps spécifique sur l'aire totale du vaisseau x100 a été effectué.

Ces marquages sont visualisés à l'aide d'une caméra-vidéo Leica DFC340 FX (Leica Microsystems®) connectée à un microscope fluorescent (Leica DMRB®, logiciel LAS®version 2.8.1).

✓ *Néo angiogenèse*

**L'analyse** de la néo angiogenèse est effectuée à partir du marquage à l'anti- $\alpha$ SMA des CMLs. Les images sont prises à l'aide d'une caméra-vidéo Leica DFC340 FX (Leica Microsystems®) connectée à un microscope fluorescent (Leica DMRB®, logiciel LAS®version 2.8.1). Le nombre de néo vaisseaux a été compté manuellement jusqu'à plus de 10 néo-vaisseaux/section.

## **8- Cytométrie en flux**

### **8.1 Isolement des cellules**

Les rates des souris sont dissociées mécaniquement par écrasement sur un filtre de 70  $\mu$ m « Cell strainer » et les cellules suspendues dans du PBS à 4°C. Après centrifugation, le culot cellulaire est re-suspendu dans un tampon de lyse Ammonium-Chloride-Potassium (ACK, Life Technologies®) afin d'éliminer les globules rouges contenus dans la rate. Enfin, un nouveau filtre de 30  $\mu$ m est utilisé avant de mettre les cellules en suspension dans des plaques de 96 puits à fond en « V ».

Les cellules sanguines sont préparées en utilisant une solution de lyse des globules rouges (tampon ACK, Life Technologies®). Les suspensions cellulaires sont ensuite passées sur un filtre de 70 µm « Cell strainer ».

Les aortes abdominales des souris sont digérées par une solution enzymatique (Elastase 1 mg/ml, Worthington; Collagenase D, 0.2 mg/ml, Roche; Dispase I, 0.2 U/ml, Stemcell; DNase I, 0.2 mg/ml, Roche; in RPMI 1640) à 37°C pendant 45 minutes. L'activité enzymatique est stoppée en ajoutant du PBS à 4°C.

## **8.2 Marquages des cellules**

Les cellules sont ensuite marquées pendant 30 minutes à 4°C avec les anticorps spécifiques. Après un nouveau lavage, les cellules sont analysées par cytométrie en flux sur le LSR-FORTESSAII équipé de 4 lasers (405, 488, 561 and 640 nm). Les données sont analysées à l'aide du logiciel BD FACS Diva 6.0 de chez BD Biosciences® et du logiciel FlowJo de chez TreeStar®.

## **9- Zymographie in situ**

Afin de quantifier l'activité enzymatiques des MMP-2 et MMP-9 au sein du tissu aortique, les aortes des souris sont prélevées à 7 et 14 jours et immédiatement disposées dans du PBS froid. Après nettoyage rapide des aortes, ces dernières sont incluses dans de l'O.C.T. Compound®, avant d'être plongées dans de l'azote liquide afin de les cryo-conserver. Les blocs sont ensuite sectionnés au cryostat pour obtenir des coupes de 10µm d'épaisseur. Les coupes sont lavées dans du PBS à 4°C pour éliminer l'O.C.T, puis recouvertes d'une solution de gélatine « Dye Quenched » (DQ, gélatine de peau de porc, 1 mg/ml, Lifetechnologies®,

Eugene, OR, USA). Après incubation pendant 3 heures à 37°C, les lames sont rincées au PBS puis incubées dans du PFA 1% afin de fixer les cellules. Afin d'analyser le clivage du « Quencher » par les MMPs rendant fluorescent le « Dye », les images sont acquises au microscope Leica DMRB® à l'objectif x20. L'intensité de la fluorescence est analysée en utilisant le logiciel Photoshop®.

## **10- Biologie moléculaire**

Les aortes initialement congelées dans l'azote liquide sont broyées et pulvérisées après agitation avec des billes.

### *✓ Extraction des ARNs*

L'extraction des ARNs est réalisée à partir du kit RNeasy Mini Kit (Qiagen®). Un tampon de lyse cellulaire RLT est ajouté pour permettre la dissociation et l'homogénéisation des cellules. Après une purification des ARNs sur colonne RNeasy, plusieurs lavages utilisant un tampon RW1 et un tampon RPE (fourni dans le kit) sont réalisés. Enfin, 20 µL d'eau RNase free sont déposés sur la membrane de la colonne afin d'éluer l'ARN.

### *✓ Préparation des ADN complémentaires*

Un kit (QuantiTect Reverse Transcription Kit®) est utilisé afin d'obtenir des ADN complémentaires. La contamination des ARNs est prévenue par l'utilisation d'un tampon gDNA. Afin de permettre la reverse transcription, un mix contenant une reverse transcriptase, une amorce de reverse transcription ainsi qu'un tampon est ajouté à chaque échantillon d'ARNs.

### ✓ *Reverse Transcription-qPCR*

La qPCR est réalisée sur ABI7900 de chez Applied Biosciences® avec du mix Mesa Green (Eurogentec®) pour les ADNc. Les analyses sont effectuées sur des plaques de 384 puits. Le programme d'amplification est constitué de 3 étapes : une étape d'initiation à 50°C pendant 2 minutes, une étape de dénaturation des ADNc à 95°C pendant 10 minutes suivie de 40 cycles de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes et d'hybridation/élongation à 60°C pendant 1 minute. Les séquences des amorces qPCR sont dessinées avec PickPrimer3<sup>94</sup>.

## **11- Cytokines plasmatiques**

L'analyse des cytokines plasmatiques a été réalisée au Laboratoire de Biochimie, Université de Cambridge, Royaume-Uni avec les réactifs MESO SCALE DISCOVERY (MSD®).

## **12- Analyse statistique**

L'analyse statistique est effectuée en utilisant le logiciel GraphPad Prism® version 5.0c et le logiciel Excel®. Les différences entre les groupes étaient analysés à l'aide du test non paramétrique de Mann-Whitney (2 groupes), du test de Kruskal-Wallis suivi du test de Dunn (3 groupes), du test de Chi2 (distribution entre 2 groupes), du Log Rank (survie entre 2 groupes) ou du test « 2-way ANOVA » (3 groupes en fonction du temps). Les résultats étaient considérés comme statistiquement significatifs pour  $P < 0.05$ .

### **III/ RESULTATS**

Les résultats de ce travail ont fait l'objet de la publication d'un article dans « Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology » (Annexe 2).

#### **“TGFβ (Transforming Growth Factor-β) Blockade Induces a Human-Like Disease in a Nondissecting Mouse Model of Abdominal Aortic Aneurysm.”**

*Lareyre F, Clément M, Raffort J, Pohlod S, Patel M, Esposito B, Master L, Finigan A, Vandestienne M, Stergiopoulos N, Taleb S, Trachet B, Mallat Z.*

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2017 Nov;37(11):2171-2181. doi:

10.1161/ATVBAHA.117.309999. Epub 2017 Sep 14.

PMID: 28912363

#### **1- Mise en place et caractérisation du nouveau modèle murin d'AAA associant application topique d'élastase et neutralisation du TGFβ**

##### **1.1 La neutralisation du TGFβ aggrave la dilatation anévrismale induite par l'élastase et favorise la rupture aortique**

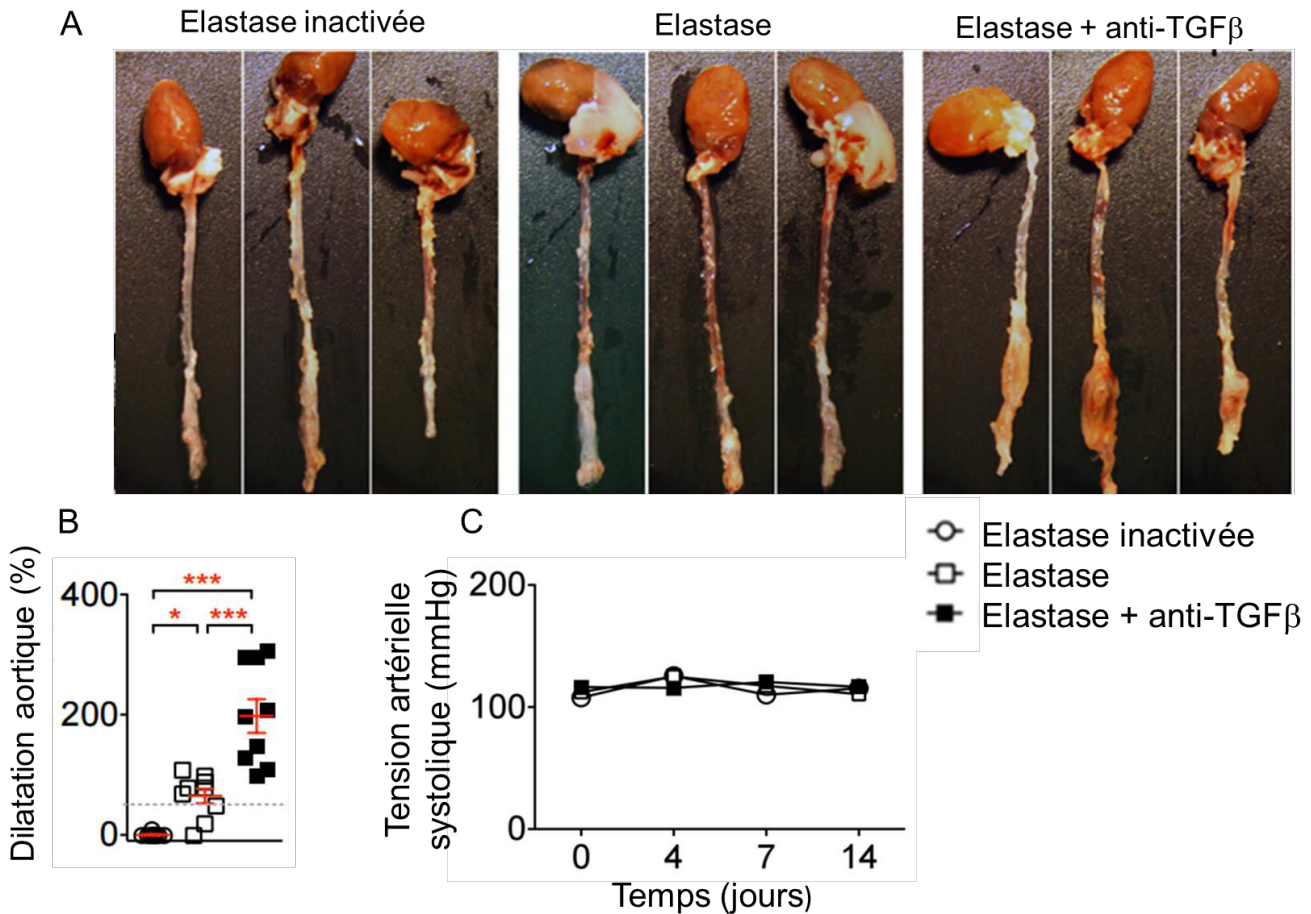
Afin d'étudier le rôle du TGFβ sur la dilation aortique induite par l'application d'élastase, 3 groupes de souris C57BL/6 (mâles de 8 semaines) ont été comparés : un groupe traité avec de l'élastase péri-adventitielle inactivée (groupe contrôle « Elastase inactivée »), un groupe traité avec de l'élastase péri-adventitielle (groupe « Elastase ») et un groupe traité avec de l'élastase péri-adventitielle et des injections intra-péritonéales d'anticorps anti-TGFβ (groupe « Elastase + anti-TGFβ »).

Après sacrifice des souris à 14 jours, les aortes ont été prélevées et la dilatation aortique a été évaluée macroscopiquement. Aucune dilatation aortique n'est observée dans le groupe « Elastase inactivée » alors qu'une dilatation de l'aorte abdominale sous rénale est constatée dans le groupe « Elastase ». De façon intéressante, la neutralisation du TGF $\beta$  augmente la dilatation aortique (Figure 1A). Afin de confirmer cette observation, la dilatation aortique a été mesurée à l'aide d'un vernier gradué. Les souris du groupe « Elastase » présentent une dilatation aortique de  $64.84 \pm 25.7\%$  par rapport aux souris du groupe « Elastase inactivée » ( $p < 0.05$ ). De plus, l'addition de l'anticorps anti-TGF $\beta$  provoque une majoration significative de la dilatation aortique par rapport au traitement par élastase seule. La dilatation aortique est de  $197.80 \pm 59.39\%$  par rapport au souris contrôles, soit près de 3 fois le diamètre aortique normal ( $p < 0.001$ ) (Figure 19B).

Le suivi de la tension artérielle a été réalisé et aucune différence significative n'a été constatée entre les différents groupes (Figure 19C).

Ainsi, le traitement par élastase induit une dilatation aortique au niveau abdominal et la neutralisation du TGF $\beta$  aggrave cet effet, indépendamment de la pression artérielle.



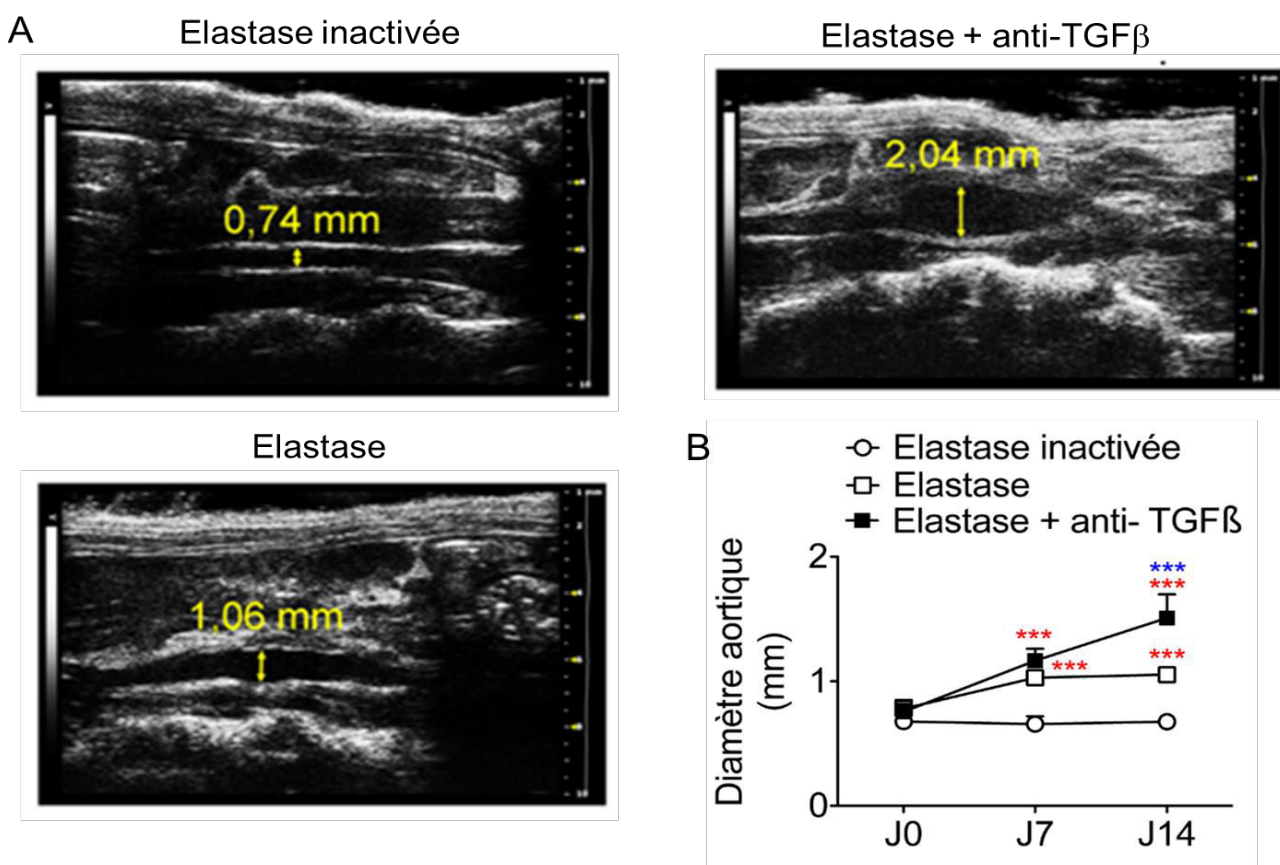


**Figure 19:** La dilatation aortique est augmentée par la neutralisation du TGF $\beta$  chez les souris traitées à l'élastase péri-adventitielle.

(A) Morphologie de l'aorte et du cœur après sacrifice à 14 jours. (B) Dilatation de l'aorte abdominale (en %) après mesure du diamètre aortique externe à l'aide d'un vernier gradué (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , Anova « one way » puis test « post-hoc » de Tukey). (C) Suivi de la tension artérielle systolique au cours du temps.

Afin de mieux caractériser le développement de la dilatation aortique in vivo, un suivi échographique du diamètre de l'aorte abdominale a été réalisé sur une cohorte de 20 souris le jour de l'intervention, à 7 et 14 jours (Figure 20A). Le groupe « Elastase inactivée » ne présente pas de modification du diamètre aortique au cours du temps. En revanche, le groupe « Elastase »

présente une augmentation significative du diamètre aortique à 7 jours comparé au diamètre aortique avant intervention chirurgicale ( $1.03 \pm 0.03\text{mm}$  vs  $0.78 \pm 0.07\text{mm}$ ,  $p < 0.001$ ). Néanmoins, le diamètre aortique reste stable du 7<sup>ème</sup> jour au 14<sup>ème</sup> jour ( $1.06 \pm 0.05\text{mm}$ ). En revanche, dans le groupe « Elastase + anti-TGF $\beta$  », l'augmentation du diamètre de l'aorte constatée au 7<sup>ème</sup> jour continue de croître pour atteindre un diamètre de  $1.7 \pm 0.1 \text{ mm}$  à 14 jours (Figure 20B). Ainsi, la neutralisation du TGF $\beta$  favorise une augmentation progressive du diamètre aortique au cours du temps, confirmée *in vivo* en imagerie.

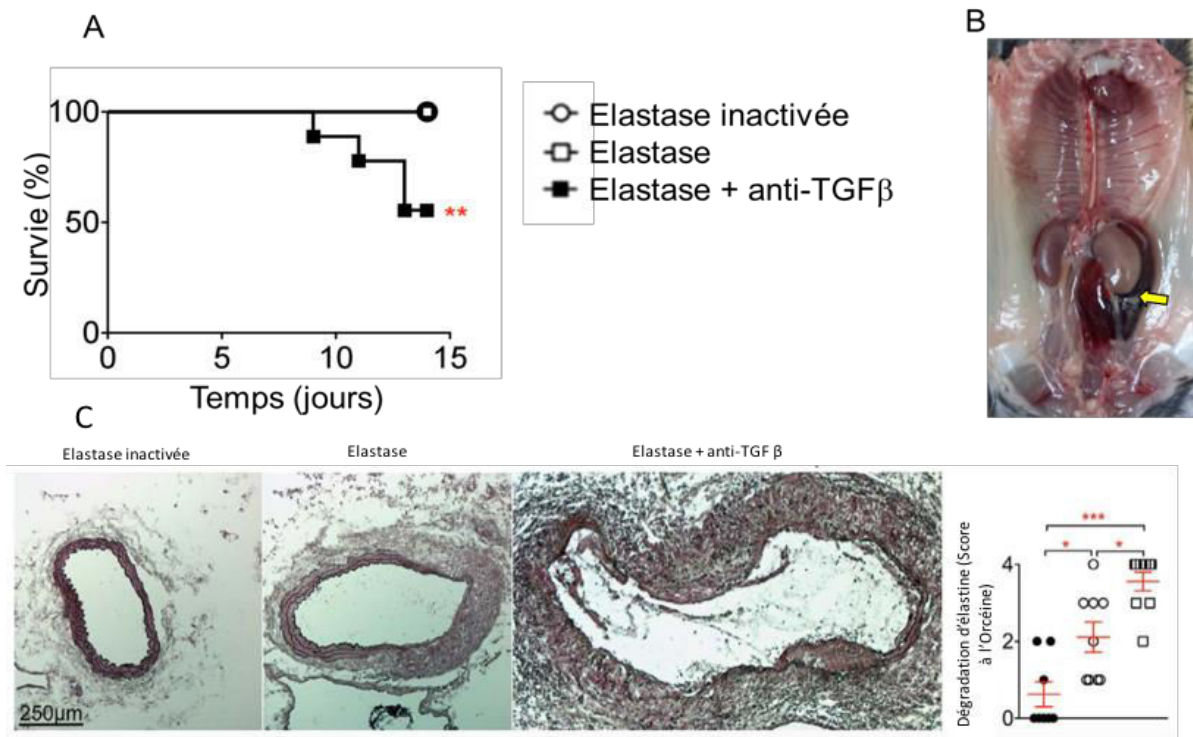


**Figure 20:** Augmentation du diamètre externe de l'aorte abdominale suivi en échographie chez les souris des groupes « Elastase » et « Elastase + anti-TGF $\beta$  ».

(A) Images représentatives d'échographie de l'aorte abdominale à 14 jours en coupe sagittale à deux dimensions en mode B. (B) Diamètre aortique externe mesuré à l'échographie abdominale

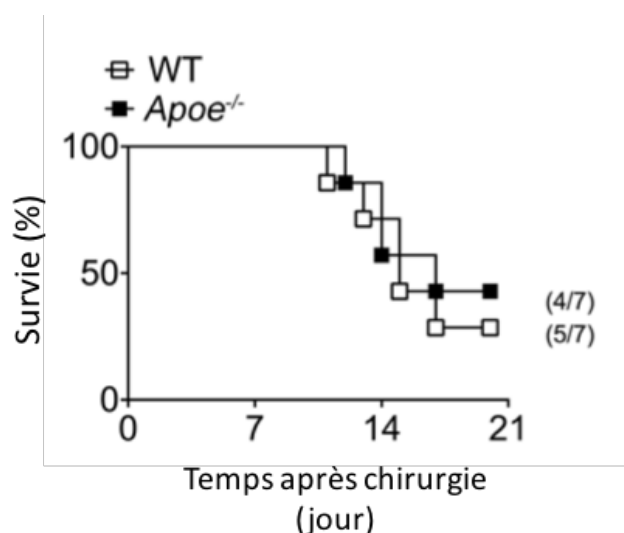
(\*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , Anova « double way » puis test « post-hoc » de Bonferroni.  
\*rouge : vs J0 , \*bleu : vs J7).

Au cours des 14 jours de suivi, aucun décès n'est survenu dans les groupes « Elastase inactivée » et « Elastase ». En revanche, 43% des souris du groupe « Elastase + anti-TGF $\beta$  » sont mortes au cours du suivi. Les premiers décès apparaissent dès le 9<sup>ème</sup> jour (Figure 21A). L'analyse post mortem a permis de mettre en évidence un hématome du rétropéritoine secondaire à une rupture aortique chez toutes ces souris (Figure 21B). Une coloration brune à l'orcéine a été réalisée afin de quantifier le degré de dégradation d'élastine. Alors que les fibres d'élastine paraissent intactes dans le groupe contrôle, on observe une fragmentation et une rupture partielle de l'élastine dans le groupe « Elastase ». La neutralisation du TGF $\beta$ , en association avec l'élastase, entraîne une augmentation significative de la dégradation de l'élastine qui semble parfois inexistante (Figure 21C). Les résultats en terme de survie ont été reproduits sur des souris hyperlipidémiques Apoe<sup>-/-</sup> (Figure 21 supplémentaire) offrant la possibilité d'étudier la survenue d'AAA dans un contexte d'athérosclérose.



**Figure 21 :** L'injection d'anticorps anti-TGF $\beta$  entraîne le décès par rupture aortique des souris traitées à l'élastase.

(A) Courbe de survie des différents groupes de souris jusqu'au sacrifice à 14 jours (\*\* $p < 0.01$ , Test de Mantel-Cox). (B) Hématome du rétropéritoine gauche (flèche jaune) secondaire à une rupture de l'aorte abdominale sous rénale chez une souris du groupe « Elastase + anti-TGF $\beta$  ». (C) Quantification de la dégradation de l'élastine, gradée de 0 à 4 (\* $p < 0.1$ , \*\*\* $p < 0.001$ , analyse Anova « one way » puis test « post-hoc » de Tukey).



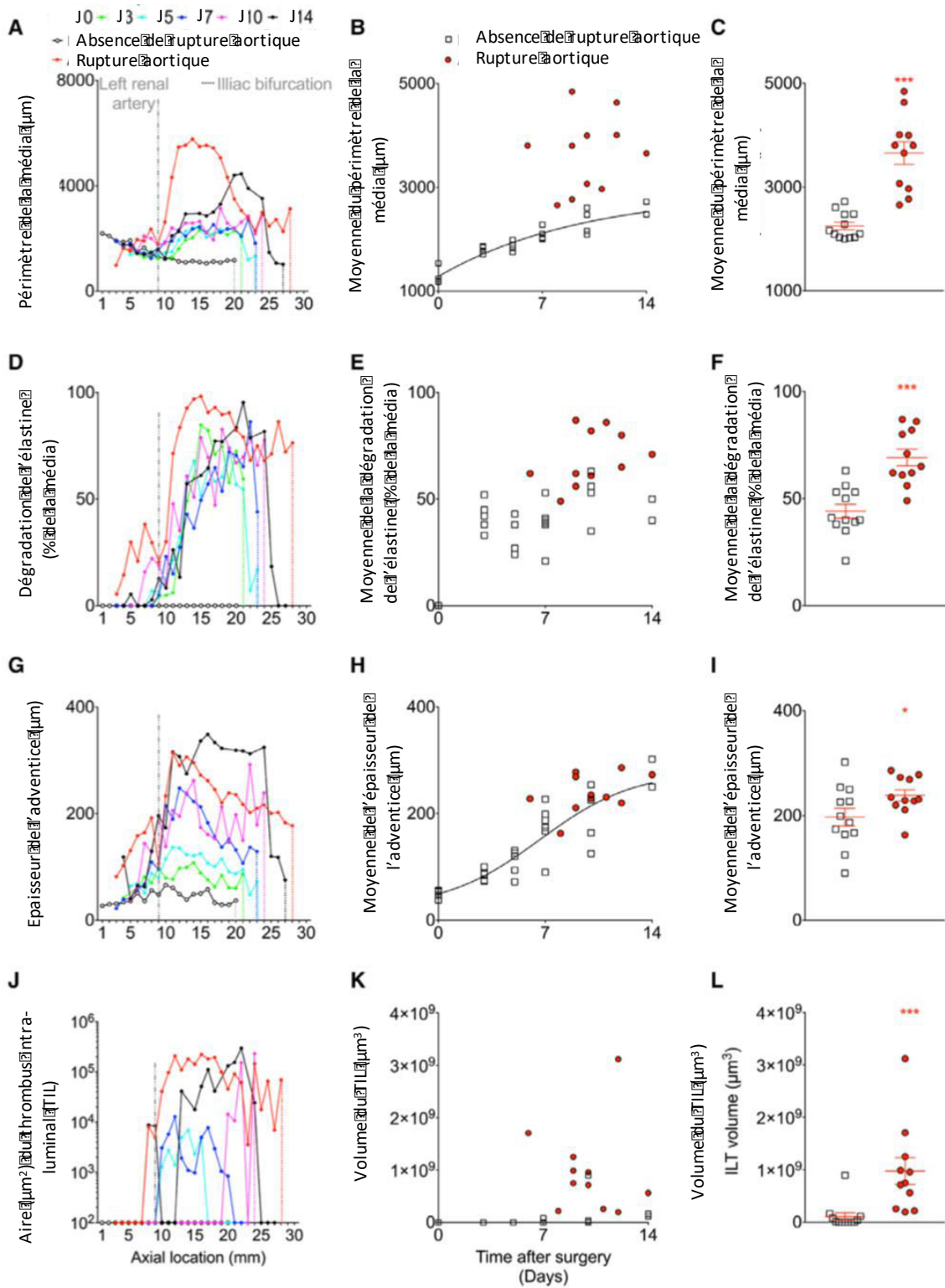
**Figure 21 supplémentaire** : Courbe de survie des souris C57Bl/6 Wild Type (WT) versus ApoE<sup>-/-</sup> traité avec l'élastase anti-TGFβ (n=7 souris/groupe)

## 1.2 La neutralisation du TGFβ après application d'élastase induit un remodelage de la paroi aortique dont les caractéristiques sont proches de la physiopathologie humaine

Pour caractériser le nouveau modèle de rupture anévrismale, une analyse au synchrotron *ex vivo* de l'aorte abdominale des souris recevant élastase + anti- TGFβ à différents temps a été effectuée. Les souris ont été sacrifiées à J0, J3, J5, J7, J10 et J14. Le diamètre, la dégradation des lames d'élastine, l'épaisseur de l'adventice, la présence d'un thrombus intraluminal, la structure de la média sont ensuite analysés à ces différents temps et également en fonction de la survenue ou non d'une rupture aortique (Figure 22).

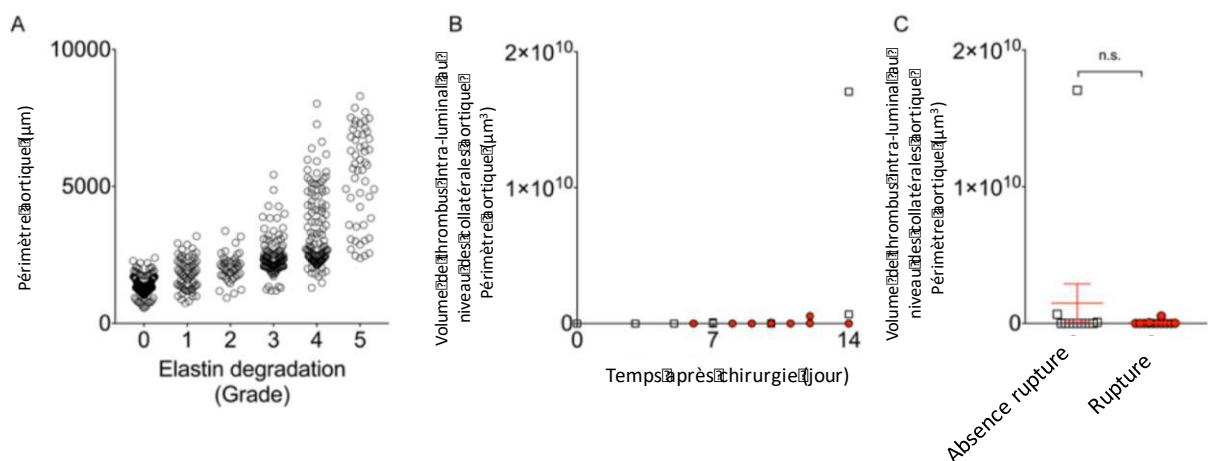
Le périmètre de la média est plus grand à l'endroit où la dégradation de l'élastine est franc (Figure 22A, 22D et 22A supplémentaire). Dès J3, le périmètre de la média (Figure 22A, 22B, 22C) et la dégradation d'élastine (Figure 22D, 22E, 22F) est élevé après

application d'élastase (Figure 22A, 22B, 22C, 22F), puis l'adventice s'épaissit (Figure 22G, 22H, 22I) et un thrombus intra-luminal apparaît (Figure 22J, 22K, 22L). Sur les aortes non rompues, la dégradation d'élastine ne change pas après 3 jours (Figure 22D, 22E) alors que le périmètre de la média (Figure 22A, 22B), l'épaisseur de l'adventice (Figure 22G, 22H) et le thrombus intra-luminal (Figure 22J, 22K) continue de croître à des temps plus tardifs. Les souris avec une rupture aortique ont un périmètre de la média plus élevé (Figure 22C) ainsi qu'une dégradation plus importante de l'élastine (Figure 22F), un thrombus intraluminal plus volumineux (Figure 22I) et une épaisseur de l'adventice plus élevée (Figure 22L) en comparaison avec les souris n'ayant pas eu de rupture. L'analyse au synchrotron de toute la longueur de l'anévrisme de l'aorte abdominale a permis de montrer l'absence de dissection/délamination de la média et attribue la mort des souris à une rupture transmurale complète de la média (Figure 23A). La présence d'un thrombus intra-luminal est retrouvée au niveau de l'aorte mais aussi sur ses collatérales (Figure 23A, 23B et 22C supplémentaire), ce qui est confirmé par les sections aortiques (Figure 23B). Le thrombus intra-luminal est marqué positivement pour les plaquettes (anti-CD41), les leucocytes (Hoescht), le fibrinogène/fibrine et visualisé au microscope confocal (Figure 23C). Les plaquettes sont également retrouvées entre l'adventice et la média, probablement dû à des hémorragies à ce niveau (Figure 23D).



**Figure 22 :** Analyse au synchrotron de l'injection d'anticorps anti-TGFβ sur les souris traitées à l'élastase.

Analyse numérique au synchrotron du périmètre aortique de la média (A-C), de la dégradation d'élastine (D-F), de l'épaisseur de l'adventice (G-I) et du thrombus intra-luminal (J-L). (A), (D), (G) et (J) Gauche : Ligne en pointillés représentant l'artère rénale gauche ; Droite (couleur) Lignes pointillées représentant la bifurcation iliaque. A noter que la distance entre l'artère rénale gauche et la bifurcation iliaque augmente avec la progression de l'AAA. (C), (F), (I) et (L) : Absence de rupture aortique : souris vivante entre 7 jours et 14 jours (n=12). Rupture aortique : Décès de souris survenant entre 6 et 14 jours (n=11). Test de Mann-Whitney. \*\*\*P<0.001, \*P<0.05 Absence de rupture aortique versus rupture aortique.

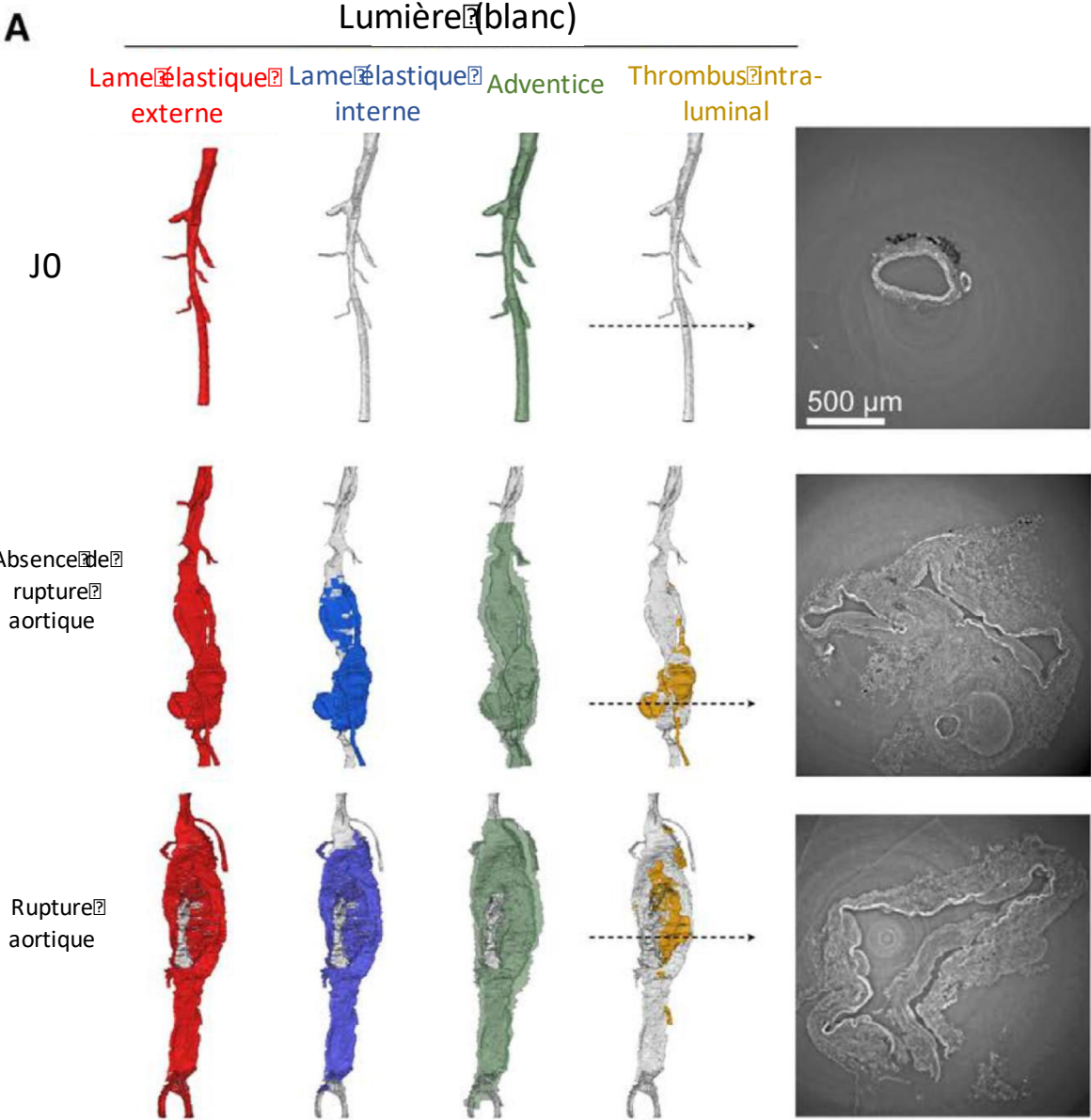


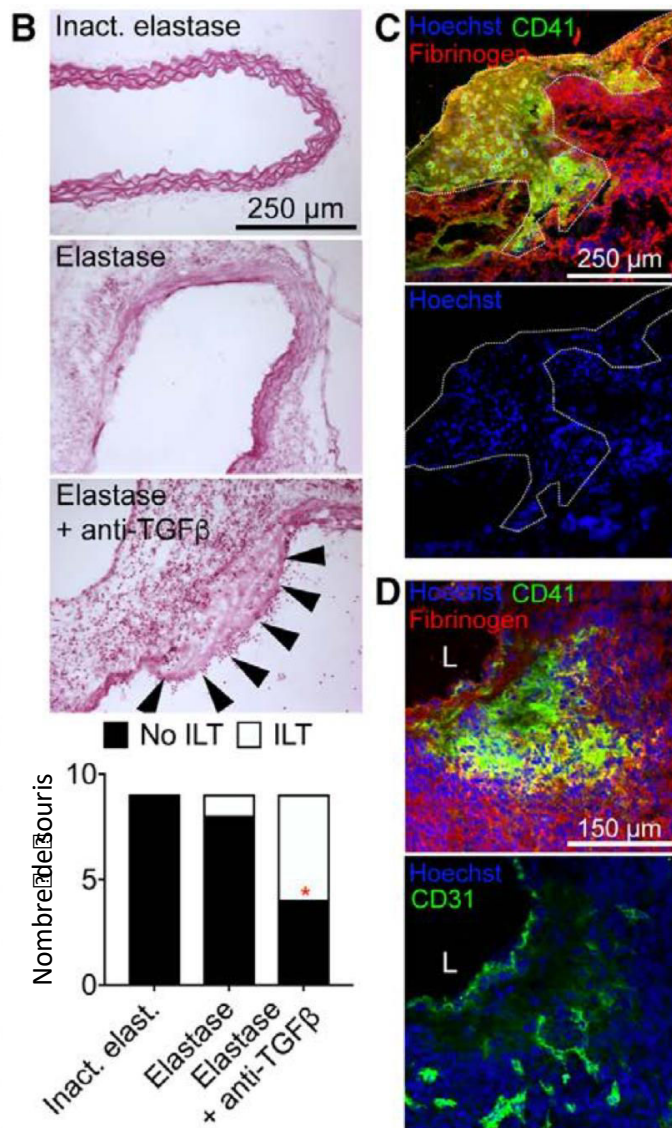
### Figure 22 supplémentaire

(A) Analyse du périmètre aortique au niveau du site d'application de l'élastase en fonction de la dégradation d'élastine (grade 0 : élastine intacte, grade 1 : 20% d'élastine dégradée, grade 2 : 21-40% d'élastine dégradée, grade 3 : 41-60% d'élastine dégradée, grade 4 : 61-80% d'élastine dégradée, grade 5 : 81-100% d'élastine dégradée). (B) Formation du thrombus



intra-luminal au niveau des branches collatérales au cours du temps. (C) Thrombus intra-luminal dans les collatérales rompues versus les collatérales non rompues.





**Figure 23 :** La neutralisation du TGFβ après induction anévrismale par l'élastase entraîne une dégradation de l'élastine, un remodelage adventitial, une rupture aortique et la formation d'un thrombus intra-luminal.

(A) Images représentatives en 3-D au synchrotron d'une aorte normale (image du haut), d'une aorte anévrismale (image du milieu) et d'une aorte anévrismale rompue (image du bas). Les lames élastiques sont colorées en rouge et bleu, l'adventice en vert et le thrombus intra-luminal en jaune. (B) Images représentatives du thrombus intra-luminal avec quantification de ce dernier dans les 3 groupes de souris. Test du Chi2. \*P<0.05 « Elastase » versus « Elastase +

anti-TGF $\beta$  ». **(C)** Caractérisation du thrombus intra-luminal en immunofluorescence montrant l'accumulation de plaquettes (vert CD41), fibrine/fibrinogène (rouge) et de cellules (Hoescht) dans la lumière aortique. **(D)** Images représentatives de l'accumulation de plaquettes dans la paroi aortique avec formation de néo-vaisseaux (CD31<sup>+</sup>) sur des sections aortiques.

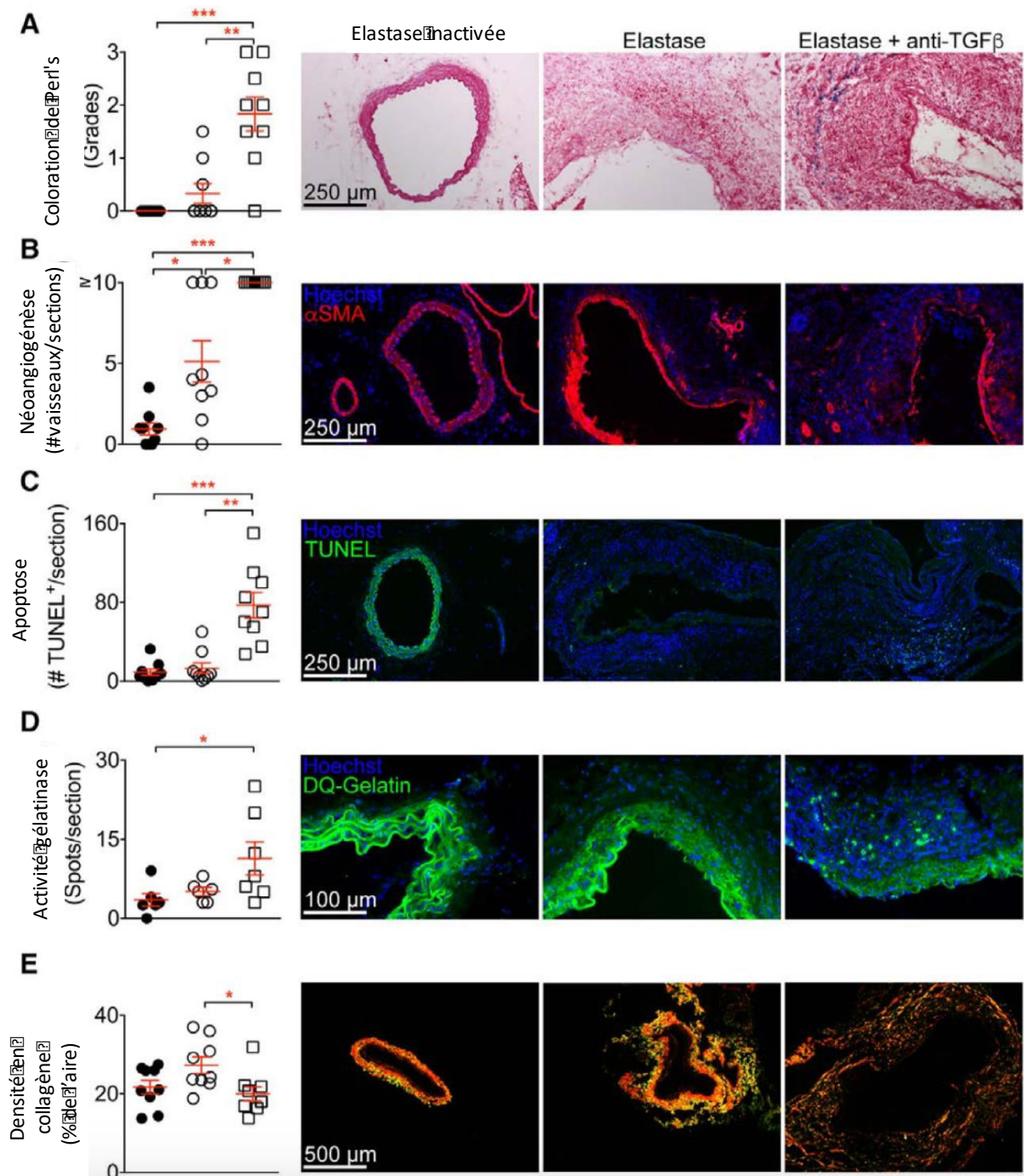
Le remodelage de la paroi aortique induit par l'application d'élastase et la neutralisation du TGF $\beta$  a ensuite été caractérisé sur les coupes histologiques. La coloration de Perls, colorant en bleu les ions ferriques a permis de mettre en évidence de dépôts de fer, témoin de l'accumulation de sang dans la paroi aortique (Figure 24A). Aucune accumulation de fer n'est présente dans le groupe « Elastase inactivée » et « Elastase ». En revanche, on constate de nombreux dépôts de fer dans le groupe « Elastase + anti-TGF $\beta$  ».

Ce remodelage est accompagné d'une diminution du nombre de CMLs au sein de la média, mis en évidence par un marquage  $\alpha$ SMA (Figure 24B). A 14 jours, les souris du groupe « Elastase inactivée » présentent une densité élevée de CMLs par section ( $35.4 \pm 6.8\%$ ). On constate une diminution d'environ 40% de la densité en CMLs dans le groupe « Elastase ». De plus, la neutralisation du TGF $\beta$  aggrave de façon significative la disparition des CMLs dans la média ( $5.7 \pm 1.4\%$ ,  $P < 0.01$ ) par rapport au groupe « Elastase ». En revanche, la néo-angiogénèse augmente dans l'adventice (Figure 24B).

La perte des CMLs est accompagnée d'une augmentation des cellules apoptotiques au marquage TUNEL. Alors que dans les groupes de souris traitées par élastase inactivée ou élastase seule, on n'observe pas ou peu d'apoptose, le traitement combinant élastase et anti-TGF $\beta$  induit une forte augmentation de l'apoptose (Figure 24C).

De plus, il existe une augmentation de l'activité gélatinase des MMPs (MMP-2, MMP-9) dans le groupe élastase + anti-TGF $\beta$  (Figure 24D).

Enfin, la coloration au rouge Sirius a été réalisée afin de mettre en évidence les fibres de collagène de type I en rouge et les fibres de collagène de type III en vert (Figure 24E). On constate une diminution de la densité en collagène dans le groupe ayant reçu l'anti-TGF $\beta$  par rapport au groupe élastase seule.



**Figure 24** : La neutralisation du TGF $\beta$  après induction anévrismale induite par l'élastase reproduit les principales caractéristiques histologiques de l'AAA humain.

Les coupes en cryosection des aortes de souris à 14 jours (n=9 par groupe) ont été marquées afin de détecter l'accumulation de fer (coloration de Perls) (A), d'évaluer la présence de CMLs et la néo-vascularisation (alpha-SMA) (B), l'apoptose (marquage TUNEL) (C), l'activité gélatinase (DG-Gelatin) (D), le collagène (coloration rouge Sirius) (E). Chaque coloration/marquage a été quantifiée dans les 3 groupes de souris (n=9 par groupe). Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn. Dans (A) \*\*\*P<0.001 « Elastase inactivée » versus « Elastase + anti-TGF $\beta$  ». \*\*P<0.01 « Elastase » versus « Elastase + anti-TGF $\beta$  ». Dans (B) \*\*\*P<0.001 « Elastase inactivée » versus « Elastase + anti-TGF $\beta$  », \*P<0.05 « Elastase » versus « Elastase + anti-TGF $\beta$  » et « Elastase inactivée » versus « Elastase ». Dans (C) \*\*\*P<0.001 « Elastase inactivée » versus « Elastase + anti-TGF $\beta$  ». \*\*P<0.01 « Elastase » versus « Elastase + anti-TGF $\beta$  ». Dans (D) \*P<0.05 « Elastase inactivée » versus « Elastase + anti-TGF $\beta$  ». Dans (E) \*P<0.05 « Elastase » versus « Elastase + anti-TGF $\beta$  ».

### **1.3 La neutralisation du TGF $\beta$ après application d'élastase favorise la réponse inflammatoire au sein de la paroi aortique**

L'inflammation est une caractéristique retrouvée dans la physiopathologie anévrismale chez l'homme. Dans notre modèle murin, différents marquages cellulaires ont été réalisés afin d'identifier les principales cellules inflammatoires au sein de la paroi aortique (Figure 25). Le marquage F4/80, fortement exprimés par les macrophages, a été utilisé pour l'analyse des phagocytes. Le marquage anti-CD3 à, quant à lui, été réalisé pour l'analyse des lymphocytes T

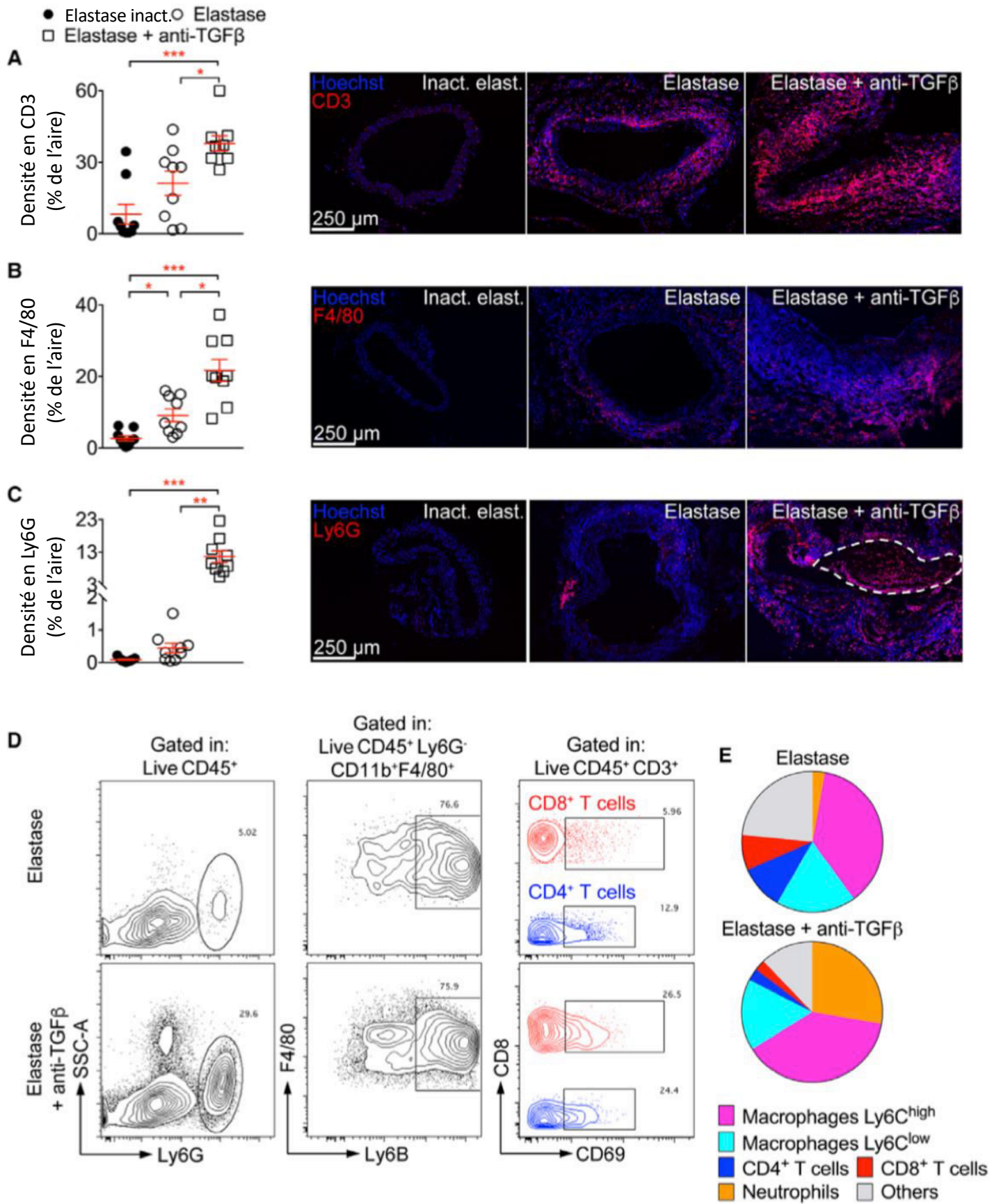
(CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) et le marquage Ly6G pour mettre en évidence les polynucléaires neutrophiles (PNN).

La neutralisation du TGFβ induit une augmentation significative de l'infiltration des lymphocytes T, des macrophages et des neutrophiles au sein de la paroi aortique par rapport aux souris traitées par élastase seule ou élastase inactivée (Figure 25A,25B, 25C).

En utilisant la cytométrie en flux, nous nous sommes ensuite intéressés à la composition cellulaire des aortes des souris des différents groupes à 14 jours. La stratégie d'isolation des différentes populations cellulaires par cytométrie en flux comprend en premier lieu une élimination des doublets cellulaires (SSC-H/SSC-W), puis une analyse des événements ayant une granulométrie et une taille similaire (SCC-A/FSC-A) à celle des lymphocytes/monocytes/granulocytes. Les neutrophiles étaient identifiés comme des cellules DC45+Ly6G<sup>+</sup>, les macrophages CD45+Ly6G-CD11b+F4/80<sup>+</sup>, les lymphocytes T CD45+CD3<sup>+</sup> (Figure 25D).

L'analyse en cytométrie suggère que les macrophages dérivent pour la plupart des monocytes, avec une haute expression de Ly6B. Quant au lymphocytes T, cette dernière population est caractérisée par l'expression de CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> avec un phénotype activé (CD69<sup>+</sup>).

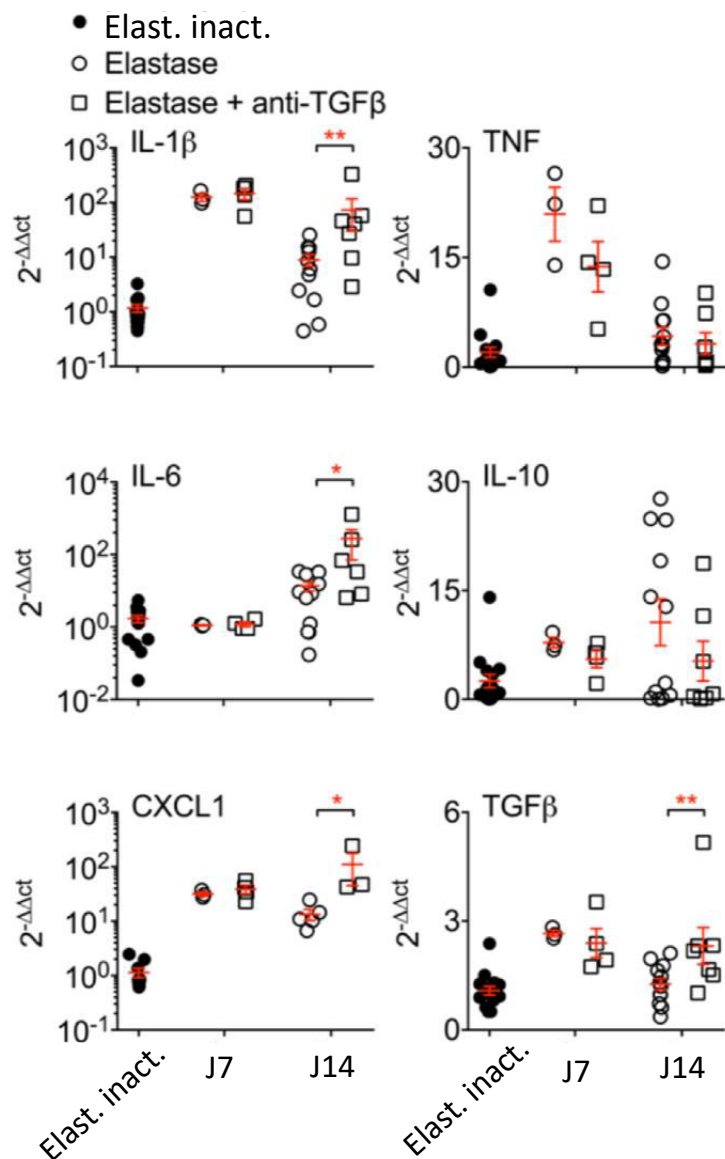
Afin de caractériser plus en détail la réponse inflammatoire, l'expression génique de différentes cytokines a été analysée au sein de la paroi aortique (Figure 26). Les cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-6, IL-1β, CXCL1) ainsi que les cytokines anti-inflammatoires (TGFβ, IL-10) étaient induites par l'application d'élastase. Certaines cytokines étaient induites dès J7 comme l'IL-1β, le TNF ou CXCL1, d'autres plus tardivement à J14 comme l'IL6 ou le TGFβ. La neutralisation du TGFβ induisait une augmentation significative de l'expression de l'IL-1β, CXCL1 et l'IL-6 à J14 par rapport à l'application d'élastase seule. La cinétique de l'IL-1β dans la paroi aortique suggère un effet variable sur l'initiation et la progression de l'AAA.



**Figure 25** : La neutralisation du TGF $\beta$  après induction anévrismale induite par l'élastase maintient l'activité inflammatoire au sein de la paroi aortique.

Les coupes en cryosection des aortes de souris à 14 jours (n=9 par groupe) ont été marquées pour les lymphocytes T **(A)**, les macrophages **(B)** et les neutrophiles **(C)**. **(A-C)** La quantifications de ces cellules a été réalisée à 14 jours (n=9 par groupe). Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn. Dans la figure **(C)**, les ligne pointillées soulignent le thrombus intra-luminal. **(D)** et **(E)**. Analyse en cytométrie de flux des cellules aortiques CD45<sup>+</sup> à 14 jours (n=4/groupe). Flow chart représentant les neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes T dans les groupes « Elastase » et « Elastase + anti-TGF $\beta$  » **(D)**. Distribution des cellules immunitaires aortique dans les groupes « Elastase » et « Elastase + anti-TGF $\beta$  » **(E)**. Dans **(A)**, \*\*\*P<0.001 « Elastase inactivée » versus « Elastase + anti-TGF $\beta$  », \*P<0.05 « Elastase » versus « Elastase + anti-TGF $\beta$  ». Dans **(B)**, \*\*\*P<0.001 « Elastase inactivée » versus « Elastase + anti-TGF $\beta$  ». \*P<0.05 « Elastase » versus « Elastase + anti-TGF $\beta$  » et « Elastase inactivée » versus « Elastase ». Dans **(C)** \*\*\*P<0.001 « Elastase inactivée » versus « Elastase + anti-TGF $\beta$  ». \*\*P<0.01 « Elastase » versus « Elastase + anti-TGF $\beta$  ».





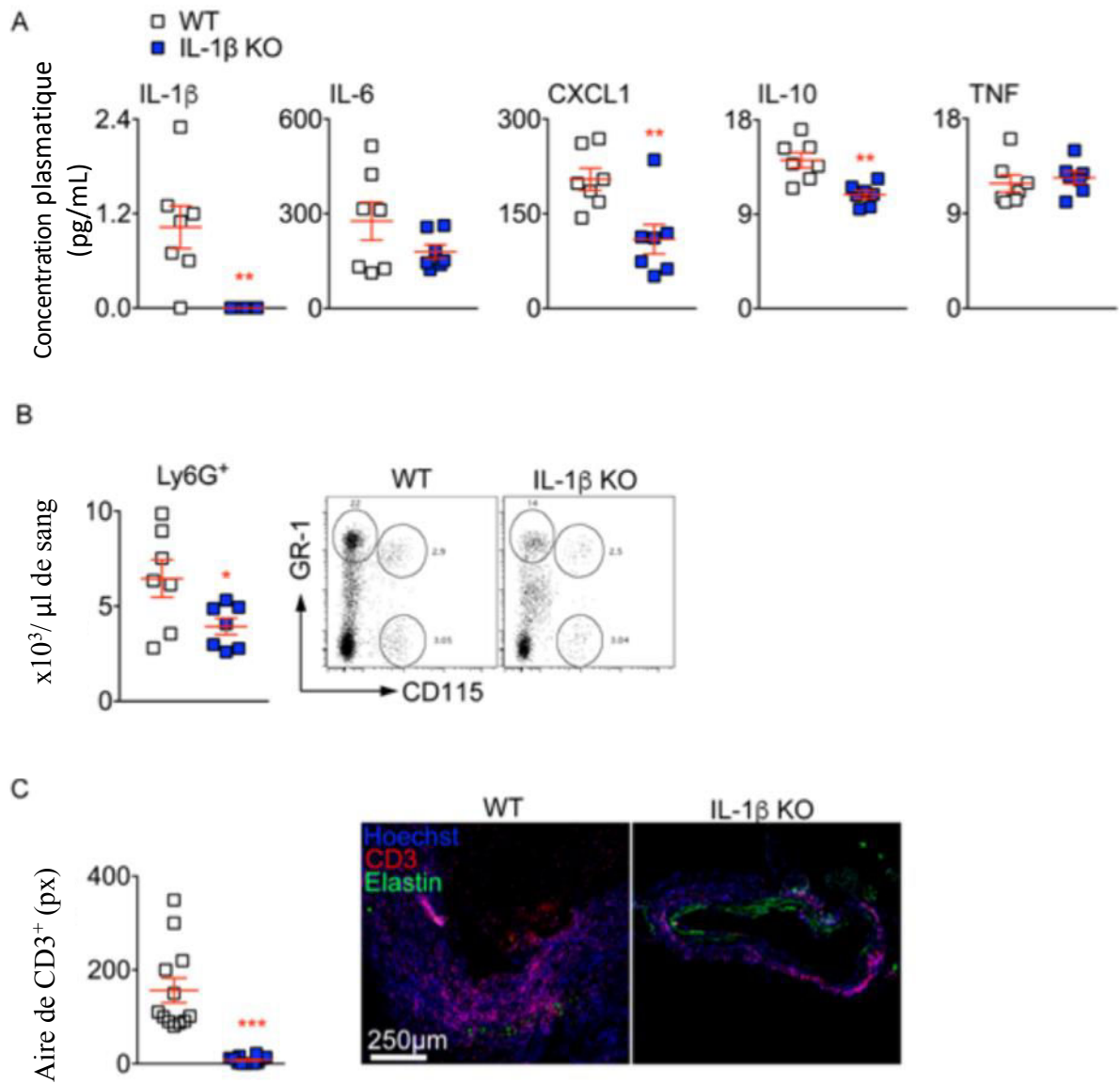
**Figure 26 :** Analyse par qPCR de l'expression des cytokines dans l'aorte de souris traitée par élastase inactivée, élastase ou élastase + anti-TGFβ. Test de Mann-Whitney, n=3-15 souris/point dans le temps. \*P<0.05. \*\*P<0.01. Résultats obtenus à partir de 3 expériences indépendantes.

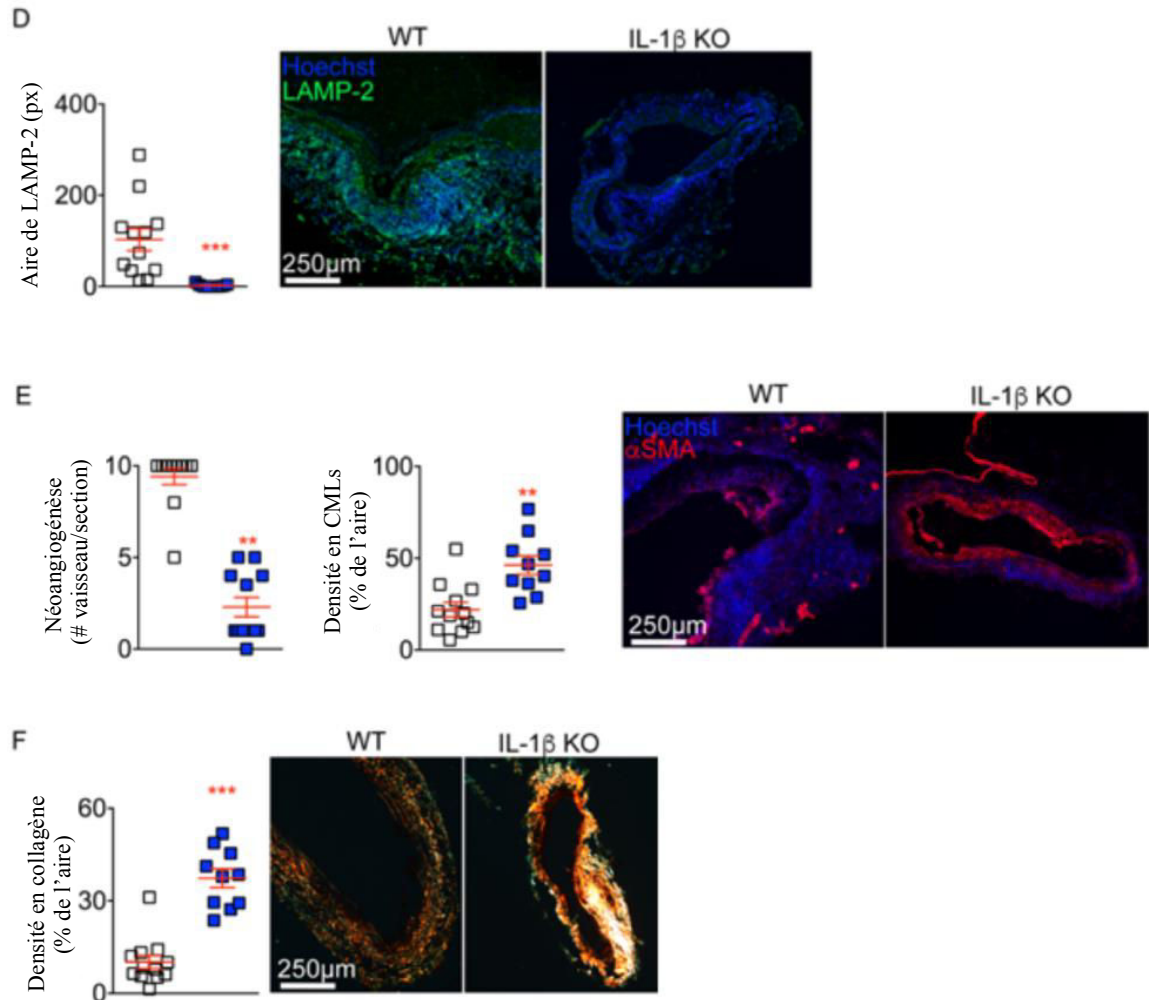
## 2- Rôle de l'IL-1 $\beta$ dans l'initiation et la progression de l'AAA

Afin de mieux comprendre l'implication de l'IL-1 $\beta$  dans la dilatation et la rupture aortique, nous avons utilisé des souris IL-1 $\beta$  KO. 2 groupes ont été mis en place : un groupe de souris IL-1 $\beta$  KO recevant de l'élastase + anti-TGF $\beta$  et un groupe de souris WT recevant de l'élastase + anti-TGF $\beta$ . Nous avons confirmé l'absence d'IL-1 $\beta$  dans le plasma des souris IL-1 $\beta$  KO et nous avons retrouvé que le taux de CXCL1 et d'IL-10 était diminué de manière significative, suggérant un rôle de l'IL-1 $\beta$  dans la production de ces cytokines (Figure 27A).

5 jours après l'induction anévrismale, les souris IL-1 $\beta$  KO ont une réduction des neutrophiles circulants (Figure 27B), de même qu'une diminution plasmatique de la concentration en CXCL1. En comparaison au groupe de souris WT, le groupe de souris IL-1 $\beta$  KO est totalement protégé de la rupture aortique induite par l'élastase et la neutralisation du TGF $\beta$  (Figure 28A, 28B). De plus, dans le groupe de souris IL-1 $\beta$  KO, il existe une diminution importante de l'infiltration de lymphocytes T (Figure 27C), de phagocytes (Figure 27D), de la néoangiogénèse (Figure 27E) mais également une augmentation de la densité en collagène du tissu aortique en comparaison au groupe de souris WT (Figure 27F). Afin d'étudier le rôle de l'IL-1 $\beta$  dans la progression et la survenue de rupture, nous avons utilisé un anticorps anti-IL1 $\beta$  monoclonal souris anti-souris. Nous avons testé l'anticorps *in vitro* et montré qu'il entraîne un blocage de la production de CXCL1 par les CMLs après adjonction d'IL-1 $\beta$  recombinant (Figure 29A). L'anticorps entraîne également une diminution de la concentration plasmatique de CXCL1 et d'IL-6 *in vivo* et impacte sur le turn-over de l'IL-1 $\beta$  (Figure 29B). *In vivo*, la neutralisation de l'IL-1 $\beta$  avec l'anticorps monoclonal anti-IL-1 $\beta$  commencée à 7 jours après induction anévrismale à l'élastase + anti-TGF $\beta$  ne limite pas la progression de l'anévrisme et ne prévient pas la rupture aortique (Figure 28). L'ensemble de ces résultats indique que l'IL-1 $\beta$

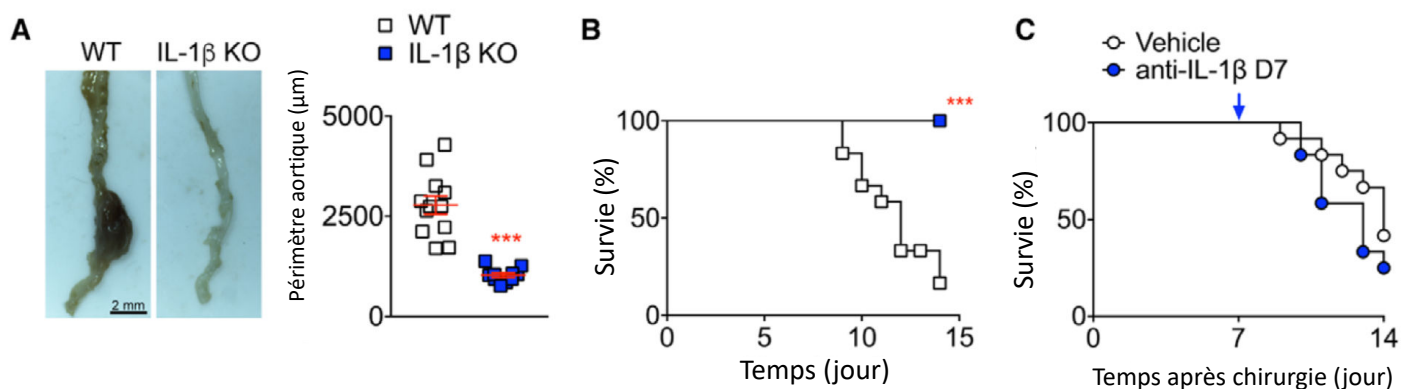
joue un rôle pathogène dans l'initiation de l'AAA mais son inhibition à un temps plus tardif ne limite pas la progression ni les complications liées à l'AAA.





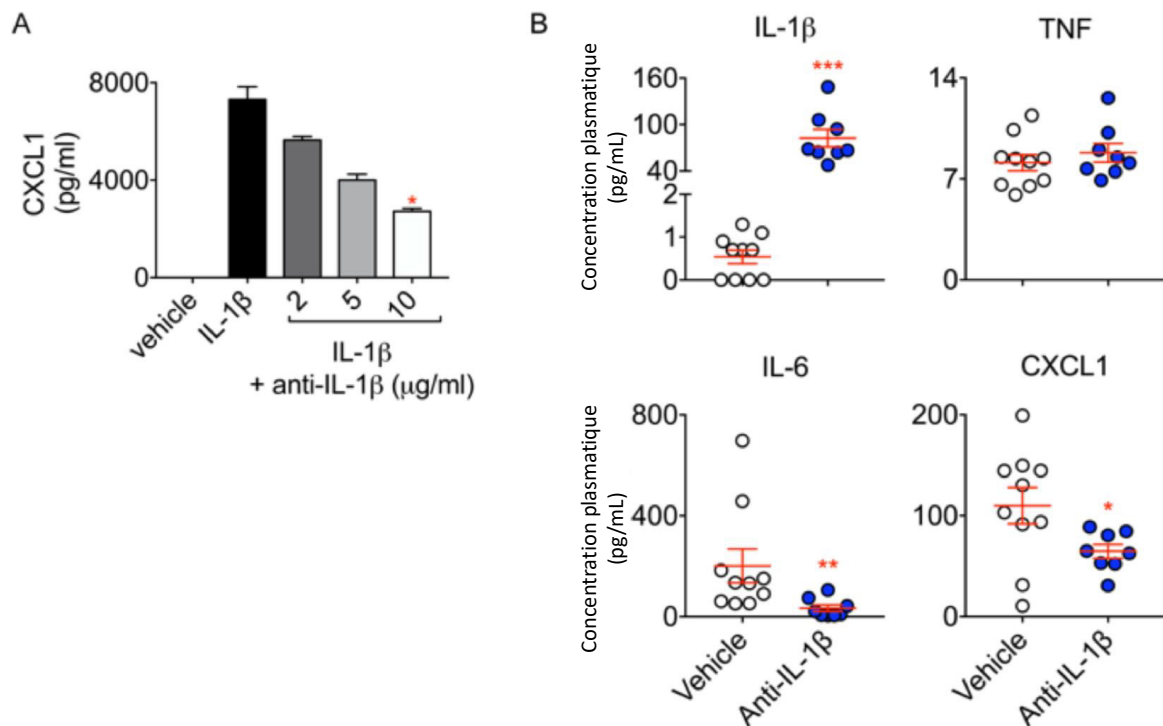
**Figure 27**

(A-B). Analyse multiplex des cytokines plasmatiques (A) et des neutrophiles sanguins (B) de souris WT et IL-1 $\beta$  KO 5 jours après la chirurgie (n=7 souris par groupe). (C-D) Analyse en immunofluorescence des lymphocytes T (C) et des phagocytes (D) à 14 jours (n=10-12 souris par groupe). (E) Analyse en immunofluorescence de la néo-vascularisation et des CMLs dans la média à 14 jours (n=10-12 souris par groupe). (F) Analyse de la densité en collagène après coloration au rouge Sirius en lumière polarisée à 14 jours (n=10-12 souris par groupe). Test de Mann-Whitney. Pour (A) et (B) : \*\*P<0.01 WT versus KO, \*P<0.05 WT versus KO. Pour (C) à (F) \*\*P<0.01 WT versus KO, \*\*\*P<0.001 WT versus KO. Résultats obtenus à partir de 2 expériences indépendantes.



**Figure 28 :** Le blocage de l'IL-1 $\beta$  ne prévient pas la rupture après neutralisation du TGF $\beta$  dans le modèle murin induit à l'élastase.

(A) Images macroscopiques des aortes et quantification du périmètre 14 jours après chirurgie (n=10-12 par groupe). Test de Mann-Whitney. (B) Courbe de survie des souris WT et IL-1 $\beta$  KO (n=10-12 souris par groupe). Log-Rank, Test de Mantel-Cox. (C) Les souris WT sont injectées (ou non) à 7 jours avec un anticorps neutralisant l'IL-1 $\beta$  souris anti-souris. L'injection a été répétée à 9 et 11 jours. Courbe de survie (n=12 souris par groupe). Log-Rank, Test de Mantel-Cox. Pour (A) et (B), \*\*\*P<0.001 WT versus IL-1 $\beta$  KO.



**Figure 29 :**

(A) Sécrétion de CXCL1 par les CMLs *in vitro* après une nuit de stimulation par de l'IL-1β (5 ng/ml), avec ou sans adjonction de l'anticorps neutralisant anti-IL-1β. Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn. \*P<0.05 IL-1β versus IL-1β + 10 μg/ml d'anti-IL-1β. (B)

Concentration plasmatique d'IL-1β, de TNF, d'IL-6 et de CXCL1 dans le groupe de souris « Elastase + anti-TGFβ » avec ou sans anti-IL-1β débutant à 7 jours et pour 7 jours de plus. Test de Mann-Whitney. Résultats obtenus à partir de 2 expériences indépendantes (n=8-10 souris par groupe). \*\*\*P<0.001, \*\*P<0.01, \*P<0.05 Vehicle versus anti-IL-1β.

## **IV/ DISCUSSION**

L'anévrisme aortique est une pathologie fréquente et grave dont la complication la plus grave est la rupture. Parmi les étiologies, l'on retrouve dans 5 à 10 % des cas les anévrismes syndromiques, qui correspondent aux formes familiales rencontrées dans le syndrome de Marfan ou le syndrome de Loeys-Dietz<sup>95,96</sup>. Les formes non syndromiques sont beaucoup plus fréquentes (90% des cas) et sont le plus souvent associées à l'athérosclérose. Les principales caractéristiques physiopathologiques de l'AAA humain incluent la dégradation de la MEC, la perte des CMLs au niveau de la média, l'infiltration et l'activation des cellules immunitaires, la formation d'un thrombus intra-luminal, une dilatation progressive de l'aorte en l'absence de dissection aboutissant finalement à la rupture aortique. De manière intrigante, malgré le nombre important de modèles expérimentaux d'anévrisme aortique, aucun n'arrive à combiner l'ensemble de ces caractéristiques. La plupart des modèles induisent une dissection de la média et non une rupture aortique transmurale. De plus, la plupart des modèles n'induisent pas de thrombus intra-luminal. De rares ruptures aortiques ont été observées dans le modèle à l'élastase chez le rat, mais pas chez la souris. Cependant, ces ruptures apparaissent très précocement après l'injection d'élastase et seraient plutôt dues à un excès d'activité de l'élastase plutôt qu'à une évolution progressive de la pathologie anévrismale aboutissant in fine à la rupture.

Des travaux réalisés précédemment au sein de notre équipe ont montré que la neutralisation du TGF $\beta$  sur un modèle d'AAA induit par l'angiotensine II sur des souris C57BL/6 entraîne un fort taux de mortalité par rupture aortique<sup>60</sup>. Néanmoins, même si ce modèle présente certaines similitudes par rapport à la physiopathologie humaine, il entraîne une rupture franche et localisée de la média responsable de l'apparition d'un faux chenal intra-mural avec la constitution d'un hématome disséquant entre la média et l'adventice<sup>60</sup>. De plus, la localisation de l'AAA dans ce modèle est le plus souvent sus-rénale alors que chez l'homme, l'AAA est

préférentiellement localisé dans la régions aortique sous-rénale. La rupture anévrismale est la principale complication redoutée des AAA, responsable d'un taux de mortalité de plus de 80%<sup>97</sup>. Ceci souligne la nécessité de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la rupture en vue d'améliorer la prise en charge des patients. Parmi les modèles animaux d'AAA, peu entraînent une rupture aortique, ce qui constitue une limite pour étudier cette complication<sup>93,98</sup>.

En contraste par rapport aux autres modèles expérimentaux d'anévrisme, le modèle que nous avons créé, associant application d'élastase et neutralisation du TGF $\beta$  reproduit les principales caractéristiques physiopathologiques retrouvées chez l'homme. En effet, ce modèle induit une dilatation anévrismale progressive au niveau de l'aorte sous-rénale pouvant évoluer vers une rupture aortique fatale. Ceci est associé à un remodelage de la paroi vasculaire incluant une dégradation de la matrice extra-cellulaire, une infiltration de cellules inflammatoires, une perte des CMLs, la formation d'un thrombus intra-luminal ainsi qu'une augmentation de la néo-angiogenèse dans l'adventice. Un autre point important à considérer dans les modèles animaux est la chronicité et la durabilité du développement et de la croissance de l'AAA au cours du temps. La plupart des modèles expérimentaux non disséquants entraînent un développement anévrismal en 7 jours et sont rapidement contenus avec très peu ou pas de progression de l'anévrisme. En fait, ils tendraient à se réparer en l'absence de maintien d'induction anévrismale. Dans ce contexte, la mise en évidence du TGF $\beta$  comme médiateur clé de la réparation de l'AAA offre de nouvelles perspectives pour le développement de modèle chronique d'AAA non disséquant. Notre modèle combinant l'élastase à la neutralisation du TGF $\beta$  produit un anévrisme semblable à celui de l'homme avec un taux élevé de rupture aortique à 14 jours. Ce modèle représente potentiellement un intérêt majeur dans la compréhension de la maladie, de son développement, de sa progression et de l'apparition des complications associées. Il serait par ailleurs intéressant de rechercher si



l'inhibition du TGF $\beta$  dans d'autres modèles expérimentaux comme le modèle au chlorure de calcium permettrait également d'induire des AAA proches de la physiopathologie humaine.

Il est remarquable de constater que l'inhibition d'une cytokine, le TGF $\beta$ , est suffisante pour aggraver la dilatation anévrismale et entraînait une rupture aortique fatale. Nos données suggèrent que la signalisation du TGF $\beta$  joue un rôle critique dans la maintenance et l'intégrité de la paroi aortique contre la progression et la rupture anévrismale. Le TGF $\beta$  joue un rôle complexe dans la pathogénèse anévrismale. Des études expérimentales dans des modèles d'anévrismes syndromiques dont le syndrome de Marfan ont initialement suggéré un effet pathogène de l'activation de la voie de signalisation du TGF $\beta$  dans le développement de l'anévrisme <sup>55,56,99</sup>. Des résultats similaires ont été observés chez des patients atteints de syndrome de Marfan où l'hyper-expression du TGF $\beta$  était associée à une altération de la synthèse des composants de la matrice extra-cellulaire ainsi qu'à une augmentation de l'apoptose au niveau de la paroi aortique <sup>57</sup>. Néanmoins, ce concept est remis en question, différentes études récentes suggérant un rôle protecteur du TGF $\beta$  sur la paroi vasculaire <sup>60,100,101</sup>. Dans le modèle d'AAA induit par l'infusion d'angiotensine II, la neutralisation du TGF $\beta$  aggravait la dilatation anévrismale et entraînait des dissections aboutissant à une rupture aortique fatale, suggérant ainsi un rôle protecteur du TGF $\beta$ . D'autre part, la mutation dans la signalisation du TGF $\beta$  est responsable de formes sévères d'anévrismes thoraciques et de dissections chez l'homme <sup>102</sup> et certaines études ont montré l'association entre le polymorphisme d'un nucléotide de molécules impliquées dans la signalisation du TGF $\beta$  (TGF $\beta$ 3, TGF $\beta$ R1, TGF $\beta$ R2, LTBP4) et la survenue d'AAA <sup>103</sup>. La signalisation du TGF $\beta$  joue un rôle majeur dans la protection contre les anévrismes thoraciques <sup>104-106</sup>. De plus, des

biopsies d'anévrismes humains montrent la perte fréquente d'une copie du récepteur TGF $\beta$  de type 2 au niveau de l'exon 8 suggérant une modulation de la voie de signalisation du TGF $\beta$  au cours de la pathologie <sup>107</sup>.

Alors que notre étude démontre l'importance du TGF $\beta$  dans le développement de l'AAA, il reste à déterminer quel type cellulaire est précisément impliqué sachant que les cellules immunitaires, les CMLs, les (myo)fibroblastes et les plaquettes peuvent contribuer à la production de TGF $\beta$ . Le TGF $\beta$  est impliqué dans la régulation de processus biologiques majeures impliqués dans l'AAA, incluant le remodelage de la MEC, la survie et la prolifération des CMLs et l'activation de la réponse inflammatoire <sup>103</sup>. Gao et al. ont montré que l'inhibition de la voie de signalisation du TGF $\beta$  dans les CMLs avait un effet protecteur sur le remodelage vasculaire en limitant l'infiltration des macrophages et l'expression des MMPs <sup>108</sup>. L'inhibition de la voie de signalisation du TGF $\beta$  dans les CMLs prévenait également la formation anévrismale induite par l'élastase <sup>108</sup>.

Notre étude a identifié l'IL-1 $\beta$  comme jouant un rôle important dans le développement anévrismal, ce qui est en accord avec de précédentes études effectuées sur des modèles d'AAA induit à l'élastase <sup>62</sup>. De manière surprenante, le blocage de l'IL-1 $\beta$  à un temps tardif ne limite pas la progression ni la rupture anévrismale, suggérant un rôle moindre de l'IL-1 $\beta$  dans les stades avancés de la maladie. Le rôle de la signalisation de l'IL-1 $\beta$  dans l'anévrisme humain est encore peu connu. Paradoxalement, la surexpression d'un antagoniste du récepteur de l'IL-1 $\beta$  est associée à une augmentation de la susceptibilité de développer un anévrisme <sup>109</sup>.

L'inflammation représentant une mécanisme physiopathologique clé dans la formation des AAA, cibler les molécules impliquées dans la réponse inflammatoire représente une

perspective thérapeutique intéressante dans le but d'améliorer la prise en charge des patients. En effet, à l'heure actuelle, aucun traitement pharmacologique n'a montré une efficacité thérapeutique suffisante et le seul traitement curatif repose sur la chirurgie.

L'utilisation d'anticorps monoclonaux chez l'homme a révolutionné la prise en charge de certaines pathologies inflammatoires. Le canakinumab, un anticorps monoclonal anti-IL-1 $\beta$ , est actuellement utilisé dans le traitement de pathologies inflammatoires comme les syndromes périodiques, l'arthrite goutteuse ou encore l'arthrite juvénile idiopathique <sup>110</sup>.

L'étude CANTOS a été le premier essai prospectif randomisé, en double aveugle, mené sur une grande cohorte de patients (10 061 personnes inclus) testant l'intérêt du canakinumab dans la prise en charge d'une pathologie liée à l'athérosclérose, à savoir l'infarctus du myocarde <sup>111</sup>. Même s'il n'existait pas de différence de mortalité après infarctus du myocarde entre les patients traités par le canakinumab et ceux traités par placebo, cette étude a montré l'intérêt de ce médicament dans la diminution des récurrences d'accidents cardiovasculaires. Un essai clinique randomisé a récemment été effectué afin d'évaluer l'intérêt potentiel du canakinumab dans la limitation de la progression anévrysmale chez des patients ayant un AAA de petite taille (entre 40 and 50 mm) <sup>112</sup>. L'essai clinique a inclus initialement 31 patients traités et 33 patients recevant le placebo et n'a pas mis en évidence de différence significative entre les groupes sur la croissance anévrysmale au cours du suivi à 3 et 12 mois. Ces données sont en accord avec nos résultats ne montrant pas de bénéfice de l'inhibition de la voie de signalisation de l'IL-1 $\beta$  à un stade tardif du développement de l'AAA, soulignant la relevance de notre modèle pour la pathologie humaine. L'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques représente un enjeu majeur pour améliorer la prise en charge des patients atteints d'AAA. L'utilisation de

modèles animaux reproduisant le plus fidèlement possible la physiopathologie humaine constitue un prérequis important dans cette optique.

## V/ CONCLUSION

L'AAA est associé à des taux de morbidité et de mortalité très élevés. A l'heure actuelle, aucun traitement pharmacologique curatif n'existe, soulignant la nécessité de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'initiation, la progression et la rupture de l'AAA. Les modèles animaux offrent la possibilité de mettre en place des approches interventionnelles mais présentent la limitation de ne pas mimer parfaitement la physiopathologie humaine.

Ce travail a permis de créer un nouveau modèle murin d'AAA basé sur l'application d'élastase au niveau de l'aorte abdominale associée à la neutralisation systémique du TGF $\beta$ . Ce modèle reproduit les caractéristiques de la physiopathologie humaine incluant la dégradation de la MEC, la perte des CMLs, l'induction d'une néo-angiogenèse dans l'adventice, l'infiltration de cellules inflammatoires et la formation d'un thrombus intraluminal. Il induit une dilatation aortique progressive aboutissant à une rupture aortique transmurale en l'absence de dissection de la média. Dans ce modèle, l'invalidation génétique de l'IL-1 $\beta$ , et non la neutralisation systémique à un temps tardif, limitait la croissance et prévenait la rupture anévrysmale suggérant le rôle de cette cytokine au cours des stades précoces du développement de l'AAA. La mise en place de ce nouveau modèle d'AAA offre des perspectives intéressantes offrant la possibilité de tester de nouvelles approches thérapeutiques en vue de transposer ensuite les résultats obtenus à la pathologie humaine.

## **VI/ REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Moll FL, Powell JT, Fraedrich G, et al. Management of abdominal aortic aneurysms clinical practice guidelines of the European society for vascular surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2011;41 Suppl 1:S1-S58.
2. Sakalihasan N, Limet R, Defawe OD. Abdominal aortic aneurysm. *Lancet.* 2005;365(9470):1577-1589.
3. [https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c\\_1361253/fr/anevrismes-de-l-aorte-abdominale-en-france-proposer-un-depistage-cible-opportuniste-unique-chez-les-hommes-presentant-des-facteurs-de-risque](https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1361253/fr/anevrismes-de-l-aorte-abdominale-en-france-proposer-un-depistage-cible-opportuniste-unique-chez-les-hommes-presentant-des-facteurs-de-risque).
4. [https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2013-02/aaa\\_fiche\\_med\\_vfinale.pdf](https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2013-02/aaa_fiche_med_vfinale.pdf).
5. Siso-Almirall A, Kostov B, Navarro Gonzalez M, et al. Abdominal aortic aneurysm screening program using hand-held ultrasound in primary healthcare. *PLoS One.* 2017;12(4):e0176877.
6. Chaikof EL, Dalman RL, Eskandari MK, et al. The Society for Vascular Surgery practice guidelines on the care of patients with an abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg.* 2018;67(1):2-77 e72.
7. Michel JB, Martin-Ventura JL, Egido J, et al. Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans. *Cardiovasc Res.* 2011;90(1):18-27.
8. Helgadottir A, Thorleifsson G, Magnusson KP, et al. The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. *Nat Genet.* 2008;40(2):217-224.
9. van de Lijstgaarden KM, Heijtsman D, Maugeri A, et al. First genetic analysis of aneurysm genes in familial and sporadic abdominal aortic aneurysm. *Hum Genet.*

- 2015;134(8):881-893.
10. Boileau C, Guo DC, Hanna N, et al. TGFB2 mutations cause familial thoracic aortic aneurysms and dissections associated with mild systemic features of Marfan syndrome. *Nat Genet.* 2012;44(8):916-921.
  11. ten Dijke P, Arthur HM. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(11):857-869.
  12. Loeys BL, Chen J, Neptune ER, et al. A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet.* 2005;37(3):275-281.
  13. Cornuz J, Sidoti Pinto C, Tevaearai H, Egger M. Risk factors for asymptomatic abdominal aortic aneurysm: systematic review and meta-analysis of population-based screening studies. *Eur J Public Health.* 2004;14(4):343-349.
  14. Li X, Zhao G, Zhang J, Duan Z, Xin S. Prevalence and trends of the abdominal aortic aneurysms epidemic in general population--a meta-analysis. *PLoS One.* 2013;8(12):e81260.
  15. Takagi H, Umemoto T, Group A. Association of Hypertension with Abdominal Aortic Aneurysm Expansion. *Ann Vasc Surg.* 2017;39:74-89.
  16. Brown LC, Powell JT. Risk factors for aneurysm rupture in patients kept under ultrasound surveillance. UK Small Aneurysm Trial Participants. *Ann Surg.* 1999;230(3):289-296; discussion 296-287.
  17. Golledge J, van Bockxmeer F, Jamrozik K, McCann M, Norman PE. Association between serum lipoproteins and abdominal aortic aneurysm. *Am J Cardiol.* 2010;105(10):1480-1484.
  18. Norman PE, Curci JA. Understanding the effects of tobacco smoke on the pathogenesis of aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(7):1473-

- 1477.
19. Kent KC, Zwolak RM, Egorova NN, et al. Analysis of risk factors for abdominal aortic aneurysm in a cohort of more than 3 million individuals. *J Vasc Surg.* 2010;52(3):539-548.
  20. Forsdahl SH, Singh K, Solberg S, Jacobsen BK. Risk factors for abdominal aortic aneurysms: a 7-year prospective study: the Tromso Study, 1994-2001. *Circulation.* 2009;119(16):2202-2208.
  21. Jamrozik K, Norman PE, Spencer CA, et al. Screening for abdominal aortic aneurysm: lessons from a population-based study. *Med J Aust.* 2000;173(7):345-350.
  22. Sweeting MJ, Thompson SG, Brown LC, Powell JT, collaborators R. Meta-analysis of individual patient data to examine factors affecting growth and rupture of small abdominal aortic aneurysms. *Br J Surg.* 2012;99(5):655-665.
  23. Villard C, Hultgren R. Abdominal aortic aneurysm: Sex differences. *Maturitas.* 2018;109:63-69.
  24. Makrygiannis G, Courtois A, Drion P, Defraigne JO, Kuivaniemi H, Sakalihan N. Sex differences in abdominal aortic aneurysm: the role of sex hormones. *Ann Vasc Surg.* 2014;28(8):1946-1958.
  25. Cho BS, Roelofs KJ, Ford JW, Henke PK, Upchurch GR, Jr. Decreased collagen and increased matrix metalloproteinase-13 in experimental abdominal aortic aneurysms in males compared with females. *Surgery.* 2010;147(2):258-267.
  26. Blanchard JF. Epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Epidemiol Rev.* 1999;21(2):207-221.
  27. Lanne T, Sonesson B, Bergqvist D, Bengtsson H, Gustafsson D. Diameter and compliance in the male human abdominal aorta: influence of age and aortic aneurysm. *Eur J Vasc Surg.* 1992;6(2):178-184.



28. Pafili K, Gouni-Berthold I, Papanas N, Mikhailidis DP. Abdominal aortic aneurysms and diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*. 2015;29(8):1330-1336.
29. De Rango P, Farchioni L, Fiorucci B, Lenti M. Diabetes and abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2014;47(3):243-261.
30. Weiss JS, Sumpio BE. Review of prevalence and outcome of vascular disease in patients with diabetes mellitus. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2006;31(2):143-150.
31. Xiong J, Wu Z, Chen C, Wei Y, Guo W. Association between diabetes and prevalence and growth rate of abdominal aortic aneurysms: A meta-analysis. *Int J Cardiol*. 2016;221:484-495.
32. Dinesh Shah A, Langenberg C, Rapsomaniki E, et al. Type 2 diabetes and incidence of a wide range of cardiovascular diseases: a cohort study in 1.9 million people. *Lancet*. 2015;385 Suppl 1:S86.
33. Lopez-de-Andres A, Jimenez-Trujillo I, Jimenez-Garcia R, et al. National trends in incidence and outcomes of abdominal aortic aneurysm among elderly type 2 diabetic and non-diabetic patients in Spain (2003-2012). *Cardiovasc Diabetol*. 2015;14:48.
34. Avdic T, Franzen S, Zarrouk M, et al. Reduced Long-Term Risk of Aortic Aneurysm and Aortic Dissection Among Individuals With Type 2 Diabetes Mellitus: A Nationwide Observational Study. *J Am Heart Assoc*. 2018;7(3).
35. Kristensen KL, Dahl M, Rasmussen LM, Lindholt JS. Glycated Hemoglobin Is Associated With the Growth Rate of Abdominal Aortic Aneurysms: A Substudy From the VIVA (Viborg Vascular) Randomized Screening Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(4):730-736.
36. Golledge J, Karan M, Moran CS, et al. Reduced expansion rate of abdominal aortic aneurysms in patients with diabetes may be related to aberrant monocyte-matrix interactions. *Eur Heart J*. 2008;29(5):665-672.

37. Takagi H, Takuya Umemoto for the AG. Association of diabetes mellitus with presence, expansion, and rupture of abdominal aortic aneurysm: "Curiouser and curiouser!" cried ALICE. *Semin Vasc Surg.* 2016;29(1-2):18-26.
38. Raffort J, Lareyre F, Clement M, Hassen-Khodja R, Chinetti G, Mallat Z. Diabetes and aortic aneurysm: current state of the art. *Cardiovasc Res.* 2018.
39. Raffort J, Lareyre F, Clement M, Mallat Z. Micro-RNAs in abdominal aortic aneurysms: insights from animal models and relevance to human disease. *Cardiovasc Res.* 2016;110(2):165-177.
40. Lu H, Rateri DL, Bruemmer D, Cassis LA, Daugherty A. Novel mechanisms of abdominal aortic aneurysms. *Curr Atheroscler Rep.* 2012;14(5):402-412.
41. Curci JA, Liao S, Huffman MD, Shapiro SD, Thompson RW. Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest.* 1998;102(11):1900-1910.
42. Mott JD, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16(5):558-564.
43. Newman KM, Ogata Y, Malon AM, et al. Identification of matrix metalloproteinases 3 (stromelysin-1) and 9 (gelatinase B) in abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb.* 1994;14(8):1315-1320.
44. Imai K, Hiramatsu A, Fukushima D, Pierschbacher MD, Okada Y. Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. *Biochem J.* 1997;322 ( Pt 3):809-814.
45. Sakalihasan N, Delvenne P, Nussgens BV, Limet R, Lapiere CM. Activated forms of MMP2 and MMP9 in abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 1996;24(1):127-133.
46. Allaire E, Forough R, Clowes M, Starcher B, Clowes AW. Local overexpression of

- TIMP-1 prevents aortic aneurysm degeneration and rupture in a rat model. *J Clin Invest.* 1998;102(7):1413-1420.
47. Knox JB, Sukhova GK, Whittemore AD, Libby P. Evidence for altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in human aortic diseases. *Circulation.* 1997;95(1):205-212.
48. Henderson EL, Geng YJ, Sukhova GK, Whittemore AD, Knox J, Libby P. Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms. *Circulation.* 1999;99(1):96-104.
49. Geng YJ, Wu Q, Muszynski M, Hansson GK, Libby P. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16(1):19-27.
50. Rizas KD, Ippagunta N, Tilson MD, 3rd. Immune cells and molecular mediators in the pathogenesis of the abdominal aortic aneurysm. *Cardiol Rev.* 2009;17(5):201-210.
51. Herron GS, Unemori E, Wong M, Rapp JH, Hibbs MH, Stoney RJ. Connective tissue proteinases and inhibitors in abdominal aortic aneurysms. Involvement of the vasa vasorum in the pathogenesis of aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb.* 1991;11(6):1667-1677.
52. Ocana E, Bohorquez JC, Perez-Requena J, Brieva JA, Rodriguez C. Characterisation of T and B lymphocytes infiltrating abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis.* 2003;170(1):39-48.
53. Rizzo RJ, McCarthy WJ, Dixit SN, et al. Collagen types and matrix protein content in human abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 1989;10(4):365-373.
54. Curci JA, Thompson RW. Adaptive cellular immunity in aortic aneurysms: cause, consequence, or context? *J Clin Invest.* 2004;114(2):168-171.
55. Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking DE, et al. Dysregulation of TGF-beta activation

- contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet.* 2003;33(3):407-411.
56. Lindsay ME, Dietz HC. Lessons on the pathogenesis of aneurysm from heritable conditions. *Nature.* 2011;473(7347):308-316.
57. Nataatmadja M, West J, West M. Overexpression of transforming growth factor-beta is associated with increased hyaluronan content and impairment of repair in Marfan syndrome aortic aneurysm. *Circulation.* 2006;114(1 Suppl):I371-377.
58. Gomez D, Al Haj Zen A, Borges LF, et al. Syndromic and non-syndromic aneurysms of the human ascending aorta share activation of the Smad2 pathway. *J Pathol.* 2009;218(1):131-142.
59. De Backer J, Renard M, Campens L, et al. Genes in Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections - Do they Matter?: Translation and Integration of Research and Modern Genetic Techniques into Daily Clinical Practice. *Aorta (Stamford).* 2013;1(2):135-145.
60. Wang Y, Ait-Oufella H, Herbin O, et al. TGF-beta activity protects against inflammatory aortic aneurysm progression and complications in angiotensin II-infused mice. *J Clin Invest.* 2010;120(2):422-432.
61. Usui F, Shirasuna K, Kimura H, et al. Inflammasome activation by mitochondrial oxidative stress in macrophages leads to the development of angiotensin II-induced aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(1):127-136.
62. Johnston WF, Salmon M, Su G, et al. Genetic and pharmacologic disruption of interleukin-1beta signaling inhibits experimental aortic aneurysm formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(2):294-304.
63. Batra R, Suh MK, Carson JS, et al. IL-1beta (Interleukin-1beta) and TNF-alpha (Tumor Necrosis Factor-alpha) Impact Abdominal Aortic Aneurysm Formation by Differential Effects on Macrophage Polarization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38(2):457-463.

64. Senemaud J, Caligiuri G, Etienne H, Delbosc S, Michel JB, Coscas R. Translational Relevance and Recent Advances of Animal Models of Abdominal Aortic Aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37(3):401-410.
65. Anidjar S, Salzman JL, Gentric D, Lagneau P, Camilleri JP, Michel JB. Elastase-induced experimental aneurysms in rats. *Circulation.* 1990;82(3):973-981.
66. Delbosc S, Rouer M, Alsac JM, et al. Elastase inhibitor AZD9668 treatment prevented progression of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2016;63(2):486-492 e481.
67. Anidjar S, Dobrin PB, Eichorst M, Graham GP, Chejfec G. Correlation of inflammatory infiltrate with the enlargement of experimental aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 1992;16(2):139-147.
68. Nchimi A, Courtois A, El Hachemi M, et al. Multimodality imaging assessment of the deleterious role of the intraluminal thrombus on the growth of abdominal aortic aneurysm in a rat model. *Eur Radiol.* 2016;26(7):2378-2386.
69. Pyo R, Lee JK, Shipley JM, et al. Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest.* 2000;105(11):1641-1649.
70. Bhamidipati CM, Mehta GS, Lu G, et al. Development of a novel murine model of aortic aneurysms using peri-adventitial elastase. *Surgery.* 2012;152(2):238-246.
71. Allaire E, Guettier C, Bruneval P, Plissonnier D, Michel JB. Cell-free arterial grafts: morphologic characteristics of aortic isografts, allografts, and xenografts in rats. *J Vasc Surg.* 1994;19(3):446-456.
72. [http://cdn.intechopen.com/pdfs/33584/InTech-Parametric\\_stochastic\\_modelling\\_of\\_uncertainties\\_in\\_the\\_mechanical\\_study\\_of\\_the\\_abdominal\\_aneurysm\\_aorta.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/33584/InTech-Parametric_stochastic_modelling_of_uncertainties_in_the_mechanical_study_of_the_abdominal_aneurysm_aorta.pdf).

73. Gertz SD, Kurgan A, Eisenberg D. Aneurysm of the rabbit common carotid artery induced by periarterial application of calcium chloride in vivo. *J Clin Invest.* 1988;81(3):649-656.
74. Freestone T, Turner RJ, Higman DJ, Lever MJ, Powell JT. Influence of hypercholesterolemia and adventitial inflammation on the development of aortic aneurysm in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(1):10-17.
75. Chiou AC, Chiu B, Pearce WH. Murine aortic aneurysm produced by periarterial application of calcium chloride. *J Surg Res.* 2001;99(2):371-376.
76. Rouer M, Meilhac O, Delbosc S, et al. A new murine model of endovascular aortic aneurysm repair. *J Vis Exp.* 2013(77):e50740.
77. Marinov GR, Marois Y, Paris E, et al. Can the infusion of elastase in the abdominal aorta of the Yucatan miniature swine consistently produce experimental aneurysms? *J Invest Surg.* 1997;10(3):129-150.
78. Lederman A, Saliture Neto FT, Ferreira R, et al. Endovascular model of abdominal aortic aneurysm induction in swine. *Vasc Med.* 2014;19(3):167-174.
79. Gertz SD, Mintz Y, Beerl R, et al. Lessons from Animal Models of Arterial Aneurysm. *Aorta (Stamford).* 2013;1(5):244-254.
80. Boudghene F, Anidjar S, Allaire E, Osborne-Pellegrin M, Bigot JM, Michel JB. Endovascular grafting in elastase-induced experimental aortic aneurysms in dogs: feasibility and preliminary results. *J Vasc Interv Radiol.* 1993;4(4):497-504.
81. Strindberg G, Nichols P, Ricci MA, et al. Experimental modifications to a canine infrarenal aortic aneurysm model for the validation of endovascular stent-grafts: an exploratory study. *J Invest Surg.* 1998;11(3):185-197.
82. Piquet P, Rolland PH, Bartoli JM, Tranier P, Moulin G, Mercier C. Tantalum-Dacron corkscrew stent for endovascular treatment of aortic aneurysms: a preliminary

- experimental study. *J Vasc Surg.* 1994;19(4):698-706.
83. Daugherty A, Manning MW, Cassis LA. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest.* 2000;105(11):1605-1612.
  84. Hahn AW, Jonas U, Buhler FR, Resink TJ. Activation of human peripheral monocytes by angiotensin II. *FEBS Lett.* 1994;347(2-3):178-180.
  85. Trachet B, Aslanidou L, Piersigilli A, et al. Angiotensin II infusion into ApoE<sup>-/-</sup> mice: a model for aortic dissection rather than abdominal aortic aneurysm? *Cardiovasc Res.* 2017;113(10):1230-1242.
  86. Hornstra IK, Birge S, Starcher B, Bailey AJ, Mecham RP, Shapiro SD. Lysyl oxidase is required for vascular and diaphragmatic development in mice. *J Biol Chem.* 2003;278(16):14387-14393.
  87. Maki JM, Rasanen J, Tikkanen H, et al. Inactivation of the lysyl oxidase gene *Lox* leads to aortic aneurysms, cardiovascular dysfunction, and perinatal death in mice. *Circulation.* 2002;106(19):2503-2509.
  88. Kagan HM, Li W. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem.* 2003;88(4):660-672.
  89. Andrews EJ, White WJ, Bullock LP. Spontaneous aortic aneurysms in blotchy mice. *Am J Pathol.* 1975;78(2):199-210.
  90. Liu S, Xie Z, Daugherty A, et al. Mineralocorticoid receptor agonists induce mouse aortic aneurysm formation and rupture in the presence of high salt. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(7):1568-1579.
  91. Blanton FS, Jr., Muller WH, Jr., Warren WD. Experimental production of dissecting aneurysms of the aorta. *Surgery.* 1959;45(1):81-90.
  92. Razavi MK, Nishimura E, Slonim S, et al. Percutaneous creation of acute type-B

- aortic dissection: an experimental model for endoluminal therapy. *J Vasc Interv Radiol*. 1998;9(4):626-632.
93. Trollope A, Moxon JV, Moran CS, Golledge J. Animal models of abdominal aortic aneurysm and their role in furthering management of human disease. *Cardiovasc Pathol*. 2011;20(2):114-123.
  94. <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>.
  95. Ernst CB. Abdominal aortic aneurysm. *N Engl J Med*. 1993;328(16):1167-1172.
  96. Loeys BL, Schwarze U, Holm T, et al. Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor. *N Engl J Med*. 2006;355(8):788-798.
  97. Bown MJ, Sutton AJ, Bell PR, Sayers RD. A meta-analysis of 50 years of ruptured abdominal aortic aneurysm repair. *Br J Surg*. 2002;89(6):714-730.
  98. Yoo YS, Park HS, Choi GH, Lee T. Recent Advances in the Development of Experimental Animal Models Mimicking Human Aortic Aneurysms. *Vasc Specialist Int*. 2015;31(1):1-10.
  99. Habashi JP, Judge DP, Holm TM, et al. Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science*. 2006;312(5770):117-121.
  100. Dai J, Michineau S, Franck G, et al. Long term stabilization of expanding aortic aneurysms by a short course of cyclosporine A through transforming growth factor-beta induction. *PLoS One*. 2011;6(12):e28903.
  101. Mallat Z, Ait-Oufella H, Tedgui A. The Pathogenic Transforming Growth Factor-beta Overdrive Hypothesis in Aortic Aneurysms and Dissections: A Mirage? *Circ Res*. 2017;120(11):1718-1720.
  102. Gillis E, Van Laer L, Loeys BL. Genetics of thoracic aortic aneurysm: at the crossroad of transforming growth factor-beta signaling and vascular smooth muscle cell contractility. *Circ Res*. 2013;113(3):327-340.



103. Wang Y, Krishna S, Walker PJ, Norman P, Golledge J. Transforming growth factor-beta and abdominal aortic aneurysms. *Cardiovasc Pathol*. 2013;22(2):126-132.
104. Li W, Li Q, Jiao Y, et al. Tgfr2 disruption in postnatal smooth muscle impairs aortic wall homeostasis. *J Clin Invest*. 2014;124(2):755-767.
105. Hu JH, Wei H, Jaffe M, et al. Postnatal Deletion of the Type II Transforming Growth Factor-beta Receptor in Smooth Muscle Cells Causes Severe Aortopathy in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(12):2647-2656.
106. Wei H, Hu JH, Angelov SN, et al. Aortopathy in a Mouse Model of Marfan Syndrome Is Not Mediated by Altered Transforming Growth Factor beta Signaling. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(1).
107. Biros E, Walker PJ, Nataatmadja M, West M, Golledge J. Downregulation of transforming growth factor, beta receptor 2 and Notch signaling pathway in human abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis*. 2012;221(2):383-386.
108. Gao F, Chambon P, Tellides G, Kong W, Zhang X, Li W. Disruption of TGF-beta signaling in smooth muscle cell prevents flow-induced vascular remodeling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;454(1):245-250.
109. Chambers JC, Loh M, Lehne B, et al. Epigenome-wide association of DNA methylation markers in peripheral blood from Indian Asians and Europeans with incident type 2 diabetes: a nested case-control study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015;3(7):526-534.
110. [https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c\\_2806295/fr/ilaris-canakinumab-inhibiteur-de-l-interleukine-1](https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2806295/fr/ilaris-canakinumab-inhibiteur-de-l-interleukine-1).
111. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med*. 2017;377(12):1119-1131.
112. [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) N.

## VII/ ANNEXES

### 1- Annexe 1 : Protocole expérimental d'induction anévrismale chez la souris C57BL/6



### REGULATED PROCEDURES STUDY PLAN

<b>STUDY PLAN No:</b>		<b>DATE: 19.03.15</b>	
<b>1. PPL No: 80/2426</b>		<b>Section E (19b) No: 9</b>	
<b>Severity Limit: Severe</b>		<b>PIL No: IAA194637</b>	
<b>2. CBR LOCATION : Phenomics</b>		<b>3. HOLDING ROOM: 161</b>	
<b>4. Contact Details:</b>			
<b>Name:</b>	<b>Tel No:</b>	<b>Out of Hours Tel No:</b>	<b>Email address:</b>
a. Fabien Lareyre	b. 07599119527	c. 07599119527	d.fabien.lareyre@gmail.com
a. Meghana Patel	b. 07711596606	c. 07711596606	d. mp510@cam.ac.uk
a. Allie Finigan	b. 01223 762582	c. 07890538035	d. af484@cam.ac.uk
<b>5. Start Date:</b>		<b>6. Expected End Date:</b>	
<b>7. Aim of this specific study (in lay terms):</b> The main aim of our study is to establish a murine model of abdominal aortic aneurysm in C57BL/6 mice using elastase with anti-TGFβ.			
<b>8. Number of Animals per group:10</b> <b>Species/strain: Mouse/ C57bl/6</b>		<b>9. Number of groups:3</b>	
<b>10. Experimental Protocol (in lay terms)- See notes below:</b>  <ol style="list-style-type: none"><li>1. Mice will undergo non-invasive blood pressure monitoring at Day -2,-1, 0, 4, 7, 14</li><li>2. Mice will also have Non-invasive echocardiography performed at day -1, 7, 14.</li><li>3. At day 0 mice will be anaesthetised with Isoflurane, A small incision site will be made on the abdomen and the aorta exposed by carefully placing of the gut to one side (gauze soaked in saline will keep the gut moist throughout procedure). The aorta will then be bathed with 10µL of inactivated elastase (group control) or Elastase from porcine pancreas for 5 minutes. Mice will then be suture.</li><li>4. The mice will then be injected i.p. anti TGF- (3 times per week) for 14 days. All mice will be checked twice daily and weighed daily to observe humane endpoints.</li><li>5. Blood samples will be collected at day 7 and 14 after the surgery.</li></ol>			

6. At day 14 the experiment will be terminated and tissue's collected.

**Provide details for the following if undertaking surgical procedures:**

- **Analgesics** Temgesic s/c twice a day on surgery day then for 5 days if required
- **Anaesthetics** Isoflurane
- **Antibiotics (If required)** Baytril in water

11. a. Are any substances being administered to the animals? YES  X  NO

b. If Yes, please state type of material and origin: anti-TGFB at 10mg/kg, Elastase

c. Is the material free of rodent pathogens? YES  X  NO NOT SCREENED

d. Do you propose to use CFA? if yes, please attach appropriate justification.

YES  NO

e. Has a Risk Assessment been carried out for this material?

YES  (see attached) NO  (Not required)

f. Are the relevant COSHH, SOP's and Risk Assessments in place for all elements of the proposed

work? YES  X NO

12. Is there a deviation from standard housing and husbandry? YES   NO X

If Yes, please state the changes:

13. Besides normal husbandry are there any activities required from the animal technicians?

YES  X NO  If Yes, please state requirements and attach any relevant documents

(e.g. score sheets, protocols): The mice will be checked twice daily. The a.m. checks will be done by CBR technicians while the p.m. checks and the daily weighing will be done by one of the study contacts.

14. a. **What are the known and potential adverse/ side effects:** After surgery it has been observed that mice exhibit hunch posture, slightly pilo-erected and sluggish for a few days, other possible adverse effects are if the incision site re-opens, in this situation, mice will be anaesthetised and the incision site closed on one occasion any additional incision site closing will be done with advice from NVS or animal will be euthanized using an approved Schedule I method.

**b. What are the humane end points:** Keep in mind that a venous cava bleeding can occur in 20% of mice. This bleeding is lethal and the mouse must be kill (Sch1 by dislocation of the neck).  $\geq 25\%$  of its body weight, hunched posture, starry coat, dehydrated, infection, reduced movement/ inactivity.

25% to 80% of mice die from aneurysm rupture during the 28 days of the experiment using this model.

**c. What is the fate of the animals: to include Schedule 1 or terminal procedure** Sch1 by CO2 and confirmation of death by ensuring that the heart has stopped beating(permanent cessation of circulation)

**15. If animals need to be culled on welfare grounds and the researcher(s) are unavailable, please describe which tissues need to be taken and how you would like them to be stored, e.g. frozen or in fixative:** Please notify study contacts in case of any emergencies. Culled mice should be put in the fridge in room 180.

**16.** I confirm that I have checked that the PPL and my PIL contain the necessary authority for all the work proposed under this study plan. I confirm that I have read and understood the Personal Licence Standard Conditions, including the requirement for appropriate supervision and declaration of competency before carrying out any regulated procedure.

**Name of person checking authority.....Allie Finigan.....Date....19.03.15.....**

**AFTER COMPLETION SEND THIS STUDY PLAN TO THE FACILITY NACWO/BIOFACILITY MANAGER**

-

**Please allow 10 working days for processing and do not start the work until it has been signed by the NACWO.**

**17. OFFICE USE ONLY**

**Date received:**

**Date returned and confirmed:**

**Study number allocated:**

**Signed by:**

## **GUIDANCE NOTES**

**No 10:** State clearly **what** and **when** something happens to a live animal.

**What** means: what kind of procedure, injection sites, volumes etc. *Do not describe detailed protocols stick to bullet points.*

**For Surgical Procedures:** animals are anaesthetised using .....( *state method*)...and the surgical procedure will take place..... (give location)..... All specifics on the surgical procedure should be in the S.O.P.

**When:** can be a date in time or a sequence order; e.g. day 0, day 6, etc. *Only mention procedures no background discussion is needed*

**No. 14:** Which clinical signs are expected and when is action needed to cull an animal in this study plan?

This is to prevent unnecessary suffering to the animal. If no adverse signs are expected (mentioned in the PPL) put down “no adverse signs”.

**No 16.** It is the responsibility of each person to check the work they intend to do is covered by the PPL, as well as their own PIL. Each person working under this Study Plan needs to fill in this section. The NACWO and NVS are not responsible for checking that the work described in this Study Plan is covered by the PPL or PIL(s).

## TGF $\beta$ (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) Blockade Induces a Human-Like Disease in a Nondissecting Mouse Model of Abdominal Aortic Aneurysm

Fabien Lareyre,\* Marc Clément,\* Juliette Raffort, Stefanie Pohlod, Meghana Patel, Bruno Esposito, Leanne Master, Alison Finigan, Marie Vandestienne, Nikolaos Stergiopoulos, Soraya Taleb, Bram Trachet, Ziad Mallat

**Objective**—Current experimental models of abdominal aortic aneurysm (AAA) do not accurately reproduce the major features of human AAA. We hypothesized that blockade of TGF $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) activity—a guardian of vascular integrity and immune homeostasis—would impair vascular healing in models of nondissecting AAA and would lead to sustained aneurysmal growth until rupture.

**Approach and Results**—Here, we test this hypothesis in the elastase-induced AAA model in mice. We analyze AAA development and progression using ultrasound in vivo, synchrotron-based ultrahigh resolution imaging ex vivo, and a combination of biological, histological, and flow cytometry-based cellular and molecular approaches in vitro. Systemic blockade of TGF $\beta$  using a monoclonal antibody induces a transition from a self-contained aortic dilatation to a model of sustained aneurysmal growth, associated with the formation of an intraluminal thrombus. AAA growth is associated with wall disruption but no medial dissection and culminates in fatal transmural aortic wall rupture. TGF $\beta$  blockade enhances leukocyte infiltration both in the aortic wall and the intraluminal thrombus and aggravates extracellular matrix degradation. Early blockade of IL-1 $\beta$  or monocyte-dependent responses substantially limits AAA severity. However, blockade of IL-1 $\beta$  after disease initiation has no effect on AAA progression to rupture.

**Conclusions**—Endogenous TGF $\beta$  activity is required for the healing of AAA. TGF $\beta$  blockade may be harnessed to generate new models of AAA with better relevance to the human disease. We expect that the new models will improve our understanding of the pathophysiology of AAA and will be useful in the identification of new therapeutic targets.

**Visual Overview**—An online visual overview is available for this article. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37:2171-2181. DOI: 10.1161/ATVBAHA.117.309999.)

**Key Words:** aneurysm ■ animals ■ humans ■ immune system ■ models

The occurrence of abdominal aortic aneurysm (AAA) is a significant cause of morbidity and mortality in Western countries. According to the UK National Health Service AAA screening program, the prevalence of AAA is 1.2% in all men at age 65 irrespective of any other risk factor.<sup>1</sup> AAA affects a much larger proportion of men >65 years of age, particularly in the presence of a family history of AAA and a positive history of smoking.<sup>1,2</sup> In contrast, a history of diabetes mellitus is associated with a strong protection against the occurrence and progression of AAA.<sup>1-3</sup>

### See accompanying editorial on page 1990

AAA is responsible for >11 000 deaths per year in the United States and has been consistently found to resist medical

treatment. Aortic wall repair through either endovascular or open surgical procedures is the only option available, with a relatively high risk of early or late morbidity and mortality.<sup>2,4</sup>

The pathophysiology of AAA is complex and associates proteolysis of the extracellular matrix (ECM), degeneration and loss of vascular smooth muscle cells (VSMCs), alteration of endothelial cells, and formation of intraluminal thrombus (ILT), along with an infiltration and activation of innate and adaptive immune cells.<sup>5</sup> The absence of resolution of those processes leads to progressive AAA growth and culminates in AAA rupture when the aortic wall is unable to sustain the hemodynamic overload. Of note, in contrast to thoracic aortic aneurysms,<sup>6</sup> medial dissection is a rare event in AAA, which

Received on: April 6, 2017; final version accepted on: August 21, 2017.

From the Division of Cardiovascular Medicine, University of Cambridge, UK (F.L., M.C., J.R., M.P., L.M., A.F., Z.M.); Université Côte d'Azur, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Institute for Research on Cancer and Aging in Nice, France (F.L., J.R.); University Hospital of Nice, France (F.L., J.R.); Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris Cardiovascular Research Center, France (B.E., M.V., S.T., Z.M.); Institute of Bioengineering, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Switzerland (S.P., N.S., B.T.); and IBItech-bioMMeda (Institute Biomedical Technology-Biofluid, Tissue and Solid Mechanics for Medical Applications), Ghent University, Belgium (N.S., B.T.).

\*These authors contributed equally to this article.

This manuscript was sent to Philip Tsao, Consulting Editor, for review by expert referees, editorial decision, and final disposition.

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://atvb.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/ATVBAHA.117.309999/-DC1>.

Correspondence to Ziad Mallat, MD, PhD, Division of Cardiovascular Medicine, University of Cambridge, Addenbrooke's Hospital, Cambridge, CB2 2QQ, UK. E-mail [zm255@medchl.cam.ac.uk](mailto:zm255@medchl.cam.ac.uk)

© 2017 American Heart Association, Inc.

*Arterioscler Thromb Vasc Biol* is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.117.309999

Nonstandard Abbreviations and Acronyms	
AAA	abdominal aortic aneurysm
ECM	extracellular matrix
ILT	intraluminal thrombus
SatM	segregated nucleus-containing atypical monocyte
TGF $\beta$	transforming growth factor- $\beta$
VSMC	vascular smooth muscle cell

rather progresses to a complete rupture of the thin aortic wall, usually at a stage of advanced aortic dilatation.<sup>7</sup>

A variety of animal models have been developed to better understand the pathophysiology of AAA. Strikingly, however, most models fail to reproduce or combine the major features of human AAA. Currently, most experimental models of AAA are performed in rodents, particularly mice, and can be divided into 2 main categories.<sup>8</sup> The first category includes models that induce medial aortic dissection rather than true aortic aneurysmal dilatation, and lead to hemorrhage into a false channel (intramural hemorrhage), which may ultimately rupture. This is the case of the angiotensin II-infusion model, initially described by the Daugherty et al<sup>9</sup> groups in mice with genetic susceptibility to hyperlipidemia and atherosclerosis,<sup>10</sup> but also models of lysyl oxidase inhibition<sup>11–13</sup> and those combining mineralocorticoid receptor activation with high salt.<sup>14</sup> Despite the many advantages of those dissecting AAA models, medial dissection is not a major feature of human AAA and is rarely an initiating event in the disease process.<sup>8</sup> Rather, most human AAAs are characterized by aneurysmal dilatation of the aorta without false channel formation and culminate in a rupture of the thin aortic wall.<sup>7</sup> The second category of experimental AAAs includes models that induce abdominal aortic dilatation without medial dissection, as is the case for the widely used elastase-induced or calcium chloride-induced AAA models.<sup>8</sup> However, those models produce moderate aortic dilatation in mice and do not induce aortic wall rupture. Finally, although leukocyte infiltration, ECM degradation, and medial degeneration are observed in almost all the abovementioned models, ILT is frequently absent. Thus, there is currently no validated AAA model in mice that reproduces and combines the major features of human AAA: sustained aneurysmal dilatation of the native aorta without false lumen formation, associating ECM degradation, medial degeneration, leukocyte infiltration, ILT formation, and culminating in transmural rupture of the thin aortic wall.

Studies on the mechanisms of aortic aneurysm and dissection have shed light on the importance of TGF $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) activity in the maintenance of aortic wall integrity. In mice, genetic disruption of TGF $\beta$  signaling in VSMCs early during the disease process promotes the development of aneurysms and dissections in the thoracic aorta.<sup>15,16</sup> Furthermore, blockade of TGF $\beta$  activity aggravates ECM degradation, medial degeneration, leukocyte infiltration, and increases the susceptibility to both thoracic and abdominal aortic dissection in mice infused with angiotensin II.<sup>17,18</sup> Finally, promotion of TGF $\beta$  activity limits the development and expansion of experimental AAAs.<sup>19</sup> Based on these observations, we hypothesized that TGF $\beta$  may be the critical factor that maintains aortic wall integrity in mouse models of nondissecting AAA (eg, elastase-induced abdominal aortic injury) and that blockade of TGF $\beta$  activity in those

settings would aggravate aneurysmal aortic dilatation, induce ILT formation, and promote aortic rupture, thereby reproducing the major features of complicated human AAA.

## Materials and Methods

Materials and Methods are available in the [online-only Data Supplement](#).

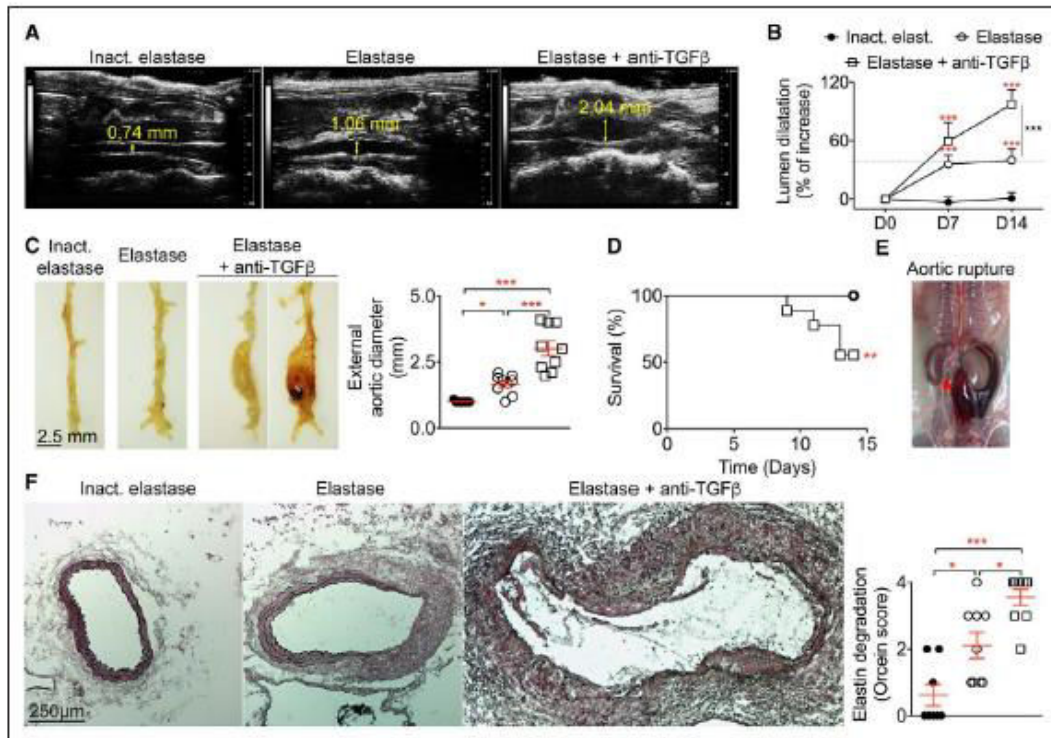
## Results

### Inhibition of TGF $\beta$ Activity Induces Abdominal Aortic Rupture After Elastase Injury

We combined topical application of elastase on the abdominal aorta<sup>20–22</sup> with systemic blockade of TGF $\beta$  activity using a neutralizing mouse monoclonal anti-TGF $\beta$ .<sup>17,18</sup> As already described,<sup>20–22</sup> periaortic elastase significantly increased aortic diameter (compared with inactive elastase) as assessed by serial *in vivo* ultrasound imaging (Figure 1A and 1B) and direct caliper measurement of the external diameter of the aorta at the time of euthanization (Figure 1C). Interestingly, although aortic dilatation did not progress after day 7 in the group receiving active elastase only (Figure 1B), concomitant inhibition of TGF $\beta$  activity dramatically reduced Smad2/3 phosphorylation (Figure 1 in the [online-only Data Supplement](#)), steadily enhanced aortic enlargement at the site of elastase application throughout the duration of the experiment (Figure 1B), and eventually led to sudden death because of aortic rupture (Figure 1D and 1E). Staining of aortic sections with Orcein revealed significantly enhanced elastin degradation in mice cotreated with elastase and anti-TGF $\beta$  (Figure 1F). These results were reproduced in hyperlipidemic *Apoe*<sup>-/-</sup> mice (Figure 1IA in the [online-only Data Supplement](#)). Systolic blood pressure was not affected by the interventions and was similar between all experimental groups (Figure 1IB in the [online-only Data Supplement](#)). Our data identify a critical role for TGF $\beta$  in preserving aortic wall integrity in response to an AAA-inducing insult. The steady increase of AAA diameter over the course of the experiment and the occurrence of AAA rupture in mice treated with anti-TGF $\beta$  antibody strongly suggest impaired resolution of the inflammatory process and altered tissue healing in the absence of TGF $\beta$  activity (below). This is further supported by our finding that TGF $\beta$  blockade initiated 14 days after periaortic elastase application—a stage of nonprogressing or resolving AAA—rapidly induced AAA destabilization and led to fatal aortic rupture (Figure 1II in the [online-only Data Supplement](#)).

### Synchrotron-Based Ultrahigh Resolution Imaging Reveals Features of Human AAA

To characterize this new mouse model of AAA rupture, we used synchrotron-based ultrahigh resolution *ex vivo* imaging on tissue samples from mice that had been euthanized at different time points and assessed in details aortic diameter, elastin degradation, adventitial thickness, and the occurrence of ILT, medial dissection, or rupture (Figures 2 and 3). The medial perimeter was highest for locations at which elastin degradation was most outspoken (Figure 2A and 2D; Figure IVA in the [online-only Data Supplement](#)). Both medial perimeter (Figure 2A through 2C) and elastin degradation (Figure 2C through 2F) were already



**Figure 1.** Blockade of TGF $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) activity in mice increases the severity of elastase-induced abdominal aortic aneurysm and induces aortic rupture. **A** and **B**, Representative ultrasound images at day 14 (D14), and quantification of lumen dilatation over time in the 3 groups ( $n=9$  per group). Two-way ANOVA and Tukey post hoc analysis. Red stars: \*\*\* $P<0.001$  D7 or D14 vs D0; Black stars: \*\*\* $P<0.001$  elastase vs elastase+anti-TGF $\beta$  at D14. **C**, Representative images and quantification of external aortic diameter (mm) by caliper at D14 ( $n=9$  per group; Kruskal-Wallis+uncorrected Dunn test). \* $P<0.05$  inactive elastase vs elastase, \*\*\* $P<0.001$  inactive elastase vs elastase+anti-TGF $\beta$  and elastase vs elastase+anti-TGF $\beta$ . **D**, Survival curve ( $n=9$  per group; log-rank, Mantel-Cox test) and representative image of aortic rupture in situ (red arrow shows the hematoma) after necropsy (**E**). \*\* $P<0.01$  elastase vs elastase+anti-TGF $\beta$ . **F**, Representative images of Orcein staining and quantification of elastin degradation at D14 ( $n=9$  per group). Kruskal-Wallis+uncorrected Dunn test; \* $P<0.05$  inactive elastase vs elastase and elastase vs elastase+anti-TGF $\beta$ , \*\*\* $P<0.001$  inactive elastase vs elastase+anti-TGF $\beta$ .

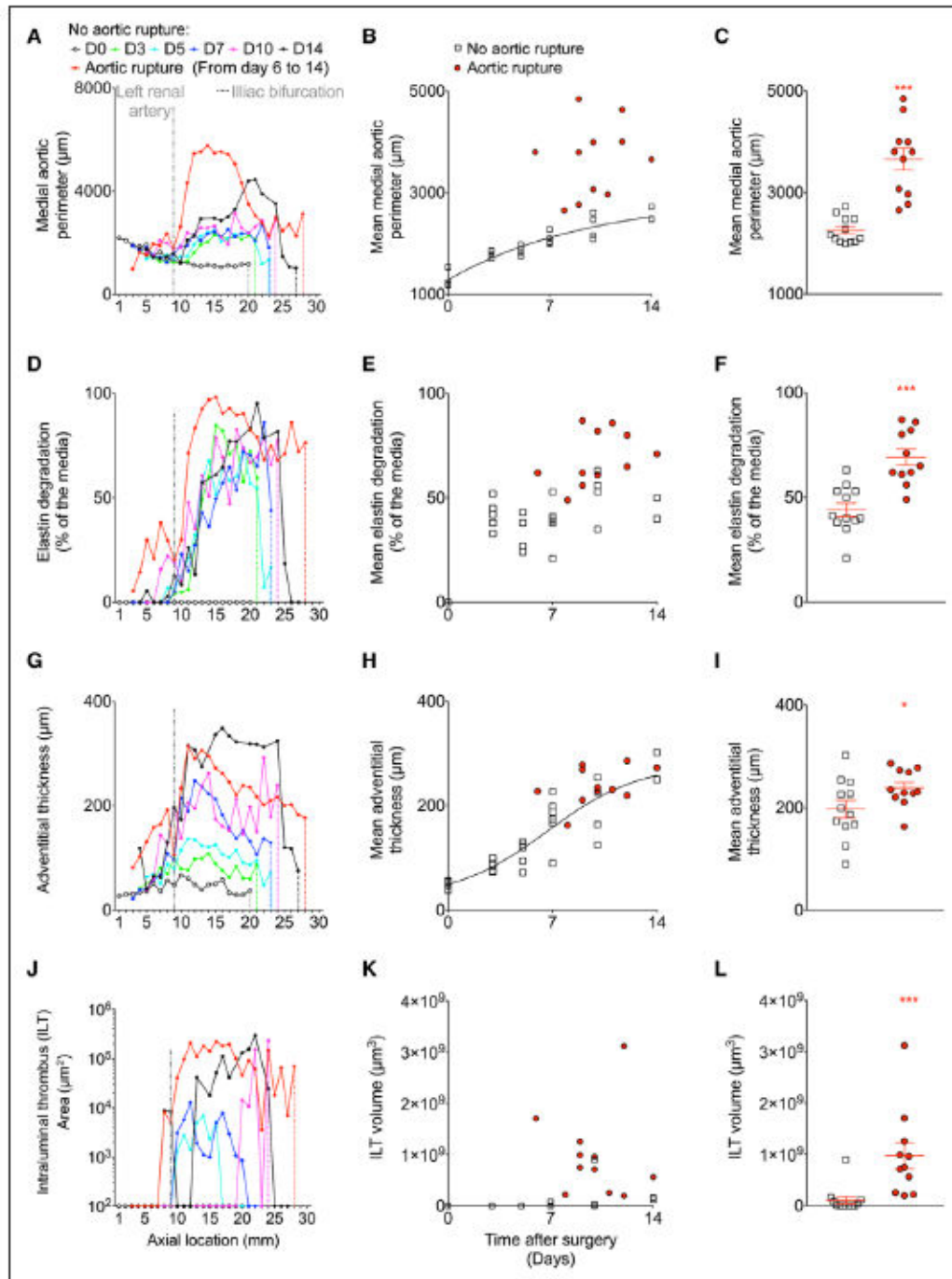
elevated 3 days after elastase application, followed by adventitial thickening (Figure 2G through 2I) and the occurrence of ILT (Figure 2J through 2L). In nonruptured AAA, elastin degradation did not change after day 3 (Figure 2D and 2E), whereas medial perimeter (Figure 2A and 2B), adventitial thickening (Figure 2G and 2H), and ILT (Figure 2J and 2K) still increased progressively at later time points. We observed that animals with ruptured AAA had substantially larger medial perimeters (Figure 2C), extensive elastin degradation (Figure 2F), and larger ILT volumes (Figure 2I) but only moderate although significant increase in adventitial thickness (Figure 2L) compared with animals with intact AAA. Synchrotron-based ultrahigh resolution analysis throughout the length of the AAA ruled out the occurrence of medial delamination/dissection and attributed fatal aortic death to complete transmural rupture of the media (Figure 3A). ILT presence was found both in the main aorta and the side branches (Figure 3A; Figure IVB and IVC in the online-only Data Supplement) and was confirmed on aortic sections (Figure 3B). ILT stained positive for platelets (anti-CD41), leukocytes (Hoechst), and fibrin/fibrinogen as shown by confocal

microscopy (Figure 3C). Platelets were also found in the aortic wall, in between the medial and adventitial layers, probably because of hemorrhage (Figure 3D).

#### Aortic Tissue Remodeling in the Elastase/Anti-TGF $\beta$ Model

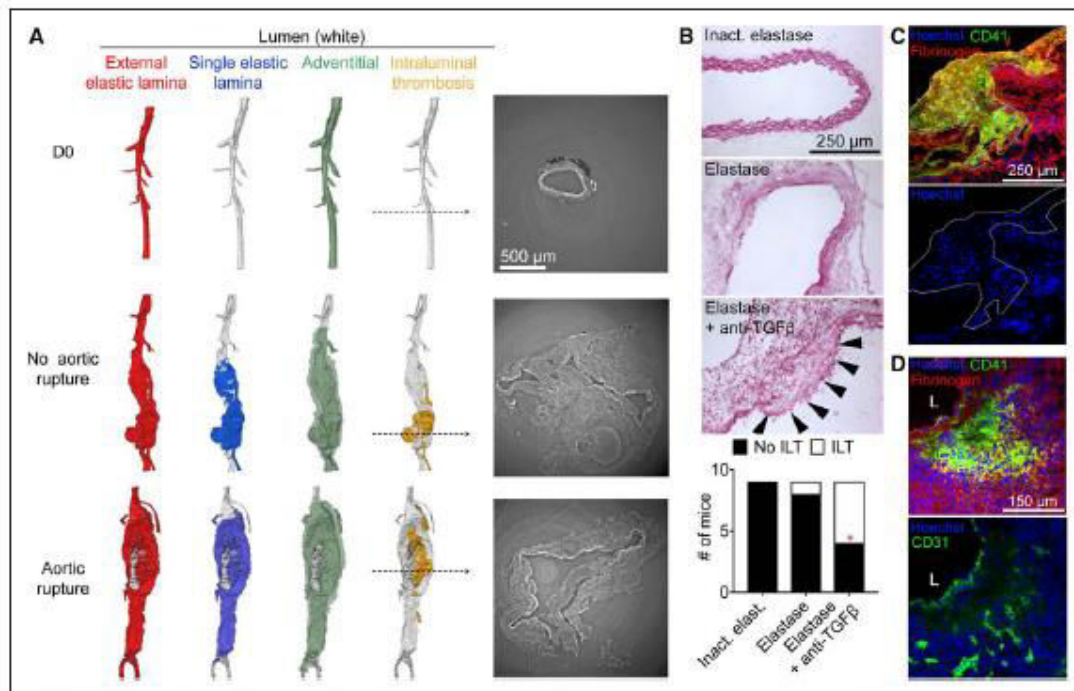
By microscopy on sections from day 14, we confirmed that the combination of elastase and anti-TGF $\beta$  significantly enhanced the accumulation of blood/iron in the aortic wall (Figure 4A) and induced profound aortic wall remodeling with smooth muscle cell loss in the media (Figure 4B), adventitial neovascularization (Figure 4B), increased accumulation of apoptotic cells (Figure 4C), as well as increased matrix metalloproteinase activity (Figure 4D) and reduced collagen content (Figure 4E), as compared with the elastase-only group. Proliferation as assessed by Ki67 staining was detected in both immune and stromal cells of vessels subjected to elastase application but was not different between elastase and elastase+anti-TGF $\beta$  groups (Figure V in the online-only Data Supplement).





**Figure 2.** Synchrotron-based analysis of elastase-induced injury in the presence of anti-TGF $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ). Digital analysis of medial aortic perimeter (A–C), elastin degradation (D–F), adventitial thickening (G–I), and intraluminal thrombosis (ILT; J–L) after synchrotron imaging. A, D, G, and J, Left dotted line represents the location of the left renal artery; right (colored) dotted lines represent the iliac bifurcation. Note that the distance between the left renal artery and the iliac bifurcation increased with the progression of abdominal aortic aneurysm. C, F, I, and L, No aortic rupture: live mice between day 7 (D7) and D14 (n=12); aortic rupture: death occurred between D6 and D14 (n=11). Mann–Whitney U test. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  no aortic rupture vs aortic rupture.

Downloaded from <http://ahajournals.org> by on August 17, 2018



**Figure 3.** Blockade of TGF $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) activity after elastase injury induces elastic degradation, adventitial remodeling, aortic rupture, and intraluminal thrombus (ILT) formation. **A**, Representative 3-dimensional segmentation and raw synchrotron pictures of a normal aorta (top row), an aneurysmal aorta (middle row), and a ruptured aneurysm (bottom row). Elastic laminae, adventitial remodeling, and ILT formation are color-coded. **B**, Representative images of ILT analysis in the 3 groups and quantification of the presence of ILT.  $\chi^2$  test; \* $P < 0.05$  elastase vs elastase+anti-TGF $\beta$ . **C**, Characterization of ILT by immunofluorescent staining showing the accumulation of platelets (CD41-green), fibrin/fibrinogen (red), and cells (Hoechst+) in the lumen side of the aortic wall. **D**, Representative picture showing the accumulation of platelets in the aortic wall and the formation of neovessels (CD31+) on serial sections.

### Inhibition of TGF $\beta$ Activity Increases Immune Cell Accumulation in the Aorta After Elastase Injury

Inflammation is another feature of AAA remodeling and rupture in humans.<sup>5</sup> Using fluorescent microscopy and flow cytometry analysis, we characterized the inflammatory infiltrate present in aortic samples at day 14. TGF $\beta$  inhibition after periaortic elastase application dramatically increased the accumulation of T cells, macrophages, and neutrophils, as compared with aortic samples treated with elastase only (Figure 5). Flow cytometry analysis suggested that macrophages were mostly derived from monocytes, given their high expression of Ly6B (Figure 5D) and that the T-cell population was composed of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells with an activated phenotype (CD69<sup>+</sup>; Figure 5D). We also noticed that, as described in human AAA, the ILT of mice treated with elastase+anti-TGF $\beta$  was rich in neutrophils (Figure 5C).

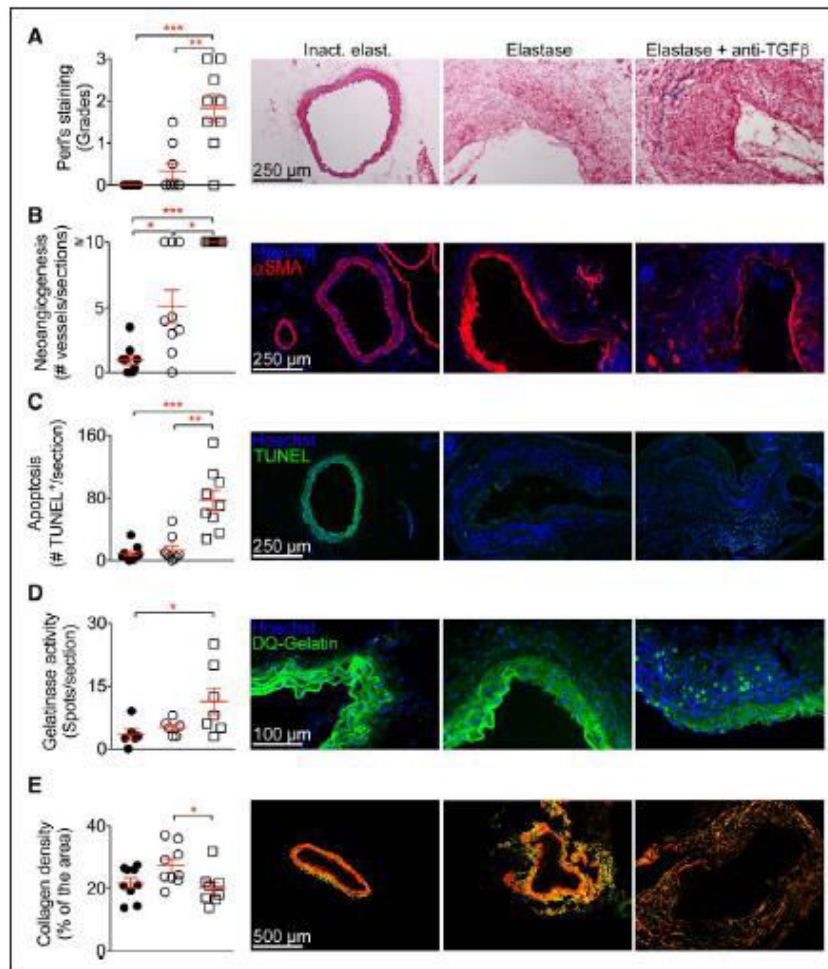
### TGF $\beta$ Blockade Limits the Accumulation of Profibrotic Segregated Atypical Monocytes

Akira et al recently identified a segregated nucleus-containing atypical monocyte (SatM) subset derived from a committed progenitor downstream of Ly6B/C-Fc $\epsilon$ R1<sup>+</sup> granulocyte/macrophage progenitors. SatM are CEACAM1<sup>+</sup>MSR1<sup>+</sup>Ly6B/C-F4/80-MAC1<sup>+</sup> monocytes that differentiate under the control

of C/EBP $\beta$ , home to injured tissues during the healing phase, and play a crucial role in tissue fibrosis.<sup>23</sup> SatM do not produce TGF $\beta$ ; however, C/EBP $\beta$  deficiency, which eliminates SatM, is associated with substantial reduction of TGF $\beta$  production.<sup>23</sup> Therefore, we tested the impact of TGF $\beta$  blockade on the accumulation of SatM after elastase injury. Interestingly, we found a substantial reduction of SatM in the bone marrow, blood, and aortic wall of mice treated with neutralizing anti-TGF $\beta$  antibody and periaortic elastase, compared with periaortic elastase only (Figure VI in the online-only Data Supplement). Our results support an important role for TGF $\beta$  in SatM homeostasis, with potentially important consequences on the healing response.

### Monocytes/Macrophages Are Necessary for the Induction of AAA Rupture After Elastase and Anti-TGF $\beta$ Treatment

Given the imbalance between inflammatory monocytes and SatM in mice treated with anti-TGF $\beta$ , we hypothesized that monocyte/macrophage depletion using clodronate liposomes would limit disease severity and reduce the occurrence of aortic rupture. Treatment with clodronate liposomes effectively depleted systemic monocytes (Figure 6A) and aortic macrophages (Figure 6B) in comparison with phosphate-buffered saline-loaded liposomes. Monocyte/macrophage depletion



**Figure 4.** Blockade of TGF $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) activity after elastase injury reproduces histological features of human abdominal aortic aneurysm. Aortic cryosections from mice at day 14 ( $n=9$  per group) after surgery were stained for iron accumulation (A, Perl staining), the presence of smooth muscle cell (SMC) to assess neovascularization and medial SMCs ( $\alpha$ SMA [smooth muscle cell actin] staining, B), apoptosis (TUNEL [terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling] staining, C), gelatinase activity (DQ-Gelatin, D), and collagen (Sirius red staining, E). Each staining was quantified in the 3 groups of mice ( $n=9$  per group). Kruskal–Wallis+uncorrected Dunn test. In A, \*\*\* $P<0.001$  inactive elastase vs elastase+anti-TGF $\beta$ , \*\* $P<0.01$  elastase vs elastase+anti-TGF $\beta$ . In B, \*\*\* $P<0.001$  inactive elastase vs elastase+anti-TGF $\beta$ , \* $P<0.05$  elastase vs elastase+anti-TGF $\beta$  and inactive elastase vs elastase. In C, \*\*\* $P<0.001$  inactive elastase vs elastase+anti-TGF $\beta$ , \*\* $P<0.01$  elastase vs elastase+anti-TGF $\beta$ . In D, \* $P<0.05$  inactive elastase vs elastase+anti-TGF $\beta$ . In E, \* $P<0.05$  elastase vs elastase+anti-TGF $\beta$ .

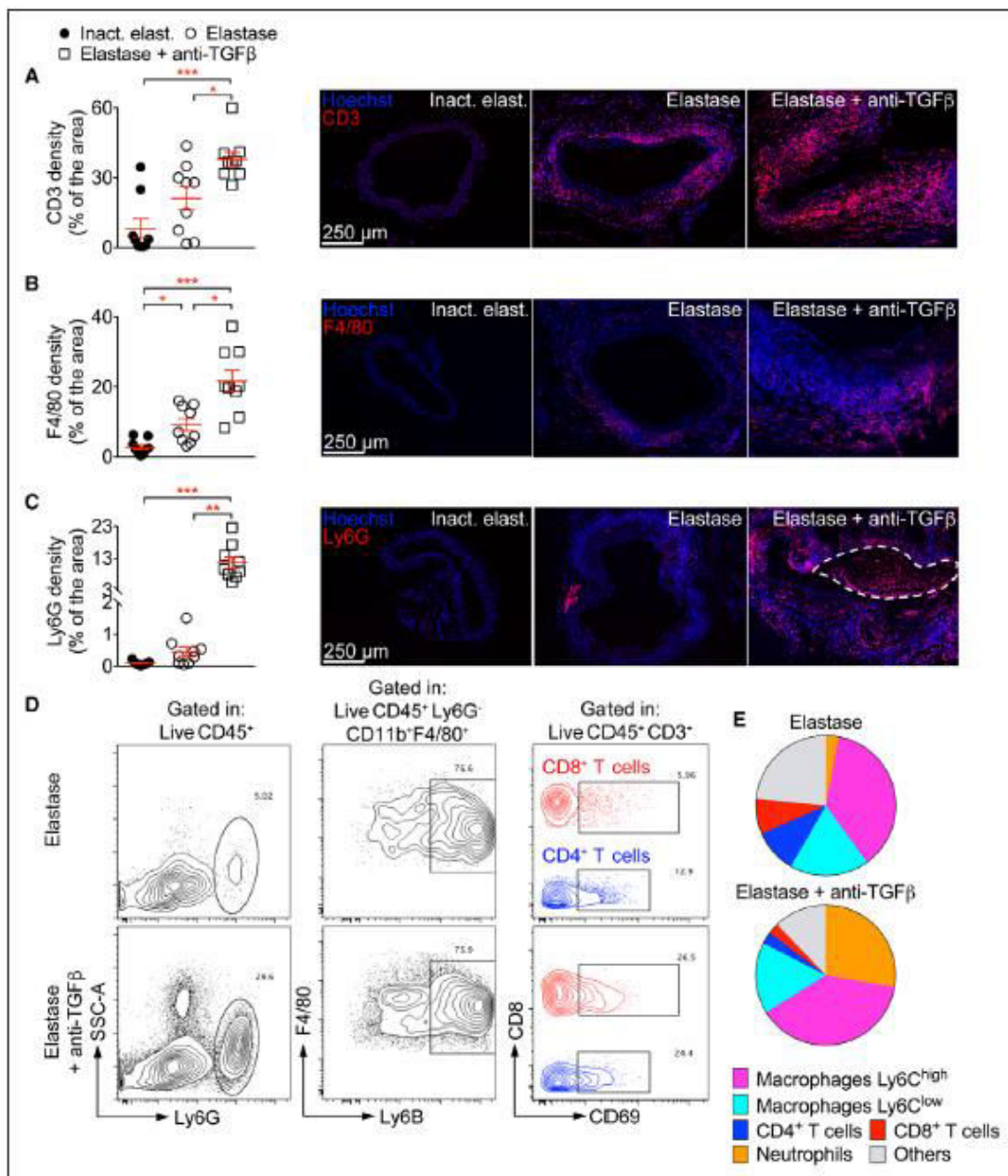
did not abrogate aneurysm development (Figure 6C) but led to a marked reduction of AAA severity (Figure 6C) and completely protected against AAA rupture (Figure 6D). This was associated with a significant reduction of elastin degradation (Figure 6E) and increased collagen content (Figure 6F).

#### Role of IL-1 $\beta$ in the Initiation Versus Progression of AAA

To gain more insight into the inflammatory response, we analyzed mRNA expression of cytokines (by quantitative polymerase chain reaction) in the aortic tissue and found that both proinflammatory (tumor necrosis factor, interleukin [IL]-6, IL-1 $\beta$ , and CXCL1) and anti-inflammatory (TGF $\beta$  and IL-10) cytokines were

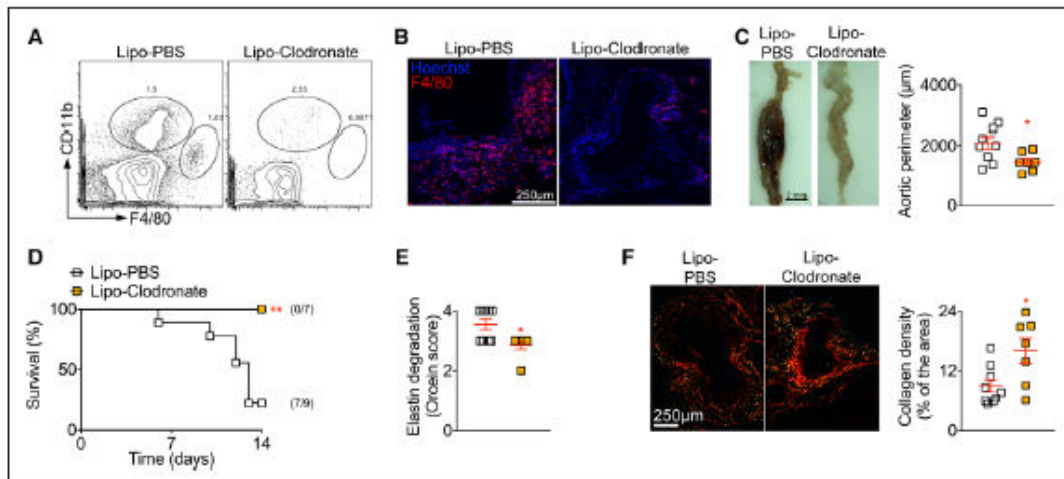
induced after elastase injury (Figure VII in the online-only Data Supplement). Tumor necrosis factor, IL-1 $\beta$ , and CXCL1 reached high levels at day 7, but their expression was attenuated at day 14. IL-6 expression showed a late increase between day 7 and day 14. IL-10 and TGF $\beta$  increased at day 7, with variable expression of IL-10 at day 14. TGF $\beta$  blockade on top of elastase application led to sustained elevations and higher levels of IL-1 $\beta$ , CXCL1, and IL-6 at day 14 after aortic injury but did not alter tumor necrosis factor and IL-10 expression. We also detected a slightly higher aortic TGF $\beta$  expression in the elastase+anti-TGF $\beta$  at day 14, compared with the elastase-only group.

The kinetics of IL-1 $\beta$  expression in the aortic wall suggested a differential effect in the initiation versus progression



Downloaded from <http://ahajournals.org> by on August 17, 2018

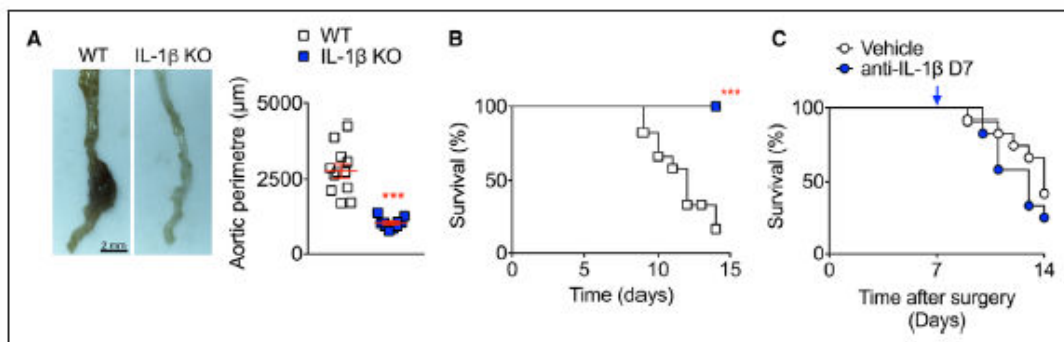
**Figure 5.** Blockade of TGFβ (transforming growth factor-β) activity sustains elastase-induced inflammation in the aorta. Aortic cryo-sections from mice at day 14 (n=9 per group) after surgery were stained for T cells (A), macrophages (B), and neutrophils (C). A-C, Quantifications are shown at day 14 (n=9 per group). Kruskal-Wallis+uncorrected Dunn test. In C, the dotted line circles the intraluminal thrombus. D and E, Flow analysis of aortic CD45<sup>+</sup> cells at day 14 (n=4 per group). Representative flow chart showing neutrophils, macrophages, and T-cell analysis in the aorta of mice treated with elastase or elastase+anti-TGFβ (D), and distribution of immune cells in the aorta of each group (E). In A, \*\*\*P<0.001 inactive elastase vs elastase+anti-TGFβ, \*P<0.05 elastase vs elastase+anti-TGFβ. In B, \*\*\*P<0.001 inactive elastase vs elastase+anti-TGFβ, \*P<0.05 elastase vs elastase+anti-TGFβ and inactive elastase vs elastase. In C, \*\*\*P<0.001 inactive elastase vs elastase+anti-TGFβ, \*\*P<0.01 elastase vs elastase+anti-TGFβ.



**Figure 6.** Depletion of monocytes/macrophages using clodronate liposomes in mice treated with elastase+anti-TGF $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) prevents aortic rupture. **A**, Representative flow data of macrophages in the spleen 5 d after liposome injection ( $n=5$  per group). **B**, Representative immunofluorescent staining of macrophages in the aorta on day 14 after surgery ( $n=7-9$  per group). **C**, Representative macroscopic picture and quantification of aortic perimeter of aorta at day 14 after surgery ( $n=7-9$  per group). Mann-Whitney  $U$  test.  $^{*}P<0.05$  liposome-phosphate-buffered saline (PBS) vs liposome-clodronate. **D**, Survival curves of mice injected with liposomes ( $n=7-9$  mice per group). Log-rank, Mantel-Cox test.  $^{**}P<0.01$  liposome-PBS vs liposome-clodronate. **E** and **F**, Analysis of elastin and collagen degradation using Orcein staining (**E**) and Sirius red (**F**), respectively. Mann-Whitney  $U$  test ( $n=7-9$  mice per group). In **E** and **F**,  $^{*}P<0.05$  liposome-PBS vs liposome-clodronate.

of AAA. To directly assess the implication of IL-1 $\beta$  in aortic dilatation and rupture, we compared IL-1 $\beta$  knockout (KO) and wild-type mice. We confirmed the absence of IL-1 $\beta$  in the plasma of IL-1 $\beta$  KO mice and found that CXCL1 and IL-10 were also significantly reduced, suggesting a role for IL-1 $\beta$  in the production of these cytokines (Figure VIII A in the online-only Data Supplement). At day 5 after injury, IL-1 $\beta$  KO mice showed a reduction of circulating neutrophils (Figure VIII B in the online-only Data Supplement), in accordance with the reduction of plasma CXCL1 levels. As compared with wild-type mice, IL-1 $\beta$  KO mice showed a marked protection against aortic dilatation (Figure 7A) and were totally protected against AAA rupture induced by

elastase and anti-TGF $\beta$  treatment (Figure 7B). Moreover, the injury induced by elastase and TGF $\beta$  blockade was dramatically reduced in IL-1 $\beta$  KO mice (Figure VIII C through VIII F in the online-only Data Supplement). To address the role of IL-1 $\beta$  in the progression and complications of established AAA, we used a mouse monoclonal anti-mouse IL-1 $\beta$  antibody. The antibody significantly blocked the induction of CXCL1 by VSMCs in response to recombinant IL-1 $\beta$  in vitro (Figure IX A in the online-only Data Supplement) and significantly reduced plasma levels of CXCL1 and IL-6 in vivo while impairing IL-1 $\beta$  clearance (Figure IX B in the online-only Data Supplement). Importantly, however, neutralization of IL-1 $\beta$  with this monoclonal anti-IL-1 $\beta$



**Figure 7.** Blocking IL-1 $\beta$  does not prevent aortic rupture of established abdominal aortic aneurysm. **A**, Representative macroscopic picture and quantification of aortic perimeter of aorta at day 14 after surgery ( $n=10-12$  per group). Mann-Whitney  $U$  test. **B**, Survival curves of mice ( $n=10-12$  per group). Log-rank, Mantel-Cox test. **C**, Wild-type (WT) mice were injected (or not) on day 7 with a neutralizing mouse anti-mouse IL-1 $\beta$  antibody. Injections were repeated on days 9 and 11. Survival curves of mice ( $n=12$  per group). Log-rank, Mantel-Cox test. In **A** and **B**,  $^{***}P<0.001$  WT vs IL-1 $\beta$  knockout (KO).

Downloaded from http://ahajournals.org by on August 17, 2018

antibody starting at day 7 after elastase+anti-TGF $\beta$  did not limit the progression of established AAA toward fatal rupture (Figure 7C). Taken together, our data indicate that IL-1 $\beta$  is important for the initiation of AAA but is dispensable for the progression and complications of established AAA.

### Discussion

Major features of human AAA include ECM degradation, medial smooth muscle cell loss and degeneration, infiltration and activation of immune cells, ILT formation, progressive aortic dilatation in the absence of medial dissection, and finally aortic wall rupture. It is noteworthy that despite the variety of experimental models of AAA, none has been reported to combine the major features of human AAA. Most models either induce early medial dissection, not transmural aortic wall rupture, or lead to self-contained aortic dilatation. Furthermore, most models do not induce ILT formation. A rare occurrence of aortic rupture has been reported in elastase-induced AAA in rats, not mice, but those rare ruptures occur early after elastase application and are because of an overactive exogenous elastase rather than a progressive aneurysmal aortic disease that culminates in aortic wall rupture. Recently, Lu et al<sup>22</sup> reported the development of a chronic model of AAA in mice after a combination of periaortic elastase application and continuous oral administration of the lysyl oxidase inhibitor BAPN (beta-aminopropionitrile). AAA development in that model was associated with thrombus formation and spontaneous rupture. Despite those interesting human-like aneurysm features, the authors provided no evidence for the absence of medial dissection, and there was no evidence that the few late ruptures had arisen from the aortic wall itself; in fact, some deaths were attributed to rupture or dissection of small arteries.<sup>22</sup> Moreover, BAPN is known to induce medial dissections, not transmural ruptures, which lead to intraluminal, not intraluminal, hemorrhage and thrombus formation.<sup>11-13</sup>

In contrast to previous models, the AAA model we describe here in detail associates all the major features of human AAA and is potentially of great interest to our understanding of the pathophysiology of AAA development, progression, and complications.

It is remarkable to observe that the transition from a model inducing a self-contained aortic dilatation to a human-like model of sustained aneurysmal growth culminating in rupture is because of the blockade of a single cytokine, TGF $\beta$ . This supports a critical role of TGF $\beta$  signaling in the maintenance of aortic wall integrity and the protection against AAA progression and complications. Mutations in the TGF $\beta$  signaling pathway are responsible for severe forms of thoracic aortic aneurysms and dissections in humans,<sup>24</sup> and some studies reported associations between single-nucleotide polymorphisms in the TGF $\beta$  signaling components and AAA.<sup>25</sup> Moreover, human AAA biopsies frequently show loss of 1 copy of TGF $\beta$  receptor type 2 exon 8 in association with a substantial reduction of gene expression, suggesting an acquired impairment in the TGF $\beta$  pathway and local downregulation of TGF $\beta$  signaling.<sup>26</sup> The major sources of TGF $\beta$  during AAA development remain to be identified. Immune cells, VSMCs, (myo)fibroblasts, and platelets may all contribute to TGF $\beta$  production.

How does TGF $\beta$  activity control AAA dilatation and propensity to rupture? TGF $\beta$  is well known to control major

biological processes involved in AAA, including ECM remodeling, VSMC survival and proliferation, and the activation of the immuno-inflammatory response.<sup>25</sup> We show here that at least some of the protective effect occurs through the control of the innate immune response and more particularly, the balance between inflammatory monocytes/macrophages and profibrotic SatM. The specific role of the latter monocyte subset will require further investigation. Moreover, other innate immune cells like neutrophils, or adaptive immune cells like T cells, may cooperate with monocytes/macrophages and probably contribute to the process. Note that our study does not exclude a role for TGF $\beta$  activity in vascular cells and (myo) fibroblasts. However, deletion of TGF $\beta$  receptor signaling in VSMC did not lead to aggravation of AAA after elastase application in mice.<sup>27</sup> The latter result is surprising given the major role of VSMC-restricted TGF $\beta$  signaling in the protection against thoracic aortic aneurysms.<sup>15,16,28</sup>

Our study identifies IL-1 $\beta$  as an important cytokine involved in the prevention of AAA development, which is an agreement with previous studies performed in less-severe models of the disease.<sup>29</sup> Surprisingly, however, IL-1 $\beta$  blockade did not affect the progression of established AAA toward rupture, suggesting a limited role (if any) of IL-1 $\beta$  in advanced stages of the disease. The role of IL-1 pathway in human AAA is not well understood. Genetic upregulation of IL-1 receptor antagonist in humans is associated with increased, not reduced, susceptibility to AAA.<sup>30</sup> Moreover, a recent placebo-controlled randomized trial failed to show any benefit of canakinumab (a neutralizing monoclonal anti-IL-1 $\beta$  antibody) on AAA progression in patients with small AAAs (between 40 and 50 mm; clinicaltrials.gov, NCT02007252). The trial included a limited number of patients in each group (31 Canakinumab and 33 placebo), and only 2 of 3 patients completed the 12-month treatment period. These unexpected human data are in disagreement with previous mouse data that suggested a detrimental role for IL-1 signaling in the progression of AAA, using the elastase model.<sup>29</sup> However, they seem to be in agreement with our findings of a limited role of IL-1 $\beta$  in established AAA, using the present elastase+anti-TGF $\beta$  model, further highlighting the clinical translational relevance of this new mouse model.

Another important point to consider is the chronicity and sustainability of AAA development and growth over time. Most available experimental models of nondissecting AAA induce a development of AAA for 7 days and are rapidly self-contained with no or little AAA progression thereafter; in fact, they tend to heal with time in the absence of sustained injury. The elastase+BAPN model described recently allows the development of a chronic aortic aneurysm and is worth of further consideration.<sup>22</sup> However, there is no solid evidence yet that it is not driven by early medial dissection or that sudden death is because of true aortic wall rupture. In this context, our identification of TGF $\beta$  as a critical mediator of AAA healing is likely to open new avenues for the development of chronic models of nondissecting AAA characterized by an impaired healing process and sustained growth, until aortic rupture. Our current elastase/anti-TGF $\beta$  model produces a human-like AAA and a high percentage of AAA rupture within 14 days. We think that this model can be adapted to produce a nonresolving inflammation that will sustain AAA

growth for a longer period, for example, through controlled blockade of TGF $\beta$  over time (varying the frequency and dose of anti-TGF $\beta$ ), better mimicking the progression of human AAA. It is expected that in such a chronic smoldering model, the pathogenic mechanisms of AAA growth may differ from our current understanding of disease pathogenesis.

Finally, the new model described here may be useful to address the role of specific features of AAA, for example, ILT formation in AAA progression and susceptibility to rupture. Moreover, it will be interesting to examine whether blockade of TGF $\beta$  activity may be useful in promoting features of human-like AAA in other experimental models, like the CaCl<sub>2</sub> model.

In conclusion, we have shown that current experimental mouse models of AAA can be improved to better reproduce major features of human AAA and may be harnessed to predict response to therapy in the human disease setting. We expect that optimized models will provide a better understanding of the pathophysiology of AAA and will be useful to identify and test new and relevant therapeutic targets.

### Acknowledgments

We gratefully acknowledge the assistance of the Department of Clinical Biochemistry, University of Cambridge, for the analysis of serum biochemical parameters and the Department of Medicine Phenotyping hub, University of Cambridge, for assistance with flow cytometry. We thank Dr Yoichiro Iwakura (Center for Experimental Medicine, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan) for providing the IL-1 $\beta$ -deficient mice.

### Sources of Funding

This work was supported by the British Heart Foundation and the European Research Council (to Dr Mallat).

### Disclosures

None.

### References

- Jacomelli J, Summers L, Stevenson A, Leos T, Earnshaw JJ. Impact of the first 5 years of a national abdominal aortic aneurysm screening programme. *Br J Surg*. 2016;103:1125–1131. doi: 10.1002/bjs.10173.
- Moll FL, Powell JT, Fraedrich G, Verzini F, Haulon S, Waltham M, van Herwaarden JA, Holt PJ, van Keulen JW, Rantner B, Schlösser FJ, Setacci F, Ricco JB; European Society for Vascular Surgery. Management of abdominal aortic aneurysms clinical practice guidelines of the European society for vascular surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2011;41(suppl 1):S1–S58. doi: 10.1016/j.ejvs.2010.09.011.
- Brady AR, Thompson SG, Fowkes FG, Greenhalgh RM, Powell JT; UK Small Aneurysm Trial Participants. Abdominal aortic aneurysm expansion: risk factors and time intervals for surveillance. *Circulation*. 2004;110:16–21. doi: 10.1161/01.CIR.0000133279.07468.9F.
- Patel R, Sweeting MJ, Powell JT, Greenhalgh RM; EVAR Trial Investigators. Endovascular versus open repair of abdominal aortic aneurysm in 15-years' follow-up of the UK endovascular aneurysm repair trial 1 (EVAR trial 1): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2016;388:2366–2374. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31135-7.
- Nordon IM, Hinchliffe RJ, Loftus IM, Thompson MM. Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8:92–102. doi: 10.1038/nrcardio.2010.180.
- Nienaber CA, Clough RE. Management of acute aortic dissection. *Lancet*. 2015;385:800–811. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61005-9.
- Sakalihasan N, Limet R, Defawe OD. Abdominal aortic aneurysm. *Lancet*. 2005;365:1577–1589. doi: 10.1016/S0140-6736(05)66459-8.
- Sénémaud J, Caligiuri G, Hétiene H, Delbosc S, Michel JB, Coscas R. Translational relevance and recent advances of animal models of abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37:401–410. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.308534.
- Daugherty A, Manning MW, Cassis LA. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest*. 2000;105:1605–1612. doi: 10.1172/JCI7818.
- Trachet B, Fraga-Silva RA, Piersigilli A, Tedgui A, Sordet-Dessimoz J, Astolfo A, Van der Donck C, Modregger P, Stamparoni MF, Segers P, Stergiopoulos N. Dissecting abdominal aortic aneurysm in ang II-infused mice: suprarenal branch ruptures and apparent luminal dilatation. *Cardiovasc Res*. 2015;105:213–222. doi: 10.1093/cvr/cvu257.
- Kurihara T, Shimizu-Hirota R, Shimoda M, Adachi T, Shimizu H, Weiss SJ, Itoh H, Hori S, Aikawa N, Okada Y. Neutrophil-derived matrix metalloproteinase 9 triggers acute aortic dissection. *Circulation*. 2012;126:3070–3080. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.097097.
- Jia LX, Zhang WM, Zhang HJ, Li TT, Wang YL, Qin YW, Gu H, Du J. Mechanical stretch-induced endoplasmic reticulum stress, apoptosis and inflammation contribute to thoracic aortic aneurysm and dissection. *J Pathol*. 2015;236:373–383. doi: 10.1002/path.4534.
- Ren W, Liu Y, Wang X, Jia L, Piao C, Lan F, Du J.  $\beta$ -Aminopropionitrile monofumarate induces thoracic aortic dissection in C57BL/6 mice. *Sci Rep*. 2016;6:28149. doi: 10.1038/srep28149.
- Liu S, Xie Z, Daugherty A, Cassis LA, Pearson KJ, Gong MC, Guo Z. Mineralocorticoid receptor agonists induce mouse aortic aneurysm formation and rupture in the presence of high salt. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:1568–1579. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300820.
- Li W, Li Q, Jiao Y, Qin L, Ali R, Zhou J, Ferruzzi J, Kim RW, Geirsson A, Dietz HC, Offermanns S, Humphrey JD, Tellides G. Tgfb2 disruption in postnatal smooth muscle impairs aortic wall homeostasis. *J Clin Invest*. 2014;124:755–767. doi: 10.1172/JCI69942.
- Hu JH, Wei H, Jaffe M, Airhart N, Du L, Angelov SN, Yan J, Allen JK, Kang I, Wight TN, Fox K, Smith A, Einstrom R, Dichek DA. Postnatal deletion of the type II transforming growth factor- $\beta$  receptor in smooth muscle cells causes severe aortopathy in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:2647–2656. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.306573.
- Wang Y, Ait-Oufella H, Herbin O, Bonnin P, Ramkhalawon B, Taleb S, Huang J, Offenstadt G, Combadère C, Rénaux L, Johnson JL, Tharaux PL, Tedgui A, Mallat Z. TGF- $\beta$  activity protects against inflammatory aortic aneurysm progression and complications in angiotensin II-infused mice. *J Clin Invest*. 2010;120:422–432. doi: 10.1172/JCI38136.
- Chen X, Rateri DL, Howatt DA, Balakrishnan A, Moorleggen JJ, Cassis LA, Daugherty A. TGF- $\beta$  neutralization enhances angII-induced aortic rupture and aneurysm in both thoracic and abdominal regions. *PLoS One*. 2016;11:e0153811. doi: 10.1371/journal.pone.0153811.
- Dai J, Losy F, Guinault AM, Pages C, Anegón I, Desgranges P, Becquemin JP, Allaire E. Overexpression of transforming growth factor- $\beta$ 1 stabilizes already-formed aortic aneurysms: a first approach to induction of functional healing by endovascular gene therapy. *Circulation*. 2005;112:1008–1015. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.523357.
- Bhamidipati CM, Mehta GS, Lu G, Mochle CW, Barbary C, DiMusto PD, Laser A, Kron IL, Upchurch GR Jr, Ailawadi G. Development of a novel murine model of aortic aneurysms using peri-adventitial elastase. *Surgery*. 2012;152:238–246. doi: 10.1016/j.surg.2012.02.010.
- Busch A, Holm A, Wagner N, Ergün S, Rosenfeld M, Otto C, Baur J, Kellersmann R, Lorenz U. Extra- and intraluminal elastase induce morphologically distinct abdominal aortic aneurysms in mice and thus represent specific subtypes of human disease. *J Vasc Res*. 2016;53:49–57. doi: 10.1159/000447263.
- Lu G, Su G, Davis JP, Schaboen B, Downs E, Roy RJ, Ailawadi G, Upchurch GR Jr. A novel chronic advanced stage abdominal aortic aneurysm murine model. *J Vasc Surg*. 2017;66:232–242.e4. doi: 10.1016/j.jvs.2016.07.105.
- Satoh T, Nakagawa K, Sugihara F, Kuwahara R, Ashihara M, Yamane F, Minowa Y, Fukushima K, Ebina I, Yoshioka Y, Kumanooh A, Akira S. Identification of an atypical monocyte and committed progenitor involved in fibrosis. *Nature*. 2017;541:96–101. doi: 10.1038/nature20611.
- Gillis E, Van Laer L, Loeys BL. Genetics of thoracic aortic aneurysm: at the crossroad of transforming growth factor- $\beta$  signaling and vascular smooth muscle cell contractility. *Circ Res*. 2013;113:327–340. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.300675.
- Wang Y, Krishna S, Walker PJ, Norman P, Gollidge J. Transforming growth factor- $\beta$  and abdominal aortic aneurysms. *Cardiovasc Pathol*. 2013;22:126–132. doi: 10.1016/j.carpath.2012.07.005.
- Biros E, Walker PJ, Nataatmadja M, West M, Gollidge J. Downregulation of transforming growth factor, beta receptor 2 and Notch signaling pathway

- in human abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis*. 2012;221:383–386. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.01.004.
27. Gao F, Chambon P, Offermanns S, Tellides G, Kong W, Zhang X, Li W. Disruption of TGF- $\beta$  signaling in smooth muscle cell prevents elastase-induced abdominal aortic aneurysm. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;454:137–143. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.10.053.
28. Wei H, Hu JH, Angelov SN, Fox K, Yan J, Enstrom R, Smith A, Dichek DA. Aortopathy in a mouse model of Marfan syndrome is not mediated by altered transforming growth factor beta signaling. *J Am Heart Assoc*. 2017;6:pii: e004968. doi: 10.1161/JAHA.116.004968.
29. Johnston WF, Salmon M, Su G, Lu G, Stone ML, Zhao Y, Owens GK, Upchurch GR Jr, Ailawadi G. Genetic and pharmacologic disruption of interleukin-1 $\beta$  signaling inhibits experimental aortic aneurysm formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:294–304. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300432.
30. Chambers JC, Leh M, Lehne B, et al. Epigenome-wide association of DNA methylation markers in peripheral blood from Indian Asians and Europeans with incident type 2 diabetes: a nested case-control study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015;3:526–534. doi: 10.1016/S2213-8587(15)00127-8.

### Highlights

- Endogenous TGF $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) activity is required for the healing of abdominal aortic aneurysm (AAA).
- Systemic blockade of TGF $\beta$  in the elastase-AAA model in mice induces a transition from a self-contained aortic dilatation to a model of sustained aneurysmal growth, associated with the formation of an intraluminal thrombus, and culminates in fatal transmural aortic wall rupture.
- Early blockade of IL1 $\beta$  limits AAA severity. However, blockade of IL1 $\beta$  after disease initiation has no effect on AAA progression to rupture.
- TGF $\beta$  blockade may be harnessed to generate new models of AAA with better relevance to the human disease.



## **SUPPLEMENTAL MATERIAL**

Lareyre et al., TGF $\beta$  blockade induces a human-like disease in a non-dissecting mouse model of abdominal aortic aneurysm

## Material and Methods

### *Mice and procedures*

C57Bl/6J male mice (6-8 week old) from Charles River UK, *ApoE*<sup>-/-</sup> mice were originally from Charles River, UK. IL-1 $\beta$  deficient were kindly provided by Yoichiro Iwakura, Japan<sup>1</sup>. Animal experiments were approved by the Home Office, UK, and were performed under PPL PA4BDF775.

The topical application of elastase on the abdominal aorta was done as previously described<sup>2-4</sup>. The solution of pancreatic porcine elastase (Sigma, Type I,  $\geq 4.0$  units/mg protein) was filtered through a 0.22  $\mu$ m filter before the experiment. Mice were injected 3 time/week with 250  $\mu$ g of the mouse anti-mouse TGF $\beta$  (BioXcell, clone 1D11.16.8) i.p. starting on the day of the surgery, or 14 days after surgery.

For monocyte/macrophage depletion, 150  $\mu$ l of liposome solution (PBS or clodronate) were injected i.v. in the tail vein the day before the surgery. Injections were repeated i.p. on day 5 and day 10.

To block IL-1 $\beta$  mice were injected with 150  $\mu$ g of mouse anti-mouse IL-1 $\beta$  (Invivogen, clone 7E3) on day 7, 9, and 11.

Blood was taken using EDTA (50  $\mu$ l of 0.5 mM for 500  $\mu$ l of blood) filled syringe by intracardiac puncture.

Harvested tissues were incubated in 4 % PFA overnight and then kept in PBS, at 4°C, for further analysis. Macroscopic aneurysm severity was adapted from previous reports<sup>5,6</sup>.

### *Blood pressure*

Non-invasive blood pressure monitoring using tail cuff was done using Visitech BP-2000. Mice were trained for blood pressure 2 days prior to taking readings. Blood pressures were measured before surgery and later at day 4, 7, and 14 during the study.

### *AAA assessment using ultrasound imaging in vivo*

We used Vevo 2100 ultrasound imager (VisualSonics) equipped with MS550D 22–55 MHz transducer. During imaging, each mouse was anesthetized with 2% isoflurane administered through an adapted nose cone. The mouse was then placed in a supine position on a heated platform to maintain its body temperature at approximately 37°C. The hair over the areas being imaged was removed with a depilatory cream. Degassed ultrasound gel was used as a coupling medium. The ultrasound device was placed on the abdomen of the mouse. Sagittal images at the level of the maximal dilatation of the aneurysmal portion of the abdominal aorta were acquired in B-mode to assess maximum cross-sectional diameter.

### *Synchrotron-based ultra-high resolution imaging*

The samples were measured at the TOMCAT beamline of the Swiss Light Source at the Paul Scherrer Institut (Villigen, Switzerland). The scans were performed exploiting the phase-contrast enhancement that was produced after positioning our detector at a certain distance from the measured sample, also known as propagation based phase contrast<sup>7</sup>. This image modality applied at TOMCAT provides an edge enhancement that is crucial to distinguish features with low density contrast. In order to produce the aforementioned phase contrast, the detector was positioned 250 mm from the

sample. TOMCAT was operated at an X-ray photon energy of 21.8 keV with an effective pixel size of 1.625. The number of projections acquired for the performed tomographic scans was 1501 and the exposure time for each of them was 80 milliseconds. Thus, the total sample exposure time was approximately of two minutes covering a field of view of  $3.5 \times 4 \text{ mm}^2$ . All samples were scanned with a 180 degrees scan except for one sample that was too large to fit in the field-of-view, and was therefore scanned with a 360 degree scan (which approximately doubles the field-of-view). The phase retrieval was performed following the algorithm described previously<sup>8</sup> which inverts the transport-of-intensity equations fixing the ratio  $\delta/\beta=217$ , where  $\delta$  and  $\beta$  are real number which describe the index of refraction of the imaged material  $n$ , given by  $n=1-\delta+j\beta$ .

#### *Flow cytometry*

**Aortic sample preparation.** Mice were extensively perfused with ice cold PBS in the heart right ventricle to drain all the blood out of the system. Aortic samples were harvested and kept in PBS, on ice. Abdominal aortic portion was cleaned out of all the surrounding tissue, chopped in small pieces and incubated in the enzyme solution (Elastase, 1 mg/ml, Worthington; Collagenase D, 0.2 mg/ml, Roche; Dispase I, 0.2 U/ml, Stemcell; DNase I, 0.2 mg/ml, Roche; in RPMI 1640) for 45 min on a rotating heat block (37°C, 600 rpm). Enzymatic activity was stopped by adding excessive volume of ice cold PBS. Cell suspension and remaining tissue pieces were meshed on a 70  $\mu\text{m}$  filter. After extensive wash with PBS, cells were stained with fluorescent antibodies.

For cell analysis, blood and spleen cell suspensions obtained after red blood cell lysis (NH<sub>4</sub>Cl, 150 mMol; KHCO<sub>3</sub>, 10 mMol; Na<sub>2</sub>EDTA, 0.1 mMol; in distilled water, pH 7.4), as well as aortic and bone-marrow cell suspensions, were incubated with Fc block solution (ebiosciences, clone 93, dilution 1/200 in flow buffer [PBS, 2.5 % BSA, 2 mM EDTA, 0.01 % NaN<sub>3</sub>]) for 10 minutes at 4°C. Cells were then stained with fluorescently labelled anti-mouse antibodies, diluted in flow buffer at 1/200 (Table I in the online-only Data Supplement) for 30 minutes at 4°C, prior to extensive wash and flow cytometry analysis. Ki67 staining was done using the ebiosciences fix/permeabilisation kit after the surface staining for CD45.

The cytometric acquisition was performed on a LSR II Fortessa (BD biosciences) equipped with 4 lasers (405, 488, 561 and 640 nm). Cell analysis was done using BD FACSDiva Software 6.0 and figure-displayed dot plots and histograms were obtained using FlowJo software (TreeStar).

#### *Histology and immunofluorescence*

After fixation, tissue samples were incubated overnight in 30% sucrose solution before being embedded in OCT and kept at -80°C. Cryosections of 10  $\mu\text{m}$  were then dried and stained with Orcein (Sigma), Sirius red (Sigma) or Perl's staining kit (Sigma). Elastin degradation stages on aortic sections were evaluated as follow: 0, no elastin destruction; 1, 1/4 of the medial circumference digested; 2, 1/2 of the medial circumference digested; 3, 3/4 of the medial circumference digested; 4, no elastin layer left. Perl's staining stages were defined as: 0, no Perl's staining; 1, sparse/diffuse blue staining; 2, few spots of intense blue staining; 3, >5 spots of intense blue staining.

For immunofluorescence, cryosections were dried for 30 minutes, before being rehydrated in PBS for 10 minutes before the staining. Sections were then permeabilized in 0.1 % Triton X-100, 0.1 % Citrate buffer pH 6.0 (Dako) for 30 minutes. They were then washed in PBS, and incubated with the blocking solution (flow buffer + 5% serum of secondary antibody species, i.e. goat or donkey) for 30 minutes, before being incubated with primary antibodies diluted in the blocking solution at indicated concentrations (Table II in the online-only Data Supplement) overnight at 4°C. Samples were extensively washed with PBS and incubated with secondary antibodies diluted in the blocking solution at indicated concentrations (Table II in the online-only Data Supplement) for 4 hours. Samples were again washed extensively in PBS, nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (Invitrogen) and samples were mounted with CC mount™ (Sigma).

Gelatinase activity was assessed using DQ™ Gelatin from pig skin, fluorescein conjugate (Molecular Probes™) according to manufacturer instructions.

Apoptosis assay was performed using In Situ Cell Death Detection Kit (Roche).

Epifluorescence analysis, brightfield and polarized light imaging were done using Leica DM6000B microscope and analyzed with accompanying software. Images analysis was performed using ImageJ (NIH).

#### *Quantitative real time polymerase chain reaction*

The abdominal aorta was cleared of all the surrounding tissues and snap frozen in liquid nitrogen. Tissue samples were pulverised using beads/shaker and RNA was prepared using an RNeasy mini kit (Qiagen). Isolated RNA ( $\geq 500$  ng) was reverse-transcribed using QuantiTect Rev. Transcription Kit (Qiagen). Real-time PCR was performed on 2  $\mu$ l cDNA product (diluted 10 to 20 times) using Syber Green qPCR mix (Applied Biosystems) on a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) and the primers described in Table III in the online-only Data Supplement (Sigma).

#### *Plasma cytokines*

Analysis of plasma cytokines was done using Meso Scale Discovery reagents by the Core Biochemical Assay Laboratory, University of Cambridge, Cambridge, UK.

#### *Statistical analysis*

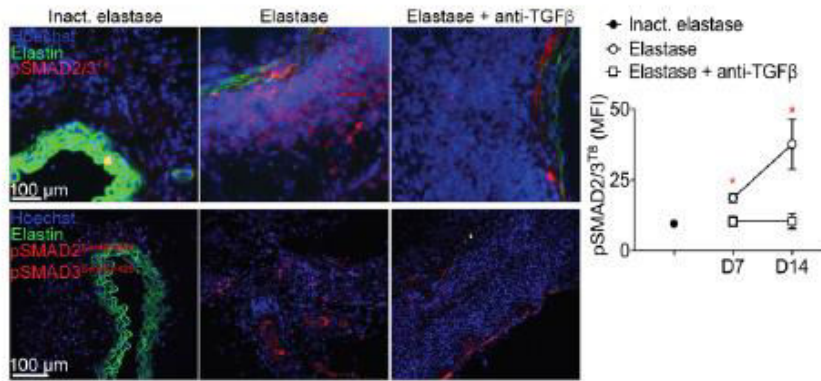
Values are expressed as means  $\pm$  s.e.m. Differences between values were analyzed using nonparametric Mann-Whitney (2 groups), Kruskal-Wallis followed by Dunn's test (3 groups), Chi2 (distribution between 2 groups), Log Rank, Mantel Cox (2 groups, survival) or 2-way ANOVA followed by Tukey post-hoc (3 groups over time), and were considered significant at  $P < 0.05$ .

#### References

1. Horai R, Asano M, Sudo K, Kanuka H, Suzuki M, Nishihara M, Takahashi M, Iwakura Y. Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that

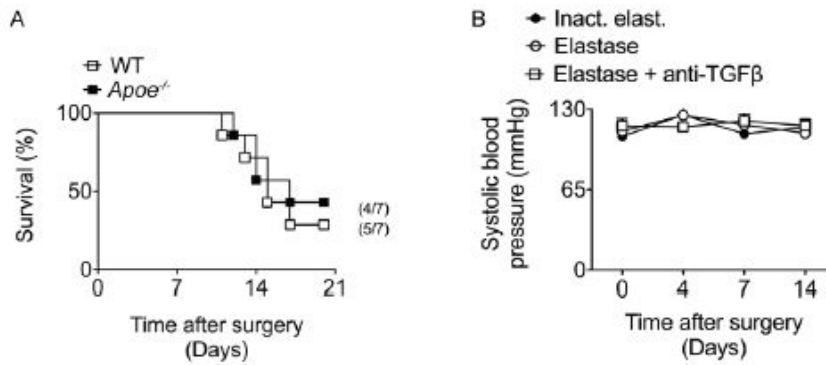
- IL-1 $\beta$  is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *J Exp Med* 1998;187:1463-1475.
2. Bhamidipati CM, Mehta GS, Lu G, Moehle CW, Barbery C, DiMusto PD, Laser A, Kron IL, Upchurch GR, Jr., Ailawadi G. Development of a novel murine model of aortic aneurysms using peri-adventitial elastase. *Surgery* 2012;152:238-246.
  3. Busch A, Holm A, Wagner N, Ergun S, Rosenfeld M, Otto C, Baur J, Kellersmann R, Lorenz U. Extra- and intraluminal elastase induce morphologically distinct abdominal aortic aneurysms in mice and thus represent specific subtypes of human disease. *J Vasc Res* 2016;53:49-57.
  4. Lu G, Su G, Davis JP, Schaheen B, Downs E, Roy RJ, Ailawadi G, Upchurch GR, Jr. A novel chronic advanced stage abdominal aortic aneurysm murine model. *J Vasc Surg* 2017;10.1016/j.jvs.2016.07.105.
  5. Manning MW, Cassi LA, Huang J, Szilvassy SJ, Daugherty A. Abdominal aortic aneurysms: fresh insights from a novel animal model of the disease. *Vasc Med* 2002;7:45-54.
  6. Wang Y, Ait-Oufella H, Herbin O, Bonnin P, Ramkhalawon B, Taleb S, Huang J, Offenstadt G, Combadiere C, Renia L, Johnson JL, Tharaux PL, Tedgui A, Mallat Z. TGF- $\beta$  activity protects against inflammatory aortic aneurysm progression and complications in angiotensin II-infused mice. *J Clin Invest* 2010;120:422-432.
  7. Paganin DM. *Coherent X-ray Optics*: Oxford University Press; 2007.
  8. Paganin D, Mayo SC, Gureyev TE, Miller PR, Wilkins SW. Simultaneous phase and amplitude extraction from a single defocused image of a homogeneous object. *J Microsc* 2002;206:33-40.

## Supplemental Figures



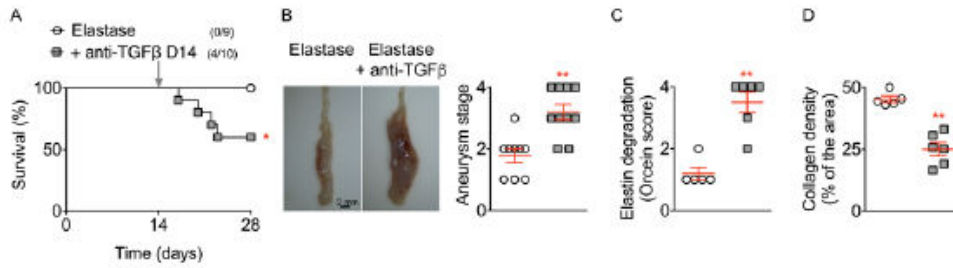
## Supplemental Figure 1

Representative photomicrographs and quantification of immunofluorescent staining for pSMAD2/3<sup>T8</sup>, and pSMAD2<sup>Ser465/Ser467</sup>/pSMAD3<sup>Ser423/Ser425</sup> on aortic tissue sections from mice treated with inactivated elastase, elastase, or elastase + anti-TGF $\beta$ , for 14 days (n=5-7 mice/group). \*P<0.05 compared to elastase group.

**Supplemental Figure II**

A- Survival curves of WT vs *ApoE*<sup>-/-</sup> mice treated with elastase + anti-TGFβ (n=7 mice/group).

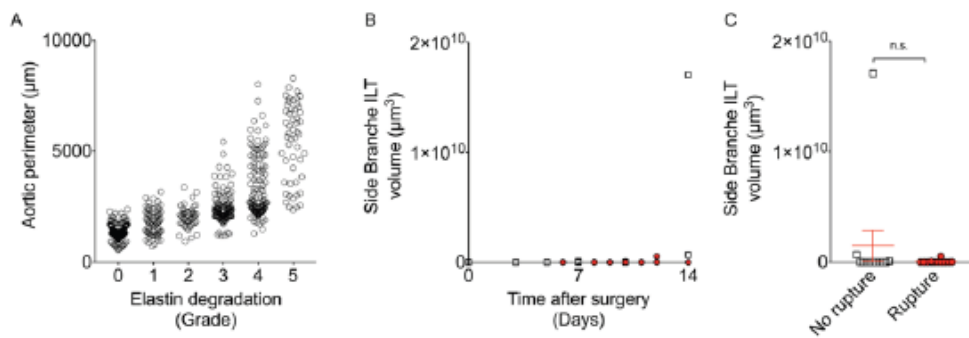
B- Blood pressure analysis by tail cuff in mice treated with inactivated elastase, elastase, or elastase + anti-TGFβ (n=9/group).



### Supplementary Figure III

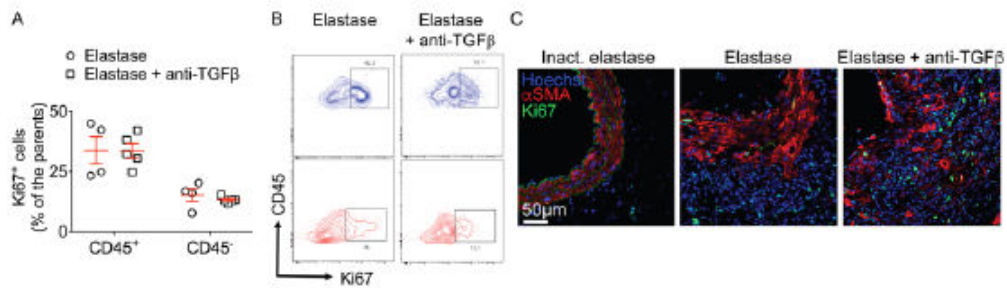
Fourteen days after topical application of elastase on the aorta, one group of mice was injected with anti-TGF $\beta$ . A- Survival curves: Elastase vs elastase + anti-TGF $\beta$  at day 14 (n=9-10 mice/group). Two pooled experiments. Log-Rank Mantel Cox test. \*P<0.05. B- Representative pictures of abdominal aorta at day 28, and aneurysm stages (2 pooled experiments). Mann-Whitney test \*\*P<0.01. C- Analysis of elastin degradation on cryosections using Orcein staining (n=5-6 mice/group); one experiment. Mann-Whitney test \*\*P<0.01. D- Analysis of collagen density on cryosections using Sirius Red staining (n=5-6 mice/group); one experiment. Mann-Whitney test \*\*P<0.01.





#### Supplemental Figure IV

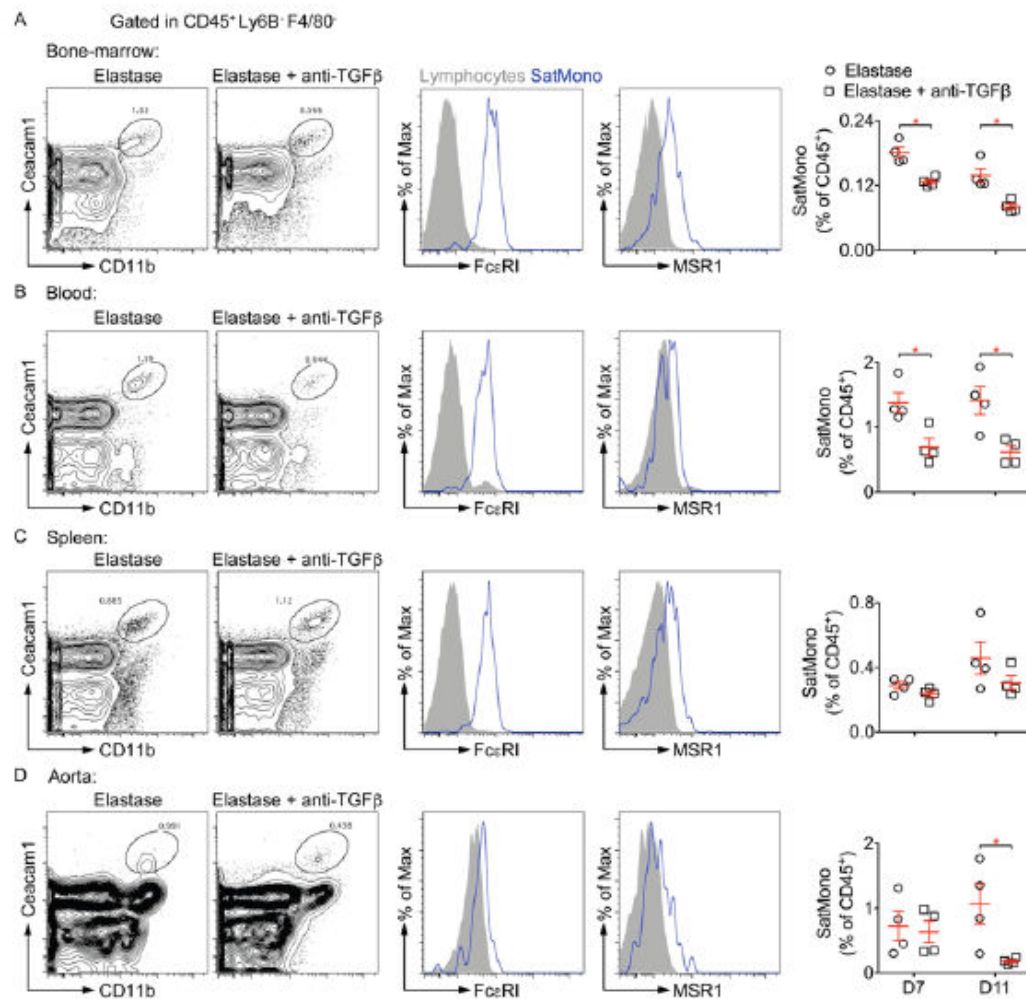
A- Analysis of the aortic perimeter at the site of elastase application against elastin degradation (grade 0: intact elastin, grade 1: 1-20% of elastin is degraded, grade 2: 21-40% of elastin is degraded, grade 3: 41-60% of elastin is degraded, grade 4: 61-80% of elastin is degraded, grade 5: 81-100% of elastin is degraded). Several images/mouse were analyzed at random sites. B- Intra-luminal thrombus (ILT) formation in side branches over time. C- Side branche ILT in non-ruptured versus ruptured mice (day 6-14; n=12 mice/group).



### Supplemental Figure V

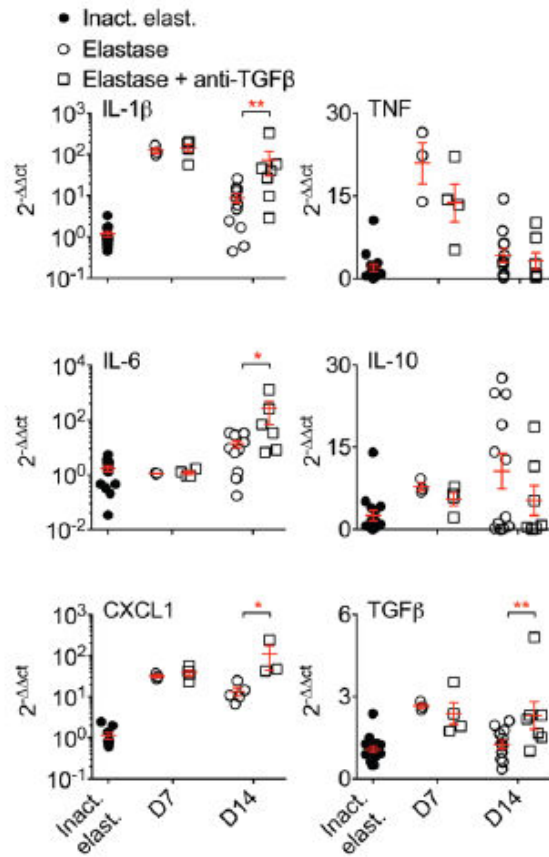
A, B- Analysis by flow cytometry of Ki67 expression in CD45<sup>+</sup> and CD45<sup>-</sup> cells of the aorta at day 12 after application of elastase, with or without anti-TGFβ treatment.

C – Representative pictures of immunostainings for Ki67 (green) and αSMA (Red) on aortic tissue sections at day 14.



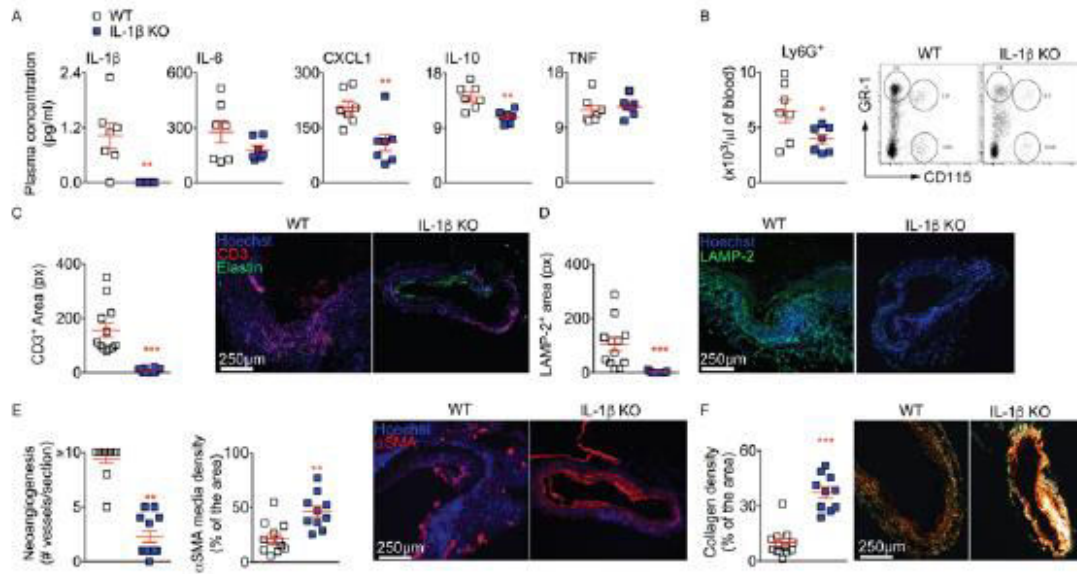
### Supplemental Figure VI

Analysis by flow cytometry of Sat-Mono in bone marrow (A), blood (B), spleen (C) and aorta (D) at day 4 and 11 after application of elastase, with or without anti-TGF $\beta$  treatment. Sat-Mono were gated as CD45<sup>+</sup>, Ly6B<sup>-</sup>, F4/80<sup>-</sup>, CD11b<sup>+</sup>, Ceacam1<sup>+</sup> and analyzed for their expression of Fc $\epsilon$ RI (n=4 mice/group). Mann-Whitney test to compare conditions at each time point. In A and B, \*p<0.05 Elastase vs Elastase + anti-TGF $\beta$  at day 7 and day 11. In D, \*p<0.05 Elastase vs Elastase + anti-TGF $\beta$  at day 11. Results were obtained from one experiment.



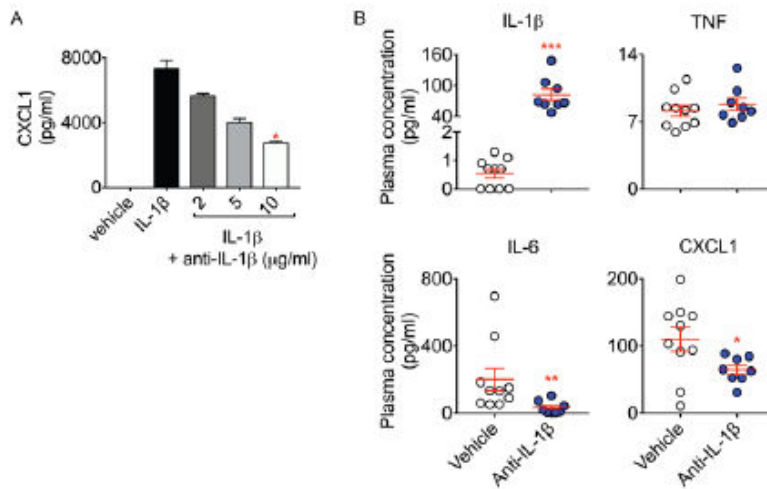
### Supplemental Figure VII

Analysis by Q-PCR of cytokines expression in the aorta of mice treated with inactivated elastase, elastase, or elastase + anti-TGFβ. Mann-Whitney at each time point, n=3-15 mice/time point. \*P<0.05. \*\*P<0.01. Results were obtained from 3 independent experiments.



### Supplemental Figure VIII

A, B- Multiplex analysis of plasma cytokines (A) and circulating neutrophils in the blood (B) of WT and IL-1 $\beta$  KO mice 5 days after surgery (n=7 mice per group). C, D- Immunofluorescence analysis of T cells (C) and phagocytes (D) at day 14 (n=10-12 mice/group). E- Analysis of neovascularization and SMC content in the media by immunofluorescent staining at day 14 (n=10-12 mice/group). F- Analysis of collagen deposition in the aorta by Sirius red staining under polarized light at day 14 (n=10-12 mice/group). Mann-whitney to compare conditions at each time point. In A and B, \*\*p<0.01 WT vs KO, \*p<0.05 WT vs KO. In C-F, \*\*p<0.01 WT vs KO, \*\*\*p<0.001 WT vs KO. Results from A, B and C-F are from 2 independent experiments.



### Supplemental Figure IX

A- IL-1 $\beta$  induced CXCL1 secretion by SMCs *in vitro* after overnight stimulation with IL-1 $\beta$  (5 ng/ml), with or without increasing concentration of the neutralizing anti-IL-1 $\beta$  antibody. Kruskal-Wallis followed by uncorrected Dunn's test. \*  $p < 0.05$  IL-1 $\beta$  vs IL-1 $\beta$  + 10  $\mu$ g/ml anti-IL-1 $\beta$ . B- Plasma concentration of IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6 and CXCL1 in mice treated with Elastase + anti-TGF $\beta$  with or without anti-IL-1 $\beta$  starting at day 7, for 7 more days. Data were obtained from 2 independent experiments (n=8-10 mice/group). Mann-Whitney to compare conditions.\*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  Vehicle vs anti-IL-1 $\beta$ .