



**HAL**  
open science

# Place de la dynamique mitochondriale dans l'hypertension artérielle et l'anévrisme aortique

Pauline Robert

► **To cite this version:**

Pauline Robert. Place de la dynamique mitochondriale dans l'hypertension artérielle et l'anévrisme aortique. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2021. Français. NNT : 2021ANGE0010 . tel-03412764v1

**HAL Id: tel-03412764**

**<https://theses.hal.science/tel-03412764v1>**

Submitted on 3 Nov 2021 (v1), last revised 4 Nov 2021 (v2)

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

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

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE D'ANGERS

ECOLE DOCTORALE N° 605

*Biologie Santé*

Spécialité : « Physiologie, Physiopathologie, Biologie Systémique Médicale »

Par

« **Pauline ROBERT** »

« **PLACE DE LA DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE DANS L'HYPERTENSION ARTERIELLE  
ET L'ANEVRISME AORTIQUE** »

Thèse présentée et soutenue à « Angers », le « 10 Mai 2021 »

Unité de recherche : Laboratoire MitoVasc UMR CNRS 6015, INSERM U1083

Thèse N° :

## Rapporteurs avant soutenance :

Pr. Stéphanie Lehoux  
Dr. Patrick Lacolley

Professeur – McGill University, Montreal, Quebec  
DR1 – UMR INSERM U1116, Nancy, France

## Composition du Jury :

Président :

Dr Yves Delneste

DR2 – CRCINA UMR 1232 INSERM -CNRS ERL 6001, Angers, France

Examineurs :

Dr Renée Ventura-Clapier  
Dr Olivier Baris

DR1 émérite – INSERM 1180, Paris, France  
CRCN - UMR CNRS 6015, INSERM 1083, équipe Mitolab, Angers, France

Directeur de thèse

Dr Laurent Loufrani

DR2 – UMR CNRS 6015, INSERM 1083, équipe Carme, Angers, France

# ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) **ROBERT Pauline**  
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une  
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,  
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.  
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées  
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le 10 / 05 / 2021

A handwritten signature in dark ink, appearing to be 'R. Pauline', written over a horizontal line.

**L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :**



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

**Consulter la licence creative commons complète en français :**  
**<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>**

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.



# Sommaire

REMERCIEMENTS

LISTE DES ABREVIATIONS

TABLE DES FIGURES

TABLE DES TABLEAUX

**INTRODUCTION GENERALE..... 1**

**1. Le système circulatoire..... 1**

1.1. Généralités.....1

1.2. Les artères .....2

1.2.1. La structure artérielle .....2

a) L'intima.....2

b) La média .....3

c) L'adventice .....8

1.2.2. Les artères de conductance.....9

1.2.3. Les artères de résistance .....9

1.2.4. La réactivité vasculaire .....9

a) Les facteurs mécaniques.....9

b) Les substances chimiques locales.....11

**2. Les mitochondries..... 17**

2.1. Généralités.....17

2.2. Structure .....18

2.2.1. La membrane externe .....18

2.2.2. La membrane interne .....18

2.2.3. L'espace intermembranaire .....19

2.2.4. Les crêtes .....20

2.2.5. La matrice.....20

a) Génome mitochondrial.....20

b) Biogénèse mitochondriale .....20

2.3. Transport et distribution des mitochondries .....22

2.4. La dynamique mitochondriale.....23

2.4.1. Généralités.....23

2.4.2. Fission mitochondriale .....23

a) DRP1 .....24

b) FIS 1 .....25

c) Protéines « accessoires » .....25

d) Déroulement de la fission mitochondriale.....26

e) La mitophagie.....26

2.4.3. Fusion mitochondriale .....28

a) Mitofusines 1 et 2.....28

b) OPA1 .....29

c) Déroulement de la fusion mitochondriale .....30

**ETUDE 1 : PLACE D'OPA1 DANS L'HYPERTENSION ARTERIELLE ..... 34**

**1. Introduction..... 34**

1.1. L'hypertension artérielle .....34

1.1.1. Le remodelage artériel.....34

1.1.2. La dysfonction endothéliale .....36

1.1.3.	Le rôle de l'angiotensine II.....	37
1.1.4.	Inflammation.....	38
1.1.5.	Stress oxydatif .....	39
1.2.	Place de la mitochondrie dans l'hypertension artérielle.....	40
1.3.	Objectif de la première partie .....	41
<b>2.</b>	<b>Article N°1 : Protective role of the mitochondrial fusion protein OPA1 in hypertension</b>	<b>42</b>

**CONCLUSION DE L'ETUDE 1 ..... 83**

**ETUDE 2 : PLACE DE LA DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE DANS L'ANEVRISME ET LA DISSECTION AORTIQUE ..... 85**

<b>1.</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>85</b>
1.1.	Anatomie de l'aorte.....	85
1.2.	Pathologies aortiques .....	86
1.3.	L'anévrisme.....	87
1.3.1.	L'anévrisme de l'aorte abdominale.....	88
	a) Généralités.....	88
	b) Athéromatose et hémodynamique.....	88
	c) Rôle du thrombus intraluminal.....	90
	d) Remodelage de la paroi aortique.....	91
	e) L'inflammation .....	94
	f) Le stress oxydant.....	98
1.3.2.	Anévrismes et dissections de l'aorte thoracique .....	98
	a) Les anévrismes de l'aorte thoracique .....	99
	b) Les dissections aortiques .....	99
	c) Les facteurs de risques et prises en charges .....	100
	d) Pathologies impliquées dans la dégradation de la matrice extra-cellulaire .....	101
	e) Modification de l'activité contractile des cellules musculaires lisses.....	103
1.4.	Place de la mitochondrie dans les pathologies anévrismales et disséquant de l'aorte.....	105
1.5.	Objectif de la deuxième étude .....	105
<b>2.</b>	<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>107</b>
2.1.	Modèles expérimentaux .....	107
2.1.1.	Modèles animaux .....	107
2.1.2.	Traitement hypertenseur .....	107
2.1.3.	Régimes alimentaires .....	108
2.1.4.	Groupes expérimentaux.....	108
2.2.	Suivi de la pression artérielle .....	108
2.3.	Sacrifice et prélèvements.....	108
2.4.	Bilan lipidique.....	109
2.5.	Etudes histologiques .....	109
2.5.1.	Inclusion et coupe des artères.....	109
2.5.2.	Coloration à l'orcéine.....	109
2.5.3.	Coloration à l'Oil Red-O .....	110
2.5.4.	Coloration au rouge sirius .....	110
2.6.	Etude moléculaire .....	111
2.7.	Analyse statistique .....	112
<b>3.</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>113</b>
3.1.	Etude macroscopique des différents segments aortiques .....	113
3.2.	Modèle de dysfonction mitochondriale ( <i>Opa1<sup>+/-</sup></i> ).....	114
3.2.1.	Généralités.....	114
3.2.2.	Bilan lipidique.....	115
3.2.3.	Etude de la dynamique mitochondriale .....	116
	a) Fusion mitochondriale.....	116
	b) Fission mitochondriale .....	117
3.2.4.	Etude du remodelage aortique .....	118
	a) Remodelage pariétal et fibres élastiques.....	118
	b) Dépôts lipidiques pariétaux .....	120

c)	Collagène pariétal .....	121
d)	Composants de la matrice extra cellulaire.....	123
e)	Dégradation de la matrice extracellulaire .....	124
f)	Acteurs de la contraction cellulaire.....	125
g)	Apoptose et survie cellulaire.....	127
h)	Stress oxydant.....	128
3.3.	Modèle anévrisimal ( <i>Ldlr<sup>-/-</sup></i> ).....	129
3.3.1.	Généralités.....	129
3.3.2.	Bilan lipidique .....	130
3.3.3.	Validation du remodelage anévrisimal .....	131
a)	Remodelage pariétal et fibres élastiques.....	131
b)	Dépôts lipidiques pariétaux .....	133
c)	Collagène pariétal .....	134
d)	Composants de la matrice extracellulaire.....	135
e)	Dégradation de la matrice extracellulaire .....	136
f)	Acteurs de la contraction cellulaire.....	138
g)	Apoptose et survie cellulaire.....	139
h)	Stress oxydant.....	139
3.3.4.	Etude de l'homéostasie mitochondriale.....	140
a)	Fusion mitochondriale.....	141
b)	Fission mitochondriale .....	142
c)	Biogénèse mitochondriale .....	142
	<b>DISCUSSION DE L'ETUDE 2 .....</b>	<b>144</b>
	<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>153</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>155</b>

## ANNEXES

# Remerciements

En premier lieu, je souhaiterais remercier la Pr **Stéphanie Lehoux** et le Dr **Patrick Lacolley** d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse. Je tiens également à remercier les Dr **Renée Ventura-Clapier** et **Olivier Baris** pour avoir accepté de prendre part à mon jury de thèse. Enfin, je remercie le Dr **Yves Delneste** d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. C'est un réel plaisir de pouvoir échanger de mon projet avec vous.

Je remercie également le **Groupe de Réflexion sur la Recherche et la Société Française de Cardiologie** de m'avoir accordé un financement de 6 mois pour terminer mes travaux et assurer la rédaction de ce manuscrit de thèse.

---

Je remercie tout particulièrement le Dr **Laurent Loufrani** de m'avoir accueilli dans son équipe depuis le Master 1 et d'avoir encadré mes travaux de recherche tout au long de ces années. Un grand merci pour ta confiance et pour l'indépendance et l'autonomie que j'ai pu acquérir grâce à toi. Sans oublier les Mojitos, les burgers et les bons moments !!

Je remercie le Dr **Daniel Henrion** pour son accueil au sein du laboratoire MitoVasc dès le Master 1 et tout au long de ces années. Je vous remercie de votre disponibilité et de votre soutien.

---

A ma famille !

Ma **maman** chérie, mon **papa** d'amour et mon tout **petit frère**, sans oublier mon **boubou** d'amour, je vous remercie de tout votre soutien et votre amour quotidien tout au long de ces années et depuis toujours. Merci de ne jamais me rappeler que depuis toujours je souhaite faire des « études courtes » ! Je ne vous le dis pas assez mais je vous aime fort ! Merci aussi au reste de la famille et principalement aux Chaillé, **Pepette, François, Quentin** et **David**, ainsi qu'aux Charbonneau et à ma **mamie** chérie d'amour que j'aime très fort, pour leur amour et leur soutien depuis toujours.

Aux meilleurs copains du monde !

**Valentine** et **Léo**, cette année nous fêtons nos 10 ans d'amitié ! Je vous remercie, non seulement d'être les meilleurs amis que je puisse avoir au quotidien depuis tant de temps, mais aussi de votre soutien sans faille tout au long de mes années de master et de thèse ! Merci aussi d'avoir égayé ma vie avec la venue du plus beau des sourires, ma poupinette d'amour, bébé **Rose** devenu grande et bientôt bébé **Joseph** !

A mes super couuupiines !

**Coralyne Proux**, « Coco », « CocoXX », cette thèse n'aurait jamais pu être ce qu'elle est sans toi ! Ma correctrice officielle et bien plus encore. Qu'aurait été cette thèse sans nos debriefs, nos chants, nos papotages et autres à des heures plus que tardives ?! Je te remercie d'avoir été une épaule, une main et un soutien quoi qu'il arrive !!

**Joohee Park**, « Madame Park », « JP », merci d'être née ! Tu as dit beaucoup trop de phrases marquantes pour toutes les écrire mais je retiendrais celle-là ! On se suit depuis un bon bout de temps maintenant et cette thèse n'aurait pas été la même sans ta spontanéité, ta joie de vivre, ton soutien, bref toi quoi ! Je te remercie d'être qui tu es et d'avoir toujours été présente !

---

Sans oublier toute la dream team !

**Alexis Richard**, « le stagiaire », merci d'avoir été un réel soutien scientifique durant tes stages et depuis le début de ta thèse. Merci aussi pour ta compréhension et les cours de sport.

**Manuela Garcia**, « Manu », merci pour toutes ces fous rires, ses chants toujours très justes, ces instants bien bof comme on aime et bien sûr nos séances de sport monumentales.

**Aglé Herbretreau**, mon binôme de bureau, merci pour tous ces instants, confidences, rigolade, boîte de nuit et potins indispensable à mon bien-être quotidien.

**Léa Réthoré**, merci pour ces centaines de kilo de pommes mais surtout pour ces enquêtes et ces potins endiablés à toute heure.

**Lucie Lebeau**, je te remercie de ta bonne humeur et de ta patience. Ce n'est pas tous les jours facile avec tous les énergumènes qui t'entourent.

**Valentine Suteau**, notre Christina à nous, un grand merci pour toutes nos discussions, potins et échanges scientifique durant toutes ces années.

**Jordan Rivron**, au-delà des remerciements je dois avant tout m'excuser d'avoir élargi ta culture musicale probablement un peu trop loin pour toi. Merci de ta patience durant ces longues journées de myographie.

A toutes ces oreilles qui ont souffert !

A commencer par **Emilie Roy-Vessières**, **Anne-Laure Guilbaud-Guihot** et tous ceux qui sont un jour passé en artério, qui ont dû supporter bien des fausses notes, mais toujours dans la bonne humeur. Je vous remercie de votre patience ainsi que de votre soutien scientifique.

Sans oublier **Agnès Toutain**, **Linda Grimaud**, **Sophie Tamareille** et **Louis Gourdin** qui forment le meilleur des bureaux. Merci d'avoir répondu à mes questions, de m'avoir supporté, soutenu et beaucoup fait rire durant ces nombreuses années.

Merci aussi à **Anna Baudry** et **Maroua Eid**, de m'avoir aidé dans mes projets mais aussi de m'avoir offert de bons moments de rire et d'échanges.

**Carole Stefanini**, je te remercie tout particulièrement pour ta bienveillance et ta disponibilité. Tu as été un réel soutien tant professionnel que personnel, et pour ça, je te remercie vraiment.

Je tiens aussi à remercier **Hélène Tricoire-Leignel** de m'avoir donné l'opportunité d'enseigner durant deux ans. Ceci a confirmé mon plaisir à transmettre et enseigner.

Merci aussi à **Céline Fassot** pour ces moments partagés et pour ta bienveillance.

Enfin, je remercie tous les autres membres du laboratoire, **Mathilde Munier, Claire Legendre, Christian Legros, César Mattéi, Marie Chabbert, Jennifer Bourreau, Cyril Le Corre, Clément Tétaud**, et les étudiants, **Abigaelle Guillod, Louwana Allawa, Rym Ben Boubaker, Asma Tiss, Charbel Mouawad, Jacinth Frangieh, Anne-Sophie Garnier, Ahmad Chehiatly et Zineb Soualah**, pour leurs conseils et leur présence.

---

**Coralie Petit et Amine Maarouf** « Coco et Mimine », depuis des années, on suit le même parcours de chaque côté du tramway. Je vous remercie pour ces apéros, restos et autres goûters qui nous ont permis de nous changer les idées et de faire des pauses dans nos semaines de fou. J'espère qu'on en fera pleins d'autres même après nos thèses !

---

Enfin, je voudrais remercier l'ensemble des acteurs extérieurs qui ont pu prendre part à ce projet de thèse. Merci à l'ensemble de l'équipe Mitolab et particulièrement aux Dr **Guy Lenaers, Arnaud Chevrollier, Salim Khiati** et de nouveau **Olivier Baris**. Je remercie aussi vivement le Pr **Pascal Reynier** pour toute l'aide qu'il nous a apporté. Je remercie aussi le Pr **Jean-Baptiste Michel** pour son soutien et pour nous avoir mis sa banque de données à disposition. Enfin, je remercie les services du Sciam et de biochimie du CHU d'Angers qui nous ont grandement aidé dans ces projets.

# Liste des abréviations

<b>AAA</b>	Anévrisme de l'aorte abdominale	<b>MFN</b>	Mitofusine
<b>AAT</b>	Anévrisme de l'aorte thoracique	<b>MID49</b>	<i>Mitochondrial dynamics proteins of 49kDa</i>
<b>AApr</b>	Aorte abdominale péri-rénale	<b>MID51</b>	<i>Mitochondrial dynamics proteins of 51 kDa</i>
<b>AAsr</b>	Aorte abdominale sous-rénale	<b>MLC</b>	Chaînes légères de myosine
<b>AC</b>	Adénylate cyclase	<b>MLCK</b>	Kinase des chaînes légères de myosine
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique	<b>MLCP</b>	Phosphatase des chaînes légères de myosine
<b>ADNmt</b>	ADN mitochondrial	<b>MMP</b>	Métalloprotéinase matricielle
<b>AMPc</b>	Adénosine monophosphate cyclique	<b>NADPH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>AngII</b>	Angiotensine II	<b>ND</b>	Régime alimentaire standard ( <i>Normal Diet</i> )
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique	<b>NO</b>	Monoxyde d'azote
<b>AT1R</b>	Récepteur de type 1 à l'angiotensine II	<b>NOS</b>	NO synthase
<b>AT2R</b>	Récepteur de type 2 à l'angiotensine II	<b>NOX</b>	NADPH oxydase
<b>ATA</b>	Aorte thoracique ascendante	<b>NRF1</b>	<i>Nuclear respiratory factor 1</i>
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate	<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anion superoxide
<b>ATD</b>	Aorte thoracique descendante	<b>ONOO</b>	Peroxydite
<b>CE</b>	Cellule endothéliale	<b>OPA1</b>	<i>Optic atrophy protein 1</i>
<b>cGMP</b>	Guanosine monophosphate cyclique	<b>OXPHOS</b>	Phosphorylation oxydative
<b>CML</b>	Cellule musculaire lisse	<b>PA</b>	Pression artérielle
<b>COX</b>	Cyclooxygénase	<b>PARKIN</b>	parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase
<b>CT</b>	Cholestérol	<b>PAS</b>	Pression artérielle systolique
<b>DAG</b>	Diacylglycérol	<b>PGC1<math>\alpha</math></b>	Proliferator-activated receptor $\gamma$ (PPAR $\gamma$ ) coactivator 1 $\alpha$
<b>DAT</b>	Dissection de l'aorte thoracique	<b>PGI2</b>	Prostacycline I2
<b>DRP1</b>	<i>Dynamin related protein 1</i>	<b>PINK</b>	<i>PTEN-induced putative kinase 1</i>
<b>EDHF</b>	Facteurs hyperpolarisant dérivés de l'endothélium	<b>PKA</b>	Protéine kinase A
<b>eNOS</b>	NOS endothéliale	<b>PKG</b>	Protéine kinase G
<b>ET-1</b>	Endothéline-1	<b>RE/RS</b>	Réticulum endoplasmique/sarcoplasmique
<b>FIS1</b>	<i>Mitochondrial fission 1 protein</i>	<b>ROS</b>	Espèces réactives de l'oxygène
<b>FMD</b>	Dilatation dépendante du flux	<b>S-OPA1</b>	Forme courte d'OPA1
<b>GCs</b>	Guanylate-cyclase soluble	<b>SIRT</b>	Sirtuine
<b>GTP</b>	Guanosine triphosphate	<b>SM22</b>	Transgélène
<b>HDL</b>	Lipoprotéine de haute densité	<b>SOD</b>	Superoxyde dismutase
<b>HFD</b>	Régime enrichi en cholestérol ( <i>High fat diet</i> )	<b>SRAA</b>	Système rénine-angiotensine-aldostérone
<b>HTA</b>	Hypertension artérielle	<b>TFAM</b>	Mitochondrial transcription facteur A
<b>IA</b>	Indice d'athérogénicité	<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Facteur de croissance transformant $\beta$
<b>ICAM-1</b>	Molécule d'adhésion intracellulaire 1	<b>Th1/2</b>	Lymphocytes T helper de type 1 et 2
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interféron gamma	<b>TIMP</b>	Inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases
<b>IL</b>	Interleukines	<b>TM</b>	Tonus myogénique
<b>ILT</b>	Thrombus intraluminal	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Facteur de nécrose tumorale $\alpha$
<b>LDL</b>	Lipoprotéine de faible densité	<b>Treg</b>	Lymphocytes T régulateurs
<b>LDLR</b>	Récepteur aux LDL	<b>TxA2</b>	Thromboxane A2
<b>L-NAME</b>	N $\omega$ -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride	<b>VCAM-1</b>	Molécule d'adhésion vasculaire 1
<b>L-OPA1</b>	Forme longue d'OPA1	<b>VDAC</b>	<i>Voltage-dependant anion channel</i>
<b>MCP-1</b>	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>	<b>WT</b>	Souche sauvage ( <i>Wild Type</i> )
<b>MEC</b>	Matrice extracellulaire		
<b>MFF</b>	<i>Mitochondrial fission factor</i>		

# Table des figures

**Figure 1** : Représentation schématique du système circulatoire.

**Figure 2** : Représentation schématique de la composition de la paroi artérielle.

**Figure 3** : Composition des parois des artères de conductance et de résistance.

**Figure 4** : Représentation schématique des voies de signalisation de la contraction cellulaire.

**Figure 5** : Représentation schématique de la composition de la matrice extracellulaire artérielle.

**Figure 6** : Représentation schématique des voies de signalisations impliquées dans la relaxation artérielle.

**Figure 7** : Représentation schématique du système rénine-angiotensine-aldostérone.

**Figure 8** : Représentation schématique des sources de ROS cellulaires.

**Figure 9** : Représentation schématique de la structure mitochondriale.

**Figure 10** : Représentation schématique du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.

**Figure 11** : Représentation schématique de la biogénèse mitochondriale.

**Figure 12** : Représentation schématique du transport mitochondrial le long des microtubules.

**Figure 13** : Représentation schématique des protéines de la fusion et de la fission mitochondriales.

**Figure 14** : Représentation schématique des modifications post-traductionnelles de DRP1.

**Figure 15** : Représentation schématique du fonctionnement de la fission mitochondriale.

**Figure 16** : Représentation schématique de la mitophagie.

**Figure 17** : Représentation schématique des formes courtes (S-OPA1) et longues (L-OPA1) d'OPA1 et de leurs fonctions.

**Figure 18** : Représentation schématique du fonctionnement de la fusion mitochondriale.

**Figure 19** : Représentation schématique des facteurs de risque cardiovasculaires.

**Figure 20** : Représentation schématique des différents types de remodelage artériel.

**Figure 21** : Représentation schématique des mécanismes impliqués dans le remodelage artériel de l'hypertension artérielle.

**Figure 22** : Remodelage de l'aorte thoracique des souris contrôles (WT) et *Opa1*<sup>+/-</sup> soumises à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham).

**Figure 23** : Représentation schématique des deux parties principales de l'aorte et de leurs sous-parties.

**Figure 24** : Représentation schématique des différents types d'anévrisme. a) anévrisme sacculaire, b) anévrisme fusiforme, c) rupture d'anévrisme.

**Figure 25** : Formation d'anévrisme après amputation au-dessus du genou.

**Figure 26** : Représentation schématique des mécanismes associés à la physiopathologie de l'anévrisme de l'aorte abdominale.

**Figure 27** : Représentation schématique des classifications des différentes dissections de l'aorte thoracique.

**Figure 28 :** Représentation schématique des mutations génétiques prédisposant aux anévrismes et dissections aortiques.

**Figure 29 :** Localisations aortiques présentant des remodelages anévrismaux et /ou disséquants.

**Figure 30 :** Bilan lipidique des souris contrôles (WT) et *Opa1*<sup>+/-</sup> soumises à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). Taux plasmatiques de (A) cholestérol total, (B) triglycérides, (C) HDL-cholestérol, (D) LDL-cholestérol et (E) indice d'athérogénicité.

**Figure 31 :** Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs de la fusion mitochondriale par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AApr des souris contrôles (WT) et *Opa1*<sup>+/-</sup> soumises à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). (A) *Opa1* codant pour OPA1, (B) *Mfn1* codant pour la mitofusine 1 et (C) *Mfn2* codant pour la mitofusine 2.

**Figure 32 :** Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs de la fission mitochondriale par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AApr des souris contrôles (WT) et *Opa1*<sup>+/-</sup> soumises à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). (A) *Dnm1l* codant pour DRP1 et (B) *Fis1* codant pour FIS1.

**Figure 33 :** Mesures histomorphométriques du remodelage aortique des ATA, ATD et AApr des souris contrôles (WT) et *Opa1*<sup>+/-</sup> soumises à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). (A) Coupes histologiques colorées à l'orcéine, (B) aire totale, (C) ratio média/lumière et (D) ratio adventice/lumière.

**Figure 34 :** Structure des fibres élastiques de l'ATA (A) et l'AApr (B) de souris *Opa1*<sup>+/-</sup> soumises à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). (A) (B) Coupes histologiques colorées à l'orcéine.

**Figure 35 :** Coloration à l'Oil-Red-O des ATA, ATD et AApr des souris contrôles (WT) et *Opa1*<sup>+/-</sup> soumises à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). (A) Coupes histologiques colorées à l'Oil-Red-O, mesure de l'aire positive d'Oil-red-o dans (B) le vaisseau entier, (C) la média et (D) l'adventice.

**Figure 36 :** Coloration au rouge sirius. Comparaison des lumières blanche et polarisée (A), coloration en lumière polarisée de l'ATA (B) et l'AApr (C) de souris *Opa1*<sup>+/-</sup> soumises à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham).

**Figure 37 :** Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs de la matrice extra cellulaire par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AApr des souris contrôles (WT) et *Opa1*<sup>+/-</sup> soumises à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). (A) *Col1a1* codant pour le collagène de type I, (B) *Col3a1* codant pour le collagène de type III et (C) *Eln* codant pour l'élastine.

**Figure 38 :** Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs de la dégradation de la MEC par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AApr des souris contrôles (WT) et *Opa1*<sup>+/-</sup> soumises à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). (A) *Mmp2* codant pour MMP2, (B) *Timp1* codant pour TIMP1 et (C) *Timp2* codant pour TIMP2.

**Figure 39 :** Représentation schématique des voies de signalisation de la contraction cellulaire.

**Figure 40 :** Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs de la contraction cellulaire par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AApr des souris contrôles (WT) et *Opa1*<sup>+/-</sup> soumises à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). (A) *Acta2* codant pour ACTA2, (B) *Myh11* codant pour MYH11, (C) *Mylk* codant pour MLCK, (D) *Mlc20* codant pour MLC20, (E) *RhoA* codant pour RhoA et (F) *Rock1* codant pour ROCK1.

**Figure 41 :** Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs de l'apoptose et de la survie cellulaire par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AApr des souris contrôles (WT) et *Opa1*<sup>+/-</sup> soumises à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). (A) *Bax* codant pour BAX, (B) *Cyts* codant pour le cytochrome c et (C) *Bcl2* codant pour BCL2.

**Figure 42 :** Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs du stress oxydant par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AApr des souris contrôles (WT) et *Opa1*<sup>+/-</sup> soumises à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). (A) *Nox4* codant pour NOX4, (B) *Cyba* codant pour la sous-unité P22-PHOX de la NADPH oxydase, (C) *Sod1* codant pour SOD1 et (D) *Sod2* codant pour SOD2.

**Figure 43 :** Bilan lipidique des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> soumises à un régime normal (ND) ou enrichi en cholestérol (HFD) et à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). Taux plasmatiques de (A) cholestérol total, (B) triglycérides, (C) HDL-cholestérol, (D) LDL-cholestérol et (E) indice d'athérogénicité.

**Figure 44 :** Mesures histomorphométriques du remodelage aortique des ATA, ATD et AApr de souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> soumises à un régime normal (ND) ou enrichi en cholestérol (HFD) et à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). (A) Coupes histologiques colorées à l'orcéine, (B) aire totale, (C) ratio média/lumière et (D) ratio adventice/lumière.

**Figure 45 :** Structure des fibres élastiques de l'ATA (A) et l'AApr (B) de souris contrôles (*Ldlr*<sup>-/-</sup> sham ND) et anévrismales (*Ldlr*<sup>-/-</sup> AngII HFD).

**Figure 46 :** Coloration Oil-Red-O des ATA, ATD et AApr des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> soumises à un régime normal (ND) ou enrichi en cholestérol (HFD) et à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). (A) Coupes histologiques colorées à l'Oil-Red-O, mesure de l'aire positive d'Oil-red-o dans (B) le vaisseau entier, (C) la lumière, (D) la média et (E) l'adventice.

**Figure 47 :** Coloration au rouge sirius. Comparaison des lumières blanche et polarisée (A), coloration en lumière polarisée de l'ATA (B) et l'AApr (C) de souris contrôles (*Ldlr*<sup>-/-</sup> sham ND) et anévrismales (*Ldlr*<sup>-/-</sup> AngII HFD).

**Figure 48 :** Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs de la matrice extracellulaire par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AApr des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> soumises à un régime normal (ND) ou enrichi en cholestérol (HFD) et à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). (A) *Col1a1* codant pour le collagène de type I, (B) *Col3a1* codant pour le collagène de type III et (C) *Eln* codant pour l'élastine.

**Figure 49 :** Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs de la dégradation de la MEC par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AApr des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> soumises à un régime normal (ND) ou enrichi en cholestérol (HFD) et à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). (A) *Mmp2* codant pour MMP2, (B) *Timp1* codant pour TIMP1, (C) *Timp2* codant pour TIMP2.

**Figure 50 :** Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs de la contraction cellulaire par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AApr des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> soumises à un régime normal (ND) ou enrichi en cholestérol (HFD) et à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). (A) *Myh11* codant pour MYH11, (B) *Mylk* codant pour MLCK et (C) *Acta2* codant pour ACTA2.

**Figure 51 :** Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs de l'apoptose et de la survie cellulaire par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AApr des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> soumises à un régime normal (ND) ou enrichi en cholestérol (HFD) et à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). (A) *Bax* codant pour BAX et (B) *Bcl2* codant pour BCL2.

**Figure 52 :** Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs du stress oxydant par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AApr des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> soumises à un régime normal (ND) ou enrichi en cholestérol (HFD) et à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). (A) *Nox4* codant pour NOX4, (B) *Ncf2* codant pour la sous-unité P67-PHOX de la NADPH oxydase, (C) *Sod1* codant pour SOD1 et (D) *Sod2* codant pour SOD2.

**Figure 53 :** Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs de la fusion mitochondriale par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AApr des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> soumises à un régime normal (ND) ou enrichi en cholestérol (HFD) et à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). (A) *Opa1* codant pour OPA1, (B) *Mfn1* codant pour la mitofusine 1 et (C) *Mfn2* codant pour la mitofusine 2.

**Figure 54 :** Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs de la fission mitochondriale par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AApr des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> soumises à un régime normal (ND) ou enrichi en cholestérol (HFD) et à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). (A) *Dnm1l* codant pour DRP1 et (B) *Fis1* codant pour FIS1.

**Figure 55 :** Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs de la biogénèse mitochondriale par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AApr des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> soumises à un régime normal (ND) ou enrichi en cholestérol (HFD) et à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). (A) *Tfam* codant pour TFAM et (B) *Nrf1* codant pour NRF-1.

# Table des tableaux

**Tableau 1** : Liste des oligonucléotides utilisés pour les PCR quantitatives.

**Tableau 2** : Mesure de la masse des animaux, des cœurs, de la pression artérielle systolique et du pourcentage de mortalité des souris contrôles (WT) et *Opa1*<sup>+/-</sup> soumises à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham).

**Tableau 3** : Mesure de la masse des animaux, des cœurs, de la pression artérielle systolique et du taux de mortalité des souris LDLR<sup>-/-</sup> soumises à un régime normal (ND) ou enrichi en cholestérol (HFD) et à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham).

# Introduction générale

## 1. Le système circulatoire

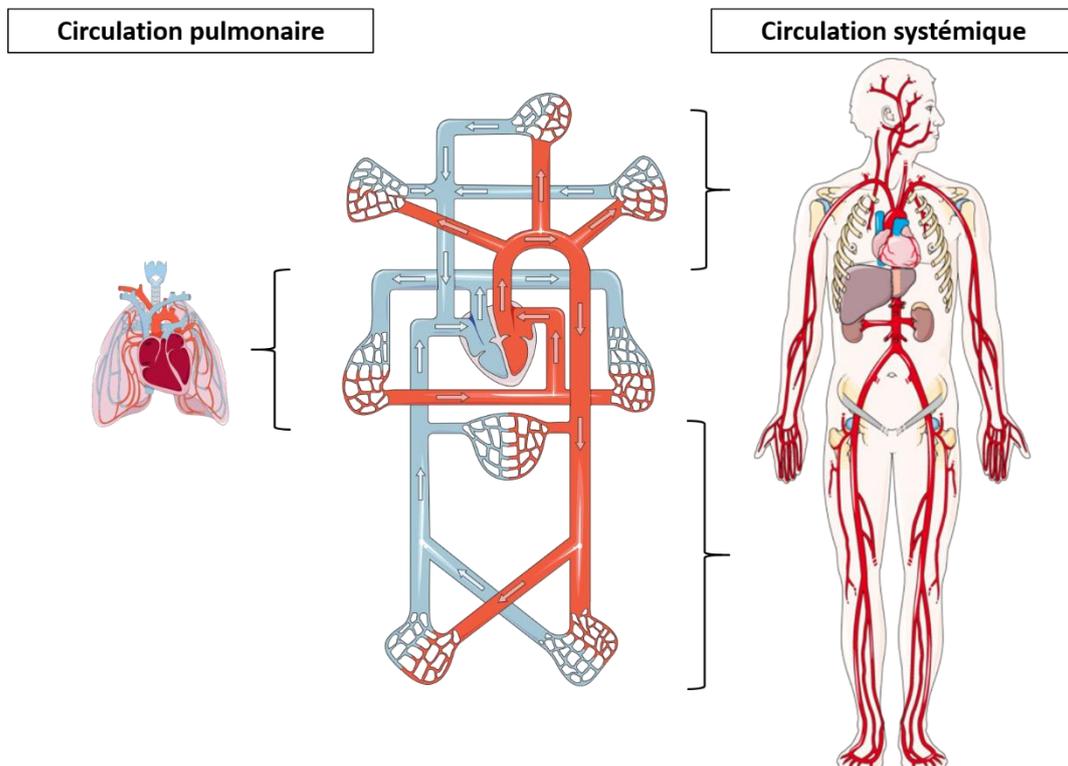
### 1.1. Généralités

La survie de chaque être vivant dépend en tout ou partie des apports énergétiques apportés à chaque organisme. Dans le règne animal, cette énergie est produite en présence d'oxygène et de nutriments qui sont transportés par le sang, *via* le système circulatoire.

Chez l'Homme, le système circulatoire est un circuit fermé dont la fonction principale est d'assurer le transport continu des éléments essentiels au bon fonctionnement des tissus et de drainer les déchets toxiques des cellules (CO<sub>2</sub>, catabolites) produits par ces derniers. Il est vulgairement décrit comme un circuit fermé composé d'une pompe, le cœur, qui permet l'éjection du sang au travers des tuyaux, les vaisseaux sanguins, permettant sa conduction à travers le corps.

Il existe, en réalité, deux circuits distincts (**Figure 1**) :

- La circulation systémique, permettant le transport du sang chargé en oxygène et en nutriments jusqu'aux tissus puis le retour des déchets vers le cœur
- La circulation pulmonaire, permettant la réoxygénation du sang et le rejet des déchets par le système respiratoire



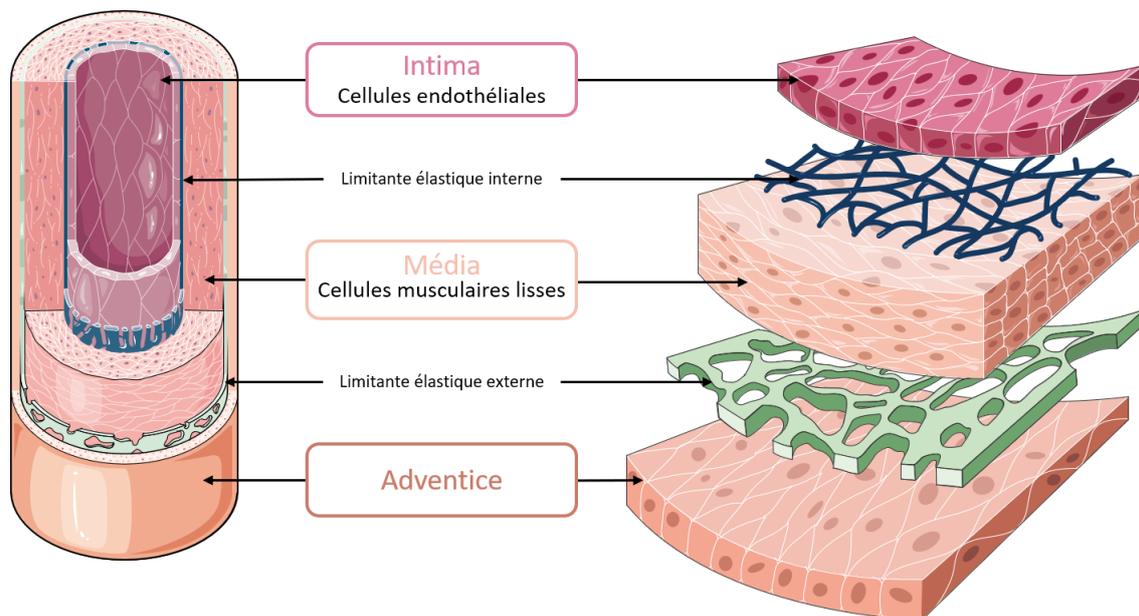
**Figure 1 : Représentation schématique du système circulatoire.**

Dans ces deux circuits, les vaisseaux sanguins se trouvent divisés en deux classes : les artères, qui transportent sang du cœur vers les organes, et les veines, permettant le retour du sang vers le cœur.

## 1.2. Les artères

Les artères sont les vaisseaux les plus actifs du système circulatoire. Leur fonction principale consiste à assurer l'irrigation de tous les tissus en conduisant vers la périphérie le sang éjecté par le cœur. Elles sont capables de se contracter et de se dilater pour distribuer le sang dans tout l'organisme. Directement soumises à la pulsativité cardiaque, elles se doivent d'amortir celle-ci afin de protéger les organes et assurer un apport constant de sang. La taille et la composition des artères sont modulées en fonction de la distance qui les sépare du cœur et des organes. Ainsi, les artères situées à proximité du cœur, appelées artères de compliance ou artères élastiques, sont de gros calibre et ont une composition élastique permettant d'amortir la pulsativité cardiaque. Les artères aux abords des organes, dites artères de résistance ou musculaires, sont de plus petit calibre et ont une paroi plus musculaire afin de protéger les organes de fortes variations de pression ou de débit. Elles représentent la plus grande densité artérielle du corps pour optimiser les échanges avec les différents tissus.

Les artères de compliance et de résistance diffèrent par leur diamètre et leur structure interne mais elles partagent une structure identique basée sur trois couches successives : l'intima, la média et l'adventice (**Figure 2**).



**Figure 2 : Représentation schématique de la composition de la paroi artérielle.**

### 1.2.1. La structure artérielle

#### a) L'intima

L'intima, ou endothélium, est la couche la plus interne du vaisseau, en contact direct avec le sang. Il est constitué d'une unique couche de cellules endothéliales reposant sur un tissu de soutien, la membrane basale. Cette couche de cellules est la première à capter les changements mécaniques et hémodynamiques du sang et des agents

circulants. Du fait de sa position anatomique, l'endothélium constitue une barrière physique entre le sang et les organes. L'intima forme une surface d'échanges entre le sang et les tissus en régulant la migration des cellules et constituants du sang, ainsi que des gaz et nutriments, vers la média. Il joue aussi un rôle important dans la thrombose, l'agrégation plaquettaire et le maintien de l'intégrité vasculaire.

De plus, l'endothélium est un organe dynamique et sensible aux forces mécaniques exercées par le sang. Il est largement impliqué dans la réactivité vasculaire en réponse au flux sanguin et à divers éléments circulants (hormones, neurotransmetteurs, facteurs vasoactifs). Ainsi, l'endothélium est principalement connu pour son rôle crucial dans la vasodilatation (Furchgott et Zawadzki 1980; Furchgott et Vanhoutte 1989) notamment par la libération de nombreux agents vasoactifs régulant le tonus vasculaire et principalement la dilatation.

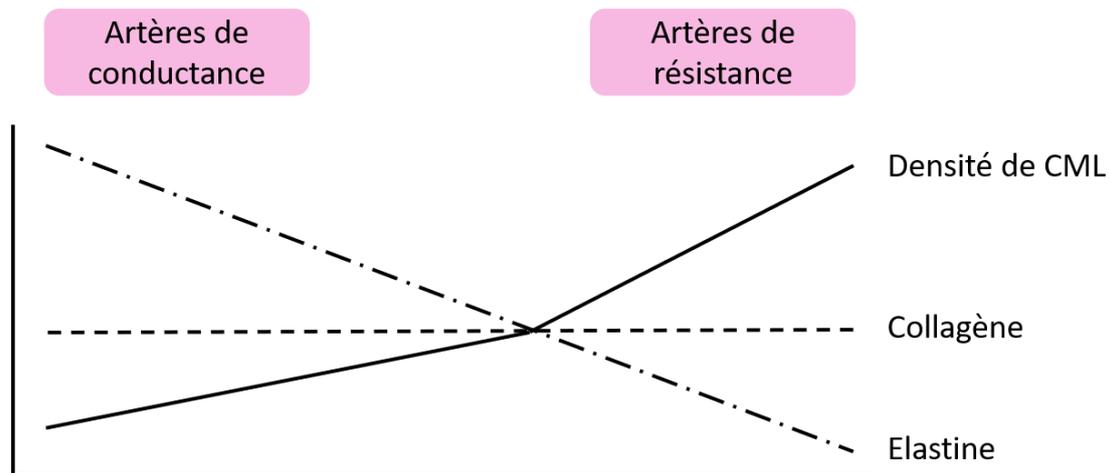
Une atteinte de l'intégrité de l'endothélium se traduit par une diminution de la capacité dilatatrice des artères et une diminution de la perméabilité membranaire pouvant être associées à un défaut de coagulation. On parle souvent de dysfonction endothéliale pour décrire la diminution de la capacité dilatatrice de l'endothélium. Celle-ci est décrite dans de nombreuses pathologies vasculaires comme dans l'hypertension artérielle (HTA) où elle joue un rôle majeur (K.-T. Kang 2014; Martinez-Quinones et al. 2018).

## b) La média

### Organisation générale

La média est la tunique moyenne et la plus épaisse de la paroi artérielle. Elle est constituée de plusieurs couches successives de cellules musculaires lisses (CML) soutenues par du tissu conjonctif, la matrice extracellulaire (MEC). Cette dernière est principalement composée de fibres d'élastine organisées en lames élastiques concentriques et de fibres de collagènes. Les CML permettent aux artères de se contracter ou se dilater, c'est ce que l'on appelle la réactivité vasculaire. L'élastine et le collagène, quant à eux, caractérisent l'élasticité et la rigidité artérielle déterminant la compliance du vaisseau. Le ratio élastine/collagène diminue au fur et à mesure de l'avancé dans l'arbre artériel. De ce fait, les artères aux abords du cœur possèdent un fort taux d'élastine, les rendant très compliantes. *A contrario*, plus les artères sont proches des organes périphériques, moins elles sont compliantes. Elles ont plus de couches musculaires, ce qui les rend plus réactives aux agents circulants et aux modifications hémodynamiques.

Ainsi, la structure des artères varie en fonction de leur localisation et de leur rôle (**Figure 3**). En revanche, la média reste composée de CML et de différentes protéines constituant la MEC, dont les fibres élastiques, les fibres de collagènes et les protéoglycanes.



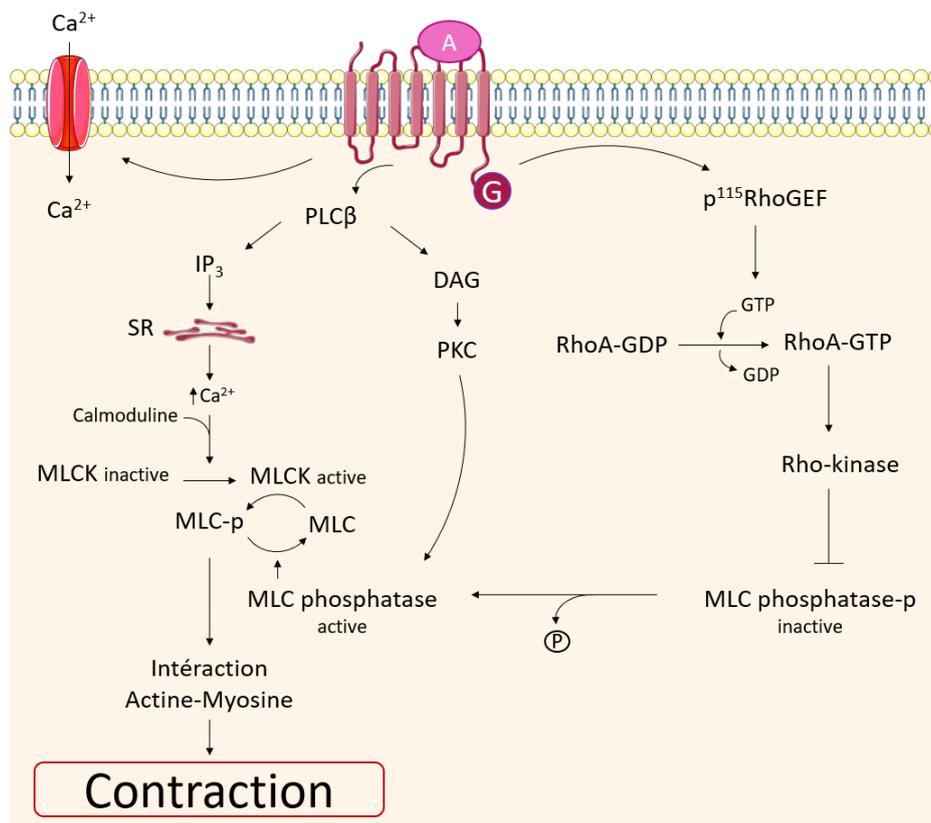
**Figure 3 : Composition des parois des artères de conductance et de résistance.**

Adapté de (J.-B. Michel 2020)

### **Les cellules musculaires lisses (CML)**

Les cellules musculaires lisses sont les cellules majoritaires de la paroi artérielle. Ce sont les principales cellules sécrétrices des composants de la MEC et de leur dégradation. Elles représentent le composant actif des artères. En effet, les CML sont les cellules responsables de la contraction et de la dilatation des artères notamment grâce à leurs microfilaments d'actine et de myosine (Sweeney et Hammers 2018).

La contraction des CML est directement liée au taux de calcium intracellulaire. En effet, les CML sont pourvues de nombreux récepteurs sensibles à des facteurs mécaniques ou hormonaux qui, lorsqu'ils sont activés, induisent une augmentation intracellulaire de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Le  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique se lie à la calmoduline afin d'activer la kinase des chaînes légères de myosine (MLCK). Cette dernière induit la phosphorylation de la sérine 19 des chaînes légères de myosine de 20kDa (MLC20). Cette phosphorylation permet la stimulation de l'activité GTPase de la myosine et sa liaison avec l'actine, provoquant alors la contraction cellulaire. L'activité enzymatique de la MLCK peut être contrôlée par de nombreuses kinases : la protéine kinase activée par l'AMPc (PKA), par le GMPc (PKG), par les petites protéines G Rac et Cdc42 (PAK) et le complexe CAM- $\text{Ca}^{2+}$  (CAMKII). A l'inverse, la phosphatase des chaînes légères de myosine (MLCP) est régulée par les protéines de la famille des Rho GTPases (**Figure 4**).



**Figure 4 : Représentation schématique des voies de signalisation de la contraction cellulaire.**

Adapté de (Ernesto L. Schiffrin et Touyz 2004)

A, Agoniste ; G, protéine G ; SR, réticulum sarcoplasmique ; PLCβ, phospholipase C β ; IP<sub>3</sub>, inositol triphosphate ; DAG, diacylglycérol ; PKC, protéine kinase C ; MLC, chaîne légère de myosine ; MLCK, kinase des chaînes légères de myosine ; GEF, facteur d'échange de nucléotide guanine ; GTP, guanosine triphosphate ; GDP, guanosine diphosphate.

Les trois protéines fonctionnelles des CML sont ACTA2 (ou α-SMA) (Whitesell et al. 2014), SM22-α (ou transgeline) (Yang et al. 2003) et MYH11 (myosine SMC) (Abrams et al. 2016). L'isoforme MYH11 est le dernier élément contractile des CML découvert et est le premier à disparaître dans le cas de dédifférenciation des CML (Babu, Warshaw, et Periasamy 2000). De nombreuses pathologies vasculaires, comme l'hypertension artérielle ou l'anévrisme, décrivent un changement phénotypique des CML vers un phénotype prolifératif, apoptotique et sécrétoire avec une augmentation du stress oxydatif local. Cela peut passer par la répression de l'expression des gènes codant pour les protéines contractiles comme ACTA2, SM22a ou MYH11 (Salmon et al. 2012; Gomez, Swiatlowska, et Owens 2015). Les CML sont donc aujourd'hui considérées comme les acteurs majeurs des pathologies vasculaires telles que l'hypertension artérielle et l'anévrisme. Les modifications phénotypiques et fonctionnelles des CML dans ces pathologies seront abordées dans les chapitres suivants.

- **La matrice extracellulaire (MEC)**

Dans la média, les propriétés mécaniques et physico-chimiques des artères sont assurées par les protéines composant la MEC. La MEC vasculaire joue un rôle essentiel dans la structure et la fonction des vaisseaux. Elle

confère un point d'ancrage pour les cellules constituant la paroi artérielle influant sur leur migration, leur phénotype et leur fonction. Principalement synthétisées par les CML, les trois principaux composants de la MEC sont les fibres élastiques, les fibres de collagène et les protéoglycanes (**Figure 5**). Les concentrations de ces composants influencent les propriétés des artères et la réponse des CML aux contraintes mécaniques.

Le remaniement de la MEC joue un rôle primordial dans de nombreux processus physiologiques tels que le développement, l'angiogenèse ou la cicatrisation (Matrisian 1990; Mignatti et Rifkin 1993). Un remodelage anormal de la MEC, se traduisant par une dégradation excessive ou insuffisante de celle-ci, a été associé à de nombreuses pathologies vasculaires telles que l'HTA, l'athérosclérose ou les anévrismes (Barallobre-Barreiro et al. 2020).

#### - Les fibres élastiques

La fonction élastique des vaisseaux est assurée par les fibres élastiques organisées en lames concentriques parallèles à la lumière du vaisseau. Il s'agit du composant principal de la MEC (40 à 60% du poids du vaisseau dans l'aorte thoracique ascendante). Elles sont indispensables dans l'amortissement de la pulsativité du cœur. En effet, les lames élastiques permettent d'amortir et de stocker l'énergie de la systole et la restituer lors de la diastole : c'est la compliance. C'est pourquoi, les fibres élastiques se retrouvent en grande quantité dans l'aorte thoracique et leur nombre diminue à mesure que l'on s'éloigne du cœur. Plus la quantité d'élastine est forte et la quantité de collagène est faible, plus le pouvoir élastique des artères est important.

Les fibres élastiques sont composées en majeure partie (90%) d'élastine. Les 10% restant correspondent aux glycoprotéines de structure microfibrillaires comportant les fibrillines 1 et 2, des MAGP (« microfibrillar-associated glycoproteins »), l'émiline, les fibulines... (Wagenseil et Mecham 2007).

Il a été prouvé sur modèle murin que la délétion génétique de l'élastine (*Eln*<sup>-/-</sup>) entraîne la létalité quelques jours après la naissance en raison de l'obstruction de l'aorte due à la prolifération des CML (D. Y. Li, Brooke, et al. 1998). En parallèle, il est décrit que les souris hétérozygotes pour le gène codant pour l'élastine sont viables mais présentent une hypertension et une compliance aortique diminuée (D. Y. Li, Faury, et al. 1998).

#### - Les fibres de collagène

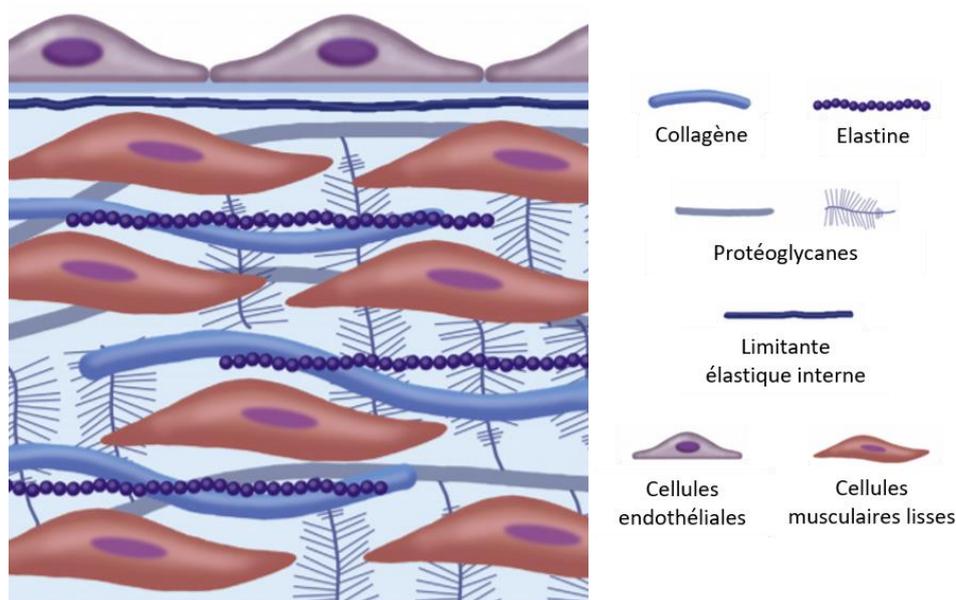
Les collagènes sont les glycoprotéines les plus représentées du règne animal. Dans la paroi vasculaire, le collagène assure la fonction de résistance mécanique à l'étirement et de rigidité du tissu artériel (Barallobre-Barreiro et al. 2020). C'est lui qui apporte la solidité aux tissus, notamment face à la rupture.

Il existe 28 collagènes différents classés en deux grandes sous-familles : les collagènes fibrillaires et non-fibrillaires. Dans la paroi vasculaire, le collagène représente 20-40% du poids sec d'un vaisseau, où les collagènes de type I et III, de structure fibrillaire, sont principalement retrouvés (80-90% des collagènes de la paroi vasculaire). Le collagène I, qui correspond à 60% du collagène total, assure le support structural du vaisseau alors que le collagène III, représentant 30% du collagène, joue un rôle dans l'élasticité et l'extensibilité pariétale. De nombreuses études sur des modèles murins ont démontré l'importance majeure des collagènes I et III dans le développement du système cardiovasculaire, entraînant notamment des ruptures artérielles spontanées en cas de déficience de ces protéines (L. J, R, et R 1984; L. X et al. 1997). La paroi artérielle comprend aussi, du collagène IV, V et VI (10%). Le collagène fibrillaire de type V est localisé autour des CML et près des membranes

basales dans le but de réguler la croissance, la migration et la différenciation cellulaire. Les collagènes non fibrillaires IV et VI sont situés dans la membrane basale pour soutenir les CE et entourer les CML. De même, des études ont mis en avant le rôle fondamental de ces protéines dans le maintien de l'intégrité et de la fonction de la paroi artérielle et principalement des membranes basales vasculaires (Rj et al. 2004; E et al. 2004; T et al. 2010).

- Les protéoglycanes (PG)

Du fait de leur forte charge électrostatique négative, les PG contrôlent le mouvement des ions et la perméabilité de la paroi artérielle. Leur localisation à l'interface entre les CML et la MEC leur permet de contrôler l'intégrité structurelle des vaisseaux et d'influencer de nombreuses fonctions cellulaires (croissance, différenciation, adhésion, migration). Enfin, elles peuvent former des complexes avec les autres protéines de la MEC et jouent donc un rôle majeur dans le dépôt de la matrice synthétisée par les CML. Une forte accumulation de protéoglycanes a été observée dans la MEC artérielle au cours du vieillissement et dans des pathologies vasculaires comme l'athérosclérose (Wight et Merrilees 2004; Karangelis et al. 2010).



**Figure 5 : Représentation schématique de la composition de la matrice extracellulaire artérielle.**

Adapté de (Barallobre-Barreiro et al. 2020)

- Dégradation de la MEC (MMP et TIMP)

La dégradation physiologique ou pathologique de la MEC est régulée par de nombreuses protéases. Les métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (MMP) semblent les plus impliquées dans le remodelage de la matrice.

Les MMP matricielles constituent une famille d'endopeptidases calcium et zinc-dépendantes capables de dégrader les composants de la MEC et des lames basales qui interviennent dans tous les processus physio-pathologiques de remaniement de la structure artérielle. Elles sont synthétisées par toutes les cellules vasculaires (notamment par les CML) (Galis et al. 1994) et par les cellules inflammatoires présentes dans la paroi vasculaire.

Les MMP peuvent être classées en différents groupes en fonction de leur structure et de leur spécificité de substrats (Y. Li et al. 2020). Les collagénases (MMP-1 et MMP-13) dégradent spécifiquement les collagènes fibrillaires du tissu conjonctif (collagènes de type I, II et III). Les gélatinases A (MMP-2) et B (MMP-9) digèrent le collagène dénaturé ainsi que les collagènes de type IV, V et VII. Les stromélysines (MMP-3, 10 et 11) possèdent une activité protéolytique très large. Elles dégradent les protéoglycanes, les laminines, la fibronectine, le collagène non fibrillaire ainsi que des molécules d'adhésions. D'autres MMP comme les MMP de type membranaire ou MT-MMP ou encore les MMP exprimées par les macrophages jouent un rôle dans la dégradation de la MEC et la réponse inflammatoire.

L'expression des MMP est régulée par des inhibiteurs tissulaires endogènes et spécifiques, les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMP) (Brew, Dinakarandian, et Nagase 2000). Il existe aujourd'hui quatre molécules appartenant à cette famille : TIMP-1, -2, -3 et -4. Leur inhibition des MMP peut se faire à deux stades, en bloquant le précurseur des MMP (pro-MMP) en formant un complexe avec lui l'empêchant de former les MMP ou en formant un complexe avec les MMP activées et ainsi bloquer leur activité de dégradation de la MEC.

Une augmentation de l'activité des MMP a été mise en évidence dans certaines pathologies comme l'anévrisme de l'aorte abdominale (Y. Yao, Cheng, et Cheng 2020).

### c) L'adventice

L'adventice constitue la tunique externe de la paroi vasculaire. Il s'agit d'un tissu conjonctif peu organisé, très vascularisé et innervé, riche en collagène, contenant des fibroblastes, des adipocytes et des cellules immunitaires. Elle permet de relier les vaisseaux aux tissus environnants, de les soutenir et de les protéger contre des déformations extrêmes. L'adventice artérielle est parcourue par deux réseaux distincts : le *vasa vasorum* et le *vasa nervorum*.

Le *vasa vasorum* comprend des micro-vaisseaux sanguins et lymphatiques permettant la bonne irrigation de la paroi artérielle et les apports en oxygène et nutriments. Ils sont principalement présents dans les grosses artères pour lesquelles la lumière artérielle ne permet pas d'irriguer les cellules situées en périphérie de l'artère.

Le *vasa nervorum*, quant à lui, est constitué de nerfs et terminaisons nerveuses jouant un rôle dans le tonus vasculaire. Les fibres nerveuses s'infiltrent jusque dans la limite externe de la média, permettant au message nerveux d'agir directement sur les CML les plus externes. La transmission de l'information s'effectue alors de proche en proche par couplage électrique. Contrairement aux *vasa vasorum* qui sont présents sur les gros vaisseaux, l'innervation artérielle est d'autant plus importante que les vaisseaux sont petits. En effet, les petites artères sont le siège des résistances périphériques et ont le plus grand tonus vasculaire.

L'adventice est le siège de la réponse immunitaire adaptative des artères altérées ce qui peut l'amener à subir un remodelage dans certaines pathologies comme l'anévrisme (J.-B. Michel et al. 2007a). Les pathologies anévrismales sont le siège d'une forte inflammation et une dégradation de cette tunique peut provoquer un remodelage expansif et dans le pire des cas, la rupture artérielle.

### 1.2.2. Les artères de conductance

Les artères de conductance, dites élastiques, représentent les vaisseaux de plus gros calibre de l'ensemble du réseau artériel (300 à 800µm de diamètre chez la souris). Elles comprennent les artères les plus proches du cœur : l'aorte, les carotides, les artères sous-clavières, pulmonaires, iliaques et le tronc artériel brachiocéphalique. Leur rôle majeur consiste à amortir la pulsativité du cœur afin d'assurer un flux sanguin continu tout le long de l'arbre vasculaire. Ceci est permis par la grande proportion en fibres élastiques permettant d'absorber l'onde de pression produite par le cœur et limitant son impact sur les organes. Ainsi, dans le cas particulier de l'aorte, l'élasticité de la paroi permet de stocker le sang lors de la systole et le restituer durant la diastole, maintenant un flux continu malgré la pulsativité du cœur : c'est l'effet Windkessel.

### 1.2.3. Les artères de résistance

Au fur et à mesure de l'avancée dans l'arbre artériel, la paroi artérielle perd en élasticité pour devenir de plus en plus musculaire. En effet, la média des artères de résistance est presque exclusivement composée de CML au détriment des fibres élastiques. Ces artères sont donc beaucoup plus musculaires et par conséquent plus réactives. Ces dernières, localisées à proximité des organes (artères mésentériques, coronaires, rénales et cérébrales), représentent la majorité du réseau artériel de l'organisme et ont un calibre plus faible que les artères de compliance (50 à 200µm de diamètre chez la souris). Les artères musculaires sont responsables de la régulation des résistances périphériques, d'où elles tiennent leur nom d'artères de résistance.

Leur rôle principal consiste à protéger les organes de variations trop importantes de pression ou de débit. Pour cela, les cellules endothéliales et musculaires lisses de ces artères possèdent de nombreux mécanorécepteurs permettant de capter rapidement les modifications de pression ou de débit (S. Wang et al. 2016). La grande quantité de CML permet une régulation fine et précise des débits locaux grâce à la rapidité de la vasoréactivité très rapide lors de changements mécaniques dans le but de normaliser les contraintes.

### 1.2.4. La réactivité vasculaire

Dans des conditions physiologiques, de nombreux facteurs peuvent influencer la réactivité vasculaire. Les cellules vasculaires se trouvent directement impactées par les variations hémodynamiques telles que la pression artérielle et le débit sanguin ou, indirectement, par l'intermédiaire de facteurs chimiques locaux libérés par les cellules sanguines et vasculaires elles-mêmes.

#### a) Les facteurs mécaniques

La pression et le débit sont deux paramètres hémodynamiques importants qui agissent sur la réactivité et la structure artérielle. Des variations chroniques de ces facteurs sont les premières responsables de pathologies vasculaires telles que l'hypertension artérielle (HTA) ou l'athérosclérose impliquant un remodelage artériel.

Cette capacité à réagir aux paramètres hémodynamiques est une caractéristique des artères de résistances. En effet, pour protéger les organes de la pulsativité du cœur, les artères de résistance doivent compenser les

variations de pression ou de débit. Leur capacité à se contracter ou à se dilater rapidement en réponse à la pression ou au flux, est défini par deux paramètres : le tonus myogénique et la dilatation dépendante du flux.

- **Le Tonus Myogénique (TM)**

La pression, exprimée en mmHg, est une force, appliquée par le sang sur la paroi vasculaire par unité de surface. La pression artérielle (PA) est contrôlée par le cerveau, le cœur, les vaisseaux et les reins. Ils agissent ensemble pour assurer l'homéostasie de la PA. Les variations de pression dans la microcirculation induisent une vasoconstriction que l'on appelle tonus myogénique.

Le tonus myogénique se définit par une réponse vasoconstrictrice locale provoquée par une augmentation de pression sur la paroi vasculaire. Le TM est retrouvé uniquement dans les artères de petit calibre (moins de 300µm de diamètre). Il permet de protéger les capillaires, et donc les organes, contre une augmentation excessive de la pression sanguine.

Le TM se déroule en plusieurs phases successives. Dans un premier temps, l'augmentation de la pression induit un étirement passif suivi de deux phases de contraction, une première phase, dite transitoire, puis une seconde, dite soutenue (Osol et al. 2002). Différents canaux membranaires peuvent être activés par l'élévation de la pression intraluminale tels que les canaux TRP (« Transient Receptor Potential »), très décrits dans le tonus myogénique (Sharif-Naeini et al. 2008). Toutes les voies de signalisations activées ont pour seul but, l'augmentation du calcium intracellulaire dans les CML (Knot et Nelson 1998). La dépolarisation des CML et l'augmentation de calcium intracellulaire induisent l'activation de la kinase des chaînes légères de myosine (MLCK). Celle-ci permet la phosphorylation des chaînes légères de myosine et ainsi le réarrangement des fibres d'actomyosine dans les CML et donc la contraction du vaisseau.

Des variations aiguës de la pression dans la microcirculation sont contrebalancées par le tonus myogénique. En revanche, des variations chroniques sont à l'origine de pathologies telles que l'hypertension artérielle, impliquant notamment un remodelage artériel et une altération de la réactivité artérielle (décrits ultérieurement).

- **La dilatation flux-dépendante (FMD : « Flow Mediate Dilation »)**

Le débit ou flux sanguin, exprimé en mL/min, est caractérisé par le volume de sang s'écoulant dans le vaisseau à un instant T. Les variations locales de débit dans la microcirculation induisent une vasodilatation appelée dilatation flux-dépendante.

La FMD est une réponse à une augmentation locale de débit sanguin, responsable d'une augmentation des forces de frottements sur l'endothélium vasculaire, nommées forces de cisaillement ou « shear stress ». Celles-ci provoquent la sécrétion d'agents vasodilatateurs *via* l'activation des cellules endothéliales, induisant un relâchement des CML sous-jacentes. La dilatation due à l'augmentation des forces de cisaillement est médiée par les trois voies de dilatation de l'endothélium : les voies du monoxyde d'azote (NO), des prostaglandines (PGI<sub>2</sub>) et des facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHF) détaillées ultérieurement (Guzman, Abe, et Zarins 1997).

Des perturbations des forces de cisaillement jouent un rôle dans le recrutement de cellules immunitaires *via* l'augmentation des molécules d'adhérence (Walpola et al. 1995). Ces dernières peuvent être impliquées dans un remodelage expansif des artères (Tronc et al. 1996; Dumont, Loufrani, et Henrion 2007), voire même dans une dégradation de la paroi artérielle, phénomène retrouvé dans des pathologies à forte composante inflammatoire telles que l'athérosclérose ou l'anévrisme.

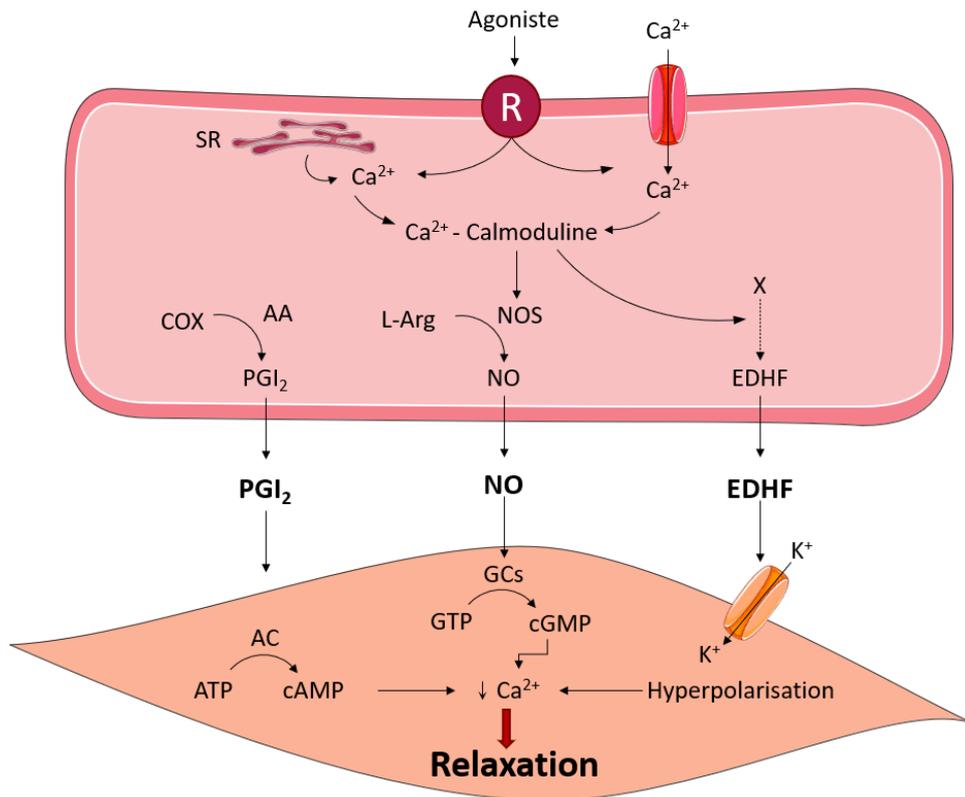
## **b) Les substances chimiques locales**

La balance vasomotrice est régulée par des substances chimiques locales permettant de contrôler le tonus artériel et donc les débits sanguins locaux. L'endothélium joue un rôle majeur dans la régulation de la vasomotricité locale. En effet, les cellules endothéliales peuvent sécréter des facteurs relaxants tels que le monoxyde d'azote (NO), les prostaglandines (PGI<sub>2</sub>) et les facteurs hyperpolarisant dérivés de l'endothélium (EDHF). L'endothélium est également responsable de la sécrétion de facteurs vasoconstricteurs tels que l'endothéline 1 (ET1), le thromboxane (TXA<sub>2</sub>) et les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS : « reactive oxygen species »). Ces éléments, impliqués dans la dilatation ou la contraction des artères, sont sécrétés en réponse à des stimuli chimiques et mécaniques.

- **Les facteurs vasorelaxants dérivés de l'endothélium (Figure 6)**

- Le monoxyde d'azote (NO, « nitric oxyde »)

Le monoxyde d'azote est l'un des acteurs majeurs de la relaxation dépendante de l'endothélium. Le NO est le produit de l'activité enzymatique de la NO synthase (NOS) qui convertit la L-arginine en citrulline avec une libération de NO. Il existe trois isoformes de la NOS : la NOS neuronale (nNOS) produisant du NO en tant que messenger neural, la NOS inductible (iNOS) activée par des cellules exposées à des phénomènes inflammatoires et la NOS endothéliale (eNOS) exprimée dans le système vasculaire. L'activation des cellules endothéliales par les forces de cisaillement ou par des agonistes chimiques comme la bradykinine (BK), l'acétylcholine (ACh), l'adénosine triphosphate (ATP) ou l'adénosine diphosphate (ADP) provoque une augmentation de calcium intracellulaire, *via* la libération des stocks calciques du réticulum endoplasmique. Le calcium, une fois libéré peut se coupler à la calmoduline et activer la eNOS (Fleming et Busse 1999; Rafikov et al. 2011). Une fois synthétisé dans les cellules endothéliales, le NO diffuse vers les CML adjacentes et se lie à la guanylate cyclase soluble (GCs) pour augmenter la synthèse de guanosine monophosphate cyclique (cGMP) à partir de guanosine triphosphate (GTP) (Denninger et Marletta 1999; Tsai et Kass 2009). L'augmentation de cGMP induit alors l'activation de la protéine kinase G (PKG) conduisant à la diminution du calcium dans les CML, à la diminution de l'activité de la MLCK et donc à une vasorelaxation.



**Figure 6 : Représentation schématique des voies de signalisations impliquées dans la relaxation artérielle.**

Adapté de (Vanhoutte 1998)

SR, réticulum sarcoplasmique ; COX, cyclooxygénases ; PGI<sub>2</sub>, prostacyclines ; AA, acide arachidonique ; L-Arg, L-Arginine ; NO, monoxyde d'azote ; NOS : NO synthase ; EDHF, facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium ; ATP, adénosine triphosphate ; cAMP, AMP cyclique ; AC, adénylate cyclase ; GTP, guanosine triphosphate ; cGMP, guanosine monophosphate cyclique ; GCs, guanylate cyclase soluble.

- Les prostacyclines (PGI<sub>2</sub>)

La deuxième voie de relaxation endothélium-dépendante est médiée par les prostacyclines. Ces dernières sont produites par les enzymes cyclooxygénases (COX) à partir de l'acide arachidonique (AA). Il existe deux isoformes de cyclooxygénases : COX-1 et COX-2. COX-1 est exprimé constitutivement, alors que COX-2 est plutôt exprimé lors d'un dommage tissulaire ou une réaction inflammatoire. Ces deux isoformes sont exprimées dans les cellules vasculaires, et plus particulièrement dans les CE. Le PGI<sub>2</sub> produit par les CE, principalement par COX-2 (Caughey et al. 2001), peut se fixer sur les récepteurs IP des CML, permettant l'activation de l'adénylate cyclase A (AC) et donc l'augmentation de la quantité d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) à partir de l'ATP. L'AMPc provoque alors, via la protéine kinase A (PKA), la diminution du calcium dans les CML et donc leur relaxation.

- Les facteurs hyperpolarisants (EDHF)

Lorsque les voies du NO et des prostacyclines sont inhibées, la dilatation endothélium-dépendante ne se trouve pas totalement abolie, prouvant la présence d'une troisième voie de dilatation dépendante de l'endothélium. Celle-ci est la voie des facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium qui est, à ce jour, la moins décrite des trois.

Son activation dépend de la présence de calcium intracellulaire et de l'efflux de potassium des CE par les canaux potassium endothéliaux activés par le calcium  $SK_{Ca}$  et  $IK_{Ca}$  provoquant alors l'hyperpolarisation des CE. L'augmentation de la concentration potassique dans l'espace intercellulaire engendre l'hyperpolarisation des CML sous-jacents. Celle-ci induit alors la diminution de calcium intracellulaire et donc une vasodilatation (K.-T. Kang 2014).

- **Les facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium**

- L'endothéline 1 (ET-1)

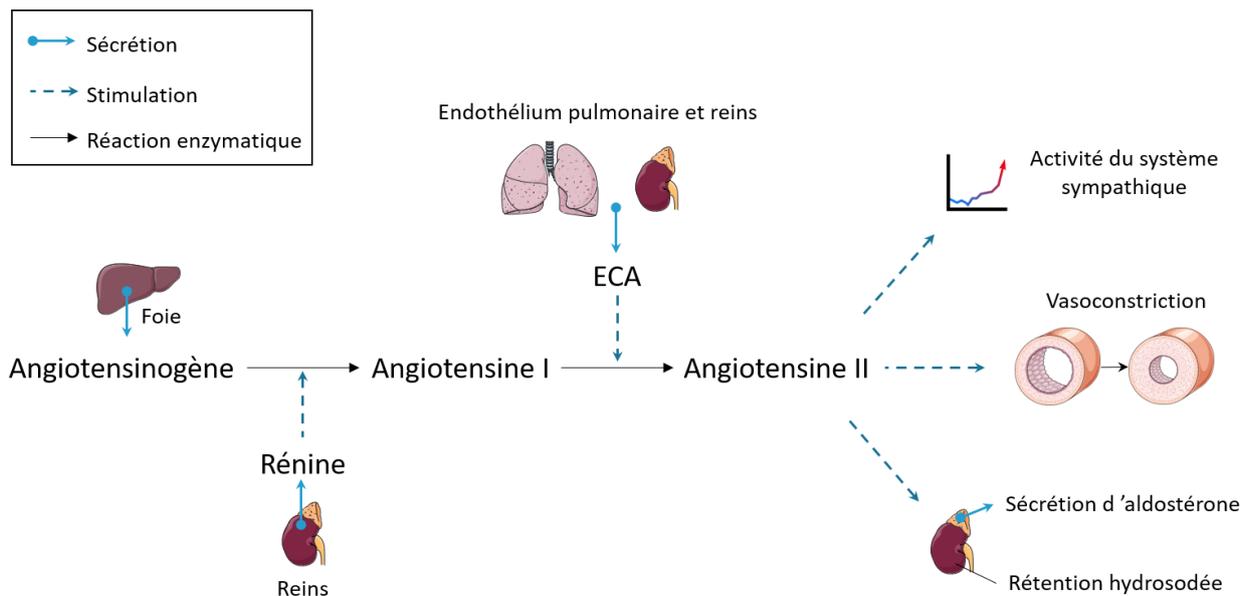
Le rôle de l'endothélium dans la vasodilatation est maintenant largement connu et prépondérant. Mais il joue aussi un rôle dans la vasoconstriction notamment grâce à l'endothéline 1 dont il existe trois isoformes (ET-1, ET-2 et ET-3). L'endothéline 1 est produite par l'endothélium en réponse à des facteurs inflammatoires (IL-1, TNF- $\alpha$ ), à l'angiotensine II, aux catécholamines ou à l'hypoxie, et est inhibée par le NO et les prostacyclines. Les récepteurs à l'ET-1 sont situés à la fois sur les CML ( $ET_A$  et  $ET_{B2}$ ) et les CE ( $ET_{B1}$ ). La vasoconstriction induite par l'endothéline 1 est due à la fixation sur le récepteur  $ET_A$  qui provoque une augmentation de la concentration calcique dans les CML. *A contrario*, la fixation de l'endothéline sur le récepteur endothélial induit une vasodilatation par libération de NO et de PGI2 (Thorin et Webb 2010).

- Le thromboxane A2 (TXA2)

En plus de leur rôle dans la vasodilatation, les COX ont une importance majeure dans la production de thromboxane A2. C'est principalement COX-1 qui induit la production de TXA2 (Caughey et al. 2001). L'action de ce vasoconstricteur est médiée par sa fixation sur les récepteurs Thromboxane-Prostanoïde (TP) situés sur les plaquettes et les CML. L'activation des récepteurs TP est impliquée dans les mécanismes d'adhésion, d'agrégation plaquettaire, de contraction, de prolifération des CML et d'activation de l'inflammation endothéliale.

- **Le système rénine-angiotensine-aldostérone**

Le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) est un acteur majeur de l'homéostasie de la pression artérielle (PA), de l'équilibre hydrosodé et du système cardiovasculaire. Il agit sur le cœur, le cerveau, les reins et les vaisseaux dans le but de contrôler la PA (**Figure 7**). Le premier acteur de cette voie est la rénine. Elle est sécrétée par les cellules de l'appareil juxta-glomérulaire lors d'une diminution de la PA et du volume sanguin. La rénine permet la conversion de l'angiotensinogène, produit par le foie, en angiotensine I (AngI). Cette dernière est ensuite convertie en angiotensine II (AngII) par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) principalement sécrétée par les cellules endothéliales au niveau pulmonaire, rénal et artériel. L'AngII se trouve être un acteur majeur de la vasoconstriction et par conséquent, de l'augmentation de la pression artérielle. Son action se situe principalement sur les glandes corticosurrénales et les artères elles-mêmes. Au niveau des glandes corticosurrénales, l'AngII induit la production d'aldostérone afin de réguler la volémie des artères *via* la balance hydrosodée, entraînant la rétention de sodium et d'eau au niveau rénal. Sur les artères, l'AngII agit directement sur les CML afin d'induire la vasoconstriction.

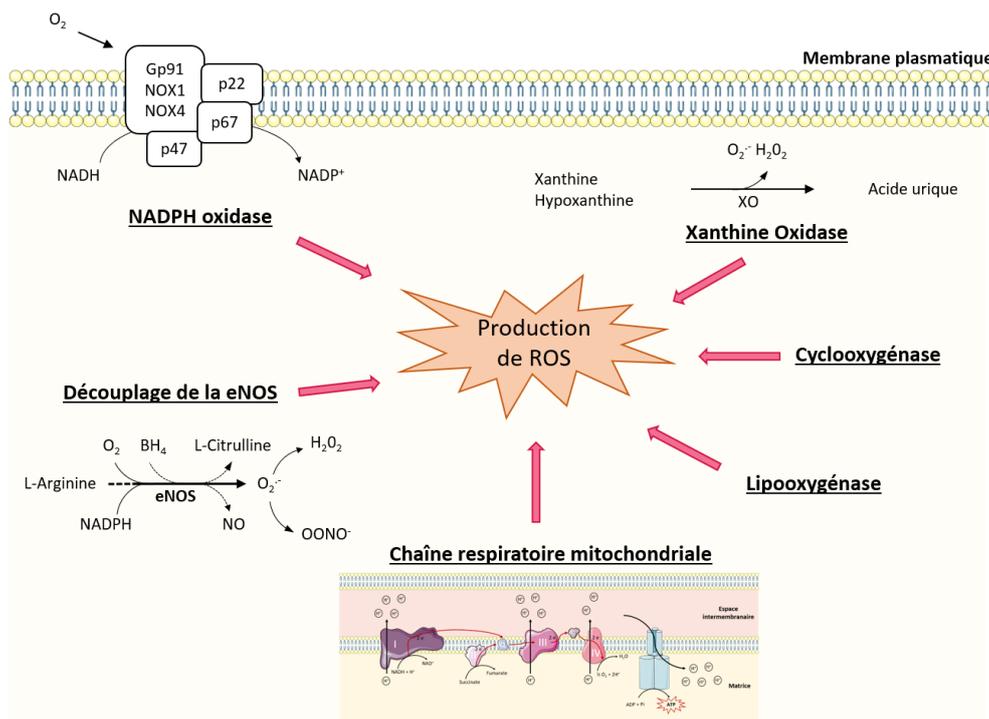


**Figure 7 : Représentation schématique du système rénine-angiotensine-aldostérone.**

Il existe deux récepteurs à l'angiotensine : le récepteur de type 1 (AT1R) et le récepteur de type 2 (AT2R) (R. M. Touyz et Schiffrin 2000). L'action de l'AngII a longtemps été imputée à la présence unique du récepteur de type 1. En effet, celui-ci est beaucoup plus abondant que le récepteur de type 2. AT1R est principalement exprimé dans les glandes surrénales, les reins, le cœur, le cerveau et les CML. Il a été démontré que ce récepteur avait un rôle majeur dans la vasoconstriction et la diminution du débit sanguin rénal, la libération d'aldostérone et de vasopressine et donc dans la rétention de sodium (Hsueh et Wyne 2011). AT2R, quant à lui, est principalement présent dans les tissus fœtaux. Son expression diminue rapidement après la naissance et se maintient à un faible niveau chez l'adulte (Horiuchi, Akishita, et Dzau 1999). Présent dans l'endothélium vasculaire, AT2R est associé à l'apoptose et à la vasodilatation artérielle, contrairement à AT1R, plutôt associé à la prolifération, l'inflammation et la vasoconstriction (Henrion, Kubis, et Lévy 2001; Suzuki et al. 2002; B. Tian et al. 2003).

- **Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)**

Les radicaux libres, ou ROS, sont des dérivés réactifs du métabolisme du dioxygène ( $O_2$ ). Ils comprennent plusieurs composés : l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) et l'acide hypochloreux ( $HOCl$ ). Les CE, CML et fibroblastes vasculaires sont capables de produire des ROS. Plusieurs sources de ROS ont été décrites dans le système vasculaire dont la principale, la nicotinamide dinucléotide phosphate oxydase (NADPH oxydase ou NOX), mais aussi le découplage de la eNOS et la mitochondrie (**Figure 8**).



**Figure 8 : Représentation schématique des sources de ROS cellulaires.**

Adapté de (Birukov 2009)

NADH, nicotinamide adénine dinucléotide réduit ; NADP<sup>+</sup>, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; BH<sub>4</sub>, tétrahydrobioptérine ; NO, monoxyde d'azote ; eNOS : NO synthase endothéliale ; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, anion superoxyde ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxyde d'hydrogène ; OONO<sup>-</sup>, peroxydinitrite.

La principale source de ROS du système vasculaire est la NADPH oxydase (NOX). Sur les 5 isoformes de la NADPH oxydase, 4 sont exprimées dans les tissus vasculaires : NOX1, NOX2, NOX4 et NOX5. Il s'agit d'un complexe enzymatique membranaire composé de différentes sous-unités comme p22phox, p47phox, p67phox prenant en charge l'association, la stabilisation et l'activation des NOX ou encore Rac1 responsable de leur activité enzymatique. Les NOX vasculaires sont constitutivement actives et produisent en continu de faibles concentrations d'anion superoxyde par la réaction d'oxydation de la NADPH par le dioxygène (Selemidis et al. 2008).

Le découplage de la eNOS est aussi une grande source de ROS dans les pathologies cardiovasculaires. En effet, l'oxydation des deux composants essentiels de la eNOS que sont la L-arginine et la tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>) provoque la production de ROS en remplacement du NO (Kuzkaya et al. 2003). Le découplage de la eNOS est impliqué dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires comme le diabète, l'hypertension artérielle, athérosclérose et l'anévrisme (Vásquez-Vivar et al. 2002; Thum et al. 2007; Schulz, Gori, et Münzel 2011).

Enfin, la mitochondrie se trouve également, s'être l'une des principales sources de ROS cellulaires. Elle intervient notamment au cours de la phosphorylation oxydative. En effet, le flux d'électrons provoque un transfert d'électrons à la molécule d'oxygène, induisant la production d'anion superoxyde (Zorov, Juhaszova, et Sollott 2014).

Les cellules possèdent aussi un système de protection contre les ROS qui comprend une succession d'enzymes antioxydantes. Les premiers acteurs de cette protection contre le stress oxydant sont les superoxydes dismutases (SOD) dont il existe trois isoformes : la SOD cytosolique (CuZn-SOD ou SOD-1), la SOD mitochondriale (Mn-SOD

ou SOD-2) et la SOD extracellulaire (EC-SOD ou SOD-3). Le rôle des SOD est de convertir l' $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$  permettant alors à d'autres acteurs antioxydants de prendre le relais (Fukai et Ushio-Fukai 2011). Ces derniers sont principalement la catalase et la glutathion peroxydase (GPx) qui ont pour rôle de convertir l' $H_2O_2$  en eau ( $H_2O$ ) (Wassmann, Wassmann, et Nickenig 2004).

Dans les conditions physiologiques, la production de ROS est compensée par leur élimination par les antioxydants. En revanche, dans des conditions pathologiques, cet équilibre est rompu et conduit à un état de stress oxydatif. Dans l'hypertension artérielle ou l'anévrisme aortique, une diminution de l'activité des antioxydants est observée, générant une augmentation de la quantité et de la biodisponibilité des ROS et conduisant ainsi au développement du stress oxydatif. L'importance de ce dernier dans les pathologies vasculaires sera approfondi ultérieurement.

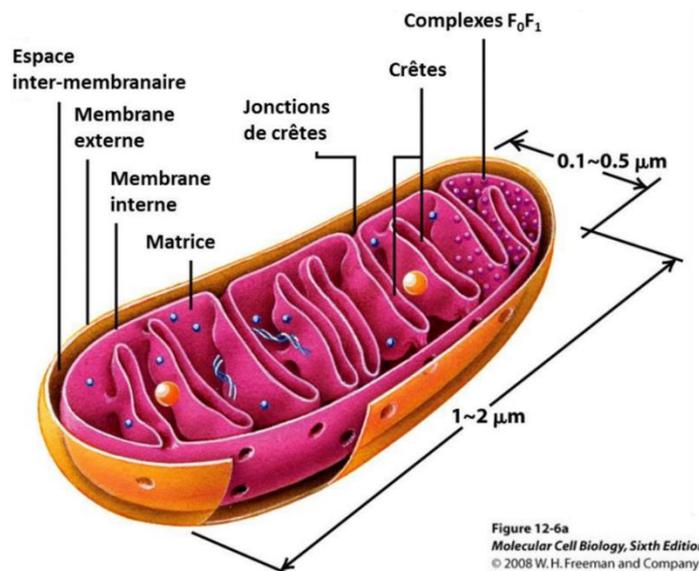
## 2. Les mitochondries

### 2.1. Généralités

Les mitochondries, du grec *mitos* (filament) et *chondros* (grain), ont été découvertes dans le tissu musculaire en 1857 par l'anatomiste et physiologiste suisse Rudolph Albert Von Kölliker. C'est la microbiologiste américaine, Lynn Margulis, qui évoqua en premier la théorie endosymbiotique selon laquelle les mitochondries actuelles proviendraient de l'endosymbiose d'une  $\alpha$ -protéobactérie dans une cellule eucaryote primitive. Ainsi, au cours de l'évolution, la mitochondrie a gardé des structures et des fonctions caractéristiques des deux organismes lui ayant donné « naissance » : une double membrane, un génome spécifique, une machinerie de biosynthèse de l'ARN et des protéines ainsi qu'un métabolisme énergétique propre.

Le rôle majeur de mitochondrie consiste à fournir l'énergie indispensable au bon fonctionnement des cellules sous forme d'ATP. Elle a un rôle central dans le métabolisme énergétique : elle est le siège de nombreuses réactions du métabolisme oxydatif dont le cycle de Krebs, la  $\beta$ -oxydation des acides gras ou la phosphorylation oxydative (OXPHOS). Elle a aussi un rôle prépondérant dans la survie et la mort cellulaire par apoptose, mais également dans la thermogénèse, la signalisation cellulaire, le stockage du calcium, la prolifération cellulaire et le vieillissement.

Les mitochondries sont présentes dans la plupart des cellules et leur nombre est proportionnel à la consommation énergétique de la cellule. En effet, plus un organe a besoin d'énergie, plus ses cellules compteront de mitochondries. Les cellules musculaires, cardiaques, hépatiques et neuronales sont donc les plus riches en mitochondries.



**Figure 9 : Représentation schématique de la structure mitochondriale.**

(Molecular Cell Biology)

## 2.2. Structure

La taille des mitochondries varie en fonction des besoins énergétiques des cellules et de la qualité des mitochondries elles-mêmes. Il est difficile de leur donner une taille précise. Il est cependant accepté qu'elles mesurent, en moyenne, 1 à 10  $\mu\text{m}$  de long et 0,5 à 1  $\mu\text{m}$  de diamètre. Du fait de son origine endosymbiotique, la mitochondrie est composée de deux membranes, plus ou moins perméables aux protéines et protons, qui délimitent trois compartiments : la matrice, l'espace inter-membranaire et le cytoplasme de la cellule (espace extra-mitochondrial). De plus, la membrane interne présente de nombreux replis formant un quatrième compartiment : les crêtes mitochondriales (**Figure 9**).

### 2.2.1. La membrane externe

La membrane externe est une bicouche lipidique, structurellement proche de la membrane plasmique, de 5 à 7 nm d'épaisseur composée de 60% de protéines et 40% de lipides, perméable aux ions et aux petites molécules. Elle est riche en protéines membranaires nommées porines ou VDAC (« voltage-dépendant anion channel »), qui forment des canaux aqueux traversant la bicouche lipidique et permettant le transport passif de molécules de taille inférieure à 5-10 kDa, du cytoplasme vers l'espace intermembranaire. Les molécules de plus de 10 kDa possédant un site d'adressage mitochondrial (MTS) sont, quant à elles, prises en charge par les complexes d'importation TOM (translocases of outer membrane) par transport actif.

### 2.2.2. La membrane interne

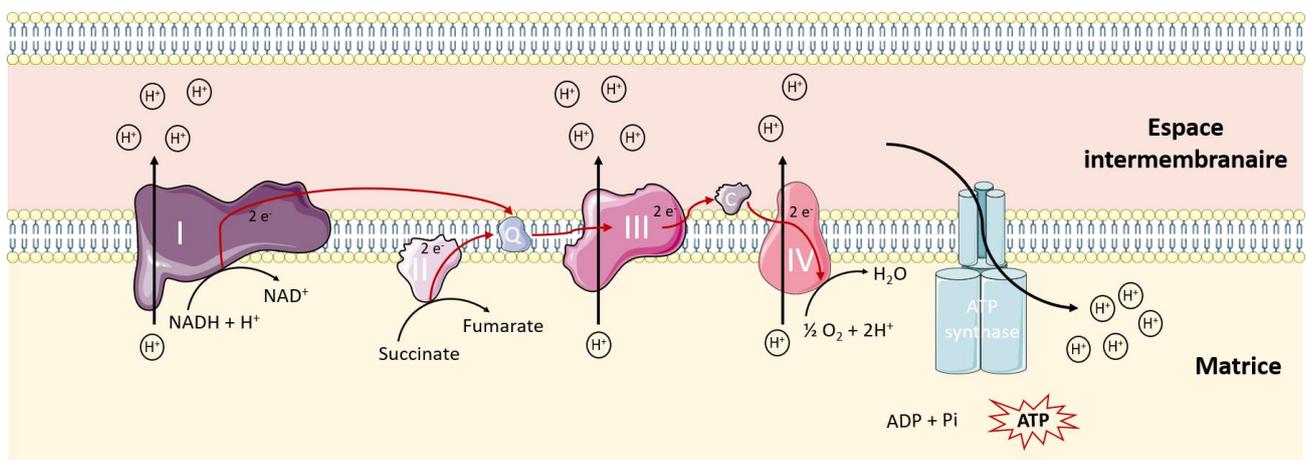
En accord avec son ancêtre procaryote, la composition de la membrane interne ressemble davantage à celle d'une bactérie qu'à celle d'une cellule eucaryote. Du fait de ses nombreuses invaginations, la surface de la membrane interne est 5 à 10 fois supérieure à celle de la membrane externe. Epaisse de 6-8 nm, elle est composée de 25% de phospholipides et de 75% de protéines. La cardiolipine constitue 20% des lipides, ce qui la rend beaucoup moins perméable que la membrane externe. Elle forme une barrière sélective entre l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale, la rendant imperméable aux ions et notamment aux protons. Le passage de molécules vers la matrice nécessite donc des transporteurs spécifiques tels que la translocase des nucléotides adényliques (ANT) assurant l'échange ATP/ADP entre le cytosol et la matrice mitochondriale, le transporteur de phosphate inorganique (PiC), la navette malate/aspartate, le transporteur du pyruvate, la navette glycérol 3-phosphate et les translocases de la membrane interne (TIM) permettant le passage des protéines. La membrane interne est aussi le siège de la formation d'un méga canal appelé pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTPm), dont l'ouverture engendre une diminution de la perméabilité membranaire et du potentiel de membrane, caractéristiques notamment retrouvées dans des pathologies cardiaques (Piquereau et al. 2012; Seidlmayer et al. 2015).

La majeure partie des protéines de la membrane interne composent la chaîne respiratoire permettant la production d'ATP à partir de l'oxygène (phosphorylation oxydative : OXPHOS). La chaîne respiratoire est une

chaîne de transport d'électrons constituée, dans un premier temps, de quatre complexes enzymatiques permettant le transport d'électrons (**Figure 10**) :

- Complexe I ou NADH ubiquinone oxydoréductase
- Complexe II ou succinate ubiquinone oxydoréductase
- Complexe III ou ubiquinol cytochrome c oxydoréductase
- Complexe IV ou cytochrome c oxydase

A ces complexes, s'ajoutent deux transporteurs mobiles d'électrons que sont l'ubiquinone (ou coenzyme Q) et le cytochrome c. Les électrons provenant de l'oxydoréduction du NADH et du FADH<sub>2</sub> sont transportés tout au long de la chaîne respiratoire, provoquant ainsi la libération de protons dans l'espace intermembranaire. Ces derniers sont alors pris en charge par un cinquième complexe enzymatique, l'ATP synthétase, qui catalyse la production d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Pi).



**Figure 10 : Représentation schématique du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.**

La sortie de protons de la matrice crée un gradient de concentration en protons et un potentiel de membrane mitochondrial à travers la membrane interne. Une diminution de ce potentiel de membrane mitochondriale peut être le reflet d'une dysfonction de la chaîne respiratoire mitochondriale retrouvé dans certaines pathologies neurodégénératives ou cardiovasculaires (Zorova et al. 2018).

### 2.2.3. L'espace intermembranaire

L'espace intermembranaire est le compartiment situé entre les deux membranes mitochondriales. Du fait de la semi-perméabilité de la membrane externe, la composition de l'espace intermembranaire est proche du cytoplasme. De ce fait, il est composé de molécules de faible poids moléculaire (inférieur à 10 kDa) pouvant traverser la membrane externe. La chaîne respiratoire située sur la membrane interne, quant à elle, induit l'accumulation de protons dans cet espace. Enfin, il contient de nombreuses protéines pouvant avoir un rôle dans l'apoptose, le métabolisme et la dynamique mitochondriale.

#### 2.2.4. Les crêtes

Les crêtes sont formées par les invaginations de la membrane interne dans la matrice. Elles sont maintenues à leur base par des protéines formant les jonctions de crêtes qui préviennent la diffusion du contenu de ces dernières en laissant un espace de 20 à 50 nm de diamètre. Ces jonctions sont formées de complexes protéiques nommés MICOS (« Mitochondrial contact site and organizing system complex ») (Kozjak-Pavlovic 2017). On y retrouve aussi la protéine OPA1 (Optic Atrophy 1) qui joue un rôle dans la fusion mitochondriale. Les crêtes renferment le cytochrome *c*, premier maillon de la cascade apoptotique. Elles ont donc une importance majeure dans le phénomène de mort cellulaire par apoptose en cas de désorganisation de celles-ci.

#### 2.2.5. La matrice

La matrice est le compartiment interne de la mitochondrie. Elle est très concentrée en enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique : cycle de Krebs,  $\beta$ -oxydation des acides gras, oxydation du pyruvate. Des réserves sous forme de granules denses contenant des ions calcium et magnésium sont observées dans la matrice. De par son origine endosymbiotique, elle contient également plusieurs copies d'ADN mitochondrial (ADNmt) et les composants nécessaires à son métabolisme ainsi que ceux indispensables à sa réplication, transcription, traduction et réparation (ARN ribosomiques, ribosomes, ARN de transfert, ATP, ADP...).

##### a) Génome mitochondrial

Le génome mitochondrial a gardé la forme circulaire du génome bactérien. Aujourd'hui, il code pour 1% de l'ADN cellulaire total. Il code pour 22 ARN de transfert, 2 ARN ribosomiques et 13 protéines de la chaîne respiratoire. Le nombre de copies d'ADNmt varie entre 2 et 10 au sein des mitochondries. C'est pourquoi, des mutations de l'ADNmt peuvent être responsables de pathologies. En effet, une mutation de l'ADNmt peut être présente sur toutes les copies (homoplasmie) ou sur une partie des copies (hétéroplasmie). Le taux d'hétéroplasmie peut être représentatif de la gravité d'une pathologie (Taylor et Turnbull 2005). Parmi ces maladies liées aux mutations de l'ADNmt, nous pouvons mettre en avant le syndrome MELAS ou la maladie de Leber ayant principalement des atteintes neurologiques, optiques et vasculaires (Lestienne et Bataillé 1994).

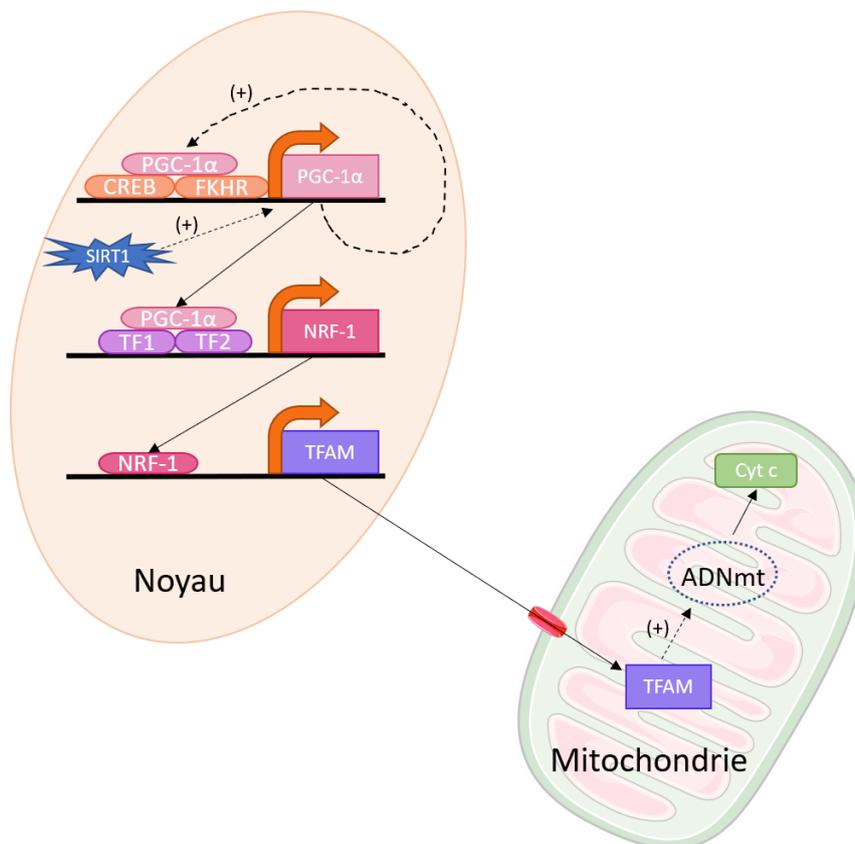
L'ADNmt est localisé sous la membrane interne, dans la matrice, et fait partie d'une structure nucléoprotéique associée à la membrane interne, appelée nucléoïde (Spelbrink 2010; Prachař 2016). Ces derniers comprennent des protéines impliquées dans la réplication, la transcription et la réparation de l'ADNmt et sont le point central de la biogénèse mitochondriale.

##### b) Biogénèse mitochondriale

La biogénèse mitochondriale se définit par la croissance et la division des mitochondries préexistantes au sein d'une cellule. Elle repose sur l'action coordonnée de l'ADNmt et de plusieurs protéines codées par le génome nucléaire qui régulent l'expression de gènes mitochondriaux, eux-mêmes encodés par l'ADN nucléaire. De nombreuses protéines sont impliquées dans ce mécanisme dont (**Figure 11**) :

- TFAM (« mitochondrial transcription facteur A ») est le facteur de transcription le plus abondant des nucléoïdes et joue un rôle dans leur organisation. En plus de son rôle essentiel dans la transcription de l'ADNmt, il joue un rôle dans le maintien et la stabilisation de l'ADNmt et contribue directement à la réplication de ce dernier et régule donc le nombre de copies d'ADNmt (Larsson et al. 1998).
- NRF1 et NRF2 (« nuclear respiratory factor 1 and 2 ») sont deux facteurs de transcription jouant un rôle important dans la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la réplication et la transcription de l'ADNmt tels que *Tfam*, *Polrmt*, *Tfb1m* et *Tfb2m* (Scarpulla 2006) ainsi que des gènes codant pour des sous-unités de la chaîne respiratoire.
- PGC1 $\alpha$  (« proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) coactivator 1 $\alpha$  ») joue un rôle central dans la biogénèse mitochondriale. Son expression et son activation sont régulées par des stimuli environnementaux et représentent une activation de la biogénèse. PGC1 $\alpha$  interagit notamment avec NRF1 et NRF2 (Scarpulla 2006) permettant alors l'expression de gène codants pour des protéines de la chaîne respiratoire ainsi que pour les facteurs indispensables à la réplication et à la transcription mitochondriale.

Les variations d'expression de ces protéines ainsi que le nombre de copies d'ADNmt sont le reflet d'une modification de la biogénèse mitochondriale.



**Figure 11 : Représentation schématique de la biogénèse mitochondriale.**

Adaptée de (Viña et al. 2009)

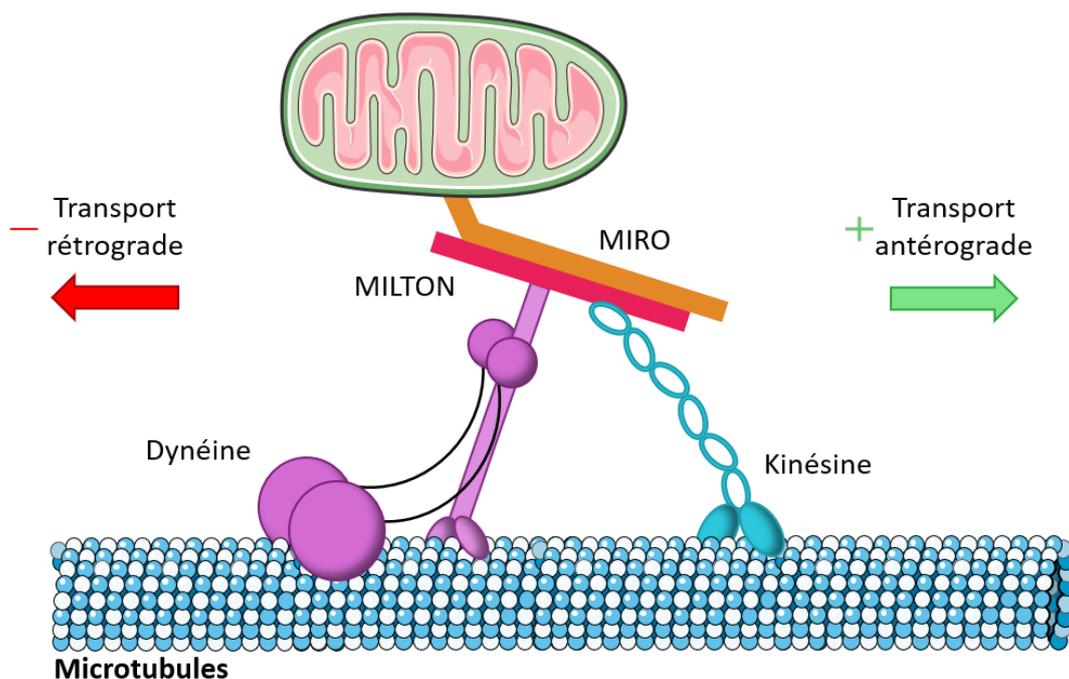
PGC1 $\alpha$ , proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) coactivator 1 $\alpha$  ; NRF-1, nuclear respiratory factor 1 ; TFAM, mitochondrial transcription factor A ; CREB, cAMP response element-binding ; FKHR, forkhead transcription factor 1 ; TF1 - TF2, transcription factors ; Cyt c, cytochrome c ; SIRT1, sirtuin 1.

## 2.3. Transport et distribution des mitochondries

Du fait des premières observations microscopiques, les mitochondries ont longtemps été décrites comme étant de petites entités indépendantes et immobiles. Il est depuis accepté qu'elles constituent un réseau hautement dynamique qui se déplace dans toute la cellule vers les zones à haute demande énergétique. Dans un premier temps, il a été décrit que les mitochondries étaient capables de se déplacer dans le cytoplasme cellulaire le long des microtubules grâce aux protéines motrices du cytosquelette (**Figure 12**).

Les kinésines assurent le transport antérograde (du centre de la cellule vers l'extrémité) des mitochondries *via* les microtubules. Les dynéines et les dynactines assurent, quant à elles, le transport rétrograde (de l'extrémité vers le centre). L'interaction entre les protéines motrices et la mitochondrie sont permises par le lien entre la protéine MIRO présente sur la membrane externe des mitochondries et la protéine cytosolique MILTON qui sert d'adaptateur entre MIRO et la kinésine ou le complexe dynéine/dynactine (Schwarz 2013; Sheng 2014).

De plus, les mitochondries peuvent se déplacer le long de l'appareil contractile de chaque cellule grâce à la myosine 19 (MYO19) qui permet le déplacement des mitochondries le long des filaments d'actine (Quintero et al. 2009). Ici aussi, la protéine mitochondriale MIRO permet le recrutement et la stabilisation de la mitochondrie sur MYO19 (Quintero et al. 2009 ; López-Doménech et al. 2018).



**Figure 12 : Représentation schématique du transport mitochondrial le long des microtubules.**

Adapté de (Schwarz 2013)

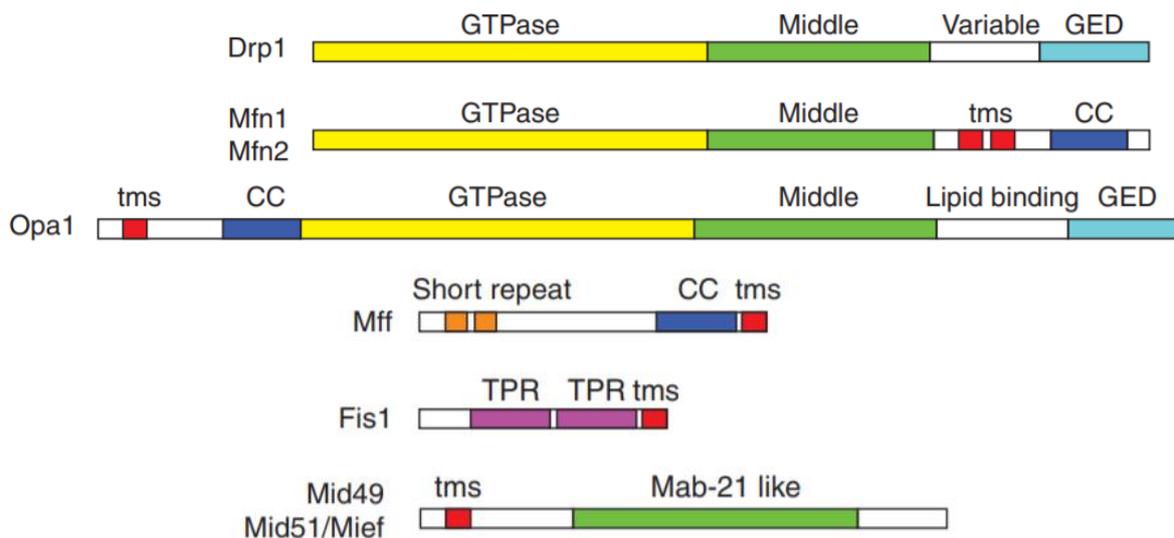
Cependant, nous savons désormais que la morphologie et la distribution des mitochondries sont aussi régulées par un mécanisme appelé la dynamique mitochondriale.

## 2.4. La dynamique mitochondriale

### 2.4.1. Généralités

La dynamique mitochondriale regroupe l'ensemble des phénomènes qui participent aux mouvements, à la structure et à la morphologie des mitochondries. La forme du réseau mitochondrial varie continuellement pour adapter sa structure en réponse aux besoins énergétiques et aux conditions physiopathologiques de chaque cellule. La morphologie du réseau mitochondrial dépend d'un équilibre constant entre des phénomènes de fusion et de fission mitochondriales. La fission est largement mise en avant lors de dysfonctions cellulaires, pathologies ou stress environnementaux. Elle est cependant indispensable lors de la division cellulaire pour la bonne répartition des mitochondries au sein des cellules filles. Elle a également un rôle majeur dans le relargage du cytochrome c lors de l'apoptose et dans l'élimination des mitochondries de mauvaise qualité par mitophagie. La fusion, quant à elle, est principalement vue comme un mécanisme bénéfique, permettant d'homogénéiser le contenu des mitochondries, pour ainsi corriger les éventuelles dysfonctions de l'ADNmt, mais également d'augmenter le potentiel de membrane et donc la respiration mitochondriale.

Les phénomènes de fission et de fusion sont régulés par des protéines de la famille des GTPases qui hydrolysent le GTP en GDP+Pi pour leur fonctionnement.



**Figure 13 : Représentation schématique des protéines de la fusion et de la fission mitochondriales.**

(van der Bliek, Shen, et Kawajiri 2013)

Drp1, dynamine related protein 1 ; Mfn1 – 2, mitofusine 1 – 2 ; Opa1, optic atrophy 1 ; Mff, mitochondrial fission factor ; Fis1, mitochondrial fission 1 protein ; Mid49/51, mitochondrial dynamics proteins of 49kDa and 51 kDa.

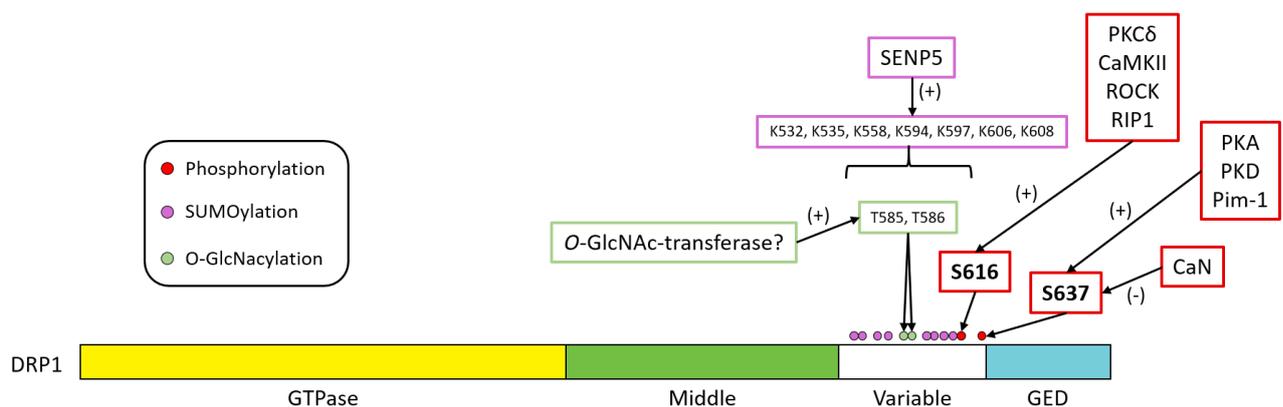
### 2.4.2. Fission mitochondriale

La fission mitochondriale correspond au processus de division des mitochondries qui induit la formation de petites mitochondries isolées dans les cellules. L'acteur majeur de la fission mitochondriale est la GTPase « dynamine-related protein 1 » (DRP1) principalement aidée par la protéine adaptatrice FIS1. Les autres protéines impliquées dans le phénomène de fission sont principalement MFF, MID49 et MID51 (**Figure 13**).

## a) DRP1

La protéine DRP1 est codée par le gène *Dnm1l* (« dynamin like 1 ») localisé sur le chromosome 12q11.21, dans le noyau. Il s'agit d'une dynamine ubiquitaire cytosolique de 736 acides aminés appartenant à la superfamille des GTPases. Elle possède un domaine GTPase N-terminal, un domaine Dynamin-like intermédiaire, un domaine variable et un domaine GTPase effecteur (GED) C-terminal, qui régule l'hydrolyse du GTP, mais elle ne possède pas de séquence d'adressage à la mitochondrie. Elle peut donc être localisée à la membrane des mitochondries (au niveau des futurs sites de fission) grâce notamment à son interaction avec des protéines adaptatrices. DRP1 est une protéine cytosolique existant sous forme de dimère ou de tétramère. Au cours de la fission mitochondriale, ces derniers s'assemblent autour de la mitochondrie pour induire sa fission grâce à l'hydrolyse du GTP. L'activité de DRP1 est régulée par des modifications post-traductionnelles permettant l'activation de son activité GTPase mais aussi son interaction avec les protéines adaptatrices.

Il existe différentes modifications post-traductionnelles de DRP1, les phosphorylations étant les plus connues (**Figure 14**). Plusieurs sites de phosphorylation de DRP1 ont été décrits : ils sont situés dans le domaine variable de DRP1. Deux sites ont été particulièrement étudiés. Le premier site correspond à la phosphorylation sur la sérine 616 par la cycline B/Cdk1, principalement pendant le cycle cellulaire, induisant l'activation de DRP1 (Taguchi et al. 2007). La deuxième phosphorylation importante de DRP1 se situe sur la sérine 637 par la PKA. Il s'agit d'une phosphorylation inhibitrice, bloquant l'activité GTPase de DRP1 (Chang et Blackstone 2007). D'autres modifications post-traductionnelles de DRP1 ont été décrites comme jouant un rôle dans sa régulation, notamment dans des pathologies cardiaques. Une acétylation de la lysine 642 associée à une augmentation de la phosphorylation s616 et une diminution de la phosphorylation s637 ont été mises en évidence dans des dysfonctions cardiaques (Hu et al. 2020). DRP1 est aussi sujet à la sumoylation, décrite comme ayant un rôle dans la cardioprotection contre des lésions d'ischémie reperfusion (Bian et al. 2019). L'activité de DRP1 peut aussi être négativement régulée par polysulfidation de la cystéine 624 (A. Nishimura et al. 2019).



**Figure 14 : Représentation schématique des modifications post-traductionnelles de DRP1.**

Adapté de (Adaniya et al. 2019)

La protéine DRP1 est connue comme étant la clef de la fission mitochondriale, mais son action sur la mitochondrie ne peut avoir lieu sans la présence de récepteurs mitochondriaux. En effet, DRP1 ne peut être recrutée à la mitochondrie sans l'aide de protéines adaptatrices telles que FIS1, MFF (« Mitochondrial Fission Receptor »), MID49, MID 51 (« Mitochondrial Dynamic Protein de 49 et 51 kDa ») sur la membrane externe des mitochondries et sans une oligomérisation (Losón et al. 2013 ; Palmer et al. 2013).

## **b) FIS 1**

FIS1 est une protéine ubiquitaire de 152 acides aminés, codée par le gène nucléaire *Fis* localisé en 7q22.1. Cette protéine se trouve ancrée à la membrane externe des mitochondries *via* son domaine transmembranaire en C-terminal. Son domaine N-terminal est constitué de six hélices  $\alpha$  antiparallèles incluant deux domaines tétratricopeptides (TPR) et se trouve exposé vers le cytoplasme. Il constitue le principal point d'ancrage de DRP1 à la membrane externe des mitochondries. Il a été prouvé qu'une surexpression de FIS1 induisait une fragmentation mitochondriale dépendante de DRP1. En effet, une absence de DRP1 inhibe la fragmentation médiée par la surexpression de FIS1 (James et al. 2003; Yoon et al. 2003).

De récents articles ont mis en évidence qu'une inhibition de l'interaction entre FIS1 et DRP1 pouvait réduire la fragmentation mitochondriale et restaurer la fonction cardiaque dans des conditions de cardiomyopathie septique (Haileselassie et al. 2019) et dans un modèle cardiaque de la maladie de Huntington (Joshi et al. 2019).

## **c) Protéines « accessoires »**

Même si FIS1 semble être la protéine adaptatrice principale de DRP1, plusieurs autres protéines ont été identifiées comme participant au recrutement de DRP1 dont les trois principales sont MFF (« Mitochondrial Fission Factor »), MiD49 et MiD51 (« Mitochondrial Dynamics proteins »).

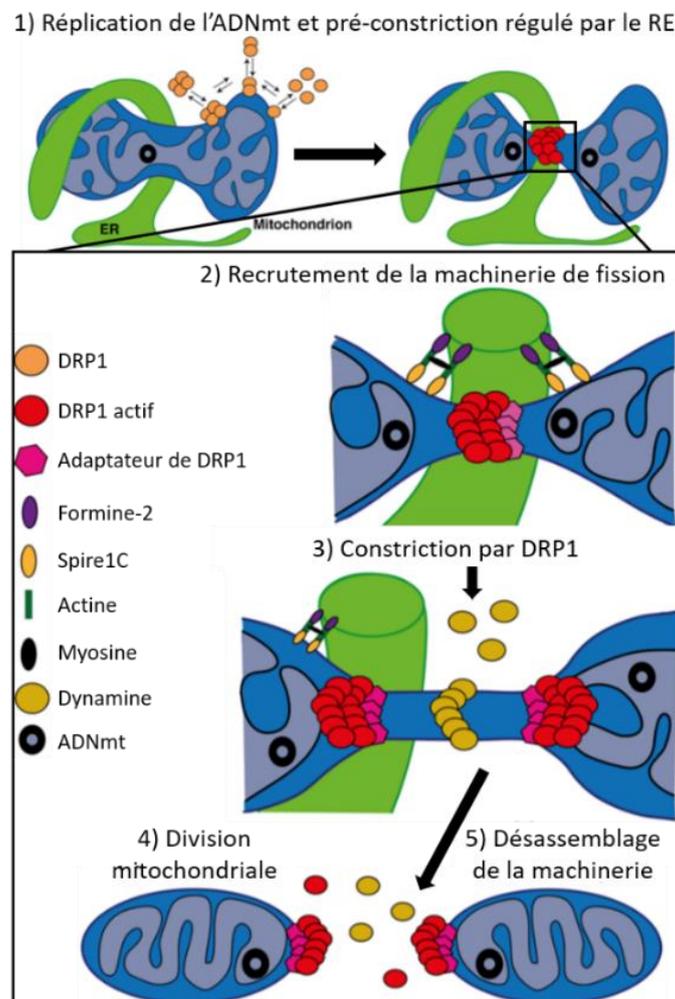
En 2010, Otera et ses collaborateurs ont prouvé qu'une absence de FIS1 n'altère pas totalement la fission mitochondriale, prouvant alors qu'elle n'est pas la seule protéine adaptatrice de DRP1. Des auteurs se sont alors penchés sur de nouveaux acteurs pouvant jouer un rôle dans le recrutement de DRP1 à la mitochondrie. Trois acteurs majeurs ont été mis en avant : le facteur de fission mitochondriale (MFF) et les protéines MiD49 et MiD51. MFF se trouve ancrée dans la membrane externe des mitochondries par son extrémité C-terminale. Sa partie N-terminale, orientée vers le cytosol, possède un site de liaison pour DRP1. Il a été prouvé que MFF interagissait avec DRP1 à la mitochondrie et ce, indépendamment de FIS1. La surexpression de MFF provoque la translocation de DRP1 à la mitochondrie et la fragmentation du réseau mitochondrial. A l'inverse, l'absence de MFF entraîne l'allongement du réseau mitochondrial par la réduction du recrutement de DRP1 à la mitochondrie (Otera et al. 2010).

MiD49 et MiD51 sont des protéines homologues ancrées, elles-aussi, dans la membrane externe des mitochondries. De même que pour MFF, l'absence de ces protéines induit une élévation de réseau mitochondrial *via* le recrutement de DRP1 à la mitochondrie (Otera et al. 2016; Osellame et al. 2016). Il a aussi été démontré que MiD49 et MiD51 pouvaient agir indépendamment de MFF et de FIS1 sur le recrutement de DRP1 et son action dans la fission (Palmer et al. 2013).

#### d) Déroulement de la fission mitochondriale

La fission mitochondriale est un mécanisme comprenant plusieurs étapes successives dont l'action principale est le recrutement de DRP1 à la membrane externe des mitochondries permettant leur scission en deux.

L'une des premières étapes de la fission mitochondriale comprend la réplication de l'ADNmt. Ceci marque une première phase de pré-constriction de la mitochondrie permise par le réticulum endoplasmique (RE) qui forme des tubules en s'enroulant autour du site de fission mitochondriale. La suite du processus repose sur le recrutement de DRP1 à la membrane externe des mitochondries. Les dimères ou tétramères de DRP1 cytosolique sont capables de former un anneau (Ingelman et al. 2005; Fröhlich et al. 2013) autour des mitochondries au point de contact entre la mitochondrie et le RE, grâce à leur ancrage aux protéines adaptatrices : FIS1, MFF, MiD49 et MiD51. C'est ensuite l'hydrolyse du GTP qui induit la constriction de la mitochondrie (Mears et al. 2011) et ainsi la scission en deux mitochondries filles (**Figure 15**).



**Figure 15 : Représentation schématique du fonctionnement de la fission mitochondriale.**

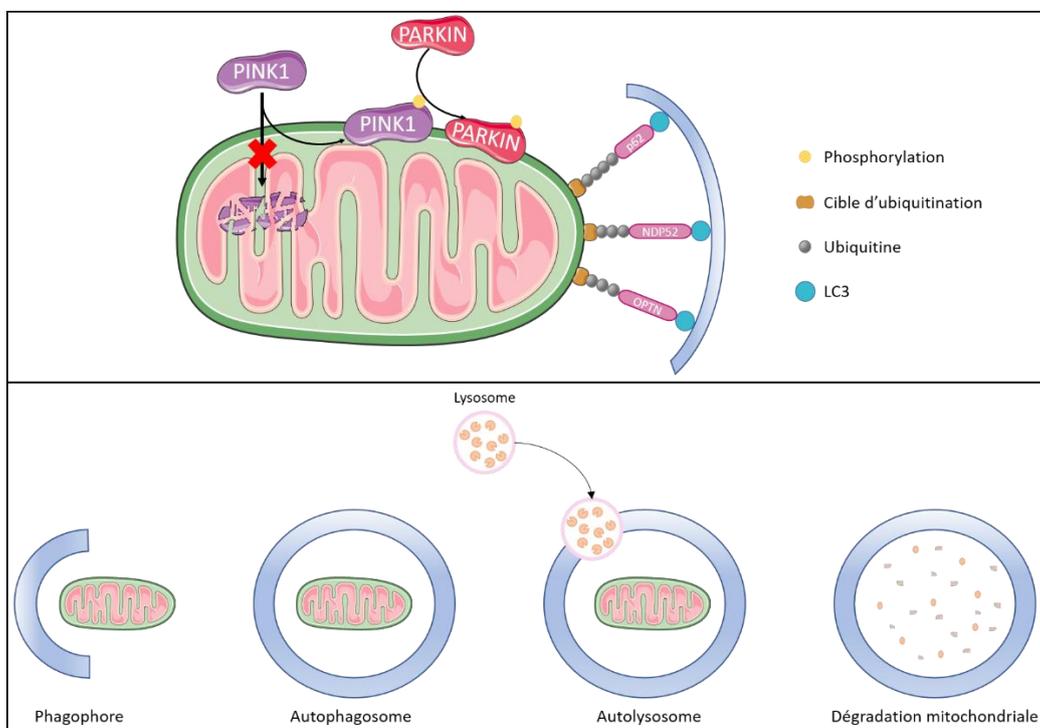
Adapté de (Tilokani et al. 2018)

#### e) La mitophagie

L'une des fonctions majeures de la fission mitochondriale reste aujourd'hui, l'élimination des mitochondries de mauvaise qualité. Les mitochondries peuvent procéder à une fission asymétrique où la partie « saine » de la

mitochondrie garde un potentiel de membrane élevé quand la partie défectueuse, présente un potentiel de membrane très faible, l'empêchant de fusionner avec une autre mitochondrie. Une fois la mitochondrie défectueuse isolée, elle peut être éliminée par mitophagie. Cette fonction a une importance majeure dans l'élimination de l'ADNmt de mauvaise qualité, notamment lorsque les mécanismes de réparation de l'ADNmt ne peuvent compenser les altérations de l'ADNmt.

L'autophagie est un mécanisme de recyclage des composants cellulaires indésirables ou de mauvaise qualité. La mitophagie est une forme spécifique d'autophagie dirigée contre les mitochondries endommagées. Plusieurs voies de signalisation ont été décrites mais la plus connue repose sur deux protéines : PINK1 (« PTEN-induced putative kinase 1 ») et PRKN (« parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase ») ou PARKIN (R.-Q. Yao et al. 2020) (**Figure 16**). PINK1 est une sérine/thréonine kinase considérée comme contrôle qualité des mitochondries. En effet, en condition physiologique, PINK1 est adressée à la mitochondrie *via* sa séquence d'adressage MTS. Elle peut ensuite être transloquée dans la mitochondrie grâce aux complexes d'importation des membranes externe et interne (TOM/TIM). PINK1 peut alors être rapidement clivée et dégradée par les peptidases membranaires et la protéase PARL (« presenilin-associated rhomboid-like protease »). Ceci est possible lorsque le potentiel de membrane mitochondrial est maintenu. En revanche, lorsque celui-ci est diminué, PINK1 ne peut plus être importée correctement à la membrane interne des mitochondries. Elle se trouve alors ancrée à la membrane externe et induit la phosphorylation et l'activation de PARKIN, une E3 ubiquitine ligase. Une fois activée, celle-ci peut alors ubiquitinyler de nombreuses protéines membranaires comme VDAC ou encore les mitofusines 1 et 2. La mitofusine 2, lorsqu'elle est phosphorylée, sert de récepteur pour le recrutement de PARKIN augmentant alors le recrutement de celle-ci.



**Figure 16 : Représentation schématique de la mitophagie.**

Adapté de (Morciano et al. 2020)

PINK1, PTEN-induced putative kinase 1 ; PARKIN, parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase ; P62, sequestrosome 1 ; NDP52, nuclear domain protein 52 ; OPTN, optineurin.

De nombreuses protéines récepteurs cargos comme le SQSTM1 ou p62 (« sequestrosome 1 »), OPTN (« optineurin »), CALCOCO2 ou NDP52 (« nuclear domain protein 52 »), sont capables de reconnaître les protéines phosphorylées et ubiquitylées à la surface des mitochondries. Ceci permet alors l'adressage des mitochondries vers l'autophagosome pour induire leur dégradation grâce à l'interaction des protéines cargos avec la protéine LC3 présente dans la membrane du phagophore (Morciano et al. 2020; R.-Q. Yao et al. 2020). Ces récepteurs cargos peuvent aussi être la cible de la protéine TBK1 (« TANK-binding kinase 1 »). Cette dernière est phosphorylée et activée par PINK1 et induit à son tour la phosphorylation des protéines cargos, augmentant alors leur affinité à l'ubiquitine et donc l'augmentation de la mitophagie.

Il a été démontré qu'une mitophagie efficace était indispensable au maintien de l'homéostasie des cardiomyocytes et qu'une dérégulation de celle-ci pouvait contribuer à des cardiomyopathies sévères (Tong et al. 2019). Dans le système vasculaire, une diminution et une dérégulation de la mitophagie ont été mises en évidence dans les plaques d'athérome de patients et de modèles murins d'athérosclérose (Razani et al. 2012; Swaminathan et al. 2014). La mitophagie est donc un point central de protection contre les pathologies cardiovasculaires, qui se trouve dérégulée dans des stades avancés et chroniques de ces dernières (Morciano et al. 2020).

### 2.4.3. Fusion mitochondriale

La fusion mitochondriale est le processus permettant de regrouper les mitochondries, formant ainsi un réseau mitochondrial long et tubulaire. Ce phénomène comprend la fusion des membranes externes, dirigée par les mitofusines 1 et 2 (MFN1 et MFN2) et la fusion des membranes internes, régulée par la protéine OPA1. Ces trois GTPases se doivent d'être parfaitement coordonnées et synchronisées afin de respecter la compartimentation mitochondriale, mais les mécanismes responsables de cette synchronisation ne sont pas encore identifiés.

#### a) Mitofusines 1 et 2

Les mitofusines 1 et 2 (MFN1 et MFN2) sont des protéines ubiquitaires codées par les gènes *Mfn1* et *Mfn2*, respectivement localisés en 3q25q26 et 1p36.22. Ces deux protéines d'environ 750 acides aminés font toutes deux parties de la famille des dynamines GTPases et partagent environ 60% d'identité de séquence.

Les deux mitofusines présentent leurs domaines N-terminal et C-terminal orientés vers le cytosol. Elles sont constituées d'un domaine de fixation au GTP correspondant à leur domaine d'activité GTPase. Elles possèdent aussi deux domaines transmembranaires permettant leur ancrage à la membrane externe des mitochondries. Ces domaines sont encadrés par deux motifs répétés hydrophobes HR1 et HR2 (Heptad Repeat). Ces derniers forment des structures « coiled-coil » orientées vers le cytosol. Les mitofusines peuvent interagir en trans pour former des homo ou hétéro-oligomères (MFN1-MFN1, MFN2-MFN2 ou MFN1-MFN2) *via* leur domaine HR2, permettant ainsi le rapprochement des mitochondries, indispensable à la fusion des membranes externes. La fusion elle-même, est alors réalisée grâce au domaine GTPase fournissant l'énergie au changement de conformation des mitofusines, permettant ainsi le rapprochement des membranes externes de deux mitochondries, entraînant leur fusion.

La fusion des membranes externes de deux mitochondries adjacentes requiert la présence de mitofusines sur chacune d'entre elle. En effet, l'absence des deux mitofusines empêche la fusion mitochondriale (Koshiba et al.

2004). De plus, l'absence de l'une ou l'autre des mitofusines réduit significativement la fusion mitochondriale mais peut être restaurée par la surexpression de la deuxième (H. Chen et al. 2003). De même, la fusion peut être restaurée par la surexpression d'une seule mitofusine, dans le cas de l'absence de MFN1 et MFN2. Une étude a prouvé que seule MFN1 était nécessaire pour la fusion mitochondriale médiée par OPA1 (Cipolat et al. 2004) mais elles restent, pour autant, assez contradictoires sur l'importance des deux mitofusines.

## b) OPA1

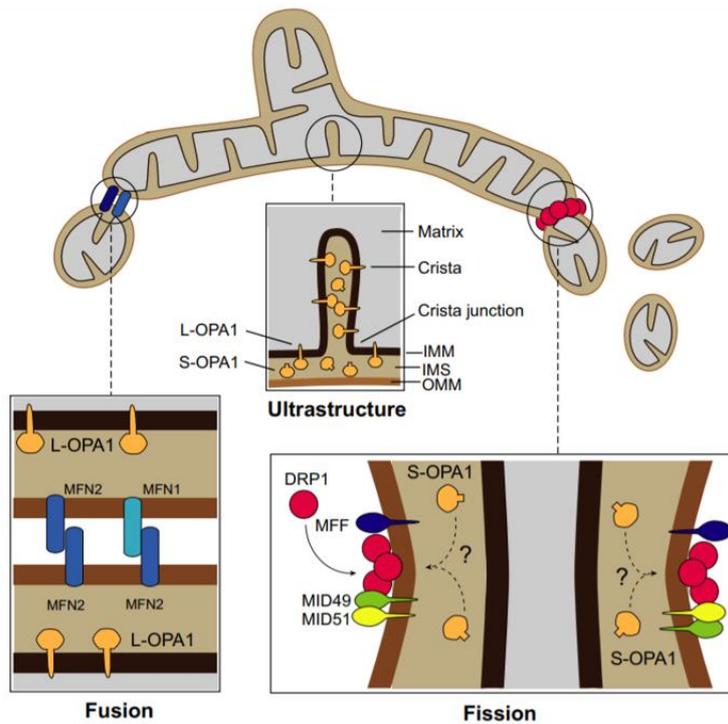
La protéine OPA1 (« Optic Atrophy Protein 1 ») a un rôle central dans la structure et l'organisation de la membrane interne des mitochondries. Elle joue un rôle important dans le métabolisme énergétique, le maintien de l'organisation des crêtes mitochondriales et l'apoptose (Frezza et al. 2006; Patten et al. 2014; Varanita et al. 2015). Une inactivation d'OPA1 induit une fragmentation du réseau mitochondrial, une diminution du potentiel de membrane, une désorganisation de la structure des crêtes, un relargage du cytochrome c et une activation de l'apoptose (Olichon et al. 2003). Tous ces mécanismes sont liés au rôle central d'OPA1 dans la fusion des membranes internes des mitochondries.

OPA1 est une dynamine GTPase ubiquitaire retrouvée en majeure partie dans le cerveau, les testicules, les muscles squelettiques et la rétine. Elle est codée par le gène nucléaire *Opa1* situé sur le chromosome 3 (3q28-q29). Ce gène est composé de 30 exons dont 3 à épissage alternatifs (4, 4b et 5b) à l'origine de 8 isoformes (5 chez la souris) d'ARNm d'OPA1 (Delettre et al. 2001). Tous les isoformes présentent la même structure.

Les ARNm sont traduits sous forme de précurseurs protéiques qui présentent une séquence d'adressage à la mitochondrie (MIS : « Mitochondria Import Sequence ») en N-terminal, un domaine transmembranaire, une séquence à structure « coiled-coil », un domaine GTPase, un motif central très conservé de type dynamine, un domaine d'homologie aux pleckstrines et d'un domaine GTPase effecteur (GED) en C-terminal régulant l'hydrolyse du GTP.

Les transcrits sont dirigés à la mitochondrie grâce leur séquence d'adressage à la mitochondrie. Celle-ci est alors clivée par une peptidase mitochondriale MPP (« Mitochondrial Processing Peptidase ») donnant place à la forme longue d'OPA1 (L-OPA1). Cette dernière peut être clivée sur deux sites précis S1 et S2 pour générer les formes courtes d'OPA1 (S-OPA1) (Ishihara et al. 2006) (**Figure 17**). Les deux sites de clivage permettent l'action de deux protéases : YME1L (« ATP-dependent protease yeast mitochondrial DNA escape 1-like ») qui coupe le domaine S2 et OMA1 (« zinc metalloprotease overlapping with m-AAA protease ») pour cliver le domaine S1 (Kaser et al. 2003; Anand et al. 2014).

La place de chaque isoforme long et court dans la fusion mitochondriale est encore très controversée. Il a d'abord été démontré que les deux isoformes étaient nécessaires pour la fusion des membranes internes (Ishihara et al. 2006). Il semblerait pourtant qu'une inhibition de YME1L et OMA1 permette tout de même de préserver la fusion et la forme des crêtes, démontrant le rôle de la forme longue dans la fusion. En revanche, une perte de la forme longue et l'accumulation de la forme courte provoquerait une désorganisation des crêtes et une apoptose (Z. Wang et al. 2019). Ces informations peuvent lier L-OPA1 à la fusion mitochondriale et S-OPA1 à la fission (Anand et al. 2014; Wai et al. 2015).



**Figure 17 : Représentation schématique des formes courtes (S-OPA1) et longues (L-OPA1) d’OPA1 et de leurs fonctions.**

Adapté de (MacVicar et Langer 2016)

La protéine OPA1 a été décrite pour la première fois dans des pathologies optiques. En effet, les mutations d’OPA1 sont connues pour être responsables d’une atrophie optique dominante (AOD) (Alexander et al. 2000; Delettre et al. 2000), caractérisée par une destruction du nerf optique et des cellules ganglionnaires de la rétine entraînant une perte progressive de la vision. On retrouve aujourd’hui de plus en plus d’articles dans la littérature démontrant l’implication d’OPA1 dans des pathologies neurodégénératives et cardiaques. En effet, il a été démontré que certaines pathologies cardiaques telles que l’ischémie myocardique présentent un réseau mitochondrial hyperfragmenté, traduisant un défaut d’OPA1 (Piquereau et al. 2012). De même, les lésions d’ischémie-reperfusion des souris hétérozygotes pour OPA1 sont augmentées par rapport aux souris contrôles (Le Page et al. 2016).

### c) Déroulement de la fusion mitochondriale

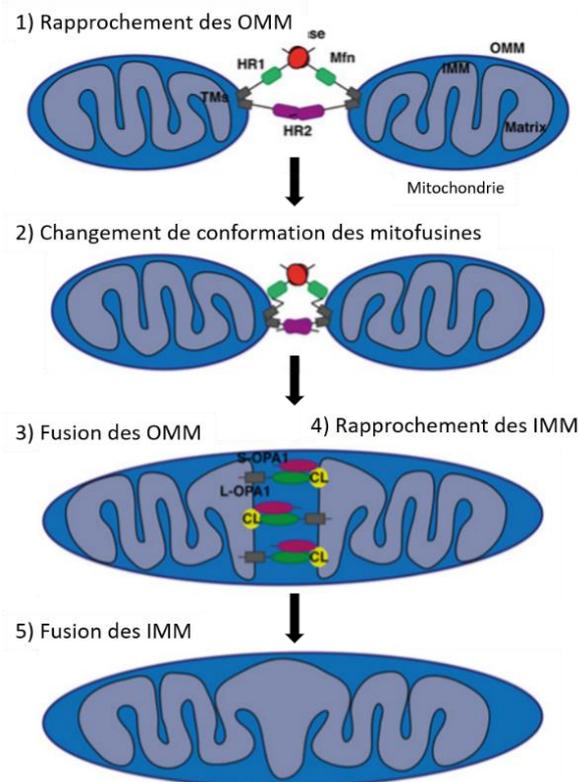
La fusion mitochondriale comprend la fusion des membranes externes des mitochondries par les mitofusines puis celle des membranes internes grâce à OPA1 (Tilokani et al. 2018) (**Figure 18**).

Dans un premier temps, la fusion mitochondriale débute par l’interaction entre les protéines MFN1 et MFN2 *via* leur domaine GTPase ou HR2. L’hydrolyse du GTP induit ensuite le changement de conformation des dimères et le rapprochement des mitochondries, menant à l’ancrage des deux membranes externes et à l’augmentation des sites de contact entre les deux membranes induisant leur fusion.

Dans un deuxième temps, la protéine OPA1 et les cardiolipines permettent la fusion des membranes internes des deux mitochondries. C’est, là encore, l’hydrolyse du GTP qui permet la fusion de ces membranes. L’activité GTPase

d'OPA1 serait en partie régulée par son association avec les cardiolipines présentes dans la membrane interne des mitochondries.

La localisation d'OPA1 lui permet d'interagir avec les mitofusines pour coordonner la fusion des membranes interne et externe (Cipolat et al. 2004). Tous les mécanismes impliqués dans l'interaction entre les mitofusines et OPA1 restent encore mal connus. De plus, de nombreux désaccords demeurent quant à l'importance des formes courtes et longues d'OPA1 dans la fusion mitochondriale. Il semblerait cependant que la forme longue soit privilégiée dans la fusion des membranes internes des mitochondries (Anand et al. 2014; Wai et al. 2015).



**Figure 18 : Représentation schématique du fonctionnement de la fusion mitochondriale.**

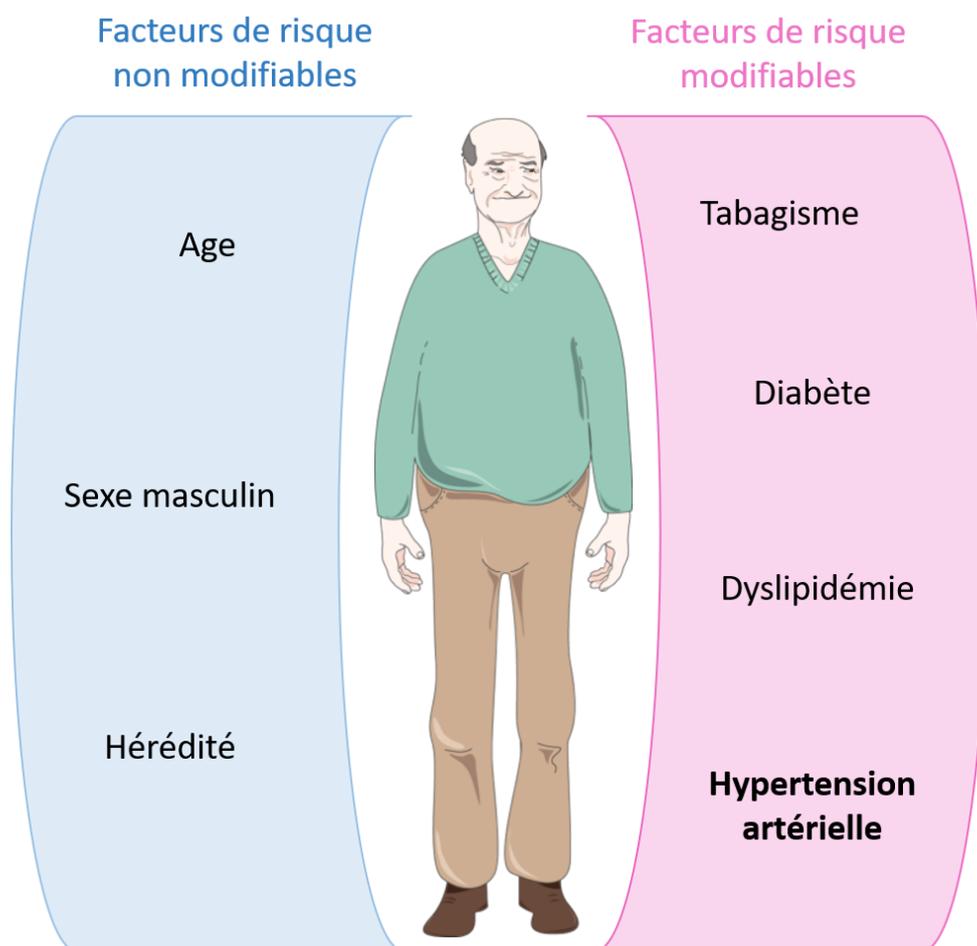
Adapté de (Tilokani et al. 2018)

OMM, membrane mitochondriale externe ; IMM, membrane mitochondriale interne.



De nos jours, les maladies cardiovasculaires représentent un problème majeur de santé publique. Il s'agit de la première cause de mortalité dans le monde avec plus de 17 millions de décès par an, soit 30% de la mortalité mondiale totale (Organisation Mondiale de la Santé, OMS).

Selon l'OMS, les maladies cardiovasculaires constituent un ensemble de troubles affectant le cœur et les vaisseaux (cardiopathies coronariennes, maladies cérébro-vasculaires, artériopathies périphériques, cardiopathies rhumatismales, malformations cardiaques, thromboses veineuses profondes et embolies pulmonaires). Les facteurs de risque de ces pathologies cardiovasculaires sont principalement classés en deux catégories : les facteurs de risque non modifiables comprenant l'âge, le sexe masculin et l'hérédité, et les facteurs modifiables dont les plus importants sont le tabagisme, la dyslipidémie, le diabète et l'hypertension artérielle (**Figure 19**).



**Figure 19 : Représentation schématique des facteurs de risque cardiovasculaires.**

# Etude 1 : Place d'OPA1 dans l'hypertension artérielle

## 1. Introduction

### 1.1. L'hypertension artérielle

L'hypertension artérielle (HTA) est l'un des facteurs de risques majeurs des maladies cardiovasculaires. Selon l'OMS, « plus d'un adulte sur trois souffre d'hypertension artérielle, un état pathologique à l'origine de la moitié environ des décès dus aux accidents vasculaires cérébraux et aux cardiopathies » et responsable de près de 10 millions de morts chaque année.

L'HTA se définit par une augmentation chronique de la pression artérielle systémique se traduisant par une pression artérielle systolique (PAS) supérieure à 140 mmHg et/ou une pression artérielle diastolique (PAD) supérieure à 90 mmHg. Elle peut être classifiée en deux grades : l'HTA primaire, dite essentielle, et l'HTA secondaire. Plus de 90% des patients souffrent d'hypertension primaire de cause inconnue. Elle peut être le fruit d'une combinaison de nombreux facteurs génétiques, environnementaux et comportementaux. L'étiologie de l'hypertension secondaire, quant à elle, est généralement connue. Elle peut être due à des néphropathies ou être d'origine endocrinienne (Chiong et al. 2008).

L'HTA représente l'une des causes majeures de décès dans les pays industrialisés et la prévalence augmente avec le vieillissement de la population. Ainsi, le traitement de l'HTA représente un objectif majeur pour la réduction de la mortalité cardiovasculaire. En effet, le traitement de l'HTA avec des  $\beta$ -bloquants, des diurétiques ou des inhibiteurs de la voie de l'angiotensine II, diminue respectivement de 40% et de 15% le risque d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) et d'infarctus. En revanche, selon l'INSERM, de nos jours, 10 à 30% des patients hypertendus sont résistants aux traitements connus. Il devient donc indispensable de mieux comprendre tous les mécanismes impliqués dans l'HTA afin de mettre en place de nouveaux traitements plus efficaces.

L'HTA est décrite comme étant une pathologie multifactorielle dont les causes et les mécanismes impliqués dans sa survenue et son maintien sont multiples :

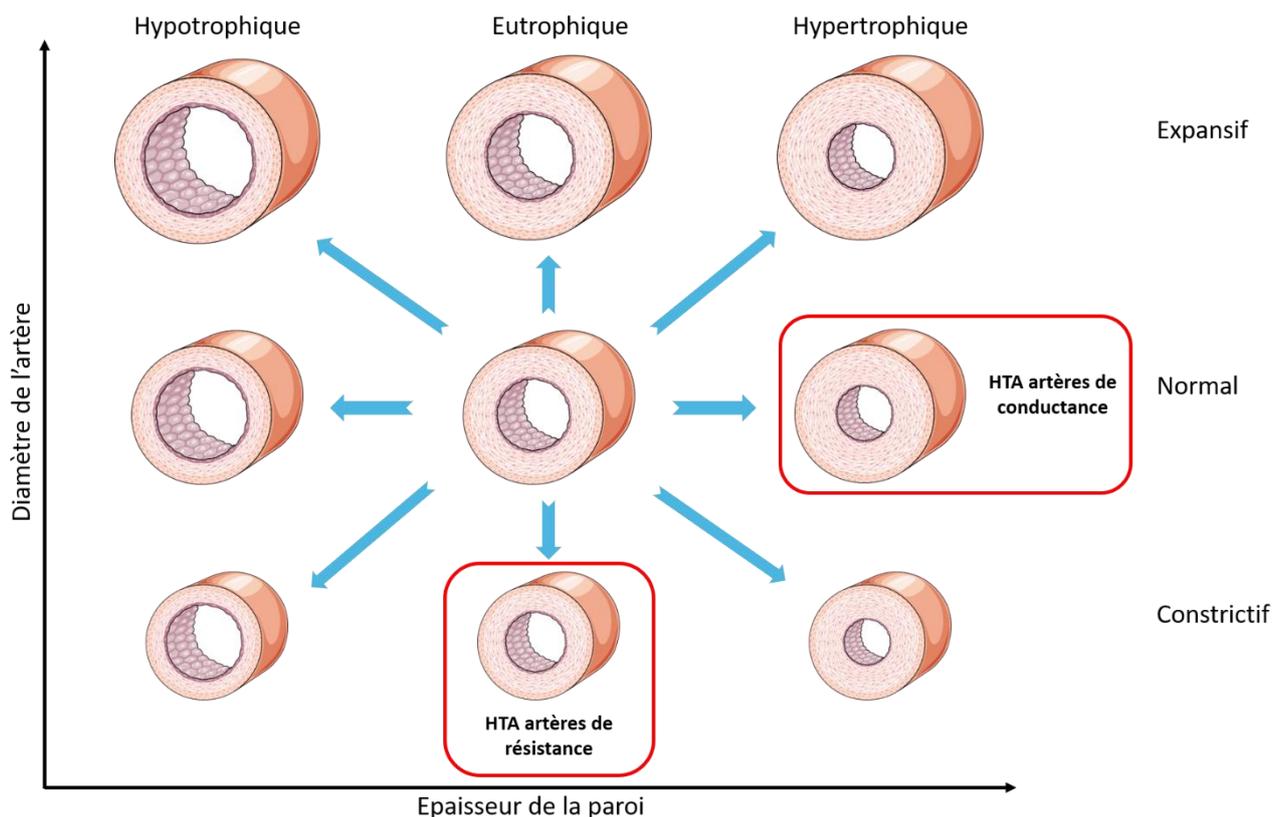
- Altération structurelle et fonctionnelle des artères : remodelage vasculaire
- Dysfonction endothéliale
- Dysfonction du système rénine-angiotensine-aldostérone : action de l'Angiotensine II
- Inflammation
- Stress oxydatif

#### 1.1.1. Le remodelage artériel

La première manifestation de l'augmentation de pression artérielle se traduit par un remodelage vasculaire. Il s'agit d'un processus actif regroupant les modifications de la morphologie et de la composition artérielle. Dans des conditions physiologiques, le remodelage artériel s'opère dans le but de normaliser les contraintes pariétales imposées par des changements hémodynamiques. Une augmentation chronique de flux peut intervenir lors d'une grossesse ou chez les sportifs ayant une activité physique soutenue, mais elle peut être inversée après l'accouchement ou lors de l'arrêt de l'activité sportive. Une augmentation chronique de la pression artérielle,

quant à elle, est plutôt retrouvée dans un cadre pathologique. Le remodelage artériel devient alors permanent et joue un rôle majeur dans l'entretien de la pathologie.

Le remodelage artériel peut être caractérisé par deux modifications phénotypiques : le changement du diamètre artériel interne ou externe, appelé remodelage expansif ou constrictif, et le changement de l'épaisseur de la paroi artérielle, dit hypotrophique, eutrophique ou hypertrophique. Ce remodelage implique notamment la croissance, la mort et la migration cellulaire ainsi que des modifications de composition de la MEC. Dans le cas de l'HTA, les artères de compliances et de résistances subissent deux remodelages différents (**Figure 20**).



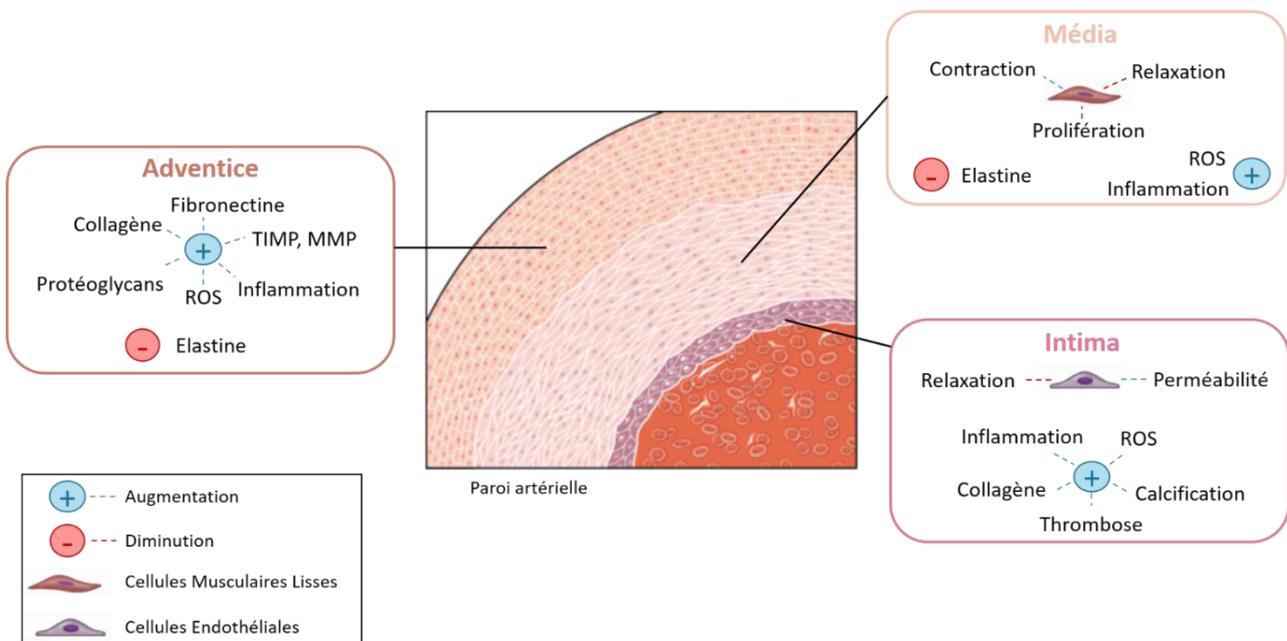
**Figure 20 : Représentation schématique des différents types de remodelage artériel.**

Adapté de (M. J. Mulvany et al. 1996)

Les artères de conductance subissent un remodelage hypertrophique se traduisant par une augmentation de l'épaisseur de la paroi et du diamètre externe du vaisseau (Laurent et Boutouyrie 2015; I. A. M. Brown et al. 2018). Cette augmentation de l'épaisseur de la média est principalement due à l'hyperplasie et l'hypertrophie des CML. Cela passe dans un premier temps par l'augmentation de la prolifération des CML (Hadrava et al. 1991) mais aussi par leur « rigidification ». En effet, il a été démontré que les CML présentaient un appareil contractile plus important et plus actif, avec une augmentation de l'expression des protéines contractiles et de leur activation, comme pour la MLCK, et donc de la phosphorylation des chaînes légères de myosine (Reusch et al. 1996). De plus, nous pouvons observer une accumulation de collagène, au détriment des lames élastiques, dans la paroi artérielle (Leung, Glagov, et Mathews 1976) conduisant à une augmentation de la rigidité artérielle et une diminution de la compliance des artères de gros calibre. Ce remodelage est aussi retrouvé dans les artères de

patients âgés, présentant ou non une HTA. C'est pourquoi l'HTA est souvent décrite comme un vieillissement prématuré des artères.

Les artères de résistance, quant à elles, subissent un remodelage eutrophique (Aalkjaer et al. 1987; Michael J. Mulvany 2012). Il s'agit d'une réduction du diamètre de la lumière, une augmentation du ratio entre l'épaisseur de la média et de la lumière du vaisseau (ratio média/lumière), caractérisée par une masse pariétale constante autour d'un diamètre plus petit. Il y a donc une réorganisation d'une même quantité de matériel autour d'une lumière réduite. Ce remodelage eutrophique serait induit par une apoptose périphérique des CML associée à une prolifération vers l'intérieur, pouvant tous deux expliquer la diminution des diamètres externe et interne des artères avec un maintien du volume de la média (Intengan et Schiffrin 2001). De plus, les CML elles-mêmes se trouvent modifiées. En effet, le remodelage des artères de résistance est en partie causé par la polymérisation de l'actine (Staiculescu et al. 2013), l'augmentation intraluminaire de la pression induit la polymérisation de l'actine dans les CML qui maintient une vasoconstriction continue du vaisseau, entraînant ainsi le remodelage des artères de résistance (Cipolla, Gokina, et Osol 2002; Staiculescu et al. 2013). Le remodelage implique aussi une réorganisation de la MEC. En effet, il a été mis en évidence une augmentation de la production de collagène par les CML associée à une diminution de l'activité des MMP provoquant l'accumulation de collagène dans la matrice artérielle et par conséquent la rigidification des artères de résistance (Intengan et Schiffrin 2001).



**Figure 21 : Représentation schématique des mécanismes impliqués dans le remodelage artériel de l'hypertension artérielle.**

Adapté de (Harvey et al. 2016)

### 1.1.2. La dysfonction endothéliale

La dysfonction endothéliale est aussi une caractéristique majeure de l'hypertension artérielle. Elle correspond à une altération phénotypique de l'endothélium vasculaire, caractérisée par une altération de la réponse

vasomotrice. Cette perturbation de l'homéostasie endothéliale se traduit par des troubles pro-thrombiques et pro-inflammatoires associés à des troubles de la prolifération des cellules endothéliales, de la perméabilité vasculaire et surtout de la capacité de relaxation endothélium-dépendante. Elle est retrouvée aussi bien au niveau des artères de compliance que de résistance et constitue un facteur de risque important dans la survenue de pathologies cardiovasculaires telles que l'HTA et l'athérosclérose (E. L. Schiffrin 1996; Aldosari et al. 2018).

L'altération de la réponse vasomotrice de l'endothélium est caractérisée par un déséquilibre dans la production d'agents vasocontractants et vasorelaxants qui se traduit par une augmentation de la production d'espèces vasoconstrictrices et/ou une diminution de la production des facteurs vasodilatateurs. Le point central de cette dysfonction endothéliale reste l'altération de la production de NO, acteur majeur de la relaxation artérielle. En effet, on retrouve une diminution de la production et de la biodisponibilité du NO dans l'HTA, principalement due à une atteinte de la eNOS elle-même. En effet, de nombreuses études ont mis en avant une altération de la relaxation endothélium-dépendante grâce à l'acétylcholine sans modification de la dilatation endothélium-indépendante, à l'aide du nitroprussiate de sodium (SNP) chez des patients hypertendus (Panza et al. 1990; Taddei et al. 1993). Les études sont divergentes quant à une sous- ou sur-expression de la eNOS dans l'HTA mais s'accordent sur une altération de sa distribution subcellulaire et une altération de son activité (Sullivan, Pollock, et Pollock 2002). Cette dernière est principalement modulée par une production accrue de ROS au sein des cellules endothéliales qui provoquent la diminution de la biodisponibilité du NO. En effet, on retrouve dans les CE d'artères hypertendues, une suractivation de la NADPH oxydase ainsi qu'une dysfonction mitochondriale, toutes deux induisant l'augmentation de la production d' $O_2^-$  dans les CE. Celui-ci peut réagir avec le NO pour former du peroxy-nitrite ( $ONOO^-$ ) pouvant oxyder le  $BH_4$  (cofacteur de la eNOS pour la formation de NO). La diminution du niveau de  $BH_4$  provoque également la production d' $O_2^-$  par la eNOS. C'est ce qu'on appelle le découplage de la eNOS, acteur majeur de la dysfonction endothéliale (Mollnau et al. 2002; Landmesser et al. 2003).

Enfin, la dysfonction endothéliale peut se traduire par une thrombose, un phénotype inflammatoire des cellules endothéliales et une augmentation de la perméabilité endothéliale (Martinez-Quinones et al. 2018). On remarque en effet, une augmentation de l'adhésion plaquettaire et leucocytaire permise par la surexpression des molécules d'adhésion endothéliales, ICAM-1, VCAM-1 et les sélectines, et des médiateurs pro-inflammatoires comme MCP-1 (Marui et al. 1993; J. Liu et al. 2003; Aldosari et al. 2018). Toutes ces modifications favorisent alors l'adhésion des plaquettes et des leucocytes à la surface des cellules endothéliales et augmentent donc les risques thrombotiques et l'infiltration pariétale de cellules immunitaires.

### **1.1.3. Le rôle de l'angiotensine II**

De manière générale, la contraction cellulaire se trouve augmentée dans l'HTA. Elle est due à une augmentation de la concentration en facteurs vasocontractants comme l'endothéline-1 ou la vasopressine. Mais l'acteur majeur de la contraction cellulaire dans l'HTA est l'angiotensine II. Par l'intermédiaire d'AT1R, l'AngII induit l'augmentation de calcium dans les CML, provoquant la phosphorylation des chaînes légères de myosine et donc l'augmentation de la contraction des artères (R. M. Touyz et Schiffrin 2000). L'AngII est aussi l'acteur principal du remodelage vasculaire notamment au niveau des artères de résistance par son rôle dans la croissance des CML, la production de collagène, la contraction artérielle, l'inflammation et la production de ROS.

L'AngII est à l'origine de l'hyperplasie et de l'hypertrophie (augmentation du nombre et de la taille) des CML *via* l'expression de facteurs de croissance (Gibbons, Pratt, et Dzau 1992; R. M. Touyz et al. 1999). De plus, le nombre d'AT1R se trouve significativement augmenté avec l'hypertension et joue un rôle majeur dans la fibrose vasculaire. Dans un premier temps, l'AngII participe activement à l'accumulation de collagène dans l'HTA (R. M. Touyz et al. 2001; Eto et al. 2003). Ensuite, il empêche la dégradation de celui-ci en diminuant les MMP en charge de la dégradation du collagène et en augmentant les TIMP (Laviades et al. 1998; Castoldi et al. 2003).

Le SRAA joue aussi un rôle dans la réponse inflammatoire dans l'HTA (Kranzhöfer et al. 1999; Rocha et al. 2002; Tostes et al. 2002). L'AngII a une forte action pro-inflammatoire, notamment par la production de ROS (Rhian M. Touyz et al. 2002) ainsi que par la modulation de l'expression de molécules d'adhésion comme VCAM-1, ICAM-1 et l'E-selectine et de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 (Kranzhöfer et al. 1999; Pueyo et al. 2000). Enfin, l'AngII possède un rôle majeur dans la production de ROS au sein de l'endothélium. Cela se traduit par l'augmentation de l'activité de la NADPH oxydase et l'altération de la fonction mitochondriale, ou dysfonction mitochondriale (Dikalov et al. 2014), augmentant la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> et diminuant la biodisponibilité du NO. Il en résulte alors une dysfonction endothéliale (Aldosari et al. 2018).

#### 1.1.4. Inflammation

La composante inflammatoire a largement été mise en évidence dans l'HTA (Ernesto L. Schiffrin 2014), souvent associée à l'infiltration rénale et vasculaire de macrophages, lymphocytes T et cytokines pro-inflammatoires (Rodriguez-Iturbe et al. 2003; Bravo et al. 2007; Chandramohan et al. 2008).

Les macrophages sont les acteurs majeurs de l'immunité innée. De nombreuses études ont démontré que la déficience en macrophages dans différents modèles murins d'HTA induit une réduction de la dysfonction endothéliale, du remodelage vasculaire et du stress oxydant, suggérant l'importance du rôle de l'immunité innée dans l'HTA (De Ciuceis et al. 2005; Ko et al. 2007). De même, l'infusion d'AngII dans un modèle murin présentant une ablation de monocytes/macrophages ne provoque pas d'augmentation de la PA et réduit l'hypertrophie vasculaire, la dysfonction endothéliale et la production de ROS, ceci étant corrigé par le transfert de monocytes compétents (Wenzel et al. 2011).

L'immunité adaptative est également, largement impliquée dans la survenue de l'hypertension artérielle. Le modèle murin *Rag1*<sup>-/-</sup> présentant une déficience pour les lymphocytes T et B présente une hypertension significativement inférieure à des souris contrôles dans différents modèles expérimentaux d'HTA (Guzik et al. 2007). Contrairement aux lymphocytes B, le transfert de lymphocytes T supprime la protection des souris *Rag1*<sup>-/-</sup> dans le développement de l'HTA, diminue la vasodilatation endothélium dépendante et augmente la production de ROS chez des souris traitées avec de l'AngII (Guzik et al. 2007), prouvant ainsi le rôle des lymphocytes T dans le développement de l'HTA. En parallèle, lorsque des souris dites scid (« severe combined immune deficiency »), c'est-à-dire possédant une anomalie génétique empêchant le développement de lymphocytes T et B, sont soumises à un traitement hypertenseur à l'AngII, elles présentent une hypertrophie et une fibrose cardiaque réduite, une diminution des atteintes rénales (Crowley et al. 2010). D'autre part, les sous-populations de lymphocytes T ont été étudiées dans l'HTA. Il semblerait qu'il y ait une dérégulation de la balance entre les lymphocytes T helper de type 1 (Th1), produisant principalement l'IFN-γ et l'IL-2, et les lymphocytes Th2 produisant différents types d'interleukines comme l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13. En effet, une étude a mis en avant une

augmentation d'IFN- $\gamma$  et une diminution de l'IL-4 dans un modèle d'infusion chronique d'AngII chez le rat (Shao et al. 2003). D'autres études ont prouvé le rôle protecteur des lymphocytes T régulateurs (Treg), impliqués dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T helper, dans l'HTA. Le transfert adoptif de Treg chez des souris déficientes n'a pas de réelle influence sur la réponse hypertensive à l'AngII mais joue principalement un rôle sur les dommages cardiaques causés par le traitement hypertenseur, à savoir une réduction de l'hypertrophie, de la fibrose et de l'inflammation cardiaque (Kvakan et al. 2009).

Les cytokines contribuent aussi à la pathogénicité de l'HTA. Dans un premier temps, l'IL-17, qui est active dans la production et le recrutement de cellules immunitaires (Kao et al. 2005; Hartupee et al. 2007), se trouve augmentée dans l'HTA. Dans un modèle murin déficient en IL-17, l'infusion d'AngII ne permet pas une augmentation persistante de la PA, ceci étant associé à la réduction de l'infiltration des lymphocytes T, et diminue la production de ROS (Madhur et al. 2010). Ces observations nous permettent alors d'affirmer que l'IL-17 est indispensable pour le maintien de l'HTA induite par l'AngII. De la même façon, une augmentation plasmatique d'IL-6 a été mise en évidence dans l'HTA (Sturgis et al. 2009). L'implication de l'IL-6 est assez controversée car son implication dans le développement de l'HTA a été démontré dans des modèles d'HTA induits par l'AngII (Schrader et al. 2007; Brands et al. 2010) mais pas dans le modèle DOCA-salt (Sturgis et al. 2009). *A contrario*, le rôle protecteur de l'IL-10 a été mis en avant dans l'HTA. En effet, lors d'un traitement à l'AngII les souris *IL-10<sup>-/-</sup>* présentent une dysfonction endothéliale accrue par une augmentation de ROS (Didion et al. 2009). Enfin, on retrouve une sécrétion augmentée de TNF- $\alpha$  (facteur de nécrose tumorale) qui augmente le processus inflammatoire mis en jeu dans l'HTA. En effet, le traitement avec un antagonisme du TNF- $\alpha$  prévient la dysfonction vasculaire, l'augmentation de pression et l'inflammation chronique (Guzik et al. 2007; Venegas-Pont et al. 2010). La diminution de TNF- $\alpha$  a aussi un fort effet protecteur contre les atteintes rénales, sans jouer sur la pression artérielle (Muller et al. 2002; Elmarakby et al. 2008).

L'inflammation est un point central du remodelage artériel, de la dysfonction endothéliale et surtout de la production de stress oxydatif (Nava et al. 2003; Rodriguez-Iturbe et al. 2003).

#### 1.1.5. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est un mécanisme physiopathologique qui survient lors d'une élévation de la quantité de ROS ou d'un épuisement des défenses anti-oxydatives. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle majeur des ROS dans le développement et la progression de l'HTA, avec principalement une augmentation de l'activité de la NADPH oxydase (Taniyama et Griendling 2003; R. M. Touyz et Schiffrin 2004). Les ROS se trouvent impliquées dans tous les mécanismes importants de l'HTA : l'augmentation de la PA, le remodelage, la dysfonction endothéliale et l'inflammation.

Dans un premier temps, l'augmentation du stress oxydatif pourrait jouer un rôle dans l'augmentation de la PA (Meng et al. 2003; N. Tian et al. 2005). Pour preuve, l'inhibition de la NADPH oxydase ou d'une de ces sous unités réduit de manière significative l'augmentation de PA induite par le traitement hypertenseur (Landmesser et al. 2002). De même, un traitement antioxydant comme la vitamine C, le tempol ou la SOD réduit l'augmentation de la pression artérielle (Laursen et al. 1997; Schnackenberg et Wilcox 1999; N. Tian et al. 2005).

En parallèle, les ROS jouent un rôle majeur dans l'hypertrophie vasculaire retrouvée dans l'HTA (Ushio-Fukai et al. 1996; Zafari et al. 1998), notamment par leur rôle majeur dans la prolifération des CML (Rao et Berk 1992). Une fois encore, l'utilisation d'antioxydants a permis d'inhiber ce remodelage pariétal (Sundaresan et al. 1995; Zafari et al. 1998; Patterson et al. 1999) par l'inhibition de la prolifération et de l'apoptose des CML (M. R. Brown et al. 1999).

Comme il a été décrit précédemment, le stress oxydatif est la cause majeure de la dysfonction endothéliale. Les ROS ont, en effet, un impact direct sur la biodisponibilité du NO en entraînant le découplage de la eNOS (Mollnau et al. 2002; Landmesser et al. 2003), elle-même responsable de l'augmentation du stress oxydant (Schulz, Gori, et Münzel 2011). L'administration de SOD restaure la relaxation endothélium-dépendante dans différents modèles murins d'HTA (Laursen et al. 1997; Somers et al. 2000).

Si l'inflammation de la paroi artérielle provoque une augmentation du stress oxydatif, ce dernier favorise à son tour l'inflammation en activant notamment le facteur de transcription NF- $\kappa$  B (Nucléaire-kappa B) et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Q. Li et Verma 2002). En parallèle, les ROS induisent l'augmentation de l'expression des protéines d'adhésion comme ICAM-1 et VCAM-1, augmentant alors l'infiltration leucocytaire (Marui et al. 1993; J. Liu et al. 2003).

## 1.2. Place de la mitochondrie dans l'hypertension artérielle

En condition physiologique, la mitochondrie est une source importante de ROS (Balaban, Nemoto, et Finkel 2005). Une augmentation anormale de la quantité de ROS est un marqueur important de nombreuses pathologies cardiovasculaires et de leur principal facteur de risque, l'HTA (Dikalova et al. 2010; Dikalov et al. 2014). Les complexes I et III de la chaîne de transport d'électrons sont les principales sources de ROS mitochondriaux (Turrens 2003; M. P. Murphy 2009). Ces derniers sont impliqués dans un cercle d'auto-amplification du stress oxydant cellulaire (Zorov, Juhaszova, et Sollott 2006). En effet, les ROS mitochondriaux sont capables de provoquer des dommages de l'ADN mitochondrial. Celui-ci codant presque exclusivement pour des protéines de la chaîne respiratoire, toute altération de son intégrité provoque ainsi inévitablement une dysfonction de la phosphorylation oxydative, une production défectueuse d'ATP et une augmentation de la production de ROS en retour (Esposito et al. 1999).

Le rôle de la mitochondrie dans l'HTA a principalement été imputé à la production accrue de ROS (Dikalova et al. 2010; Rubattu et al. 2014). De nombreuses études ont mis en avant le rôle majeur des ROS mitochondriaux dans l'augmentation de la rigidité artérielle, de la relaxation vasculaire, de l'inflammation chronique et de la sénescence des cellules endothéliales (Q. Li et Verma 2002; Mollnau et al. 2002; Landmesser et al. 2003; R.-H. Zhou et al. 2012), mais aussi dans l'endommagement des organes cibles comme le cœur, l'inflammation microvasculaire cérébrale ou encore l'inflammation intra-rénale (Rodrigues et Granger 2012; Rubattu et al. 2014).

Outre le rôle majeur de la mitochondrie dans la production d'ATP et de ROS, d'autres mécanismes pourraient être à l'origine de la pathogénicité de l'HTA. Nous savons que la dynamique mitochondriale est un mécanisme indispensable au maintien de la qualité des mitochondries et qu'elle a donc un impact majeur sur la respiration mitochondriale, la qualité de l'ADNmt et le renouvellement mitochondrial. Cette dynamique pourrait donc jouer un rôle majeur dans l'HTA.

Jusqu'alors, peu d'études ont cherché à comprendre la place de cette dynamique dans l'HTA. Une diminution de l'expression des gènes codant pour OPA1, et les mitofusines 1 et 2 a été mise en évidence dans les cœurs de rats hypertendus (Lahera et al. 2017). Au niveau vasculaire, l'inhibition de la fission mitochondriale semblerait diminuer la contraction d'artères mésentériques et d'aortes isolées, suggérant une augmentation de la fission mitochondriale dans la contraction artérielle (M.-Y. Liu et al. 2016). Ces études laissent entrevoir un possible rôle de la dynamique mitochondriale dans la physiopathologie vasculaire et l'HTA mais restent encore très évanescentes. En revanche de nombreuses études cellulaires ont mis en avant son rôle dans la prolifération et l'apoptose des cellules musculaires lisses. En effet, les premières observations semblent associer la fission mitochondriale à la production accrue de ROS dans les CML (L. Wang et al. 2015) ainsi qu'à un phénotype hyperprolifératif des CML provenant d'animaux présentant une hypertension pulmonaires (Marsboom et al. 2012). De plus, l'inhibition de la fission prévient la prolifération des CML (Chalmers et al. 2012). A l'inverse, la fusion mitochondriale semble favoriser l'apoptose des CML. En effet, l'augmentation de l'expression de MFN2 dans les CML provoque l'arrêt du cycle en phase G0/G1 et donc l'arrêt de la prolifération des CML (D. Li et al. 2015) et augmente leur apoptose (W. Zhang et al. 2015). De plus, la surexpression de MFN2 provoque l'apoptose CML en culture alors que son inhibition protège contre leur apoptose (Guo Xiaomei et al. 2007).

Ainsi, nous savons que la mitochondrie joue un rôle majeur dans le stress oxydant de la paroi vasculaire retrouvé dans l'HTA et que la dynamique mitochondriale est largement impliquée dans la prolifération et l'apoptose des CML vasculaires, mais son implication précise dans l'HTA est encore inconnue.

### 1.3. Objectif de la première partie

Le rôle de la dynamique mitochondriale a largement été étudié dans des pathologies neurodégénératives (Manczak et al. 2016; Qi et al. 2019). Les premières études mitochondriales au niveau cardiovasculaire ont été menées sur le cœur. En effet, il est connu que les mitochondries occupent 30% du volume total des cardiomyocytes et produisent 90% de l'énergie nécessaire au bon fonctionnement du cœur *via* la phosphorylation oxydative (Schaper, Meiser, et Stämmler 1985; Vásquez-Trincado et al. 2016). Ainsi, toute atteinte de cet organite peut avoir un impact majeur sur le fonctionnement cardiaque, comme on peut le constater dans l'ischémie myocardique où la mitochondrie joue un rôle majeur dans la mort des cardiomyocytes (J. G. Murphy, Marsh, et Smith 1987). De par l'importance des mitochondries dans le cœur, le rôle de la dynamique mitochondriale dans le système cardiaque a été étudié, mettant en avant une forte dérégulation de cette dynamique dans les pathologies cardiaques pour lesquelles on retrouve une hyper-fragmentation mitochondriale (L. Chen et al. 2009; Piquereau et al. 2012; Varanita et al. 2015; Le Page et al. 2016).

Pour compléter notre compréhension des mécanismes impliquant la dynamique mitochondriale dans les pathologies cardiovasculaires, nous avons décidé de nous intéresser, dans cette étude, à la place de cette dynamique dans le facteur de risque majeur des pathologies cardiovasculaires, l'hypertension artérielle. Le rôle protecteur de la protéine de fusion, OPA1, dans les pathologies cardiaques étant bien défini, nous avons basé notre première étude sur l'hypothèse suivante : « **OPA1 pourrait jouer un rôle protecteur dans l'hypertension artérielle** ».

## 2. Article N°1 : Protective role of the mitochondrial fusion protein OPA1 in hypertension

Au vu de l'absence d'informations quant à la place de la dynamique mitochondriale dans les pathologies vasculaire, nous avons décidé d'étudier le rôle de la protéine de fusion mitochondriale, OPA1, dans l'hypertension artérielle. Pour ce faire, nous avons mis en place différents modèles murins et cellulaires. Ceux-ci ont d'abord permis de visualiser la structure du réseau mitochondriale des artères mésentériques et cellules vasculaires lors d'une dysfonction de la fusion mitochondriale et en présence d'un traitement hypertenseur. D'autre part, l'impact de la mutation d'*Opa1* et du traitement sur la physiologie vasculaire a été étudiée. Ces éléments ont révélé une hyperfragmentation mitochondriale associée à une aggravation de l'hypertension artérielle, mettant en avant le rôle protecteur d'OPA1 dans l'hypertension artérielle.

Cette partie est présentée sous forme d'article (accepté pour publication au journal FASEB).

# Protective role of the mitochondrial fusion protein OPA1 in hypertension

**Pauline Robert\***<sup>a,b,c</sup>, **Phuc Minh Chau Nguyen\***<sup>a,b,c</sup>, **Alexis Richard**<sup>a,b,c</sup>, **Céline Grenier**<sup>a,b,c</sup>, **Arnaud Chevrollier**<sup>a,b,c</sup>, **Mathilde Munier**<sup>a,b,c</sup>, **Linda Grimaud**<sup>a,b,c</sup>, **Coralyne Proux**<sup>a,b,c</sup>, **Tristan Champin**<sup>a,b,c</sup>, **Eric Lelièvre**<sup>a</sup>, **Emmanuelle Sarzi**<sup>e</sup>, **Emilie Vessières**<sup>a,b,c</sup>, **Samir Henni**<sup>d</sup>, **Delphine Prunier**<sup>a,b,c,d</sup>, **Pascal Reynier**<sup>a,b,c,d</sup>, **Guys Lenaers**<sup>a,b,c,d</sup>, **Céline Fassot**<sup>a,b,c</sup>, **Daniel Henrion**<sup>a,b,c,d</sup>, **Laurent Loufrani**<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup> MITOVASC institute and CARFI facility, University of Angers, Angers, France;

<sup>b</sup> UMR CNRS 6015, Angers, France;

<sup>c</sup> INSERM U1083, Angers, France;

<sup>d</sup> University Hospital (CHU) of Angers, Angers, France

<sup>e</sup> Institute for Neurosciences of Montpellier - INSERM U1051, Montpellier, France;

\*these two authors contributed equally to the study.

**Running Title: Mitochondria dynamics and hypertension**

**word count: 6437**

**Correspondence:**

Laurent Loufrani, Ph.D.

MITOVASC, CNRS UMR 6015, INSERM U1083,

3 rue Roger Amsler, 49045 Angers, France

Tel : +33244688263

E-mail : laurent.loufrani@inserm.fr

**Nonstandard abbreviations:**

Opa1, Optic atrophy 1; Mfn1, Mitofusin1 ; Mfn2, Mitofusin 2 ; Drp1, Dynamin-related protein; Fis1, Mitochondrial fission 1 protein; ROS, Reactive Oxygen Species; MA, mesenteric arteries; SHR, Spontaneously hypertensive rat; L-NAME, L-N<sup>G</sup>-Nitroarginine methyl ester; AngII, angiotensin II; DOCA, Deoxycorticosterone acetate; DHE, Dihydroethidium; PSS, physiological salt solution; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium.

## Abstract

Hypertension is associated with excessive reactive oxygen species (ROS) production in vascular cells. Mitochondria undergo fusion and fission, a process playing a role in mitochondrial function. OPA1 is essential for mitochondrial fusion. Loss of OPA1 is associated with ROS production and cell dysfunction. We hypothesized that mitochondria fusion could reduce oxidative stress that defect in fusion would exacerbate hypertension. Using 1) *Opa1* haploinsufficiency in isolated resistance arteries from *Opa1*<sup>+/-</sup> mice, 2) primary vascular cells from *Opa1*<sup>+/-</sup> mice and 3) RNA interference experiments with siRNA against *Opa1* in vascular cells, we investigated the role of mitochondria fusion in hypertension. In hypertension, *Opa1* haploinsufficiency induced altered mitochondrial cristae structure both in vascular smooth muscle and endothelial cells but did not modify protein level of long and short forms of OPA1. In addition, we demonstrated an increase of mitochondrial ROS production, associated with a decrease of superoxide dismutase 1 protein expression. We also observed an increase of apoptosis in vascular cells and a decreased VSMCs proliferation. Blood pressure, vascular contractility as well as endothelium-dependent and -independent relaxation were similar in *Opa1*<sup>+/-</sup>, WT, L-NAME-treated *Opa1*<sup>+/-</sup> and WT mice. Nevertheless, chronic NO-synthase inhibition with L-NAME induced a greater hypertension in *Opa1*<sup>+/-</sup> than in WT mice without compensatory arterial wall hypertrophy. This was associated with a stronger reduction in endothelium-dependent relaxation due to excessive ROS production. Our results highlight the protective role of mitochondria fusion in the vasculature during hypertension by limiting mitochondria ROS production.

**Keywords: Opa1, mitochondria, vascular function, hypertension, oxidative stress**

## Introduction

Hypertension is a main risk factor for cardiovascular disorders. Increased vascular oxidative stress has been shown to play a major role in the pathophysiology of hypertension leading to vascular inflammation, endothelial and smooth muscle cells dysfunction (1). Mitochondrial dysfunction could precede endothelial dysfunction, and might promote the development of hypertension. Energy requirements in the endothelium are relatively low (mitochondria represent 2-6% of the endothelial cell (ECs) volume compared to 32% in cardiomyocytes) and glycolysis is the major source of ATP production. It is recognized that endothelial mitochondria play a prominent role in cellular responses through the production of reactive oxygen species (ROS) to signal a change in endothelial phenotype (2). The cellular distribution of mitochondria is important for its function and its communication with other cellular organelle (e.g. endoplasmic reticulum, ER) and nucleus. In ECs, mitochondria release ROS in response to cell deformation by shear stress (3). But oxidative stress could also be induced by an imbalance in cellular calcium hemostasis due to poor cooperation between mitochondria and ER (4). Thus, altered mitochondrial calcium contributes to endothelial response to pathological stimuli. Elevated global  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in endothelial cells promotes endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activation, and consequently nitric oxide (NO) production (5).

Fusion and fission are essential processes for preservation of normal mitochondrial function. In mammalian cells, mitochondrial fission is controlled by FIS1 and DRP1 while mitochondrial fusion requires the mitofusins MFN1 and MFN2 for the outer membrane fusion, and OPA1 for the inner membrane fusion. These morphological changes are regulated also by proteolytic processing of OPA1 by the inner-membrane peptidases YME1L (also known as YME1L1) and OMA1. Long, membrane-bound forms of OPA1 are required for mitochondrial fusion, but their processing to short, soluble forms limits fusion and can facilitate mitochondrial fission (6). Besides its role in mitochondrial fusion, OPA1 is also responsible for the maintenance of cristae structure (7). Loss of OPA1 leads to mitochondrial fragmentation and disorganization of cristae, subsequently resulting in alterations in mitochondrial function including ATP production by oxidative phosphorylation, calcium homeostasis, and regulation of cell growth and apoptosis (8-12). These alterations lead to excessive ROS production as shown in previous studies which have demonstrated that *Opal* mutations caused the accumulation of oxidative damages in drosophila (aging and lifespan) (11), in human lymphoblastoid cell lines from four autosomal dominant optic atrophy families (13) and in eye-specific somatic mutation (14) nevertheless no study has shown such a role in vascular cells.

The need for blood vessels to adapt to hypertension increases the energy demand of the vascular smooth muscle cells (VSMCs) and could induce mitochondrial biogenesis and activation of fusion-fission cycles in order to optimize mitochondria functions. Mitochondria are also an important source

of cellular ROS production for hypertrophy and cell migration (15) but the possible protective role of mitochondrial dynamics remains incompletely understood. Clinical investigations have observed a significant increase in OPA1 mRNA and protein expression in the placenta of patients with preeclampsia (16). Moreover, genetic variation of *Opa1* is associated with hypertension in the Korean population suggesting a possible role of mitochondrial fusion in the pathogenesis of hypertension (17). Finally, in specific ocular hypertension, mitochondrial OPA1 provides protection against pressure-mediated retinal damage (18) although no systemic hypertension occurs in this pathology. Experimental studies also give unclear results. Indeed in spontaneously hypertensive rats, mitochondrial dynamics were in favor of fusion (19); in this model, Tang et al. demonstrated a decreased level of mitochondrial fission protein DRP1 while that of OPA1 protein is increased in cardiomyocytes, suggesting a possible role of mitochondrial dynamic in heart damages induced by high blood pressure (20). But another study using phenylephrine-induced hypertrophy demonstrated a decrease in mRNA levels of the outer membrane fusion proteins MFN1/MFN2 and OPA1 in the heart of hypertensive rats, suggesting a shift towards increased mitochondrial fragmentation during hypertension (21). In the heart, excessive fission has been associated with more ischemia/reperfusion (I/R) injury and cell apoptosis (22). Similarly, Le Page et al. have demonstrated that *Opa1* deficiency is associated with increased sensitivity to I/R, imbalance in mitochondrial  $Ca^{2+}$  uptake, and subsequently to an increase in sodium-calcium exchanger activity (23).

Although OPA1 has been abundantly linked to cardiovascular pathophysiology, to our knowledge its contribution in the pathophysiological mechanisms of arterial hypertension has never been clearly demonstrated. Therefore, we hypothesized that mitochondrial fusion and specifically the long and short forms of OPA1 might contribute to the regulation of vascular function, especially in endothelium-mediated tone which is very sensitive to oxidative stress. We tested this hypothesis on vascular tone and adaptation to high blood pressure, challenging an *Opa1*<sup>+/-</sup> mouse model with L-NAME-induced hypertension.

## Materials and Methods

- **Animals**

We used a male mouse model carrying the recurrent *Opa1*c.2708<sup>delTTAG</sup> mutation (24). A total of 93 *Opa1*<sup>+/+</sup> and 93 *Opa1*<sup>+/-</sup> mice aged 6 months were used for all the study : 35 *Opa1*<sup>+/+</sup> and 35 *Opa1*<sup>+/-</sup> mice treated with L-NAME (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in the drinking water (300mg/kg/day) during 14 days as previously shown (25) and 46 *Opa1*<sup>+/+</sup> and *Opa1*<sup>+/-</sup> non treated mice. Systolic blood pressure was measured in conscious mice every day using tail cuff plethysmography (non-invasive automated and computerized Visitech BP2000 Systems Inc.). For good quality, reliability and reproducibility of measurements, mice were previously trained during 7 days before treatment. After 21 days of measurement (7 days without treatment and 14 days with treatment) mice were sacrificed and mesenteric resistance arteries were quickly removed and placed in an ice-cold physiological salt solution (PSS). Different arterial segments (second order of mesenteric arteries) were used for cell culture, pharmacological, biochemical, immuno-histological and mitochondrial length and cristae analyses as described below.

The experimental procedures followed for the care and euthanasia of animals were in accordance with the European Community Standards on the Care and Use of Laboratory Animals (Ministère de l'Agriculture, France, authorization number 6422). Protocols were approved by the regional ethical committee (Protocol CEEA PdL number CEEA.2012.21).

- **Primary Cell culture**

Vascular Smooth muscle cells were obtained from the whole mesentery arterial bed of WT and *Opa1*<sup>+/-</sup> mice. First, adventitial peripheral fat was removed. Then, arterial wall was enzymatically digested with elastase (0.125 U/ml) and collagenase (2 U/ml) (Worthington, Lakewood NJ, USA) during 3 hours at 37°C under agitation in DMEM medium without serum. Vascular smooth muscle cells were maintained in DMEM medium (Lonza, Basle, Switzerland) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biowest, Nuaille, France), glutamine (2mM, Lonza), penicillin (100U/ml, Lonza) and streptomycin (100µg/ml, Lonza) and maintained at 37°C with 5% carbon dioxide and 95% humidity. Cells between P2 and P4 were seeded in Petri dish. Once reached 80% of confluence cells were treated with Angiotensin II (AngII 10<sup>-6</sup>M, Sigma-Aldrich) or DMEM medium for 24 hours. Stimulation was stopped with PBS washing and cells were used for electronic microscopy or western blot analysis. Specificity of primary VSMCs were determined by gene expression of contractile proteins Myh11, Mylk and Myl9 (SUP8), using Real-Time qPCR.

- **Transmission electron microscopy**

Primary cells and mesenteric arteries were fixed in glutaraldehyde 2.5% and 60-nm thick sections were cut with an ultramicrotome, and examined using a JEOL JEM 1400 electron microscope (SCIAM platform, University of Angers). Measurements of mitochondrial cristae width were conducted using the Image J software (NIH, USA).

- **3D fluorescence microscopy**

Cells were then incubated for 15 minutes with 100 nM Mitotracker® green (Molecular Probes, Sunnyvale, CA, USA) to stain mitochondrial network. For fluorescence imaging, coverslips were mounted in housing and placed on the stage of an inverted wide-field microscope ECLIPSE Ti-E (Nikon, Champigny sur Marne, France) equipped with a 100x oil immersion objective (Nikon Plan Apo100, N.A. 1.45) and an Andor NEO sCOMS camera controlled by Metamorph® 7.7 software (Molecular Devices). A precision, piezoelectric driver mounted underneath the objective lens allowed faster Z-step movements, keeping the sample immobile while shifting the objective lens. Twenty-one 2D images were acquired along the Z-axis at 0.2 µm increments. For mitochondrial network characterization, acquired images were iteratively deconvolved using Huygens Essential® software (Scientific Volume Imaging, Hilversum, The Netherlands), with a maximum iteration scored 50 and a quality threshold at 0.01. After this deconvolution step and applying a threshold to separate the mitochondrial signal from the background, Imaris 8.0® software (Bitplane, Zurich, Switzerland) created a 3D mask around the fluorescent signal that we call the 3D model of the mitochondrial network (26) (27).

- **Histomorphometric analysis**

Mesenteric arterial segments pressurized at 75mmHg and fixed in 4% para-formaldehyde solution were cut using a cryostat. Transverse sections (7µm thick) were stained with an orcein solution. After image acquisition (Olympus T100 microscope, Sony camera), internal and external medial circumferences and media thickness were measured and analyzed using the ImageJ software. Using these values, the cross sectional area (CSA) was calculated as previously described (28).

- **Pharmacological reactivity of isolated arteries**

Segments of mesenteric resistance arteries (second order, 2mm long) were mounted on a 610M wire-myograph (Danish Myo Technology, Aarhus, Denmark) as previously described (29). For each condition, 2 arterial segments of each mice were used and averaged as a single value. Two tungsten wires (40µm diameter) were inserted into the lumen of the arteries and respectively fixed to a force transducer and a micrometer. Arteries were bathed in a physiological salt solution (PSS) of the following composition (mmol/L): 130.0, NaCl; 15.0, NaHCO<sub>3</sub>; 3.7, KCl; 1.6, CaCl<sub>2</sub>; 1.2, MgSO<sub>4</sub> and 11.0, glucose (pH 7.4, 37°C). Wall tension was applied as previously described (30). After a 45min equilibration period under applied wall tension, artery viability was tested using a potassium rich PSS (80mmol/L). Then, cumulative concentration-response curve to phenylephrine (1nmol/L to 10µmol/L) was performed. After washout, the arteries were pre-contracted with phenylephrine to a level approximately equivalent to 50% of the maximal response. Cumulative concentration-response curves to acetylcholine (1nmol/L to 10µmol/L) were done (31). On the second artery, after viability test, the arteries were precontracted with phenylephrine (10µmol/L). In order to test the NO sensitivity of the VSMCs, a cumulative concentration-response curve to a NO donor, sodium nitroprusside (SNP) (1nmol/L to 3µmol/L) was performed.

- **Detection of reactive oxygen species using confocal microscopy in resistance arteries**

Frozen mesenteric arterial segments were cut using a cryostat to obtain transverse sections of 7µm thick. Dihydroethidium microphotography (DHE; Sigma-Aldrich) was used to evaluate superoxide production in arteries, as previously described (28). Cells are permeable to DHE, which is oxidized by superoxide to form fluorescent products, which are, in turn, trapped by intercalation in the DNA. Sections were incubated with 1 mmol/L of DHE at 37°C for 30 minutes in a humidified chamber protected from light. Fluorescent images of DHE were obtained by using confocal microscopy and the QED-image software (Solamere Technology, Salt Lake City, UT, USA). Pixel quantification was executed as also described previously (28). A positive control was performed using a section of mesenteric artery treated for 2 hours with lipopolysaccharide in vitro at 37°C in a physiological salt solution (100 of Arbitrary unit). A negative control was obtained by omitting DHE or by adding Tempol to the section 15 minutes before DHE (0 of Arbitrary unit).

- **Quantitative real time PCR**

Mesenteric arteries were dissected in ice cold PBS and stored at -20°C in RNAlater Tissue Storage Reagent (Sigma-Aldrich). RNA extraction was performed using the RNeasy® micro kit (Qiagen,

Hilden, Germany). 100 ng of total RNA were subjected to reverse transcription with the QuantiTect® Reverse Transcription kit (Qiagen). Real-time PCR was performed with Sybr® Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) on using a LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche, Branchburg, NJ, USA). 7500 SDS Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Relative expression was calculated according to the formula  $E = 2^{-(Ct[\text{Target}] - Ct[\text{Reference}])}$ . All data were normalized to the *Gusb*, *Hprt* and *Gapdh* mRNA. *Gapdh*, *Hprt* and *Gusb* were used as housekeeping genes. Analysis was not performed when Ct values exceeded 35. Results were expressed as:  $2^{(Ct \text{ target} - Ct \text{ housekeeping gene})}$ .

- **Western Blot analysis**

Western blots were performed on VSMCs primary culture from mesenteric arteries and whole on mesenteric arteries tissues. Mesenteric arteries from WT and *Opal*<sup>+/-</sup> mice with or without L-NAME treatment were crushed and extracted in SDS lysis buffer (SDS 20%, Tris 500mM pH7.4, halt protease & phosphatase inhibitor cocktail, 0.5M EDTA solution). VSMCs were directly extracted in SDS lysis buffer. The homogenate of mesenteric arteries and cells in lysis buffer was centrifuged at 13000 rpm at 4°C for 20min, and the supernatant was then collected. Protein concentration was determined using Micro BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. After solubilization in 25µl of Laemmli sample buffer containing 5% β-mercaptoethanol, boiled 5 min at 90°C, equal amounts of proteins (10µg) were separated on 4-15% polyacrylamide gel electrophoresis (BioRad, Marnes la Coquette, France) and transferred to a nitrocellulose membrane (BioRad). For OXPHOS protein detection, 10µg were solubilized in 25µl of Laemmli sample buffer containing 5% β-mercapto ethanol, boiled 5 min at 45°C and separated by 12% polyacrylamide gel electrophoresis (Bio-Rad) and transferred to a PVDF membrane (Bio-Rad). Proteins were detected with specific antibodies: Total Oxphos cocktail (1:500, Abcam, Cambridge, UK), NDUFS1 (1:2000, Abcam), OPA1 (1:1000 BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), Collagen I (1:250, Abcam), Collagen III (1:1000, Abcam), Elastin (1:500, Abcam), SOD 1 (1:1000, EnzoLife Sciences, Villeurbanne, France), SOD 2 (1:1000, EnzoLife Sciences), iNOS (1:1000, BD Biosciences), VDAC (1:1000, Abcam), GAPDH (1:2000, Cell Signaling Technology). The amount of targeted proteins was normalized to the total protein amount (Ponceau staining) present in each line.

- **RNA interference**

Vascular smooth muscle cells from MOVAS (American Type Culture Collection ATCC) were maintained in DMEM medium (Lonza), supplemented with 10% fetal bovine serum and 200µg/ml G-418 (Sigma). Vascular endothelial cells from MS1 (American Type Culture Collection ATCC, MILE SVEN1) were maintained in DMEM medium (Lonza), supplemented with 5% fetal bovine serum. Cells were maintained at 37°C in 5% carbon dioxide. RNA interference experiments were performed by transfection of 50 nM of a control and a prevalidated siRNA against *Opal* (Ambion ID AS010402), using the Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher), according the manufacturer's instructions, and followed by a 48h incubation.

To verify siRNA efficiency, Western blot assay of OPA1 was carried out. Transfected cells were trypsinized, washed once in ice-cold PBS, and harvested. Equal amounts of cells were solubilized in 25µl of Laemmli sample buffer were separated by SDS-PAGE using a 4% stacking gel followed by a 10% running gel. Proteins were detected with specific antibodies: OPA1 (1:1000, BD Biosciences), beta-actin (1:5000, Sigma-Aldrich) and a second antibody anti-mouse HRP (1:5000, Thermofisher). After 48h of transfection, cells were incubated with Angiotensin II (10<sup>-6</sup>M) for 24h, then proliferation assay or apoptosis assay or mitochondrial superoxide assay were conducted.

- **Mitochondrial superoxide assay**

Cells grown on glass coverslips were incubated with Mitotracker Green FM (200nM, Thermo Fisher Scientific) and Mitosox Red (5µM, Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's instructions. The percentage of positive cells was calculated using the Image J software.

- **Apoptosis assay**

Cells grown on glass coverslips were fixed in paraformaldehyde 4%. Blocking of unspecific protein binding sites was carried out in PBS-BSA 5%. Cells were incubated with primary antibody Cleaved Caspase-3 (1:100, Merck Millipore, France) overnight at 4°C. Then, cells were incubated with secondary antibody Anti-Rabbit IgG PE (1:100, Thermo Fisher Scientific) and DAPI (1:1000, Sigma-Aldrich) for 2 hours at room temperature in the dark. Percentage of cleaved caspase-3 positive cells per total cells was assessed.

- **Proliferation assay**

Ki67 immuno-histochemical labeling was performed and cells grown on glass coverslips, according to manufacturer's instructions. For that purpose, 7µm thick frozen sections of aorta were prepared,

fixed in paraformaldehyde 4%. After blocking unspecific protein binding sites in PBS-BSA 5%, the sections were incubated with fluorescent conjugated antibody anti-Ki67-eFluor 570 (1:100, Thermo Fisher Scientific) and DAPI (1:1000, Sigma- Aldrich) for 2 hours at room temperature in the dark. Then, glass coverslips were observed with a confocal microscope. The percentage of Ki67 positive cells was calculated.

- **Statistical analysis**

Results were expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism<sup>®</sup> software (San Diego, CA, USA). For vascular reactivity, a 2-way ANOVA for consecutive measurements was used followed by a Bonferroni's post-test. A Mann-Whitney test was used for all other results. All results were considered as significantly different when  $p < 0.05$ .

## Results

- **Impact of OPA1 on mitochondrial length and cristae morphology in primary VSMCs and whole mesenteric arteries**

To test if OPA1 influenced mitochondrial length and cristae morphology in vascular cells in normal or hypertensive condition, transmission electron microscopic observations were performed both on primary VSMCs of mesenteric arteries and on whole resistance arteries (**Fig 1**).

*Opa1 haploinsufficiency* reduced mitochondria length in primary VSMCs and whole mesenteric arteries in both normal and hypertensive condition (**Fig 1B, 1E**). Furthermore, a mitochondrial fragmentation and disorganized cristae were found in primary VSMCs but neither in whole mesenteric arteries nor in hypertensive condition (**Fig 1C, 1F**). In the same way, the *Opa1* siRNA (siOpa1) induced reduction of the mitochondria length in the VSMCs, a mitochondrial fragmentation, with less disorganized cristae, unusual shapes (i.e. vesicle-like structures). In parallel, siOpa1 ECs showed enlarged cristae (SUP 1A and 1B).

- **Impact of OPA1 on mitochondrial fragmentation in primary VSMCs of mesenteric arteries in normal and hypertensive conditions.**

In order to characterize the impact of OPA1 on mitochondrial network architecture, mitochondrial morphology was investigated in primary VSMCs isolated from mesenteric arteries of WT and *Opa1*<sup>+/-</sup> mice in the presence or absence of AngII.

Representative images of the mitochondria in VSMCs are shown in **Fig 2A**. Four phenotypes of mitochondrial shape have been found in primary VSMCs. On the basis of mitochondrial volume, types of mitochondria were classified in 4 categories: cells with filamentous and interconnected mitochondria (**Fig 2A IV**), cells with coexisting long and short tubular mitochondria (**Fig 2A III**), cells with short tubular mitochondria (**Fig 2A II**) and cells with completely fragmented mitochondria (**Fig 2A I**). According to mitochondrial shape, it was found out that the wild type mitochondria were essentially filamentous with long coexisting and some short tubular mitochondria (**Fig 2B III + IV**). Whereas OPA1 displayed high rate of mitochondrial fragmentation. Moreover, in these isolated mitochondria, a high proportion of rounded shape was found (**Fig 2B II + I**). The histograms show the distribution of the mitochondrial population in 4 different categories on the basis of mitochondrial volume. Following AngII treatment, the mitochondrial interconnected network of WT VSMCs became hyper-fragmentated with an increase rate of short mitochondria  $0.1 \mu\text{m}^3$ .

- **Impact of OPA1 on L-NAME-induced hypertension**

In vivo studies were realized in order to investigate the impact of OPA1 in hypertension. We observed no significant change in mice body weight in *OPA1*<sup>+/+</sup> vs *OPA1*<sup>+/-</sup> mice in normal ( $32.0 \pm 1.2\text{g}$ ; n=11 vs  $31.0 \pm 1.3\text{g}$ ; n=10) or hypertensive ( $30.0 \pm 0.4\text{g}$ ; n=7 vs  $29.0 \pm 0.9\text{g}$ ; n=9) conditions. Systolic blood pressure (SBP) was not significantly different in *OPA1*<sup>+/-</sup> mice than in WT mice ( $121 \pm 1\text{mmHg}$  in *OPA1*<sup>+/-</sup> mice vs  $119 \pm 1\text{mmHg}$  in WT mice before treatment, **Fig 3A**, Day 0). Furthermore, to evaluate whether partial depletion of OPA1 affect vascular function in stress condition, we treated WT and *OPA1*<sup>+/-</sup> mice by L-NAME to induce hypertension. After 6 days, SBP was higher in *OPA1*<sup>+/-</sup> mice than in WT mice. 14 days after L-NAME treatment, SBP was significantly greater in *OPA1*<sup>+/-</sup> mice than in WT mice ( $150 \pm 1\text{mmHg}$  in *OPA1*<sup>+/-</sup> mice vs  $140 \pm 2\text{mmHg}$  in WT mice) (**Fig 3A**). Mesenteric arteries of L-NAME-treated *OPA1*<sup>+/-</sup> and WT mice displayed a similar increase in the media/lumen ratio compared to mesenteric arteries of non-treated mice (**Fig 3B**), suggesting that no further hypertrophy occurred in hypertensive *OPA1*<sup>+/-</sup> mice despite higher hypertension as compared to WT mice.

- **Vascular reactivity of mesenteric arteries in *OPA1*<sup>+/-</sup> hypertensive mice**

Phenylephrine-mediated contraction of mesenteric arteries was not different between WT and *OPA1*<sup>+/-</sup> mice without or with L-NAME treatment (**Fig 4A, 4B**). In addition, no significant difference in endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine was observed between WT and *OPA1*<sup>+/-</sup> mice (**Fig 4C**). But, acetylcholine-mediated endothelium-dependent relaxation of mesenteric arteries

was lower in L-NAME-treated WT and *Opal*<sup>+/-</sup> mice than in non-treated mice thus L-NAME treatment induced endothelial dysfunction. The reduction in acetylcholine-mediated relaxation was significantly higher in L-NAME-treated *Opal*<sup>+/-</sup> mice than in L-NAME-treated WT mice (**Fig 4D**). Finally, no significant difference was observed between the 2 groups of mice in endothelium-independent relaxation to the SNP in mesenteric arteries (**Fig 4E**) and in L-NAME-treated WT and *Opal*<sup>+/-</sup> mice (**Fig 4F**).

- **Impact of OPA1 on oxidative stress in whole mesenteric arteries**

ROS level was higher in mesenteric arteries of hypertensive mice compared to normotensive mice in both *Opal*<sup>+/-</sup> and WT mice (**Fig 5A**). The mesenteric arteries of *Opal*<sup>+/-</sup> hypertensive mice displayed a significantly higher ROS level than in WT hypertensive mice (**Fig 5A**).

We then evaluated gene expression level of antioxidant enzymes including *Sod1*, *Sod2* and *Gpx1* in the different groups of mice. Expression of *Sod1* in *Opal*<sup>+/-</sup> mice and L-NAME-treated *Opal*<sup>+/-</sup> mice were significantly lower than in WT mice and L-NAME-treated WT mice (**Fig 5B1**). In addition, *Sod2* expression was significantly lower in L-NAME-treated *Opal*<sup>+/-</sup> mice in comparison with *Opal*<sup>+/-</sup> mice while it was not different between the two groups of WT mice (**Fig 5C1**). The protein levels of SOD1 and SOD2 were also altered. SOD1 protein level were significantly lower in *Opal*<sup>+/-</sup> treated mice than in WT treated mice (**Fig 5B2**). SOD2 protein level were significantly higher in *Opal*<sup>+/-</sup> treated mice than in WT treated mice (**Fig 5C2**). Besides, the expression level of GPX1 was comparable between these groups of mice (**Fig 6A**). Similarly, eNOS gene expression level was not different between WT mice and *Opal*<sup>+/-</sup> mice (**Fig 6B**).

- **Impacts of *Opal* silencing on mitochondrial superoxide generation**

Impact of *Opal* silencing on vascular cells was then investigated. *Opal* deletion has been reported to increase mitochondrial ROS (mROS) generation (11, 13). Therefore, mitochondrial superoxide was evaluated in VSMCs transfected with *Opal* siRNA. Compared to siCTR, the production of mitochondrial ROS in si*Opal* VSMCs was not different in normal condition, but was significantly increased after treatment by AngII 10<sup>-6</sup> M for 24h (SUP. 2A). In ECs, siRNA mediated *Opal* silencing potentiated the mROS generation induced by AngII (SUP 2B).

- **Impacts of *Opa1* silencing on vascular cells apoptosis and proliferation**

The role of OPA1 in apoptosis of vascular cells was then tested. *Opa1* silencing did not increase spontaneous apoptosis in VSMCs. However, AngII increased the cleaved caspase 3 positive cells in siOpa1 VSMCs, but not in those transfected with siCTR cells. In ECs, loss of OPA1 (siOpa1 ECs) induced apoptosis and AngII had no effect (SUP 3A and 3B). In addition, AngII induced an increased percentage of ki67 positive cells in VSMCs infected with siCTR and CTR cells, whereas this increase was blunted in siOPA1-treated VSMCs (SUP 4).

- **Mitochondrial gene expression in whole mesenteric arteries**

Finally, we evaluated the expression of mitochondrial transcription factor A (*Tfam*), which is required for mitochondrial DNA (mtDNA) transcription and replication, and nuclear respiratory factor 1 (*Nrf1*) which has been shown to regulate expression of many genes involved in mitochondrial function and mitochondrial biogenesis (32, 33). Gene expression level of *Tfam* was increased in *Opa1*<sup>+/-</sup> mice compared to WT mice (**Fig 6C**). *Nrf1* gene expression level in L-NAME-treated *Opa1*<sup>+/-</sup> mice was higher than in L-NAME-treated WT mice (**Fig 6C**). *Mfn1* expression level was higher in L-NAME-treated *Opa1*<sup>+/-</sup> mice and *Opa1*<sup>+/-</sup> mice in comparison with L-NAME-treated WT mice and WT mice (**Fig 6E**). However, there was no significant difference in the gene expression level of *Mfn2* between these groups of mice (**Fig 6F**).

- **Mitochondrial Oxidative Phosphorylation (OxPhos) in primary VSMCs and whole mesenteric arteries**

No significant difference was found in the expression of OxPhos proteins in primary VSMCs from mesenteric arteries (**Fig 7**)

Also, we evaluated the expression of mitochondrial oxidative phosphorylation system in whole mesenteric arteries (**Fig 8**). We measured the NADPH-ubiquinone oxidoreductase (NDUFS1), Succinate dehydrogenase (CII-SDH8), Cytochrome b-c1 complex subunit 2 (CIII-UQCRC2), Cytochrome c oxidase subunit 1 (CIV-MTCO1), and the ATP Synthase (CV-ATP5A) levels.

Finally, Oxphos western blot complex analysis showed no significant difference in the expression of OxPhos proteins in whole vessel.

- **Mitochondrial OPA1 long (OPA1L) and short (OPA1s) forms in primary VSMCs and whole mesenteric arteries**

No significant difference, with or without hypertension, was found in the expression of total OPA1 protein in primary VSMCs from mesenteric arteries (**Fig 9**) or in whole mesenteric arteries (**Fig 10**), but as expected, total OPA1 protein is halved in *Opal*<sup>+/-</sup> mice.

Finally, we found similar results for OPA1L or OPA1s form in *Opal*<sup>+/-</sup> hypertensive mice compared to *Opal*<sup>+/-</sup> mice in primary VSMCs from mesenteric arteries (**Fig 9**) or in whole mesenteric arteries (**Fig 10**).

## **Discussion**

Studies highlighted the importance of mitochondrial dynamics, in particular the pro-fusion protein OPA1, in cells with high-energy demand such as neurons, skeletal muscle, and cardiomyocytes (34-36). In accordance, our study suggests that mitochondrial fusion has a protective role against hypertension in *Opal haploinsufficiency* mice model, a total *Opal* silencing being lethal. Indeed, our results showed, for the first time, impact of decreased mitochondrial fusion on the vasculature during hypertension despite a maintained activity of half of the OPA1 proteins. Although *Opal*<sup>+/-</sup> mice displayed no obvious change in mice body weight, normal blood pressure and vascular function, they developed a more severe hypertension than *Opal*<sup>+/+</sup> mice in association with an altered endothelium-dependent relaxation and excessive oxidative stress of mitochondrial origin. These results were not associated with a difference in iNOS expression after 2 weeks of L-NAME treatment. In accordance, Sun et al described in a model of iNOS knockout mice, that iNOS leads to better preservation of cardiac function induced by a reduced oxidative stress and an increased eNOS without a significant role in preventing hypertension and hypertrophy (37).

Previous clinical studies showing that besides abnormalities due to OPA1 protein deficiency get worse visual failure, deafness, peripheral neuropathy, ataxia and cardiomyopathy but had normal feeding and body weight (24). Similarly, *Opal*<sup>+/-</sup> mice body weight was not different from that of *Opal*<sup>+/+</sup> mice (23, 38). Studies have shown that loss of *Opal* resulted in disruption of cristae structure and increased cell sensitivity to spontaneous and induced apoptosis (supplemental data) (7, 9). Anti-apoptotic function of OPA1 was attributed to the formation of OPA1 oligomers that maintained the structure of the cristae junctions and sequester cytochrome c within the cristae (7, 9, 39).

L-Name treatment induced a lower hypertension compared to angiotensin II infusion with osmotic pump in mice. Because L-NAME-induced hypertension is associated with renin-angiotensin system activation (40), we stimulated our cells with Ang II. We observed that *Opal haploinsufficiency*

resulted in altered mitochondria morphology and cristae structure in both primary mouse VSMCs and whole mouse resistance arteries and in *Opal* silencing MOVAS cells. *Opal* haploinsufficiency induced mitochondria hyper-fragmentation as observed in arteries from hypertensive WT mice. Furthermore, we found that AngII-dependent production of ROS was further increased in *Opal*-silenced VSMCs compared to control cells, demonstrating that the loss of *Opal* increased ROS production as it has also been described in diabetes (41), (42).

We found that *Opal* deficiency in MOVAS VMSCs led to cristae disorganization causing increased cell apoptosis in MS1 ECs and in MOVAS VSMCs after treatment with AngII. This result is in agreement with previous studies performed in invertebrate models bearing *Opal* mutations and in lymphoblastoid cells of autosomal dominant optic atrophy (*ADOA*) patients which both present an excessive mROS production associated to mitochondrial dysfunction (11, 13, 14). In mouse embryonic fibroblasts bearing *Opal* mutations and in fibroblasts from *ADOA* patients, recent studies have shown an increased percentage of apoptotic cells compared to controls in oxidative stress conditions (7, 43).

Chronic inhibition of NO with L-NAME-induced hypertension in both *Opal*<sup>+/-</sup> and WT mice. However, *Opal* haploinsufficiency in *Opal*<sup>+/-</sup> mice displayed higher hypertension than WT mice, showing that haplo-insufficiency of *Opal* had a deleterious impact in a stress condition such as hypertension. This finding suggests a vascular protective effect for *Opal* under conditions of chronic stress. Our results are consistent with a study showing no evidence of cardiac dysfunction in *Opal*<sup>+/-</sup> mice, whereas these mice were more vulnerable to chronic pressure overload (44). In agreement with previous studies (45, 46), we found that L-NAME-induced hypertension was associated with impaired endothelium-dependent relaxation in resistance arteries (47). However, the alteration was more pronounced in L-NAME-treated *Opal*<sup>+/-</sup> mice than in L-NAME-treated WT mice, consistent with the higher blood pressure observed in L-NAME-treated *Opal*<sup>+/-</sup> mice. This higher hypertension was not associated with further hypertrophy in *Opal*<sup>+/-</sup> mice compared to WT mice, this result may be due to a slower hypertension dependent remodeling in the *Opal*<sup>+/-</sup> mice which would be evidenced by a longer L-NAME treatment. In our experiments, although the increase of collagen I is not significant, this variation is associated with an increase of collagen III in L-NAME-treated *Opal*<sup>+/-</sup> mice as demonstrated in supplemental data. Our results did not show that hypertension is the consequence of a deficiency of mitochondrial fusion but that alteration of mitochondrial fusion was an aggravating factor in hypertension. As described by Sarzy et al, the authors found that *Opal*<sup>+/-</sup> mouse displays a multi-systemic poly-degenerative phenotype, and a pre-mature age-related mitochondrial supercomplex instability preceding degeneration and cell death (24). Indeed, it is well known that in aging, vascular wall stiffness is increased (48). All these arguments could explain the excessive increase in blood pressure in *Opal*<sup>+/-</sup> hypertensive mice.

Previous studies have shown that endothelium dysfunction occurs before organ damage in hypertension (49). Chronic impairment in NO-mediated endothelium-dependent dilation and low-grade inflammation facilitate the maintenance of elevated peripheral resistance and promote hypertension development (50, 51). Nevertheless, a recent study has compared plethysmography analysis using the tail cuff method to telemetry. It has demonstrated that the amplitude of the rise in pressure in mice is the same whether it is measured using plethysmography or telemetry, even though basal blood pressure is better measured with telemetry (52).

Endothelial dysfunction in cardiovascular pathologies is usually associated with increased ROS production which inactivates NO released from endothelial cells (53). In agreement, DHE staining showed significantly increased ROS level in L-NAME-treated *Opal*<sup>+/-</sup> mice compared to L-NAME-treated WT mice, suggesting that ROS reduced endothelium (NO)-mediated relaxation in both groups and this effect was significantly more pronounced in L-NAME-treated *Opal*<sup>+/-</sup> mice than in L-NAME-treated WT mice.

We also observed that SOD1 level was significantly lower in L-NAME-treated *Opal*<sup>+/-</sup> mice than in WT mice and SOD2 higher in L-NAME-treated *Opal*<sup>+/-</sup> mice than in WT mice, showing an imbalance of the oxidative stress. Despite this higher SOD2 protein level trying a compensatory effect, oxidative stress (DHE and mitosox) stays significantly higher in L-NAME-treated *Opal*<sup>+/-</sup> mice vs WT mice and subsequently leads to a more severe endothelium dysfunction in L-NAME-treated *Opal*<sup>+/-</sup> mice. Otherwise, there is no significant difference in expression level of eNOS between L-NAME-treated WT mice and L-NAME-treated *Opal*<sup>+/-</sup> mice. Thus, the more pronounced impairment in endothelium-dependent relaxation in L-NAME-treated *Opal*<sup>+/-</sup> mice was not related to a reduced NO synthesis but to NO scavenging by ROS.

*Nrf1* is critical for mitochondrial biogenesis and for the regulation of respiratory genes. *Tfam* is an essential activator of mtDNA transcription and replication. Changes in *Nrf1* and *Tfam* expression could generally affect mitochondrial functionality and encoded in mtDNA (33). In the present study, we observed an up-regulation of *Nrf1* in L-NAME-treated *Opal*<sup>+/-</sup> mice and up-regulation of *Tfam* in *Opal*<sup>+/-</sup> mice compared to WT mice. These results show that *Opal* influence *Tfam* expression in normal condition and *Nrf1* expression during hypertension. Besides, up-regulation of *Mfn1* but not of *Mfn2* in L-NAME-treated *Opal*<sup>+/-</sup> mice suggests a compensatory process in the control of mitochondrial fusion due to *Opal* deficiency in these mice.

Finally, Oxphos complex western blot analysis showed that no significant difference was found in primary VSMCs and in mouse mesenteric arteries. These results could demonstrate a potential difference of complex expression but not activity, in agreement with Le Page et al. who characterized mitochondrial respiration in *Opal*<sup>+/-</sup> and WT mice by measuring the respirations of complex I, II and

IV without significant difference (23). Although the oxphos components showed no difference in protein levels, this did not mean that the mitochondrial membrane potential and hence ATP or ROS production were not altered by these enzymes. Furthermore, no significant difference, with or without hypertension, was found in the expression of OPA1 long and short forms, suggesting a possible change of location of the OPA1 short form to be more active. Vascular cells (ECs and VSMCs) are exposed to blood pressure and shear stress. Hypertension induces mechanical fluctuations of pressure, applied to VSMCs, which could influence ATP and ROS production (54). On the other hand, the myocardium is also subjected to a variety of forces during each contraction, such as stretch, afterload, and shear stress, and adapts to those mechanical stimuli. The interaction between mitochondria and sarcomere directly affects cardiomyocyte excitation-contraction and is also involved in mechano-transduction through the cytoskeletal proteins and the sarcoplasmic reticulum. Mitochondria adapt their structure and activity by sensing the mechanical force in the environment and, within a dynamic organ such as the heart, it contributes to calcium homeostasis (55). Taken together, these results suggest that *Opal* deficiency affects in vivo response to high blood pressure via the induction of an excessive oxidative stress probably due to an altered mitochondrial function demonstrated by a hyper-fragmentation of the mitochondria.

In conclusion, down-regulation of *Opal* has no obvious impact on baseline vascular tone and structure, but in our *Opal haploinsufficiency* model, it aggravates endothelial dysfunction during hypertension and decrease the possibility to normalize tensile stress due to high blood pressure by hypertrophy of the vessel wall; an effect which might explain the increase in blood pressure in *Opal*<sup>+/-</sup> mice. Taken together, these data suggest for the first time that *OPA1*, a regulator of mitochondrial fusion and function, plays a protective role in blood vessels in stress conditions.

- **Conflict of Interest**

None declared.

- **Author Contributions**

Laurent Loufrani designed the protocol, obtained grants, researched data, wrote the manuscript, contributed to discussion and edited the manuscript. Pauline Robert, Phuc Minh Chau Nguyen, Céline Grenier, Arnaud Chevrollier, Mathilde Munier, Tristan Champin, Eric Lelièvre, Emmanuelle Sarzi, Linda Grimaud, Emilie Vessières, Coralynne Proux, Alexis Richard performed the experiments; Samir Henni, Delphine Prunier, Pascal Reynier, Guys Lenaers, Céline Fassot, and Daniel Henrion contributed to discussion and reviewed the manuscript. All authors have approved the final version of the manuscript.

- **Funding**

This work was supported by the Region Pays de la Loire (Mitovasc project), by the Foundation for Medical Research (FRM - DPC20171138957) and by GRRC (Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire, France).

- **Acknowledgments**

We thank the SCIAM (Service commun d'Imageries et d'Analyses Microscopiques) for Electronic microscopy analysis and the SCAHU (Service Commun d'Animalerie Hospitalo Universitaire) of the University of Angers.

## References

1. Touyz, R. M., and Schiffrin, E. L. (2004) Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* **122**, 339-352
2. Kluge, M. A., Fetterman, J. L., and Vita, J. A. (2013) Mitochondria and endothelial function. *Circ Res* **112**, 1171-1188
3. Liu, Y., Li, H., Bubolz, A. H., Zhang, D. X., and Gutterman, D. D. (2008) Endothelial cytoskeletal elements are critical for flow-mediated dilation in human coronary arterioles. *Med Biol Eng Comput* **46**, 469-478
4. Mironov, S. L., Ivannikov, M. V., and Johansson, M. (2005) [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> signaling between mitochondria and endoplasmic reticulum in neurons is regulated by microtubules. From mitochondrial permeability transition pore to Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release. *J Biol Chem* **280**, 715-721
5. Katakam, P. V., Wappler, E. A., Katz, P. S., Rutkai, I., Institoris, A., Domoki, F., Gaspar, T., Grovenburg, S. M., Snipes, J. A., and Busija, D. W. (2013) Depolarization of mitochondria in endothelial cells promotes cerebral artery vasodilation by activation of nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**, 752-759
6. MacVicar, T., and Langer, T. (2016) OPA1 processing in cell death and disease - the long and short of it. *J Cell Sci* **129**, 2297-2306
7. Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G. V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R. S., Danial, N. N., De Strooper, B., and Scorrano, L. (2006) OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* **126**, 177-189
8. Patten, D. A., Wong, J., Khacho, M., Soubannier, V., Mailloux, R. J., Pilon-Larose, K., MacLaurin, J. G., Park, D. S., McBride, H. M., Trinkle-Mulcahy, L., Harper, M. E., Germain, M., and Slack, R. S. (2014) OPA1-dependent cristae modulation is essential for cellular adaptation to metabolic demand. *EMBO J* **33**, 2676-2691
9. Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P., and Lenaers, G. (2003) Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* **278**, 7743-7746
10. Fulop, L., Szanda, G., Enyedi, B., Varnai, P., and Spat, A. (2011) The Effect of OPA1 on Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Signaling. *PLoS One* **6**, e25199-e25199
11. Tang, S., Le, P. K., Tse, S., Wallace, D. C., and Huang, T. (2009) Heterozygous mutation of Opa1 in Drosophila shortens lifespan mediated through increased reactive oxygen species production. *PLoS One* **4**, e4492
12. Chen, H., Chomyn, A., and Chan, D. C. (2005) Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* **280**, 26185-26192
13. Kao, S. H., Yen, M. Y., Wang, A. G., Yeh, Y. L., and Lin, A. L. (2015) Changes in Mitochondrial Morphology and Bioenergetics in Human Lymphoblastoid Cells With Four Novel OPA1 Mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **56**, 2269-2278
14. Yarosh, W., Monserrate, J., Tong, J. J., Tse, S., Le, P. K., Nguyen, K., Brachmann, C. B., Wallace, D. C., and Huang, T. (2008) The molecular mechanisms of OPA1-mediated optic atrophy in Drosophila model and prospects for antioxidant treatment. *PLoS Genet* **4**, e6
15. Puddu, P., Puddu, G. M., Cravero, E., Pascalis, S., and Muscari, A. (2007) The Putative Role of Mitochondrial Dysfunction in Hypertension. *Clinical and Experimental Hypertension*, **29**, 427-434
16. Vishnyakova, P. A., Volodina, M. A., Tarasova, N. V., Marey, M. V., Tsvirkun, D. V., Vavina, O. V., Khodzhaeva, Z. S., Kan, N. E., Menon, R., Vysokikh, M. Y., and Sukhikh, G. T. (2016) Mitochondrial role in adaptive response to stress conditions in preeclampsia. *Scientific reports* **6**, 32410
17. Jin, H. S., Sober, S., Hong, K. W., Org, E., Kim, B. Y., Laan, M., Oh, B., and Jeong, S. Y. (2011) Age-dependent association of the polymorphisms in the mitochondria-shaping gene, OPA1, with blood pressure and hypertension in Korean population. *American journal of hypertension* **24**, 1127-1135
18. Dai, Y., Weinreb, R. N., Kim, K. Y., Nguyen, D., Park, S., Sun, X., Lindsey, J. D., Ellisman, M. H., and Ju, W. K. (2011) Inducible nitric oxide synthase-mediated alteration of mitochondrial OPA1 expression in ocular hypertensive rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**, 2468-2476

19. Lin, Y. Y., Hong, Y., Yu, S. H., Wu, X. B., Shyu, W. C., Chen, J. S., Ting, H., Yang, A. L., and Lee, S. D. (2019) Antiapoptotic and mitochondrial biogenetic effects of exercise training on ovariectomized hypertensive rat hearts. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **126**, 1661-1672
20. Tang, Y., Mi, C., Liu, J., Gao, F., and Long, J. (2014) Compromised mitochondrial remodeling in compensatory hypertrophied myocardium of spontaneously hypertensive rat. *Cardiovasc Pathol* **23**, 101-106
21. Lahera, V., de Las Heras, N., Lopez-Farre, A., Manucha, W., and Ferder, L. (2017) Role of Mitochondrial Dysfunction in Hypertension and Obesity. *Curr Hypertens Rep* **19**, 11
22. Ong, S. B., Subrayan, S., Lim, S. Y., Yellon, D. M., Davidson, S. M., and Hausenloy, D. J. (2010) Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation* **121**, 2012-2022
23. Le Page, S., Niro, M., Fauconnier, J., Cellier, L., Tamareille, S., Gharib, A., Chevrollier, A., Loufrani, L., Grenier, C., Kamel, R., Sarzi, E., Lacampagne, A., Ovize, M., Henrion, D., Reynier, P., Lenaers, G., Mirebeau-Prunier, D., and Prunier, F. (2016) Increase in Cardiac Ischemia-Reperfusion Injuries in Opa1+/- Mouse Model. *PLoS One* **11**, e0164066
24. Sarzi, E., Angebault, C., Seveno, M., Gueguen, N., Chaix, B., Bielicki, G., Boddaert, N., Mausset-Bonnefont, A. L., Cazevielle, C., Rigau, V., Renou, J. P., Wang, J., Delettre, C., Brabet, P., Puel, J. L., Hamel, C. P., Reynier, P., and Lenaers, G. (2012) The human OPA1delTTAG mutation induces premature age-related systemic neurodegeneration in mouse. *Brain* **135**, 3599-3613
25. Berger, J. M., Vaillant, N., Le May, C., Calderon, C., Bregeon, J., Prieur, X., Hadchouel, J., Loirand, G., and Cariou, B. (2015) PCSK9-deficiency does not alter blood pressure and sodium balance in mouse models of hypertension. *Atherosclerosis* **239**, 252-259
26. Codron, P., Cassereau, J., Vourc'h, P., Veyrat-Durebex, C., Blasco, H., Kane, S., Procaccio, V., Letournel, F., Verny, C., Lenaers, G., Reynier, P., and Chevrollier, A. (2018) Primary fibroblasts derived from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients do not show ALS cytological lesions. *Amyotrophic lateral sclerosis & frontotemporal degeneration* **19**, 446-456
27. Chevrollier, A., Cassereau, J., Ferré, M., Alban, J., Desquirit-Dumas, V., Gueguen, N., Amati-Bonneau, P., Procaccio, V., Bonneau, D., and Reynier, P. (2012) Standardized mitochondrial analysis gives new insights into mitochondrial dynamics and OPA1 function. *The international journal of biochemistry & cell biology* **44**, 980-988
28. Cousin, M., Custaud, M. A., Baron-Menguy, C., Toutain, B., Dumont, O., Guihot, A. L., Vessieres, E., Subra, J. F., Henrion, D., and Loufrani, L. (2010) Role of angiotensin II in the remodeling induced by a chronic increase in flow in rat mesenteric resistance arteries. *Hypertension* **55**, 109-115
29. Loufrani, L., Matrougui, K., Li, Z., Levy, B. I., Lacolley, P., Paulin, D., and Henrion, D. (2002) Selective microvascular dysfunction in mice lacking the gene encoding for desmin. *FASEB J* **16**, 117-119
30. Bouvet, C., Belin de Chantemele, E., Guihot, A. L., Vessieres, E., Bocquet, A., Dumont, O., Jardel, A., Loufrani, L., Moreau, P., and Henrion, D. (2007) Flow-induced remodeling in resistance arteries from obese Zucker rats is associated with endothelial dysfunction. *Hypertension* **50**, 248-254
31. Retailliau, K., Belin de Chantemele, E. J., Chanoine, S., Guihot, A. L., Vessieres, E., Toutain, B., Faure, S., Bagi, Z., Loufrani, L., and Henrion, D. (2010) Reactive oxygen species and cyclooxygenase 2-derived thromboxane A2 reduce angiotensin II type 2 receptor vasorelaxation in diabetic rat resistance arteries. *Hypertension* **55**, 339-344
32. Piantadosi, C. A., and Suliman, H. B. (2006) Mitochondrial transcription factor A induction by redox activation of nuclear respiratory factor 1. *J Biol Chem* **281**, 324-333
33. Kelly, D. P., and Scarpulla, R. C. (2004) Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev* **18**, 357-368
34. Bertholet, A. M., Millet, A. M., Guillermin, O., Daloyau, M., Davezac, N., Miquel, M. C., and Belenguer, P. (2013) OPA1 loss of function affects in vitro neuronal maturation. *Brain* **136**, 1518-1533
35. Caffin, F., Prola, A., Piquereau, J., Novotova, M., David, D. J., Garnier, A., Fortin, D., Alavi, M. V., Veksler, V., Ventura-Clapier, R., and Joubert, F. (2013) Altered skeletal muscle mitochondrial biogenesis but improved endurance capacity in trained OPA1-deficient mice. *The Journal of physiology* **591**, 6017-6037
36. Chen, L., Liu, T., Tran, A., Lu, X., Tomilov, A. A., Davies, V., Cortopassi, G., Chiamvimonvat, N., Bers, D. M., Votruba, M., and Knowlton, A. A. (2012) OPA1 mutation and late-onset cardiomyopathy: mitochondrial dysfunction and mtDNA instability. *J Am Heart Assoc* **1**, e003012

37. Sun, Y., Carretero, O. A., Xu, J., Rhaleb, N. E., Wang, F., Lin, C., Yang, J. J., Pagano, P. J., and Yang, X. P. (2005) Lack of inducible NO synthase reduces oxidative stress and enhances cardiac response to isoproterenol in mice with deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Hypertension* **46**, 1355-1361
38. Chao de la Barca, J. M., Simard, G., Sarzi, E., Chaumette, T., Rousseau, G., Chupin, S., Gadras, C., Tessier, L., Ferre, M., Chevrollier, A., Desquirit-Dumas, V., Gueguen, N., Leruez, S., Verny, C., Milea, D., Bonneau, D., Amati-Bonneau, P., Procaccio, V., Hamel, C., Lenaers, G., Reynier, P., and Prunier-Mirebeau, D. (2017) Targeted Metabolomics Reveals Early Dominant Optic Atrophy Signature in Optic Nerves of Opa1delTTAG/+ Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **58**, 812-820
39. Olichon, A., Landes, T., Arnauné-Pelloquin, L., Emorine, L. J., Mils, V., Guichet, A., Delettre, C., Hamel, C., Amati-Bonneau, P., Bonneau, D., Reynier, P., Lenaers, G., and Belenguer, P. (2007) Effects of OPA1 mutations on mitochondrial morphology and apoptosis relevance to ADOA pathogenesis. *J. Cell. Physiol.* **211**, 423-430
40. Ribeiro, M. O., Antunes, E., de Nucci, G., Lovisololo, S. M., and Zatz, R. (1992) Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* **20**, 298-303
41. Liu, N., Wu, J., Zhang, L., Gao, Z., Sun, Y., Yu, M., Zhao, Y., Dong, S., Lu, F., and Zhang, W. (2017) Hydrogen Sulphide modulating mitochondrial morphology to promote mitophagy in endothelial cells under high-glucose and high-palmitate. *J Cell Mol Med* **21**, 3190-3203
42. Makino, A., Scott, B. T., and Dillmann, W. H. (2010) Mitochondrial fragmentation and superoxide anion production in coronary endothelial cells from a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia* **53**, 1783-1794
43. Formichi, P., Radi, E., Giorgi, E., Gallus, G. N., Brunetti, J., Battisti, C., Rufa, A., Dotti, M. T., Franceschini, R., Bracci, L., and Federico, A. (2015) Analysis of opa1 isoforms expression and apoptosis regulation in autosomal dominant optic atrophy (ADOA) patients with mutations in the opa1 gene. *J Neurol Sci* **351**, 99-108
44. Piquereau, J., Caffin, F., Novotova, M., Prola, A., Garnier, A., Mateo, P., Fortin, D., Huynh le, H., Nicolas, V., Alavi, M. V., Brenner, C., Ventura-Clapier, R., Veksler, V., and Joubert, F. (2012) Down-regulation of OPA1 alters mouse mitochondrial morphology, PTP function, and cardiac adaptation to pressure overload. *Cardiovasc Res* **94**, 408-417
45. Preti, S. C., Cunha, V., Vassallo, D. V., and Stefanon, I. (2005) The superoxide dismutase mimetic, tempol, reduces the bioavailability of nitric oxide and does not alter L-NAME-induced hypertension in rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 29-34
46. Kalliovalkama, J., Jolma, P., Tolvanen, J. P., Kahonen, M., Hutri-Kahonen, N., Wu, X., Holm, P., and Porsti, I. (1999) Arterial function in nitric oxide-deficient hypertension. *Cardiovascular Research* **42**, 773-782
47. Dowell, F. J., Henrion, D., Duriez, M., and Michel, J. B. (1996) Vascular reactivity in mesenteric resistance arteries following chronic nitric oxide synthase inhibition in Wistar rats. *Br J Pharmacol* **117**, 341-346
48. Lakatta, E. G., and Levy, D. (2003) Arterial and cardiac aging : major shareholders in cardiovascular disease enterprises : Part I : aging arteries : a « set up » for vascular disease. *Circulation* **107** 139-146
49. Endemann, D. H., and Schiffrin, E. L. (2004) Endothelial dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **15**, 1983-1992
50. Bautista, L. E. (2003) Inflammation, endothelial dysfunction, and the risk of high blood pressure: epidemiologic and biological evidence. *J Hum Hypertens* **17**, 223-230
51. Wei, B. R., Stauffer, B. L., Greiner, J., and DeSouza, C. A. (2011) Prehypertension Is Associated With Impaired Nitric Oxide-Mediated Endothelium-Dependent Vasodilation in Sedentary Adults. *American journal of hypertension* **24**, 976-981
52. Wilde, E., Aubdool, A. A., Thakore, P., Baldissera, L., Jr., Alawi, K. M., Keeble, J., Nandi, M., and Brain, S. D. (2017) Tail-Cuff Technique and Its Influence on Central Blood Pressure in the Mouse. *J Am Heart Assoc* **6**
53. Cai, H., and Harrison, D. G. (2000) Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. *Circ Res* **87**, 840-844
54. Bartolák-Suki, E., and Suki, B. (2020) Tuning mitochondrial structure and function to criticality by fluctuation-driven mechanotransduction. *Scientific reports* **10**, 407

55. Caffarra Malvezzi, C., Cabassi, A., and Miragoli, M. (2020) Mitochondrial mechanosensor in cardiovascular diseases. *Vascular biology (Bristol, England)* **2**, R85-r92

## Figure Legends

**Figure 1:** Mitochondrial length and cristae morphology in primary VSMCs treated with AngII (10<sup>-6</sup>M or DMEM, 24h, **A, B, C**) and in whole mesenteric arteries from normotensive or hypertensive mice treated with L-NAME in the drinking water (5mg/10mL, 14 days, **D, E, F**) (n=30-50 mitochondria used for analysis in each animal. Red Arrows correspond to disorganized cristae, Yellow Arrows correspond to normal cristae. Mean ± SEM is shown (n=5 mice per group), \* p<0.05, \*\*\* p<0.001

**Figure 2:** AngII promotes mitochondrial hyperfragmentation in VSMCs.

**A:** VSMCs were loaded with MitoTracker Green probes as described in Materials and Methods. Mitochondrial shape and distribution of WT and *Opa1*<sup>+/-</sup> VSMCs were classified in four categories (I-IV) and representative images are shown. Details show enlargement of some mitochondria; the mitochondrial shape were assessed and color-coded.

**B:** Histograms indicate the proportion of WT and *OPA1*<sup>+/-</sup> VSMCs within subcategories (I+II) and (III+IV). Values are the mean ± sem of at least 60 measurements from two independent acquisitions for each animal. Scale bar = 10 μm.

Statistical analysis was carried out using non-parametric Mann-Whitney test, \*\*\* p-value < 0.001, n=8 mice per group.

**Figure 3:** L-NAME-mediated hypertension in WT and *Opa1*<sup>+/-</sup> mice (**A**). (\* p<0.05, \*\* p<0.01, *Opa1*<sup>+/-</sup> hypertensive mice versus WT hypertensive mice) (n=10 mice per group).

Media/lumen ratio of mesenteric arteries (**B**) in WT and *Opa1*<sup>+/-</sup>, WT hypertensive (WT L-NAME) and *Opa1*<sup>+/-</sup> hypertensive mice (*Opa1*<sup>+/-</sup> L-NAME), (n=5-7 mice per group), (\$ p<0.05, hypertensive versus normotensive mice).

**Figure 4:** Vascular reactivity in WT and *Opa1*<sup>+/-</sup> mice. Concentration-response curves to phenylephrine, acetylcholine, SNP were performed in mesenteric arteries of normotensive mice (**A, C, E**) and hypertensive mice (**B, D, F**). Mean ± SEM is presented (n = 5-9 mice per group). \$ p<0.05, WT versus WT+L-NAME, \$\$ p<0.05 *Opa1*<sup>+/-</sup> versus *Opa1*<sup>+/-</sup> +L-NAME, \* p<0.05, WT+L-NAME versus *Opa1*<sup>+/-</sup> +L-NAME.

**Figure 5:** Measurement of ROS level by DHE staining in mesenteric arteries (**A**) (n=5 per group); Gene expression level of Sod1 (**B**) and Sod2 (**C**) measured using qPCR analysis in mesenteric arteries

(n=5-8 mice per group) (\* p<0.05, *Opal*<sup>+/-</sup> hypertensive mice versus WT hypertensive mice, \$ p<0.05, hypertensive versus normotensive mice). Western blot examining SOD1 (**B2**) and SOD2 (**C2**) protein level in whole mesenteric arteries from normotensive and hypertensive mice, (n=6 per group), \* p< 0.05, \*\*\* p< 0.001. The amount of targeted proteins was normalized to the total protein amount (Ponceau staining) present in each line.

**Figure 6:** Gene expression level of *Gpx1* (**A**), *eNOS* (**B**), *Nrf1* (**C**), *Tfam* (**D**), *Mfn1* (**E**) and *Mfn2* (**F**) measured using qPCR analysis in mesenteric arteries (n=5-8 per group); (\* p<0.05, \*\* p<0.01, *Opal*<sup>+/-</sup> hypertensive versus WT hypertensive mice).

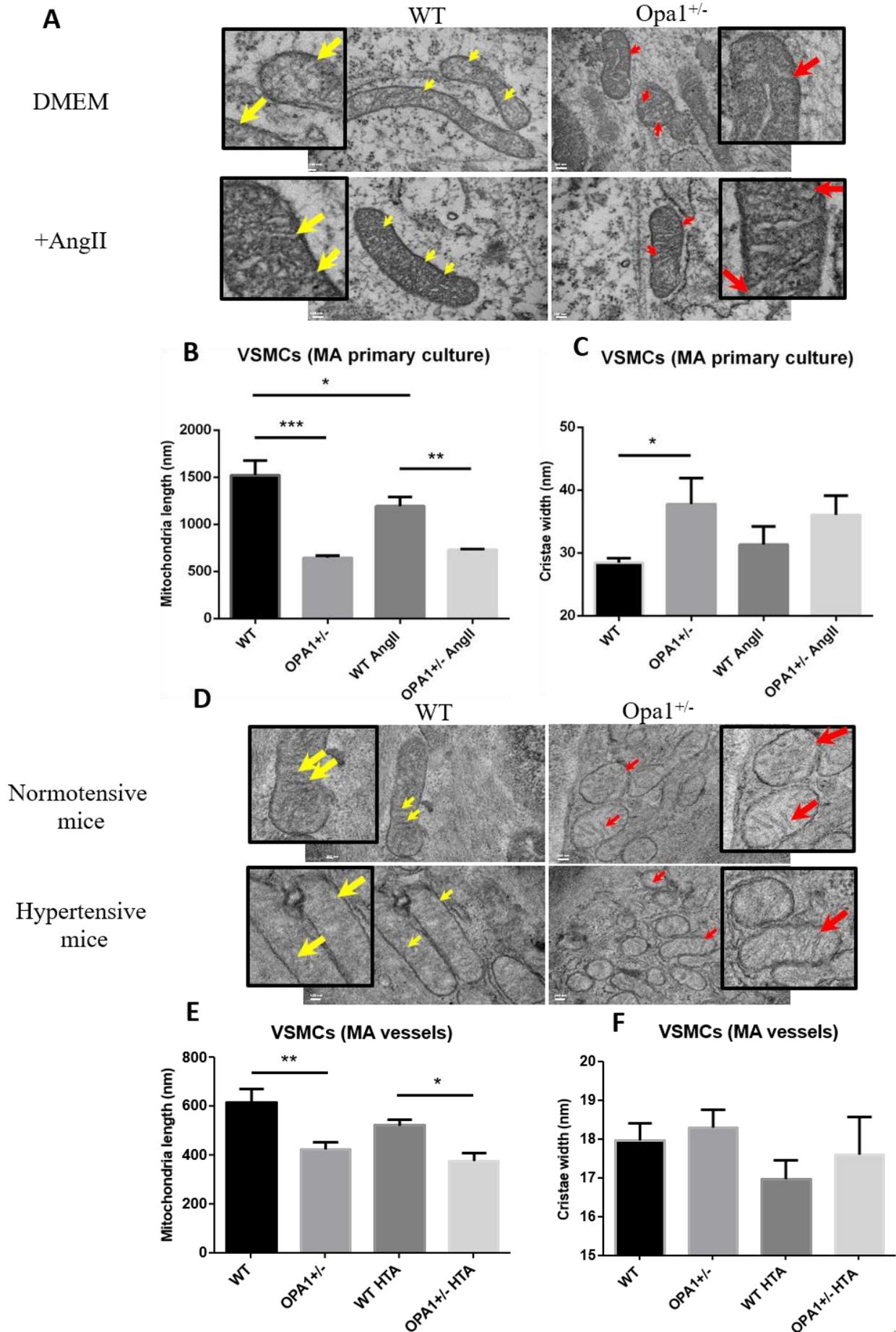
**Figure 7:** Western blot examining Oxphos proteins level in primary VSMCs isolated from mesenteric arteries after 24h of AngII treatment. (n=6), \* p< 0.05, \*\*\* p< 0.001. The amount of targeted proteins was normalized to the total protein amount (Ponceau staining) present in each line.

**Figure 8:** Western blot examining Oxphos protein level in whole mesenteric arteries from normotensive and hypertensive mice. (n=6), \* p< 0.05, \*\*\* p< 0.001. The amount of targeted proteins was normalized to the total protein amount (Ponceau staining) present in each line.

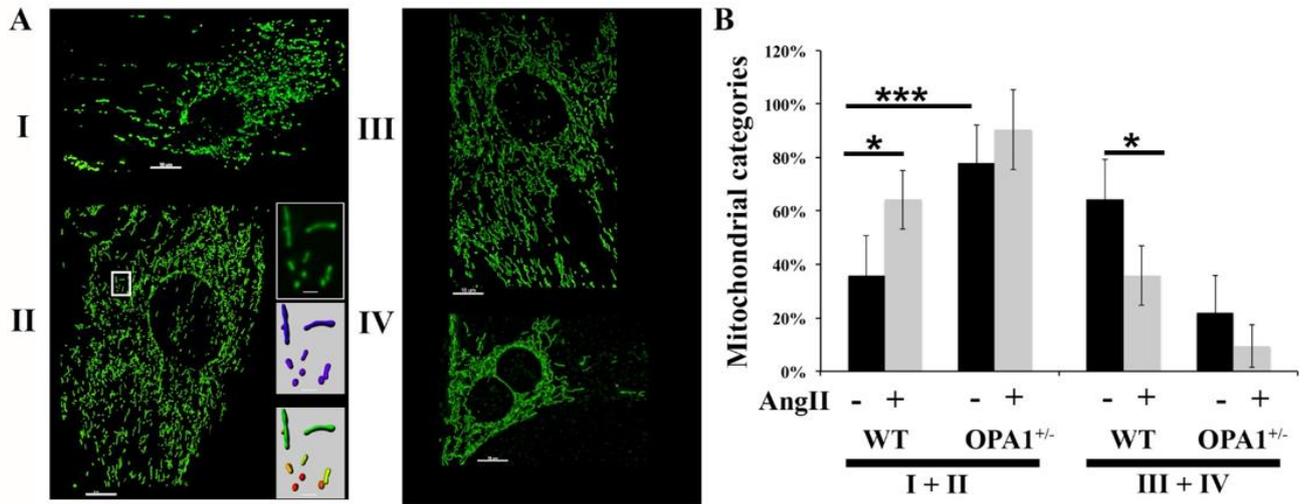
**Figure 9:** Western blot examining OPA1 protein and OPA1s and OPA1L level in primary VSMCs isolated from mesenteric arteries after 24h of AngII. (n=6), \* p< 0.05, \*\*\* p< 0.001. The amount of targeted proteins was normalized to the total protein amount (Ponceau staining) present in each line.

**Figure 10:** Western blot examining OPA1 protein and OPA1s and OPA1L level in mesenteric arteries from normotensive and hypertensive mice. (n=6), \* p< 0.05, \*\*\* p< 0.001. The amount of targeted proteins was normalized to the total protein amount (Ponceau staining) present in each line.

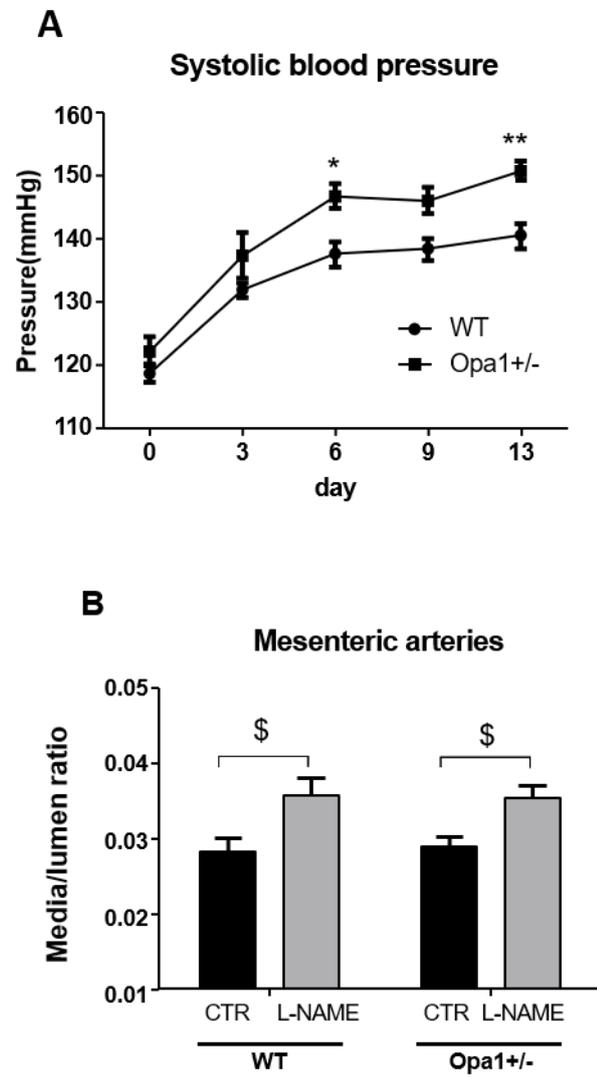
**Figure 1**



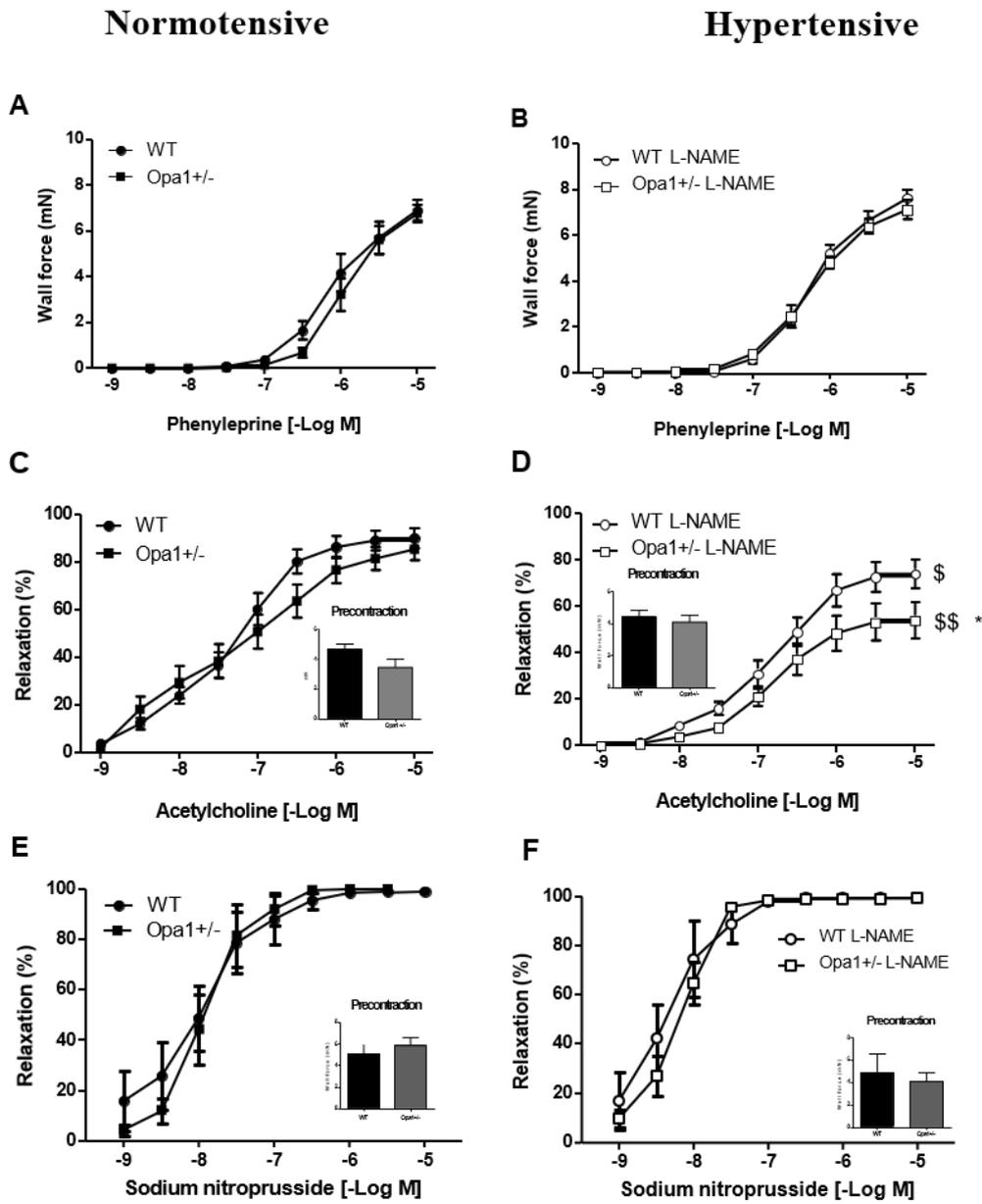
**Figure 2**



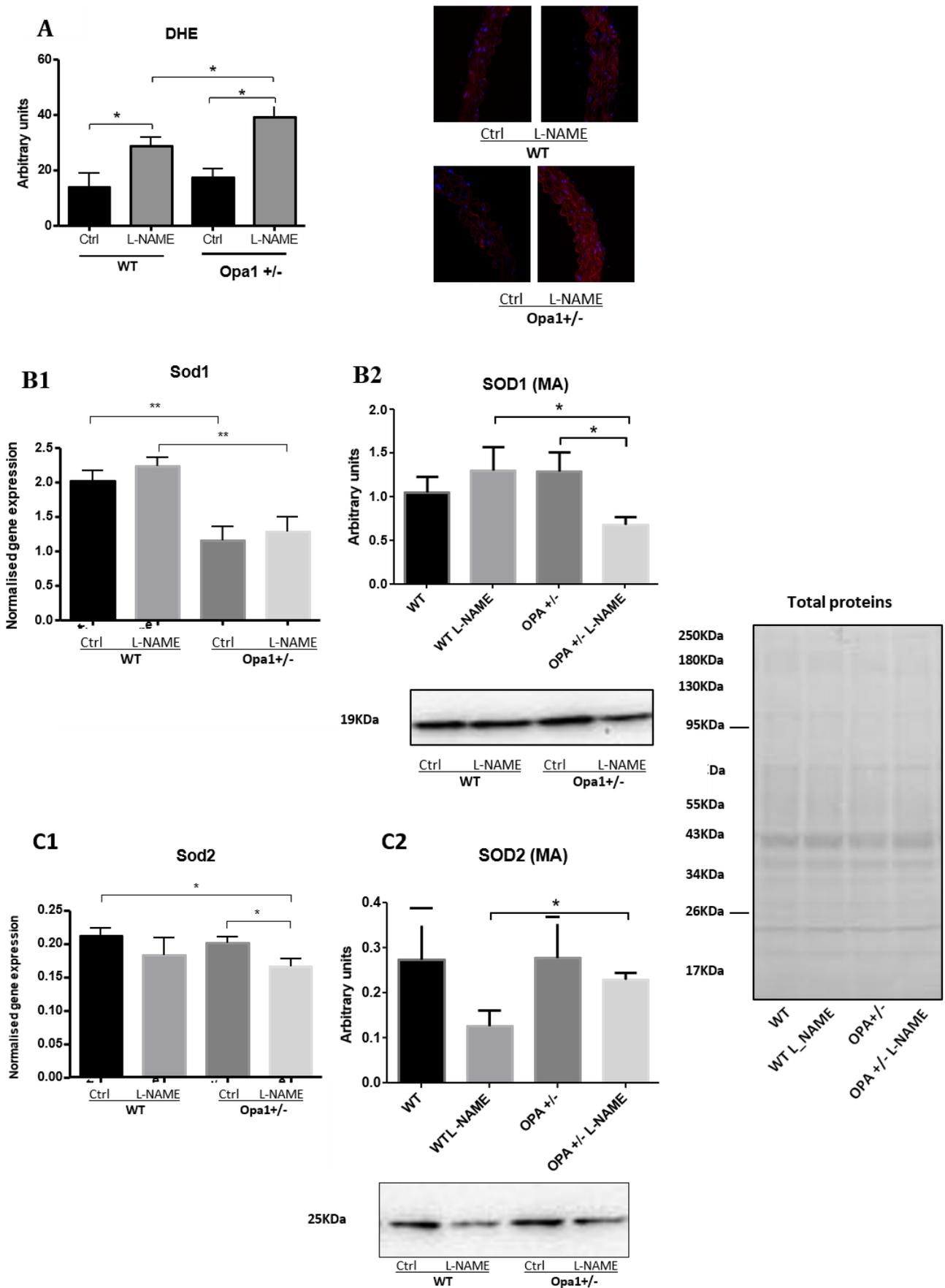
**Figure 3**



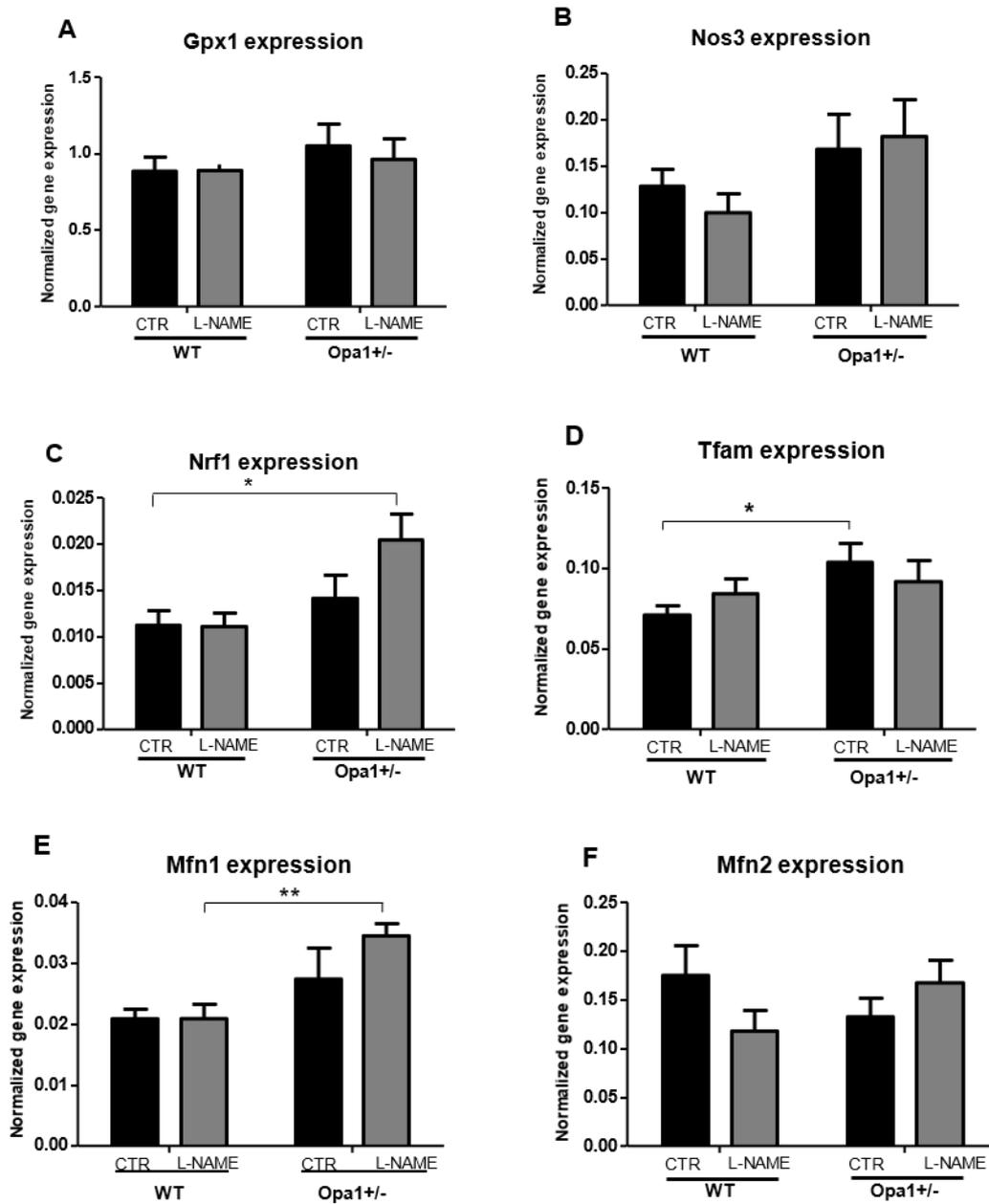
**Figure 4**



**Figure 5**

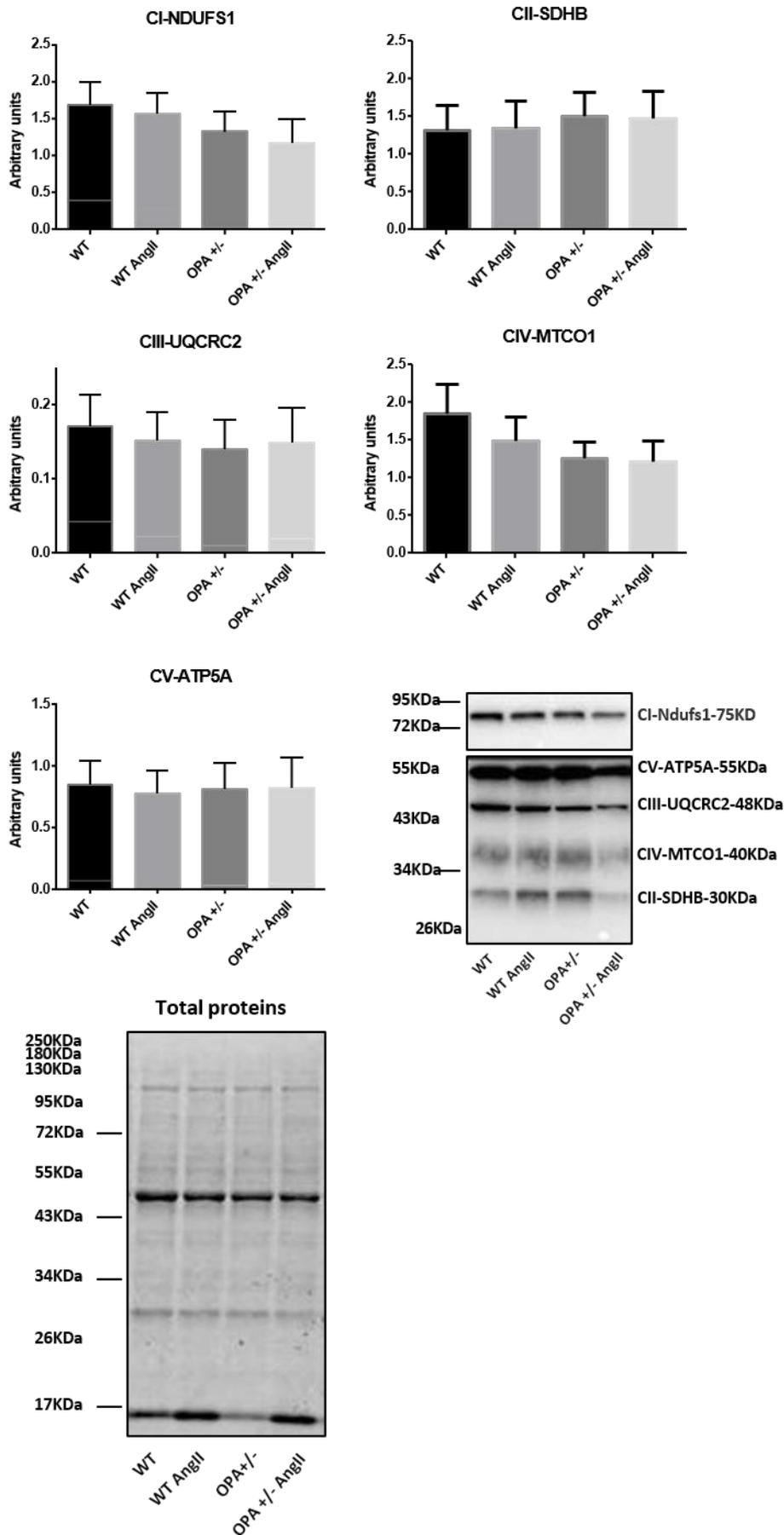


**Figure 6**



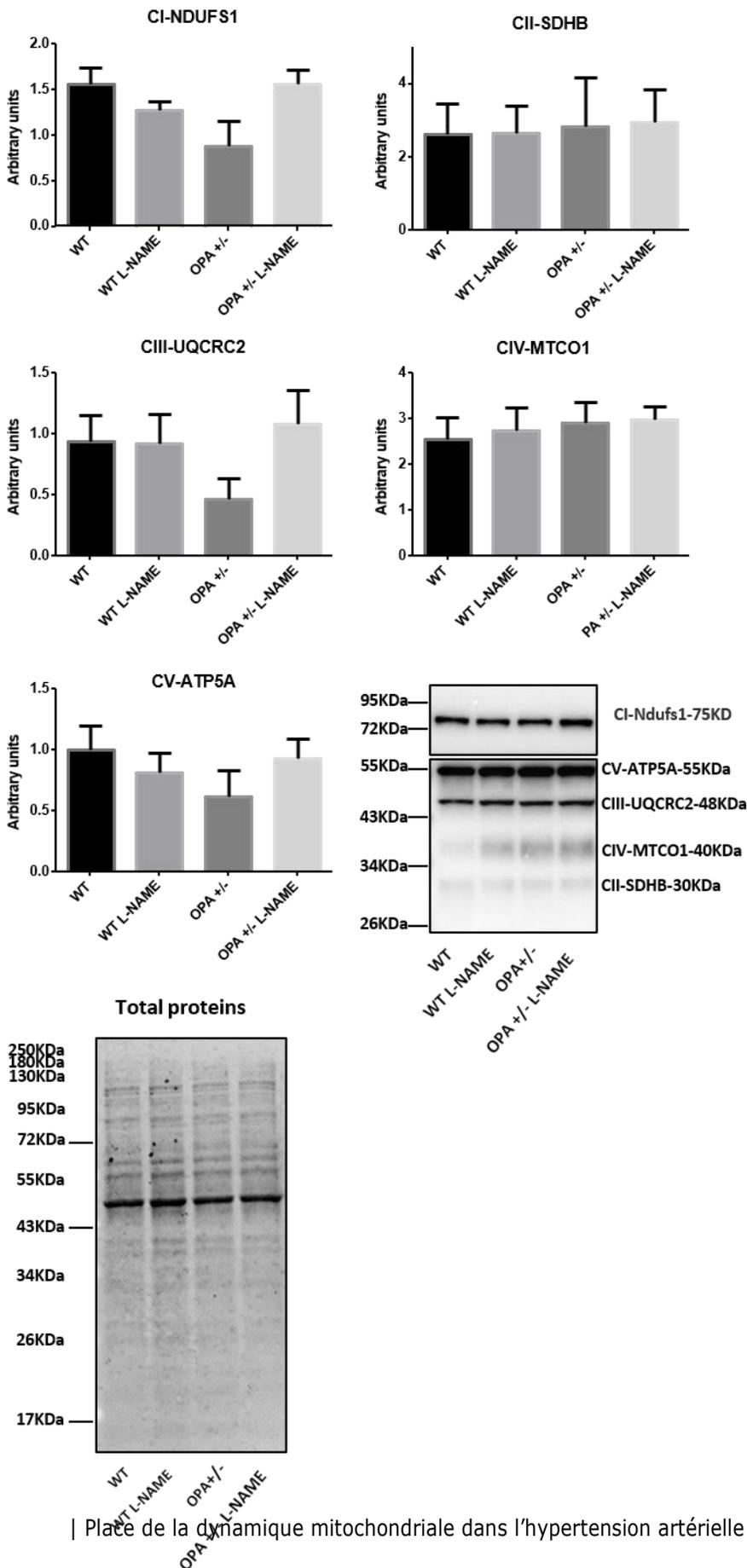
**Figure 7**

**Oxphos (VSMCs, MA Primary culture)**

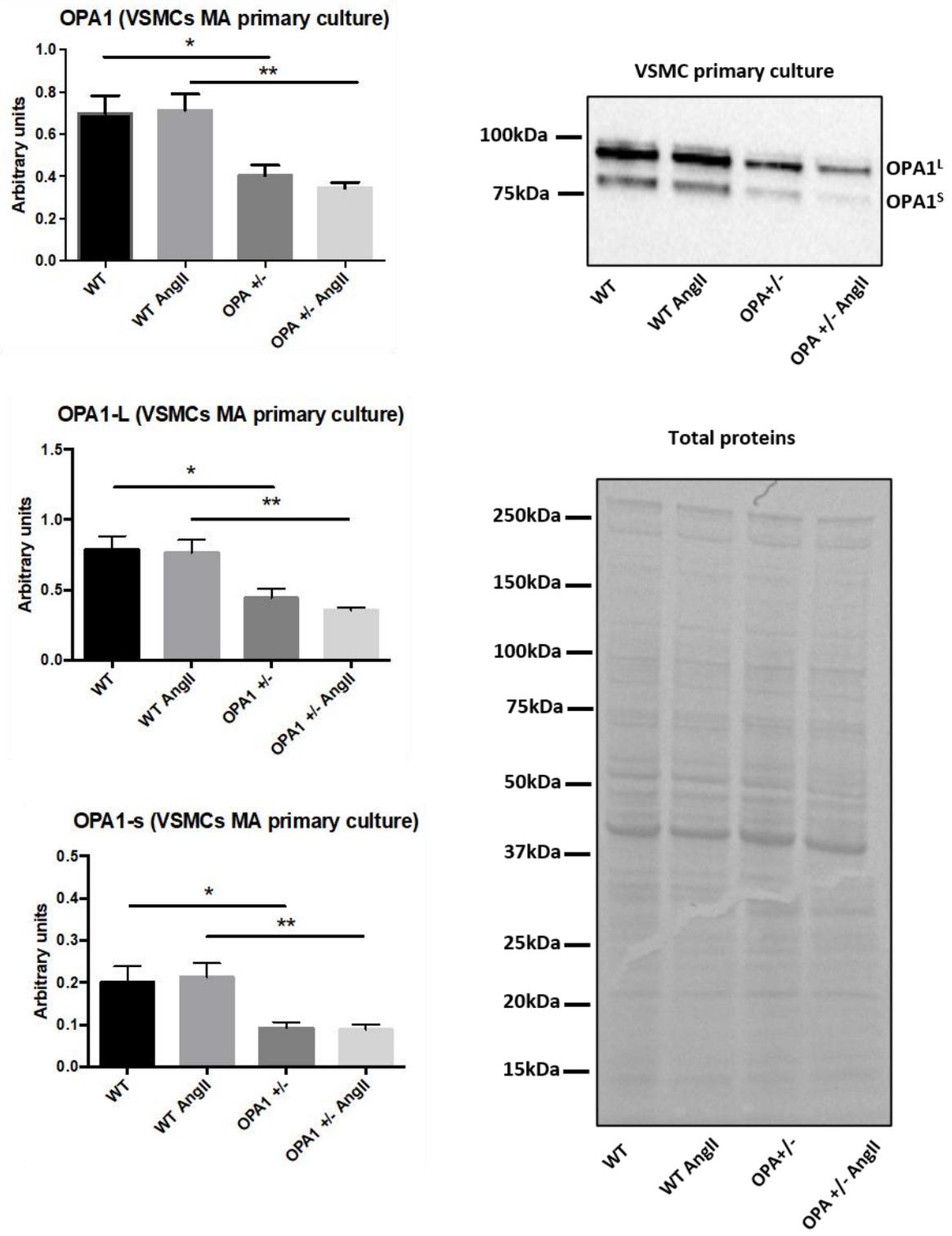


**Figure 8**

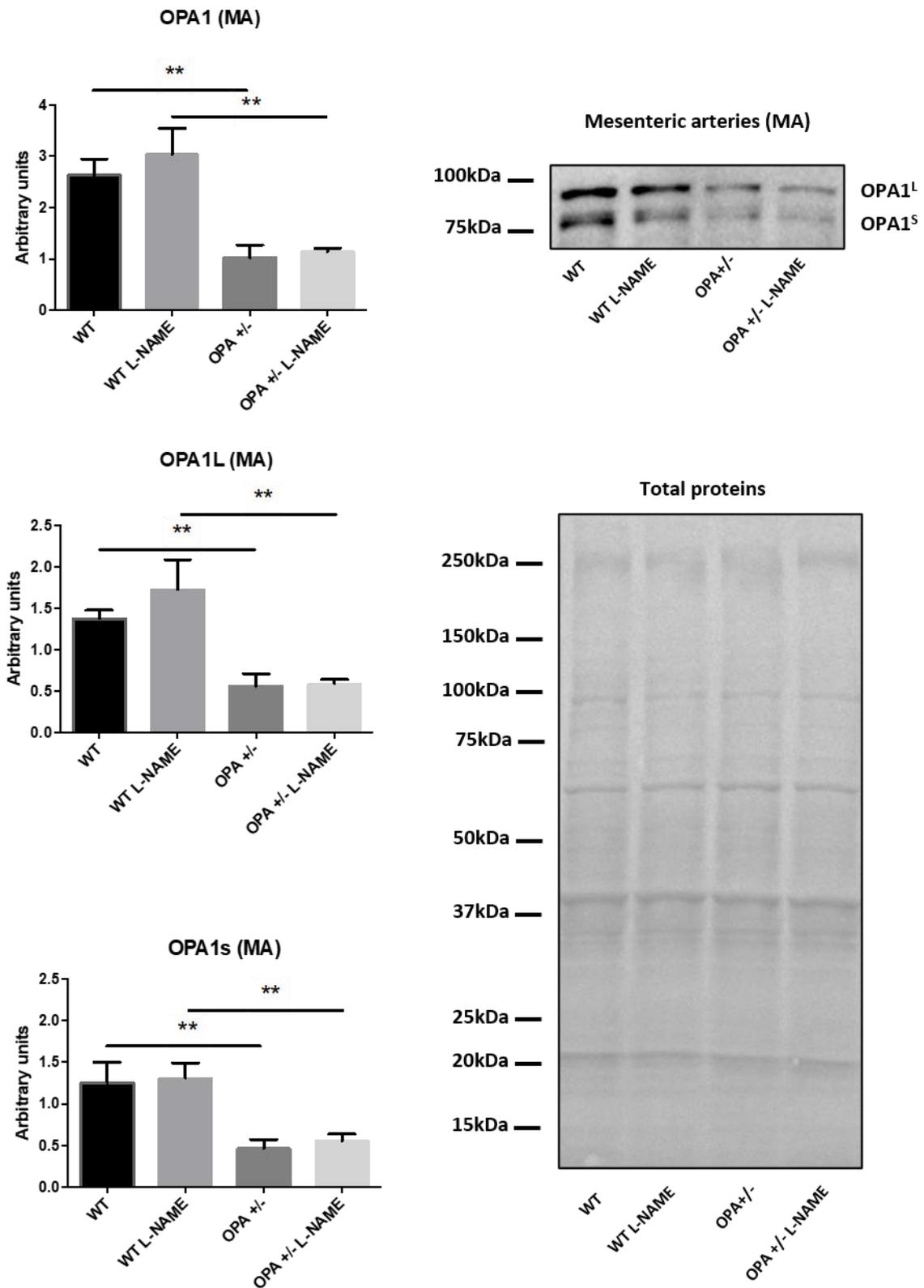
**Oxphos (MA)**



**Figure 9**



**Figure 10**



## Supplemental legends

**SUP1:** Western blot examining Opa1 protein level in VSMCs (n=3 per group) and in ECs (B) (n=5 per group); after siRNA transfection, and mitochondrial length, cristae morphology in VSMCs (A) and ECs (B). Red Arrows correspond to disorganized cristae; Yellow Arrows correspond to normal cristae. (n=30-50), \* p< 0.05, \*\*\* p< 0.001, OPA1-siRNA versus CTR-siRNA).

**SUP2:** Impact of OPA1 silencing on VSMCs and ECs function in vitro after siRNA transfection: Measurement of mitochondrial superoxide production in VSMCs (A) (n=3 per group), in ECs (B) (n=5 per group);

(\$ p<0.05, \$\$ p<0.01, \$\$\$ p<0.001, AngII-treated cells versus untreated cells; \* p<0.05, \*\* p<0.01, AngII-treated siOPA1 cells versus AngII-treated siCTR cells.

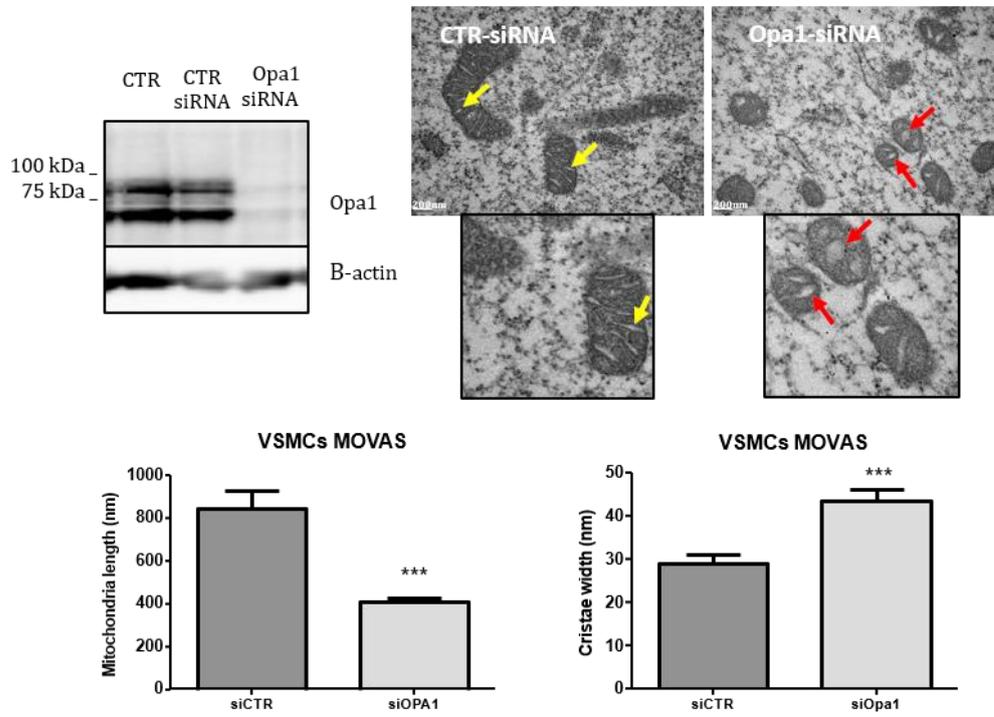
**SUP3:** Apoptosis assay in VSMCs (C) and in EC (D) (n=3 per group) after siRNA transfection (\$ p<0.05, \$\$ p<0.01, \$\$\$ p<0.001, AngII-treated cells versus untreated cells; \* p<0.05, \*\* p<0.01, AngII-treated siOPA1 cells versus AngII-treated siCTR cells.

**SUP4:** Impact of OPA1 silencing on VSMCs proliferation in vitro after siRNA transfection (n=3 per group), (\$ p<0.05, \$\$ p<0.01, \$\$\$ p<0.001, AngII-treated cells versus untreated cells; \* p<0.05, \*\* p<0.01, AngII-treated siOPA1 cells versus AngII-treated siCTR cells.

# SUP 1

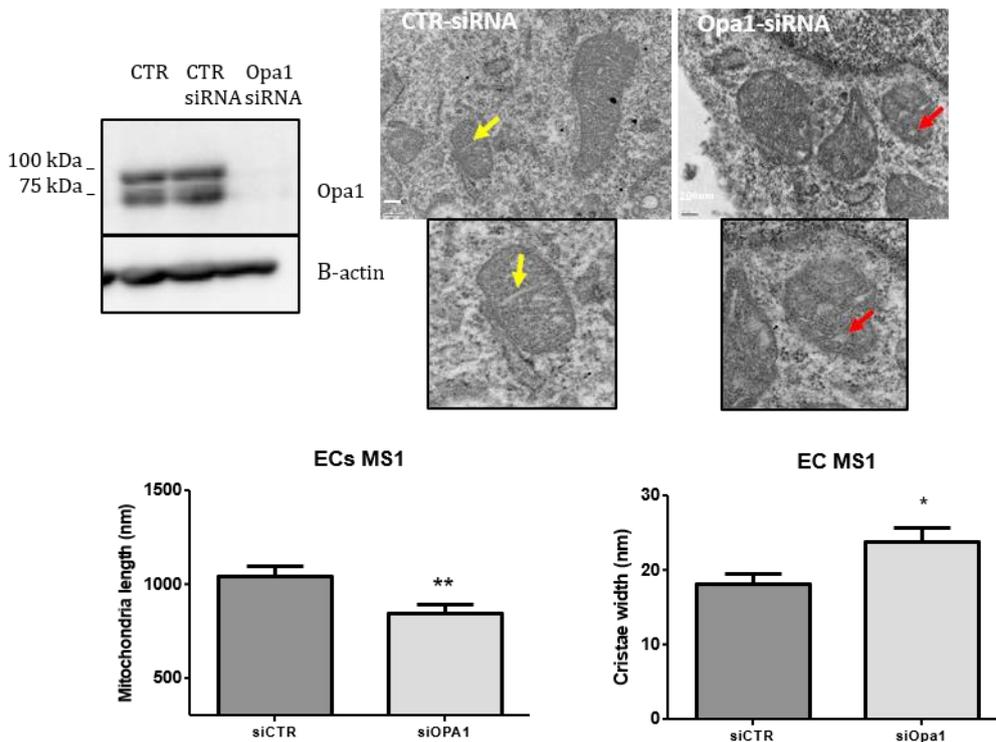
## Vascular Smooth Muscle Cells

**A**

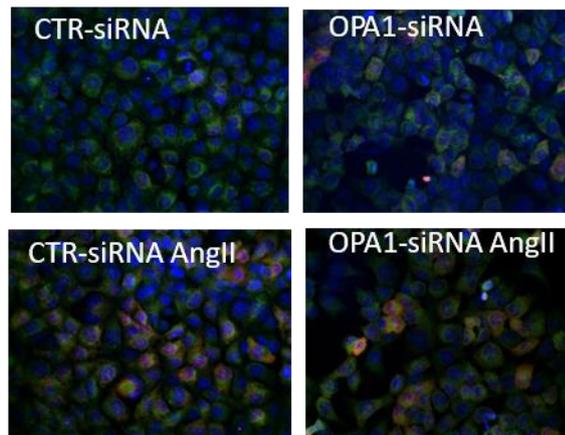
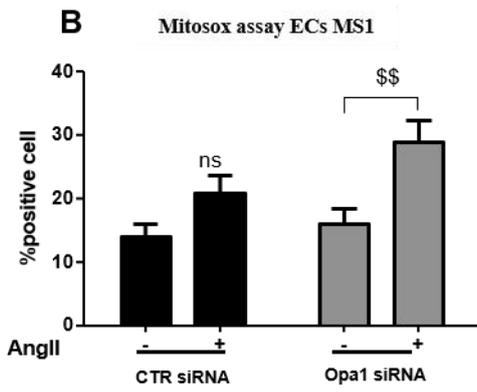
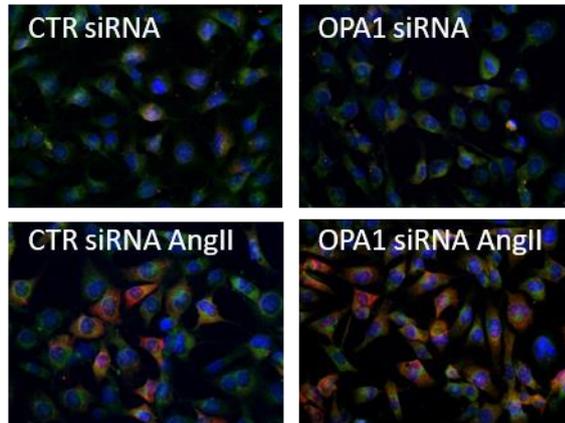
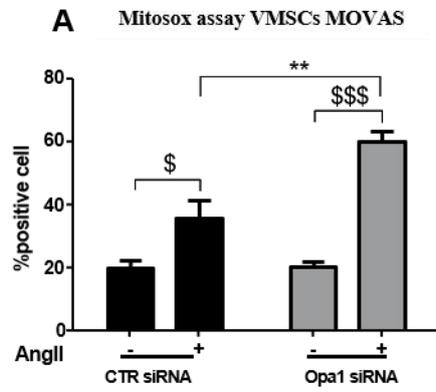


**B**

## Endothelial Cells



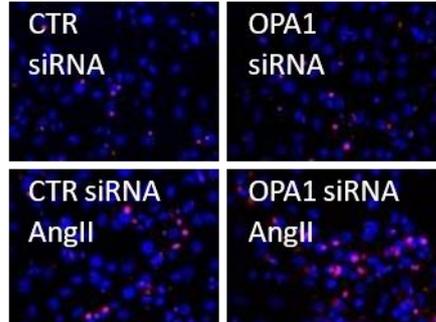
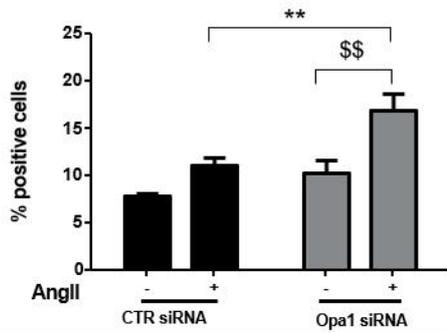
# SUP 2



# SUP 3

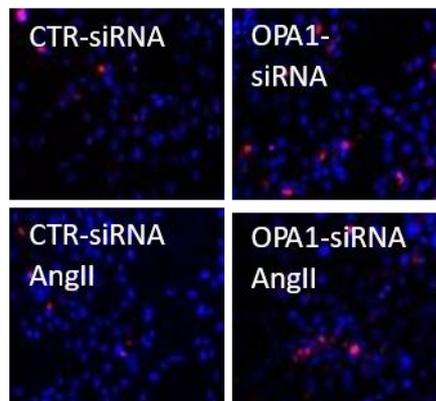
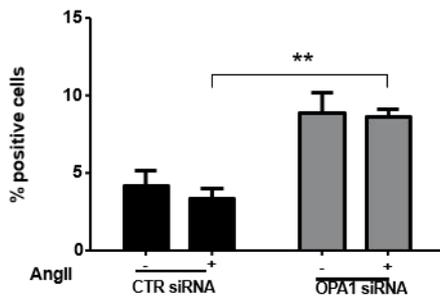
## A

Cleaved caspase 3 VSMC MOVAS

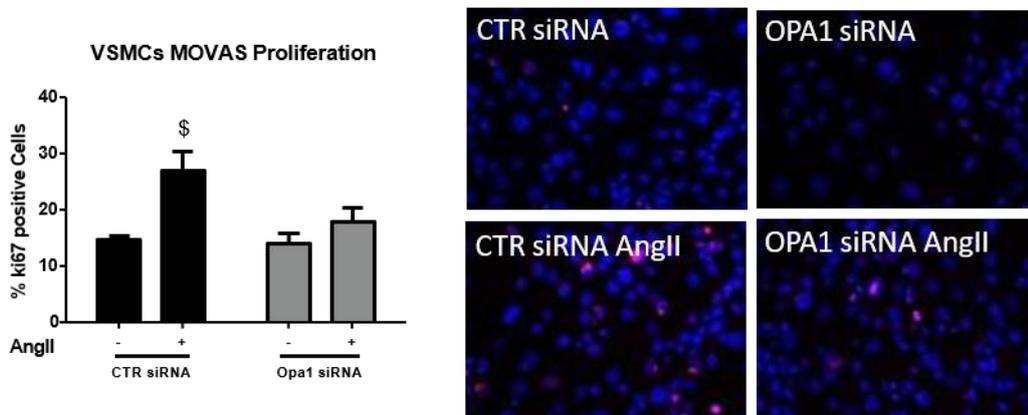


## B

Cleaved caspase 3 ECs MS1



# SUP 4

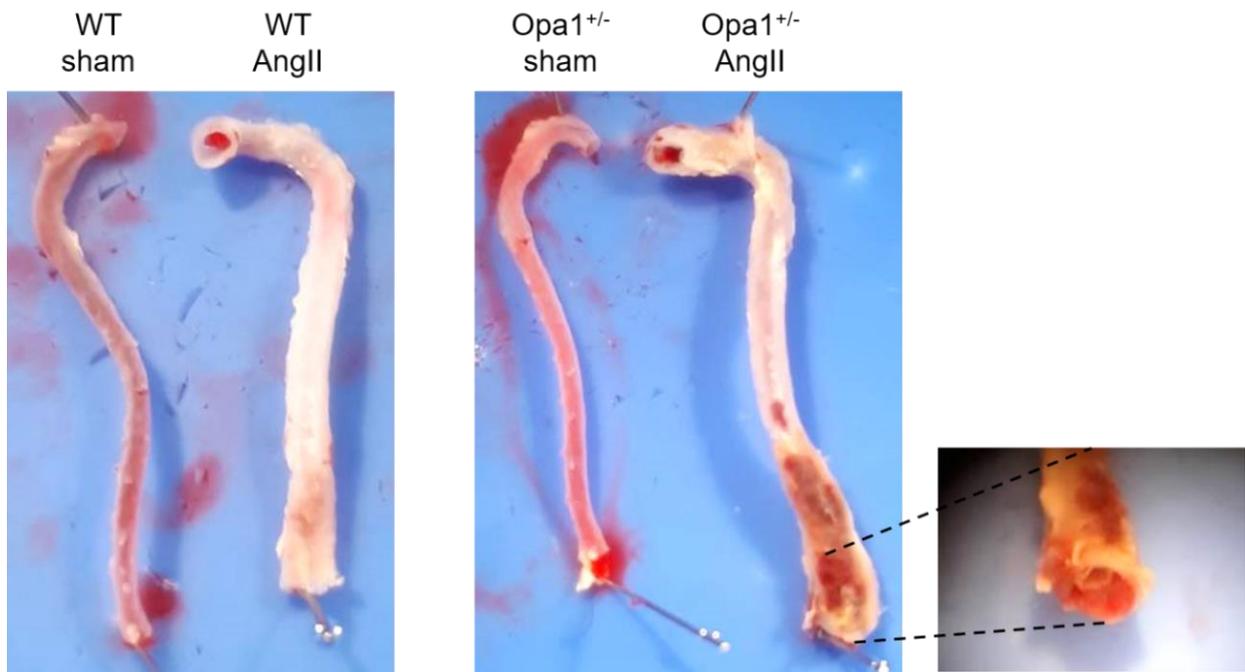


## Conclusion de l'étude 1

Les premiers éléments de la littérature mettant en avant un rôle protecteur d'OPA1 dans les pathologies cardiaques, l'objectif de cette étude visait à comprendre, la place de la protéine de fusion mitochondriale dans l'hypertension artérielle, premier facteur de risque des pathologies cardiovasculaires. Ce projet a été basé sur l'utilisation de modèles murins et cellulaires présentant une déficience d'expression du gène codant pour la protéine de fusion mitochondriale, OPA1, soumis à un traitement hypertenseur. Le modèle murin *Opa1*<sup>+/-</sup> soumis à un traitement hypertenseur au L-NAME, a permis de mettre en évidence une aggravation de l'hypertension artérielle chez ces animaux par rapport aux contrôles. En parallèle, l'utilisation de lignées de cellules endothéliales et musculaires lisses de souris nous ont permis comprendre les effets de l'extinction d'*Opa1* et du traitement hypertenseur sur les deux types cellulaires majoritaires composant les artères. Le traitement à l'angiotensine II et l'altération de la fusion mitochondriale ont ainsi provoqué une augmentation du stress oxydant mitochondrial et de l'apoptose des cellules associés à une fragmentation du réseau mitochondrial. Enfin, l'isolement spécifique de CML primaires d'artères mésentériques des animaux *Opa1*<sup>+/-</sup> permet en plus de prouver que le traitement hypertenseur, lui-même, provoque la fragmentation du réseau mitochondrial. Ceci prouve alors que cet effet sur la physiologie des artères mésentériques peut être en partie dû à la fragmentation du réseau provoqué par la délétion d'*Opa1* et potentialisée par l'effet du traitement hypertenseur.

Durant cette première étude, basée sur les artères de résistances, nous avons conservé un regard sur les artères de conductance et principalement l'aorte thoracique. Par ailleurs, en parallèle du traitement hypertenseur au L-NAME, nous avons traité des souris à l'angiotensine II. C'est alors que nous avons observé des remodelages de type anévrismaux et disséquants sur les aortes thoraciques des souris *Opa1*<sup>+/-</sup> traitées à l'AngII (**Figure 22**), soulevant alors une deuxième question :

- La fusion mitochondriale joue-t-elle un rôle dans les pathologies anévrismales et disséquantes de l'aorte ?



**Figure 22 : Remodelage de l'aorte thoracique des souris contrôles (WT) et *Opa1*<sup>+/-</sup> soumises à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham).**

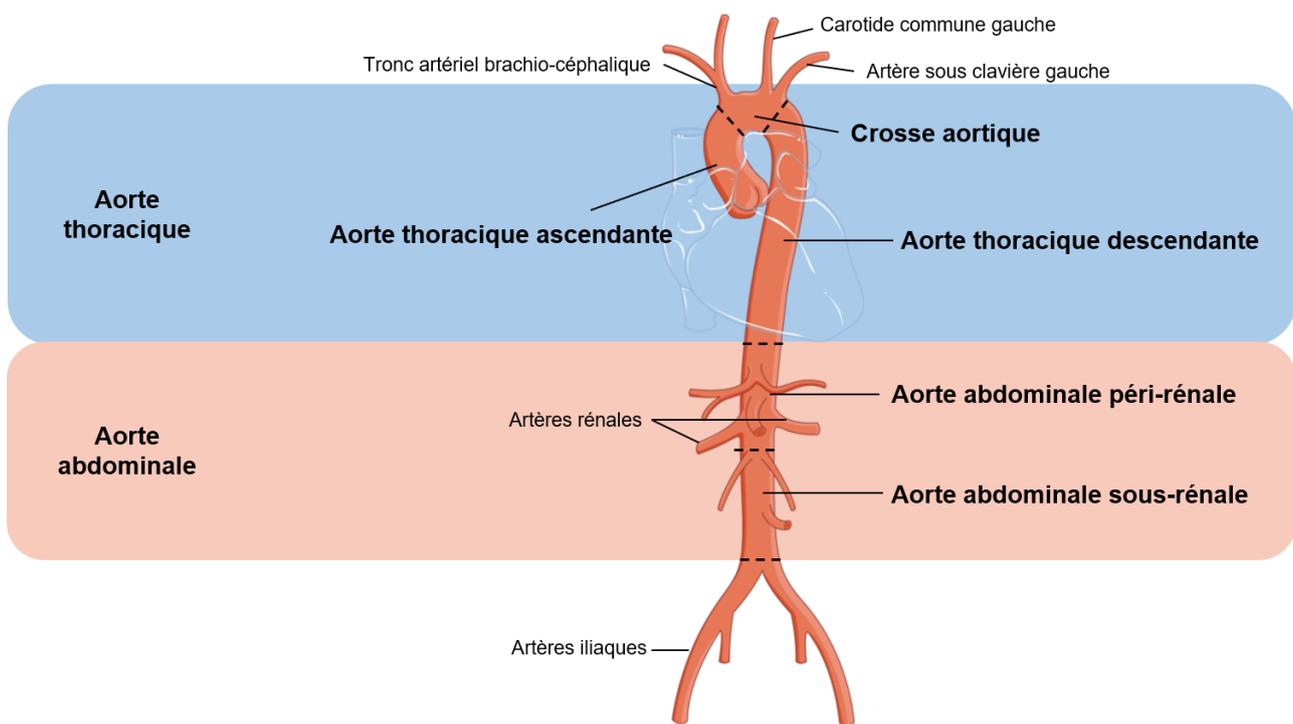
Ces observations macroscopiques ont donc été le point de départ de notre deuxième étude visant à comprendre le rôle de la dynamique mitochondriale dans l'anévrisme et la dissection aortique.

# Etude 2 : Place de la dynamique mitochondriale dans l'anévrisme et la dissection aortique

## 1. Introduction

### 1.1. Anatomie de l'aorte

L'aorte est la plus grosse et la plus longue artère du corps dont la principale fonction est de distribuer le sang riche en oxygène et en nutriments dans tout l'organisme. Directement connectée au ventricule gauche du cœur, elle donne naissance aux principales artères de la cage thoracique (artères coronaires, tronc brachio-céphalique, carotide gauche, brachiale gauche...) et abdominale (artères hépatique, mésentériques, rénales...), jusqu'à la partie inférieure de la cavité abdominale donnant naissance aux artères iliaques.



**Figure 23 : Représentation schématique des deux parties principales de l'aorte et de leurs sous-parties.**

Le diaphragme décrit une division naturelle de l'aorte en deux parties : thoracique et abdominale (**Figure 23**). De même, l'aorte thoracique est, elle-même, subdivisée en trois segments :

- Segment 1 : l'aorte thoracique ascendante (ATA) est directement située à la sortie de la valve aortique et se termine au départ du tronc artériel brachio-céphalique (TABC). Elle est, elle-même, divisée en deux : le sinus de Valsalva (d'où partent les deux coronaires) et l'ascendante elle-même (1 à 2 cm au-dessus des *ostia* coronariens)
- Segment 2 : la crosse aortique comprend la partie horizontale de l'aorte. Elle part du TABC, passe par la carotide commune gauche et se termine sous l'artère sous-clavière gauche.

- Segment 3 : l'aorte thoracique descendante qui chemine de l'artère sous-clavière gauche, exclue, jusqu'à l'origine aortique du diaphragme. Elle donne naissance aux artères bronchiques et intercostales.

L'aorte abdominale, quant à elle, est généralement considérée comme un seul et même bloc. Elle peut tout de même être scindée en deux segments :

- L'aorte abdominale péri-rénale : point de départ des principales artères abdominales.
- L'aorte abdominale sous-rénale : linéaire jusqu'aux iliaques, présentant peu de collatérales.

Ainsi, l'aorte thoracique permet l'irrigation des muscles et organes de la tête, du cou, des bras et du thorax comprenant principalement le cœur et le cerveau. L'aorte abdominale fait suite à l'aorte thoracique à partir du diaphragme, jusqu'aux artères iliaques et permet la vascularisation des organes abdominaux (reins, foie, rate, estomac, intestins...) ainsi que la partie inférieure du corps (jambes).

Comme décrit précédemment, la structure pariétale de l'aorte est composée de 3 couches : l'intima, la média et l'adventice. Etant donné que l'aorte est classée comme une artère de conductance, ou artère élastique, sa matrice extracellulaire est principalement composée de fibres élastiques. Cependant, cette artère étant la plus longue du corps, sa composition évolue à mesure que l'on s'éloigne du cœur. En effet, l'aorte thoracique ascendante (ATA) est le segment artériel comprenant la plus grande quantité d'élastine. Cette quantité diminue tout au long de l'aorte proportionnellement à l'augmentation de collagène.

## 1.2. Pathologies aortiques

L'aorte est constamment soumise à des contraintes hémodynamiques variables sur toute sa longueur, selon sa distance avec le cœur et de la présence, ou non, de collatérales. Ces facteurs ont un impact majeur sur les variations de pression ou de débit tout au long de l'aorte, donc sur les contraintes pariétales exercées sur la paroi aortique. Ainsi, les atteintes vont être variables tout au long de l'aorte.

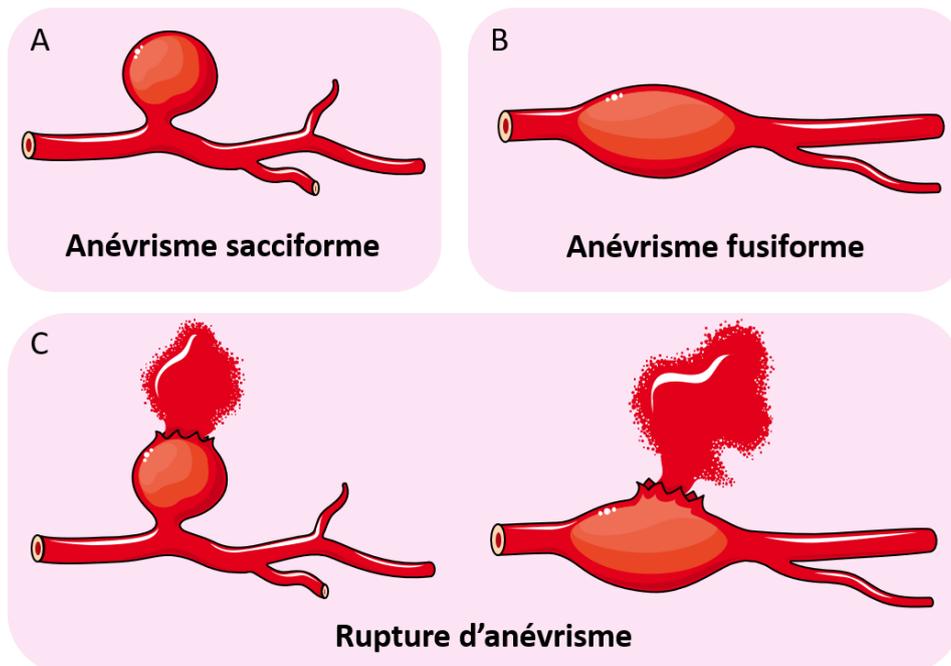
- L'ATA est sujette à la forte pression du sang éjecté par le cœur qui s'abat principalement sur sa partie externe (grande courbure). Elle est aussi la première touchée lors de dysfonctions valvulaires. La forte pression très localisée est responsable d'atteintes anévrismales non athéromateuses et de dissections aortiques.
- La crosse aortique est le siège de perturbations de flux importantes. En effet, la naissance de trois artères provoque la formation d'un flux non laminaire favorisant les dépôts lipidiques et, par conséquent, la formation de plaques d'athérome.
- Par effet de « ricochet », le sang pulsé du cœur provenant directement de l'ATA peut entraîner une fragilisation de la paroi aortique du haut de l'ATD à l'origine de grandes dissections aortiques.
- L'aorte abdominale, par la présence de nombreuses collatérales, présente de fortes perturbations hémodynamiques, en faisant le siège privilégié d'anévrismes de types athéromateux.

Ces différentes atteintes aortiques peuvent être associées aux facteurs de risque cardiovasculaires décrits dans la partie 1 comme le mode de vie, le sexe ou l'âge des patients. Néanmoins, les deux points les plus importants dans les pathologies aortiques, et principalement de type anévrismal, sont les facteurs génétiques (mutations génétiques) et l'hypertension artérielle.

### 1.3. L'anévrisme

L'anévrisme est défini comme une pathologie de la paroi artérielle responsable d'une dilatation permanente et localisée d'un vaisseau sanguin, d'au moins 50% de son diamètre initial (Ernst 1993) associée à une perte de parallélisme des parois de l'artère. Cette dilatation est liée à un remodelage de la paroi artérielle qui affecte les propriétés mécaniques de l'artère et peut mener, dans le pire des cas, au décès du patient par rupture du vaisseau. Par son caractère asymptomatique, un anévrisme est le plus souvent découvert de manière fortuite lors d'un examen médical ou lors de sa rupture. Il s'agit du stade le plus avancé de l'anévrisme qui peut entraîner la mort du patient s'il n'est pas pris en charge à temps et le risque de rupture augmente à mesure que le diamètre de l'anévrisme augmente.

Les anévrismes peuvent affecter tous les segments artériels et peuvent être classifiés en fonction de leur apparence macroscopique (**Figure 24**). Les anévrismes sacciformes forment une excroissance dans la paroi artérielle due à une fragilisation ponctuelle. Les anévrismes fusiformes, les plus communs, sont diffus et affectent toute la circonférence de l'artère.



**Figure 24 : Représentation schématique des différents types d'anévrisme.**

a) anévrisme sacciforme, b) anévrisme fusiforme, c) rupture d'anévrisme.

La majeure partie de la population associe l'anévrisme avec les accidents vasculaires cérébraux (AVC). En effet, les anévrismes intracrâniens, formés à partir de vaisseaux de petit calibre, sont responsables d'une partie des accidents vasculaires cérébraux, les AVC hémorragiques. Ils représentent environ 20% des cas mais ce sont les plus graves. Majoritairement de type sacciforme, les anévrismes cérébraux sont principalement retrouvés au niveau de bifurcations.

L'aorte peut également, être sujette à la pathologie anévrismale. Comme décrit précédemment, toutes les parties de l'aorte peuvent être plus ou moins propice à un remodelage anévrismal. La localisation la plus fréquente reste cependant l'aorte abdominale, avec plus de 60% des anévrismes artériels.

Les anévrismes, quelle que soit leur localisation, sont définis par des changements progressifs de la paroi artérielle en réponse à des modifications hémodynamiques conduisant à un amincissement de la média artérielle, avec la dégradation de la MEC et la perte des CML, augmentant la susceptibilité de rupture (J.-B. Michel et al. 2011).

### 1.3.1. L'anévrisme de l'aorte abdominale

#### a) Généralités

Lorsque la dilatation touche la partie abdominale de l'aorte, on parle d'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA). Il s'agit de la localisation la plus fréquente avec plus de 60% des anévrismes artériels (Ernst 1993). L'anévrisme de l'aorte abdominale a une prévalence de 4 à 8% pour les hommes de plus de 65 ans et augmente avec l'âge. Il existe une forte prédominance masculine, qui tend à s'estomper avec l'âge et le tabagisme. Le risque de rupture est directement corrélé au diamètre de l'anévrisme et à sa vitesse de croissance (Brewster et al. 2003; Brady et al. 2004). Ainsi, le risque de rupture augmente avec l'âge et la gravité des lésions. Même si, jusqu'à la ménopause, les femmes semblent être moins touchées que les hommes, il a cependant été prouvé que les atteintes étaient plus graves chez les femmes. De fait, le risque de rupture est quatre fois plus important chez les femmes par rapport aux hommes pour des anévrismes de même taille (Murali Krishna et al. 2020). En effet, l'œstrogène est impliqué dans la diminution du ratio collagène/élastine dans la paroi aortique, à l'origine de la fragilisation pariétale et donc de la rupture d'anévrisme (Norman et Powell 2007).

Du fait de son caractère asymptomatique, l'AAA est principalement découvert de manière fortuite lors d'examen annexes ou trop tard, lors de la rupture du vaisseau.

L'aorte abdominale reste, à ce jour, la partie de l'aorte la plus touchée par les atteintes anévrismales étant donné sa composition moins élastique et des facteurs hémodynamiques. Elle constitue en effet, le point de départ de nombreuses artères permettant l'irrigation de la partie inférieure du corps, créant de nombreuses perturbations de débit et de pression. L'AAA est une forme particulière d'évolution d'athérome caractérisé par la présence d'un thrombus intraluminal, d'une fragmentation de l'élastine, de l'apoptose des CML, de l'augmentation du stress oxydant dans la paroi aortique et une infiltration de cellules immunitaires par l'adventice.

#### b) Athéromatose et hémodynamique

##### • Athérosclérose et athéromatose

Selon l'OMS, « l'athérosclérose est une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre ». Il s'agit d'une pathologie diffuse et évolutive à l'origine de nombreuses complications vasculaires comme l'infarctus du myocarde ou les AVC ischémiques, qui se caractérisent par une réaction immunitaire chronique induisant la formation d'une plaque lipidique néo-intimale (Weber et Noels 2011).

La pathologie athéromateuse débute par une accumulation de lipoprotéines de basse densité (LDL-cholestérol) dans la circulation sanguine qui, par un phénomène passif, va entraîner l'accumulation de ces derniers dans l'intima artérielle. Suite à cette infiltration lipidique, les LDL subissent une oxydation (Jessup, Kritharides, et

Stocker 2004; Stocker et Keane 2004). Les LDL-oxydés pouvant alors générer des dérivés réactifs capables d'induire des modifications de certains lipides (Stocker et Keane 2004). Il est généralement admis que les lipoprotéines modifiées sont impliquées dans la genèse de la dysfonction endothéliale et dans la formation et la progression des lésions d'athérosclérose (Baynes et Thorpe 2000).

La deuxième phase implique les cellules immunitaires. Une accumulation néo-intimale de LDL provoque l'augmentation d'expression de molécules d'adhérences (VCAM-1 et ICAM-1) à la surface de l'endothélium (Lusis 2000), permettant alors l'adhésion des monocytes circulants à la surface de celui-ci (Libby 2002). Une fois adhérents, les monocytes sont capables de traverser la monocouche de cellules endothéliales et de se différencier en macrophages sous l'influence de MCP-1 (« monocyte chemoattractant protein 1 ») et M-CSF (« macrophage colony-stimulating factor »). Les macrophages présents dans l'espace sous-endothélial se transforment alors en cellules spumeuses en captant les LDL-oxydés *via* leurs récepteurs « Scavenger ». Ceux-ci vont alors entraîner une réaction inflammatoire chronique impliquée dans la croissance et l'entretien de la plaque (Lusis 2000; Libby 2002). L'ensemble des lipides infiltrés dans la paroi s'associe ensuite pour former un cœur lipidique entouré d'une chape fibreuse composée de CML dédifférenciées, possédant un phénotype sécrétoire, et de protéines de la MEC.

Dans le cas de l'AAA, on parle principalement d'athéromatose pouvant contribuer à la formation du thrombus intra-luminal (ILT), notion développée ultérieurement. Tout comme l'athérosclérose, l'athéromatose est définie comme une maladie générale des artères, diffuse et évolutive, à l'origine de la plupart des accidents cardiovasculaires graves, résultant de l'association de deux phénomènes : l'athérosclérose et la thrombose. La relation entre le dépôt de plaques lipidiques dans l'athérosclérose et le développement anévrisimal dans l'aorte abdominale a été établie par l'équipe du docteur Glagov (Xu, Zarins, et Glagov 2001). Cette étude prouve que dans l'AAA le dépôt de plaques lipidiques est associé à une dilatation locale avec un amincissement de la paroi et une dégradation des fibres élastiques.

Les pathologies athéromatoseuses sont spécifiques des artères possédant un terrain athéromateux, comme les zones de bifurcations que l'on retrouve au niveau de l'aorte abdominale.

- **Hémodynamique**

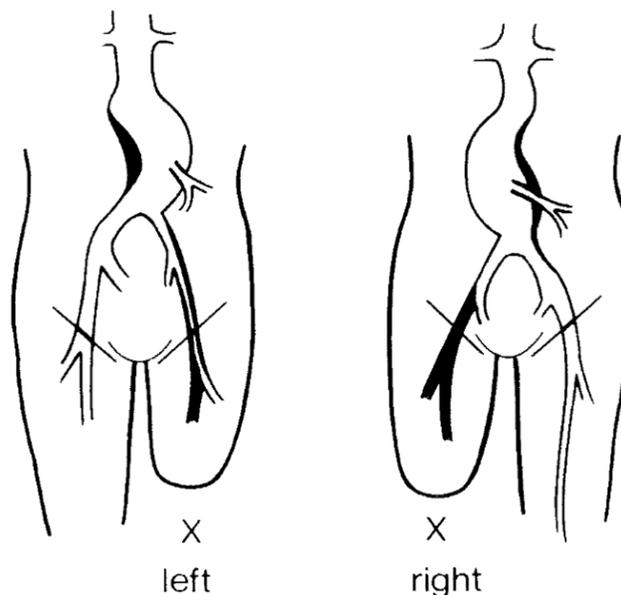
L'aorte abdominale est une localisation préférentielle de dilatations athéromatoseuses spécifiquement par les conditions hémodynamiques associées aux nombreuses bifurcations créées par toutes les artères irrigant l'abdomen et les membres inférieurs.

Il existe un important gradient de pression entre la lumière soumise à la pression artérielle systolo-diastolique (120-80 mmHg) et l'adventice ayant une pression interstitielle très faible (10-30 mmHg). Ceci explique le phénomène de convection radiale des éléments plasmatiques à travers la paroi artérielle ainsi que les lésions médiales en résultant. Ainsi, les éléments sanguins circulants vont pénétrer dans la paroi aortique vers les couches les plus externes et induire la destruction de la MEC et des CML. L'intensité et l'importance de cette pénétration vont dépendre de plusieurs facteurs hémodynamiques comme le stress biomécanique, la réflexion de l'onde de pression et de flux sur la bifurcation aortique et la porosité de la paroi aortique. Cette convection radiale est

d'autant plus importante dans les AAA du fait de la forte porosité de l'ILT (Adolph et al. 1997), la perte d'endothélium, la dégradation de la MEC, les perturbations de flux (J. B. Michel et al. 2011).

Aux bifurcations aortiques irrigant l'abdomen, vient s'ajouter la bifurcation aorto-iliaque créant des modifications hémodynamiques importantes, prédisposant l'aorte abdominale à la dilatation athérotrombotique. Une étude de Vollmar et ses collaborateurs (Vollmar et al. 1989) menée sur des patients présentant une amputation au-dessus du genou, a mis en évidence un développement anévrismal sur le côté opposé de la jambe non amputée (**Figure 25**). A l'inverse de la jambe amputée, pour laquelle l'iliaque se trouve thrombosée, la jambe « saine » présente de nombreuses bifurcations, prouvant alors que les ondes de réflexion sur les bifurcations peuvent jouer un rôle important dans le développement et la latéralisation des AAA.

Tous ces éléments mettent en évidence le rôle majeur des facteurs hémodynamiques dans la survenue et le développement de l'AAA.



**Figure 25 : Formation d'anévrisme après amputation au-dessus du genou.** (Vollmar et al. 1989)

Enfin, si l'aorte thoracique est une zone à haute pression dans laquelle la convection radiale contribue à la dilatation aortique, l'aorte abdominale est une grande zone de perturbation de flux favorisant la formation d'un thrombus intraluminal susceptible de s'étendre et de provoquer la rupture aortique.

### c) Rôle du thrombus intraluminal

En temps normal, une lésion vasculaire est à l'origine de la mise en place de l'hémostase qui empêche le saignement grâce à la coagulation, tout en limitant ce phénomène pour empêcher l'occlusion du vaisseau. L'hémostase fait intervenir de nombreux acteurs dont la fibrine, formée grâce à la thrombine, qui est le point final de la coagulation. En condition physiologique, elle est contrebalancée par un mécanisme de fibrinolyse indispensable à la dissolution du caillot fibrinoplaquettaire, afin d'empêcher l'obstruction du vaisseau (Longstaff et Kolev 2015). Une production inappropriée et une activité excessive de la thrombine sont les fondements de la formation de caillots de fibrine dans la lumière artérielle responsable d'évènements thromboemboliques et

ischémiques. L'une des caractéristiques de l'AAA est justement la formation de fibrine appelée thrombus intraluminal.

En effet, l'altération du milieu hémodynamique de l'aorte entraîne une stagnation et la collision des éléments figurés du sang, contribuant à la formation d'un thrombus intraluminal (ILT) qui est retrouvé dans 75% des AAA (Harter et al. 1982). Il s'agit d'un néo-tissu biologiquement actif et dynamique, stratifié, constitué de différentes couches de fibrine se formant au niveau intimal, à l'interface avec le sang (Fontaine et al. 2002; Touat et al. 2006; J. B. Michel et al. 2011). Il est principalement constitué d'hématies et de plaquettes favorisant la rétention et l'activation du plasminogène (Fontaine et al. 2002; Xavier Houard et al. 2009). Ce dernier permet la formation de couches successives de fibrine qui peut jouer un rôle de soutien de la paroi aortique amincie et dégénérée. En effet, il a été prouvé que la présence d'un ILT est corrélée à une épaisseur de la paroi aortique diminuée (Kazi et al. 2003).

Du fait de sa taille et de sa composition, l'ILT forme un terrain hostile au développement de cellules vasculaires (Fontaine et al. 2004) et à l'initiation et la propagation de la réponse inflammatoire (Kazi et al. 2003; J.-B. Michel et al. 2007b). En effet, des études ont mis en avant la production accrue de protéases contribuant non seulement à la dégradation de la MEC mais aussi des protéines d'adhésion provoquant le détachement des cellules par anoïkis (Fontaine et al. 2002; Meilhac et al. 2003; J.-B. Michel et al. 2011). Cet environnement protéolytique est favorisé par un recrutement immunitaire important dans l'ILT (Kazi et al. 2003; X. Houard et al. 2007; J.-B. Michel et al. 2007b) qui sera décrit ultérieurement.

#### **d) Remodelage de la paroi aortique**

- **Dégradation de la matrice extra-cellulaire**

La dégradation de la MEC est considérée comme le facteur le plus important dans le développement de l'AAA. L'un des éléments principaux est la fragmentation et la diminution de la quantité des lamelles élastiques. L'élastine représente plus de 40% de la paroi aortique, contre 8% de celle d'une aorte anévrismale (Campa, Greenhalgh, et Powell 1987; Carmo et al. 2002). On retrouve en effet, une diminution, une désorganisation et une fragmentation du nombre de lamelles élastiques mais aussi du nombre de fibres d'élastine par lame. En parallèle, la quantité de collagène se trouve généralement augmentée dans l'aorte anévrismale (He et Roach 1994; Minion et al. 1994; Carmo et al. 2002). De nombreuses études montrent, en plus de l'augmentation du collagène, une accélération de son renouvellement (Menashi et al. 1987; Baxter et al. 1994; Minion et al. 1994).

Les variations d'élastine et de collagène de la paroi sont principalement quantifiées *via* le rapport élastine/collagène. Au vu de la diminution d'élastine par rapport au collagène, ce ratio se trouve diminué dans l'AAA. Il arrive que la quantité d'élastine soit augmentée (Baxter et al. 1994; Minion et al. 1994) ou que le collagène soit inchangé (Dubick et al. 1988). Dans les deux cas, il y a toujours un effet de dilution de la quantité d'élastine par rapport au collagène réduisant toujours le ratio élastine/collagène. Celui-ci est d'autant plus diminué à mesure de l'évolution de l'AAA. En effet il a été prouvé que les anévrismes de petite taille (moins de 5 cm de diamètre) présentent principalement une diminution de la quantité d'élastine. A l'inverse, lors d'anévrismes de plus grand diamètre, nous retrouvons une augmentation progressive du collagène qui induit un effet de dilution de l'élastine dans la masse augmentée de collagène (Sakalihan et al. 1993).

Ainsi, l'AAA est principalement défini par la protéolyse de l'élastine qui favorise le développement anévrismal. Si le collagène est principalement augmenté dans l'AAA, il subit également, une dégradation protéolytique (Abdul-Hussien et al. 2007) qui est principalement impliquée dans le risque de rupture. En effet, l'activité collagénase dans la paroi anévrismale se trouve augmentée dans les anévrismes rompus (Menashi et al. 1987), et une faible quantité de collagène est associée au risque de rupture (Abdul-Hussien et al. 2007; Klink et al. 2011).

De nombreuses protéases ont été impliquées dans le développement de l'AAA telles que les ADAM (« A Disintegrin and Metalloprotease ») (Folkesson et al. 2015; Kawai et al. 2017), les cathepsines (Sun et al. 2011; 2012; Y. Qin et al. 2012) ou encore certains composants du système fibrinolytique (E. Allaire, Hasenstab, et al. 1998; X. Houard et al. 2007). Les sérines protéases ont aussi un rôle important dans le développement anévrismal (Chamberlain et al. 2010) en dégradant la MEC, directement ou indirectement, en passant par les protéines d'adhésion induisant, par la même occasion, le détachement des CML par anoïkis (Meilhac et al. 2003). Mais les MMP restent, à ce jour, les acteurs majeurs de la protéolyse matricielle. Plusieurs études ont démontré une augmentation de l'expression de MMP dans l'AAA aussi bien chez l'Homme que dans des modèles expérimentaux (Annabi et al. 2002; Abdul-Hussien et al. 2007). Il a été démontré que l'inhibition de l'activité des MMP par l'administration de doxycycline limite la dégradation de la média et réduit l'incidence de l'AAA (Prall et al. 2002). Ce sont les gélatinases (MMP-2 et MMP-9) qui jouent le rôle le plus important dans la dégradation matricielle des aortes anévrismales (Sakalihasan et al. 1996; Wassef et al. 2001; Annabi et al. 2002; Longo et al. 2002).

MMP-2, principalement produite par les CML vasculaires et les macrophages infiltrant la paroi, se trouve largement augmentées dans l'AAA. Sa concentration semble augmenter à mesure de la croissance de l'AAA (Freestone et al. 1995; Crowther et al. 2000), suggérant le rôle de MMP-2 dans l'expansion anévrismale. Il a été mis en évidence que la déficience génétique de MMP-2 inhibe le développement d'AAA (Longo et al. 2002). L'activation des MMP-2 semble également augmentée dans l'AAA. En effet, MT1-MMP, qui joue un rôle important dans son activation, est surexprimé dans l'AAA chez l'Homme (Nollendorfs et al. 2001). La déficience en MT1-MMP réduit drastiquement l'incidence de la dilatation anévrismale dans un modèle expérimental d'AAA, qui est restauré par le transfert de macrophages compétents (Xiong, Knispel, et al. 2009).

En parallèle, de nombreuses études ont démontré que MMP-9 est la métalloprotéinase majoritaire dans l'AAA. Son expression et son activité sont largement augmentées dans l'AAA tant au niveau tissulaire que plasmatique (Sakalihasan et al. 1996; Patel et al. 1996; Hovsepian et al. 2000; Vasic et al. 2017). La dégénérescence de l'AAA chez l'animal se trouve inhibée par l'inactivation du gène codant pour MMP-9 (Pyo et al. 2000) et l'inhibition de la voie de signalisation MMP-9 permet de prévenir le développement de l'AAA (F. Yao et al. 2019). De plus, l'expression de MMP-9 se trouve plus importante dans les anévrismes rompus, mettant alors en avant son rôle dans l'évolution de l'AAA vers la rupture (Petersen, Wågberg, et Angquist 2002). Comme pour MMP-2, les CML mais aussi les macrophages ont une part importante dans la production des MMP-9 (Thompson et al. 1995). En effet, le transfert de moelle osseuse déficiente en MMP-9 dans une souris sauvage met en avant l'effet protecteur révélé lors de la déficience en MMP-9. *A contrario*, la transplantation de cellules de moelle osseuse exprimant correctement MMP-9 chez une souris déficiente en MMP-9 altère cette protection (Pyo et al. 2000). De même, la transplantation de macrophages péritonéaux compétents chez des souris déficientes en MMP-9 abolit la protection

contre le développement anévrisimal, confirmant la place cruciale des macrophages dans la dégradation de la MEC par les MMP-9 (Longo et al. 2002).

L'élastase macrophagique (MMP-12) prend aussi une part dans la protéolyse de l'élastine pariétale (Shiple et al. 1996). Une expression de MMP-12 dans la partie active de dégradation de l'élastine de l'AAA a été démontrée (J. A. Curci et al. 1998). En revanche, des résultats contradictoires ont été mis en avant quant à son implication dans le développement anévrisimal dans différents modèles murins d'AAA (Pyo et al. 2000; Longo et al. 2005). Enfin, des études ont rapporté l'importance d'autres MMP dans la dégradation du collagène adventiciel dans l'AAA qui se trouvent augmentées dans les aortes anévrismales comme les MMP-1 (Irizarry et al. 1993; Tamarina et al. 1997), MMP-3 (Carrell et al. 2002) et MMP-13 (Mao et al. 1999)..

Cette protéolyse matricielle est partiellement limitée par les antiprotéases comme les TIMP (K. Nishimura et al. 2003), sécrétées en tout ou partie par les CML et les macrophages au sein du tissu anévrisimal. La modification de la balance entre les MMP et leurs inhibiteurs, les TIMP, joue un rôle important dans le développement de l'AAA en créant un déséquilibre entre l'activité des MMP et des TIMP (Knox et al. 1997). En effet, l'inflammation accrue de la paroi anévrismale entraîne une forte augmentation de la quantité des MMP et un dérèglement de la balance MMP/TIMP potentialisant alors la dégradation de la MEC et la mort des CML, empêchant le renouvellement de la MEC.

De nombreuses études ont cherché à comprendre les variations et le rôle de TIMP-1 et TIMP-2 au cours du développement de l'AAA (Tamarina et al. 1997; Elmore et al. 1998). Les études montrent des résultats variables mais, dans l'ensemble, les expressions de TIMP-1 et TIMP-2 sont principalement augmentées ou inchangées (McMillan, Patterson, Keen, et Pearce 1995; McMillan, Patterson, Keen, Shively, et al. 1995). L'important est le ratio MMP/TIMP qui se trouve augmenté dans l'AAA suggérant que l'augmentation des MMP prend le dessus sur celle des TIMP (Tamarina et al. 1997; Elmore et al. 1998). Quelles que soit les variations d'expression des TIMP dans le tissu anévrisimal, leur rôle protecteur dans le développement de la pathologie a largement été mis en avant. En effet, il est acquis que la déficience de TIMP-1 provoque l'aggravation de la dilatation anévrismale dans un modèle d'AAA (Eskandari et al. 2005). En outre, la surexpression locale de TIMP-1 provoque la diminution de MMP-2 et MMP-9 diminuant ainsi la dilatation anévrismale en restaurant la balance MMP/TIMP (E. Allaire, Forough, et al. 1998). Enfin, l'inhibition de TIMP-2 provoque l'accroissement anévrisimal dans un modèle murin d'AAA (Xiong et al. 2006).

- **Apoptose des CML**

En plus de l'impact majeur de la protéolyse matricielle, la diminution drastique de la densité de CML participe activement à l'amincissement de la média dans l'AAA.

Dans la paroi anévrismale, les CML subissent ce qu'on appelle un « switch phénotypique » durant lequel elles évoluent d'un phénotype contractile différencié vers un phénotype sécrétoire dédifférencié. Ce switch (Lacolley et al. 2012) est associé à des modifications structurelles et fonctionnelles des CML. On y retrouve alors une répression de l'expression des gènes codant pour les protéines contractiles. En effet, des articles ont démontré une diminution significative de l'expression génique de l' $\alpha$ -SMA et de *Sm22- $\alpha$*  dans différents modèles d'AAA, en

partie due à la méthylation de leur promoteur (Ailawadi et al. 2009; Zhong et al. 2019). Il a été prouvé que l'inhibition de SM22- $\alpha$  est associée à une augmentation de la production de ROS et à une aggravation de la pathologie anévrismale. *A contrario*, la surexpression de SM22- $\alpha$  protège la paroi aortique contre le développement de l'AAA (Zhong et al. 2019). En parallèle de cette répression des gènes contractiles, ce switch phénotypique des CML est associé à une augmentation significative de la sécrétion de MMP-2 et MMP-9 par les CML (Airhart et al. 2014). Elles jouent donc un rôle important de soutien des cellules inflammatoires dans la sécrétion de MMP et donc dans la dégradation de la MEC. En effet, l'inhibition du switch phénotypique des CML limite l'expansion de l'AAA (X. Qin et al. 2019; Lai et al. 2020).

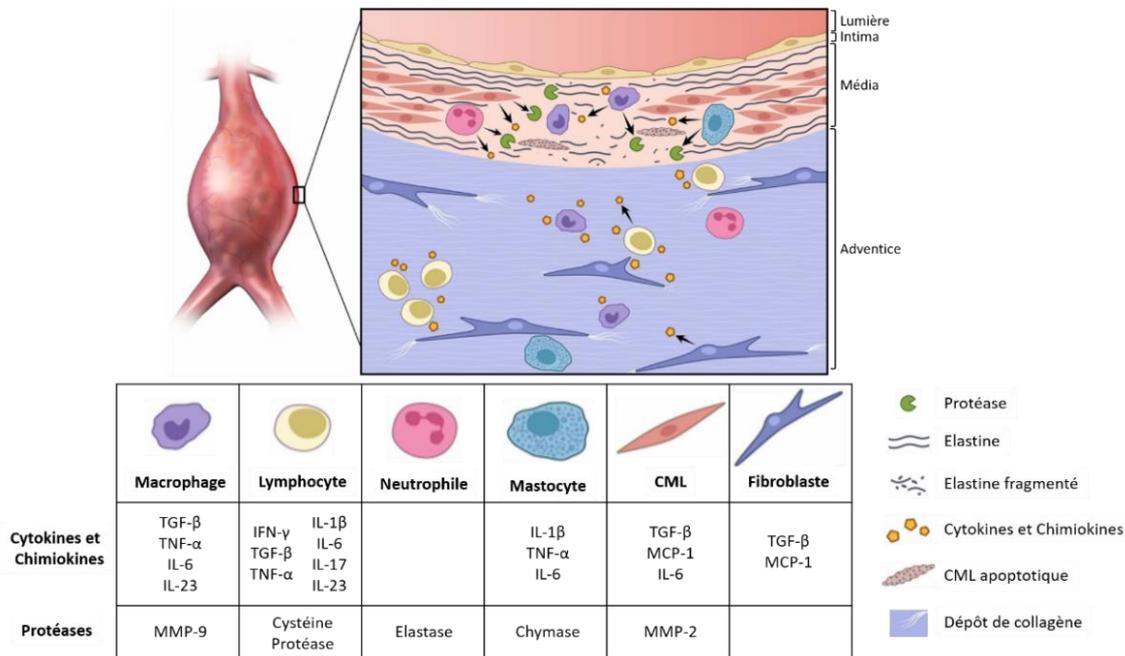
Cette diminution des marqueurs spécifiques des CML est associée à une augmentation de leur apoptose. L'environnement proche des CML a un impact majeur sur leur phénotype. En effet, la dégradation de la MEC et la diminution du contact entre les CML et la MEC peuvent induire le détachement des CML et leur mort par anoïkis (Meilhac et al. 2003). De plus, les cytokines et facteurs de croissance produits par les cellules inflammatoires environnantes, ou encore les différents stress mécaniques ou les ROS influencent le phénotype des CML. En effet, la présence de fibronectine ou encore de collagène I favorise le switch phénotypique des CML vers un phénotype sécrétoire (Hedin et al. 1988). Une étude *in vitro* a mis en évidence que l'action combinée de plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , l'IFN- $\gamma$ , et l'IL-1 $\beta$  provoque l'apoptose des CML de rat (Geng et al. 1996). Ceci provoque un cercle d'amplification car cette apoptose précoce des CML augmente la réponse inflammatoire et donc le développement anévrismal. En effet, l'inhibition de l'apoptose cellulaire provoque la diminution de l'infiltration macrophagique, la dégradation de la MEC et par conséquent le développement de l'AAA dans un modèle expérimental d'AAA (Yamanouchi et al. 2010).

Les CML ayant une part très importante dans la production des composants de la MEC, leur apoptose a un impact majeur sur le développement de l'AAA. La restauration de la quantité de CML dans un modèle d'AAA diminue la dégradation de la MEC, l'infiltration des cellules inflammatoires et donc le développement anévrismal (Eric Allaire et al. 2002).

## e) L'inflammation

En plus des modifications hémodynamiques, de la dégradation de la MEC et de l'apoptose des CML, l'anévrisme de l'aorte abdominale est défini par une forte réponse immunitaire adventitielle, site privilégié de la réponse immune adaptative de la paroi artérielle (**Figure 26**).

L'infiltrat inflammatoire chronique est une des caractéristiques principales de l'AAA (Koch et al. 1990), donnant ainsi sa définition de pathologie inflammatoire chronique de la paroi vasculaire. Une grande partie de cet infiltrat est retrouvé dans l'adventice de l'aorte anévrismale (Freestone et al. 1995) grâce aux *vasa vasorum*. La progression de l'AAA implique l'immunité innée et adaptative. Des études ont en effet mis en avant la présence de cellules de l'immunité innée (monocytes, macrophages, mastocytes, cellules dendritiques, Natural Killers et neutrophiles), de l'immunité adaptative (lymphocytes T et B) et de nombreuses cytokines dans l'AAA (Koch et al. 1990), associées à une augmentation de l'expression de leurs gènes (Lenk et al. 2007; Biros et al. 2015). L'inhibition de l'infiltration leucocytaire *via* l'administration d'anticorps anti-CD18 réduit le développement anévrismal dans un modèle d'AAA chez le rat (Ricci et al. 1996).



**Figure 26 : Représentation schématique des mécanismes associés à la physiopathologie de l'anévrisme de l'aorte abdominale.** Adapté de (Davis, Rateri, et Daugherty 2014)

- **Les cellules immunitaires**

Parmi les différents types de leucocytes retrouvés dans l'infiltrat inflammatoire de l'AAA, les macrophages se trouvent en plus grand nombre et sont retrouvés dans la média et l'adventice, notamment lors de l'initiation de la pathologie (Koch et al. 1990; Saraff et al. 2003; Boytard et al. 2013). Cette accumulation de macrophages a été mise en évidence dans différents modèles expérimentaux d'AAA (Anidjar et al. 1990; Freestone et al. 1997; Saraff et al. 2003; Rateri et al. 2011). Des études ont prouvé qu'au-delà des macrophages seuls, différents acteurs de la différenciation des monocytes en macrophages, de leur recrutement ou de la signalisation des macrophages sont modulés dans l'AAA. Il a été mis en évidence qu'une déficience de CCR2 (« C-C chemokine receptor type 2 ») dans différents modèles expérimentaux d'AAA réduit le développement anévrisimal (M. Ishibashi et al. 2004; MacTaggart et al. 2007; Daugherty et al. 2010). De la même manière, une déficience de MyD88 (« Myeloid differentiation factor 88 ») dans les macrophages provoque une diminution de l'AAA dans un modèle murin de perfusion d'AngII (Owens et al. 2011).

Des expérimentations ont aussi révélé la présence de neutrophiles dans l'AAA (Cohen et al. 1991), principalement sur la face luminale du thrombus (Xavier Houard et al. 2009). Il a été prouvé que la déplétion en neutrophiles réduit la formation anévrismale (Eliason et al. 2005). De même, l'inhibition de la L-sélectine, impliquée dans le recrutement des neutrophiles, diminue le développement anévrisimal dans un modèle murin d'AAA (Hannawa et al. 2005).

Les mastocytes, connus pour produire de nombreuses protéases et facteurs inflammatoires, sont aussi représentés dans la réaction inflammatoire de l'AAA (Swedenborg, Mäyränpää, et Kovanen 2011). Leur inhibition permet, là encore, de prévenir le développement de l'AAA dans des modèles expérimentaux d'AAA (Sun et al. 2007; Tsuruda et al. 2008).

Plusieurs études ont aussi révélé la présence de cellules Natural Killers (NK) dans la paroi aortique anévrismale (Chan et al. 2005). Cette augmentation de la quantité de NK a principalement été relevée dans la circulation sanguine de patients présentant un AAA (Forester et al. 2006). Mais le rôle de ces cellules dans le développement anévrisimal n'est pas encore déterminé.

L'analyse de tissus aortiques anévrismaux de patients révèle une surexpression de lymphocytes T et B (Saraff et al. 2003). Chez l'Homme, les lymphocytes T, principalement les CD4+, sont les plus représentés dans les phases avancées de la pathologie (Koch et al. 1990). Cet infiltrat lymphocytaire a aussi été mis en avant dans des modèles expérimentaux d'AAA (Saraff et al. 2003; John A. Curci et Thompson 2004), confirmant l'importance de ces cellules dans le développement anévrisimal. L'implication des lymphocytes T dans le développement anévrisimal est encore controversée. En effet, une cohorte de patients présentant un AAA a démontré une déficience fonctionnelle des lymphocytes T régulateurs CD4+ et CD25+ (Yin et al. 2010, 25). Mais l'inhibition totale des lymphocytes semble n'avoir aucun impact sur la formation anévrismale sur un modèle murin d'AAA (Uchida et al. 2010). Il semblerait cependant que les différents sous-types de lymphocytes T CD4+ jouent des rôles différents dans le développement anévrisimal. Il est acquis que les lymphocytes T CD4+ peuvent évoluer vers différents types cellulaires dont les principaux sont les lymphocytes T helper (Th1, Th2 et Th17) et les lymphocytes T régulateurs (Treg) présentant chacun des profils cytokiniques différents. Il semblerait que la déstabilisation de la balance entre lymphocytes T helper de type 1 et 2 joue un rôle dans le développement anévrisimal (Shimizu et al. 2004). En effet, le profil cytokinique du tissu anévrisimal semblerait orienté vers le type Th2, et un blocage de la signalisation Th1 au profit des Th2 favoriserait la survenue d'évènements anévrismaux (Shimizu et al. 2004), mais ces observations restent encore controversées (Xiong et al. 2004; Galle et al. 2005). Quant aux lymphocytes Th17, ils sont responsables de la production d'IL-17 et d'IL-23, décrits ultérieurement.

En parallèle, on retrouve une diminution du nombre de lymphocytes Treg dans la paroi anévrismale avec une capacité immunosuppressive altérée (Yin et al. 2010; Y. Zhou et al. 2015). Ces derniers ont un rôle protecteur dans le développement anévrisimal (M. X et al. 2014), notamment par la production d'IL-10 et de TGF- $\beta$ . En effet, la déficience d'IL-10 inhibe l'effet protecteur des Treg (Ait-Oufella et al. 2013). Le rôle du TGF- $\beta$  sera développé ultérieurement.

Les lymphocytes B ont aussi été retrouvés dans l'infiltrat inflammatoire de l'AAA chez l'Homme ainsi que dans des modèles expérimentaux d'AAA (Ocana et al. 2003; Furusho et al. 2018). Leur rôle dans le développement de l'AAA reste cependant encore controversé (Meher et al. 2014; Schaheen et al. 2016; Furusho et al. 2018).

- **Les cytokines**

Les cytokines sont des molécules de signalisation indispensables aux communications intercellulaires, à la réponse inflammatoire et au recrutement leucocytaire. Ce sont aussi des actrices majeures du développement anévrisimal. En effet, un nombre important d'études a révélé une augmentation des taux plasmatiques et tissulaires de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6 (Juvonen et al. 1997; Middleton et al. 2007; Golledge et al. 2009).

Le TNF- $\alpha$  (« tumor necrosis factor »), qui a un rôle important dans la production de MMP-2 et MMP-9, se trouve augmenté dans le plasma de patients présentant un AAA (Juvonen et al. 1997; Golledge et al. 2009) ainsi que dans les tissus anévrismaux de patients (Satoh et al. 2004; Kaneko et al. 2011). Il a été rapporté qu'une inhibition pharmacologique du TNF- $\alpha$  limite le développement de l'AAA (Xiong, MacTaggart, et al. 2009). On observe aussi une augmentation des enzymes régulatrices du TNF- $\alpha$  comme le TACE (« TNF- $\alpha$ -converting enzyme ») (Satoh et al. 2004). L'inhibition du TNF- $\alpha$  ou du TACE diminue le développement anévrisimal dans un modèle expérimental d'AAA (Xiong, MacTaggart, et al. 2009; Kaneko et al. 2011). En revanche, la déficience génétique du récepteur p55 TNF (p55 TNFR), l'un des récepteurs les plus importants dans la réponse inflammatoire régulée par le TNF- $\alpha$ , ne semble produire aucun effet sur le développement anévrisimal (Xanthoulea et al. 2009).

La deuxième cytokine ayant un rôle important dans la réponse inflammatoire de l'AAA est le TGF- $\beta$  (« transforming growth factor »). A l'inverse du TNF- $\alpha$ , le TGF- $\beta$  joue un rôle protecteur dans l'AAA par l'inhibition de l'activité des MMP et la stimulation de la production de collagène par les cellules vasculaires (Amento et al. 1991; Xie, Dong, et Fidler 1994; Roberts et al. 1986). Il a été démontré qu'une inhibition du TGF- $\beta$  induisait l'aggravation de la pathologie anévrismale vers la rupture (Lareyre et al. 2017). De plus, le blocage systémique du TGF- $\beta$  provoque l'augmentation de l'apoptose des CML et la fragmentation de l'élastine, augmentant alors le risque de rupture dans différents modèles murins d'AAA (Y. Wang et al. 2010; Lareyre et al. 2017). A l'inverse, la surexpression de TGF- $\beta$  permet une stabilisation de l'AAA préexistant (Dai et al. 2005).

Enfin, les interleukines (IL) sont également d'importants régulateurs de l'inflammation dans l'AAA. Ici encore, de nombreuses études ont montré une augmentation plasmatique et tissulaire de nombreuses interleukines comme l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'IL-17 (Juvonen et al. 1997; Middleton et al. 2007; Golledge et al. 2009).

L'IL-1 $\beta$ , principalement produite par les macrophages, se trouve augmentée dans l'AAA (Middleton et al. 2007). Tout comme l'IL-10, l'IL-1 $\beta$  semble avoir un rôle protecteur dans l'AAA. En effet, le blocage précoce de l'IL-1 $\beta$  prévient le développement anévrisimal dans un modèle expérimental d'AAA (Lareyre et al. 2017). En revanche, son effet dans la progression de la pathologie vers la rupture est assez controversé car son inhibition, lorsque la pathologie est déjà installée, ne semble pas freiner sa progression (Lareyre et al. 2017).

L'IL-6, produite par les macrophages, les lymphocytes T et les cellules vasculaires, se trouve aussi augmentée dans l'AAA (Middleton et al. 2007; Pope et al. 2015). En revanche, son rôle dans le développement de la pathologie est encore mal connu. Dans un modèle murin d'AAA, la délétion de l'IL-6 n'a pas d'effet sur le développement de l'AAA (Pope et al. 2015). En revanche, la diminution de l'activité du récepteur à l'IL-6 (IL-6R) semblerait être associée à une augmentation du risque de survenue d'AAA (Harrison et al. 2013), mais d'autres études ont rapporté qu'une inhibition pharmacologique de l'IL-6R aurait peu d'effet sur le développement de l'AAA (M et al. 2017).

Enfin, le rôle de l'IL-17 a également été étudié mais son rôle reste encore controversé. En effet, plusieurs études ont mis en évidence une réduction de la réponse inflammatoire et donc une diminution du développement anévrisimal dans des modèles expérimentaux d'AAA (Sharma et al. 2012; Wei et al. 2014). En revanche, une autre étude a prouvé qu'une diminution de la production d'IL-17 jouerait plutôt un rôle dans le développement de l'AAA (Romain et al. 2013). Il est donc difficile de définir avec précision le rôle de l'IL-17 dans le développement anévrisimal.

## f) Le stress oxydant

Une augmentation du stress oxydant a largement été mis en avant dans l'AAA chez l'Homme (Miller et al. 2002) et serait associé à l'état clinique des patients et au risque de mortalité (P. J et al. 2012). Cette augmentation a aussi été mise en avant dans des modèles expérimentaux d'AAA (Griendling et al. 1994; Yajima et al. 2002; Thomas et al. 2006). En effet, plusieurs sous-unités de la NADPH oxydase se trouvent augmentées dans les modèles expérimentaux d'AAA (Griendling et al. 1994; W. Yu et al. 2020) et la délétion de p47phox atténue l'AAA (Thomas et al. 2006).

Les cellules vasculaires peuvent être une source de ROS. Le stress biomécanique appliqué sur la paroi vasculaire a un rôle direct dans la production de ROS *via* la NADPH oxydase des CML (Grote et al. 2003). Les cellules immunitaires jouent un rôle important dans la production de ROS (Rajagopalan et al. 1996). En effet, les cytokines pro-inflammatoires produites par les leucocytes tissulaires participent à l'augmentation de l'activité NADPH oxydase (Satriano et al. 1993). En parallèle, le stress oxydant est un point central de la réponse immunitaire adaptative dans l'AAA. En effet, en plus de contribuer à la dégradation matricielle (Wassef et al. 2001), le stress oxydatif possède une place prédominante dans l'inflammation du tissu anévrismal par l'augmentation de molécules d'adhésion, de cytokines chimiotactiques et peptides chémo-attractants permettant le recrutement de cellules immunitaires (McCormick, Gavrilu, et Weintraub 2007).

Le stress oxydatif joue un rôle majeur dans la protéolyse de la média *via* l'activation des MMP (Rajagopalan et al. 1996). Il a été prouvé que l'inhibition des ROS dans ces modèles induisait non seulement la diminution de l'expression de MMP-2 et MMP-9 mais également une réduction de la formation de l'AAA (Xiong, Mactaggart, et al. 2009).

Pour conclure, toutes ces informations prouvent que l'anévrisme de l'aorte abdominale, à l'instar des pathologies inflammatoires chroniques, est une pathologie multifactorielle qui auto-entretient son propre développement. En effet, la dégradation de la MEC et l'apoptose cellulaire ont un impact majeur dans le recrutement de cellules inflammatoires et la production de stress oxydatif (Postlethwaite et Kang 1976; Senior, Griffin, et Mecham 1980; Dale et al. 2016) qui, eux-mêmes, induisent la protéolyse matricielle, le détachement et la mort des CML (Thompson et al. 1995; Longo et al. 2002; Meilhac et al. 2003). Ainsi, chaque acteur de son développement joue un rôle sur les autres, produisant un cercle d'amplification important de la pathologie vers le stade le plus avancé, la rupture.

### 1.3.2. Anévrismes et dissections de l'aorte thoracique

Si l'aorte abdominale est la localisation privilégiée des anévrismes aortiques avec plus de 60% des anévrismes artériels (Ernst 1993), l'aorte thoracique représente également une localisation privilégiée pour le développement d'anévrismes et de dissections artériels. Ces pathologies ont une incidence moins importante que les AAA. Elles sont cependant très mortelles et souvent découvertes trop tardivement. Les mécanismes responsables de la survenue et du développement de ces pathologies sont donc beaucoup moins documentés.

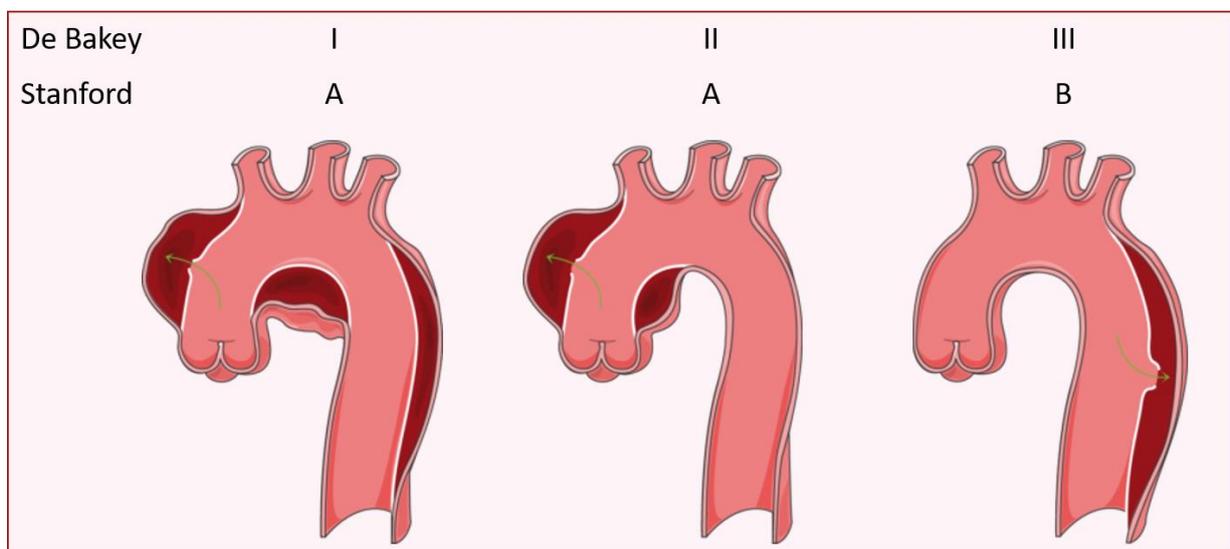
### a) Les anévrismes de l'aorte thoracique

Les anévrismes de l'aorte thoracique (AAT) peuvent être classés en plusieurs catégories en fonction de la zone aortique touchée. La partie ascendante de l'aorte est la plus touchée avec plus de 60% des cas et une incidence d'environ 5 cas pour 100 000 personnes (Johansson, Markström, et Swedenborg 1995). Il s'agit surtout d'une pathologie avec un taux de mortalité très élevé, supérieur à 95% en cas de rupture (Johnston et al. 1991; Johansson, Markström, et Swedenborg 1995).

Les anévrismes de l'aorte thoracique sont globalement asymptomatiques. Les symptômes proviennent principalement de la compression des tissus voisins lors de la dilatation de l'aorte. Le tissu aortique de patients présentant un AAT présente de profondes modifications de la MEC caractérisées par une fragmentation des fibres élastiques et des modifications phénotypiques des CML (Lindsay et Dietz 2011; Isselbacher, Lino Cardenas, et Lindsay 2016).

### b) Les dissections aortiques

Une dissection de l'aorte thoracique (DAT) correspond à une déchirure intimale provoquant l'infiltration de sang pulsé dans la média aortique. Cette infiltration de sang provoque la création d'une cavité, dite fausse lumière, parallèle à la lumière aortique. Avec le temps, cette cavité peut s'accroître et induire la réduction du calibre artériel en obstruant la lumière artérielle. Le plus grand risque pour les patients est la mort par rupture. Sans prise en charge, le risque de rupture et de mort augmente de 1% toutes les heures. Même avec un traitement approprié, la rupture aortique provoque un taux de mortalité de plus de 50% (Dillavou, Muluk, et Makaroun 2006). Parmi les patients qui survivent à l'opération, la dissection confère tout de même une mortalité de 50% dans les 30 jours (Howard et al. 2013). L'aorte ascendante demeure, le segment aortique le plus fréquemment touché par la dissection (60%).



**Figure 27 : Représentation schématique des classifications des différentes dissections de l'aorte thoracique.**

Les dissections aortiques peuvent être classifiées en fonction de l'anatomie, la localisation de la déchirure intimale initiale et de l'expansion de la dissection (**Figure 27**) :

- La classification de De Backer classe les dissections en trois catégories : type 1, la déchirure intimale se situe dans l'ATA et peut s'étendre jusqu'à l'ATD ; type 2, elle débute et se localise uniquement dans l'ATA ; type 3, elle débute et se localise uniquement dans l'ATD.
- La classification de Stanford scinde les dissections en deux catégories : les dissections aortiques de type A (65% des cas) comprennent les dissections touchant l'aorte ascendante pouvant s'étendre jusqu'à la descendante et les dissections de type B (35% des cas) touchant uniquement l'ATD.

Si les anévrismes aortiques se développent principalement de manière asymptomatique, le développement des dissections aortiques s'accompagne de fortes douleurs thoraciques et dorsales. La première difficulté dans leur diagnostic est donc de différencier la dissection aortique d'atteintes cardiaques, comme l'infarctus du myocarde.

### c) Les facteurs de risques et prises en charges

Contrairement à l'AAA, pathologie inflammatoire étroitement liée à la pathologie athéromateuse, la composante inflammatoire ne semble jouer qu'un rôle mineur dans le développement des AAT et DAT. De même, l'athérosclérose n'est pas un facteur de risque majoritaire de l'AAT et de la DAT. En effet, étant donné la forte pression à la sortie du cœur, l'aorte ascendante est généralement dépourvue d'athérosclérose (Zarins, Xu, et Glagov 2001). Dans ce contexte, la présence d'athérome devient secondaire dans ces pathologies. Le sang est continuellement expulsé du cœur à forte pression et exerce ainsi une contrainte importante sur la paroi de l'ATA avec une répartition des contraintes non uniforme sur toute l'ATA (Cotrufo et al. 2005). En effet, les contraintes dues à l'expulsion du sang sont concentrées dans la grande courbure de l'ATA, raison pour laquelle les atteintes anévrismales ou disséquantes se développent principalement sur la grande courbure (Tremblay et al. 2010). Par effet de « ricochet », le sang frappant la grande courbure de l'ATA est directement envoyé sur le haut de l'ATD, fragilisant la paroi et créant ainsi une localisation plus propice à une déchirure intimale et/ou une atteinte anévrismale de la paroi aortique.

Les facteurs de risque majoritaires des pathologies de l'aorte thoracique ont principalement trois étiologies comprenant la présence d'une valve bicuspide (Nistri et al. 2002; Grotenhuis et al. 2007; Choudhury et al. 2009; Viscardi et al. 2010; Pham et al. 2013), des facteurs héréditaires et des formes dégénératives chez des patients âgés (J.-B. Michel, Jondeau, et Milewicz 2018). Mais le facteur de risque majoritaire de la dissection aortique reste l'hypertension artérielle présente dans 75% des patients (Albornoz et al. 2006).

Les traitements contre les anévrismes et dissections de l'aorte thoracique passent dans un premier temps par la prévention des risques d'expansion et de rupture. Le contrôle de la pression artérielle reste un traitement important pour la stabilisation de ces pathologies (Ong et al. 2010). Mais l'expansion des pathologies requiert un acte chirurgical dans le but de réduire la dilatation aortique et/ou de refermer la cavité formée. Cependant, si l'atteinte s'avère trop importante, il convient de remplacer le segment touché par une prothèse synthétique.

Du fait de la gravité de ces pathologies et de la prise en charge tardive des patients, les mécanismes à l'origine de ces pathologies sont encore mal connus. La plupart des études menées sur les pathologies de l'aorte thoracique sont principalement basées sur les mutations génétiques favorisant leur développement. Environ un quart des patients avec une pathologie de l'aorte thoracique présentent une mutation les prédisposant à celles-ci, comme dans le cas du syndrome de Marfan, causé par une mutation du gène codant pour la fibrilline-1 (FBN1). Les formes génétiques d'anévrismes ou de dissections de l'aorte thoracique peuvent être classées en trois catégories : une mutation génétique d'un composant de la MEC, d'une protéine contractile des CML ou de la voie du TGF- $\beta$  (Milewicz et al. 2017; Chou et Lindsay 2020).

#### **d) Pathologies impliquées dans la dégradation de la matrice extra-cellulaire**

Même si la cinétique des événements menant à la survenue et au développement des AAT et DAT est encore largement incomprise, certaines analyses révèlent une forte désorganisation de la MEC des tissus anévrismaux et disséquants. Les AAT et DAT comprennent un fort remodelage pariétal principalement basé sur la dégradation de la MEC. On retrouve un amincissement de la média avec une désorganisation et une fragmentation des fibres élastiques. Il a été prouvé que la paroi anévrismale de l'ATA présente une quantité d'élastine significativement diminuée par rapport la paroi saine (Choudhury et al. 2009). A l'inverse, la quantité de collagène est significativement plus importante dans le tissu anévrisimal par rapport au tissu sain (Choudhury et al. 2009). Comme pour l'AAA, la dégradation de la MEC est principalement régulée par les MMP-2 et MMP-9 (LeMaire et al. 2005).

Les études menées sur les pathologies de l'aorte thoracique ont principalement été basées sur les différentes mutations génétiques impliquées dans le développement de celles-ci. Une partie de ces mutations touchent des gènes codant pour des composants de la MEC (Chou et Lindsay 2020). La plupart de ces mutations sont à l'origine de pathologies dans lesquelles la survenue d'anévrismes ou de dissections de l'aorte sont favorisées.

Les AAT et DAT peuvent survenir lors d'haplo-insuffisances ou de mutations spécifiques du gène codant pour l'élastine. Une mutation des gènes *Eln* et *Efemp2* codant respectivement pour l'élastine et la Fibuline-4 sont responsables d'une forte perturbation de l'homéostasie du collagène et de l'élastine dans la *Cutis laxa* (autosomal dominant *cutis laxa*, ADCL), pathologie affectant le tissu conjonctif de la peau (Huchtagowder et al. 2006; Dasouki et al. 2007; Callewaert et al. 2011). La Fibuline-4 permet le recrutement de la lysyl oxydase indispensable à l'interaction entre l'élastine et le collagène. Il a été prouvé qu'une mutation de la Fibuline-4 ou de la lysyl oxydase sont responsables d'AAT chez la souris (Mäki et al. 2002; Huchtagowder et al. 2006). En plus de la fragmentation de l'élastine dans la peau, l'ADCL peut provoquer des anévrismes pédiatriques et des tortuosités des artères de conductance (Dasouki et al. 2007; Hadj-Rabia et al. 2013).

Le syndrome d'Ehlers-Danlos est une maladie causée par la mutation du gène *Col3a1* codant pour le collagène de type 3 (Superti-Furga et al. 1988). Les anévrismes thoraciques semblent peu courants dans cette pathologie mais le risque de dissection est plus important. En effet, cette pathologie est caractérisée par des événements

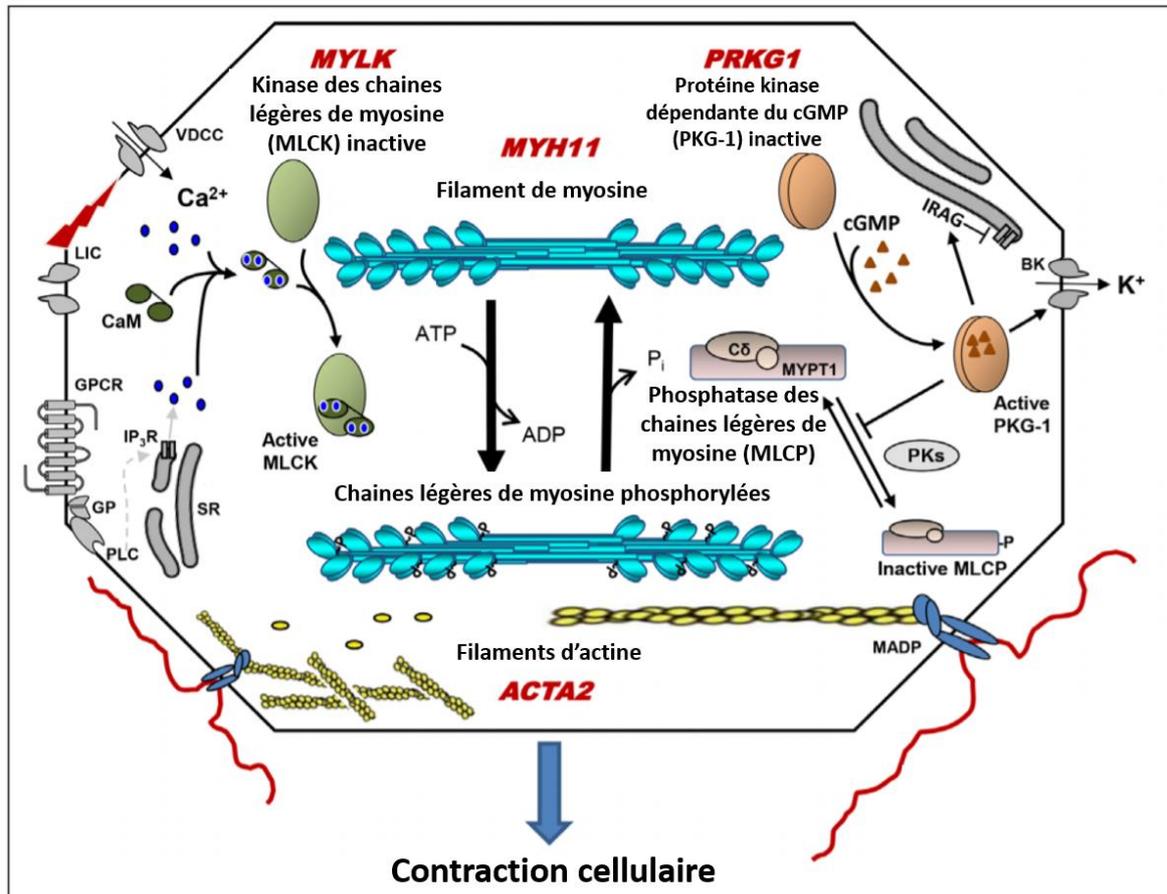
aigus répétés de dissections localisées, de ruptures artérielles, de rupture ventriculaires post-infarctus, de pneumothorax et de varices (Byers et al. 2017). Dans ce contexte d'extrême fragilité de la paroi artérielle, toute intervention chirurgicale ou endovasculaire reste très risquée. Près de 80% des patients atteints de cette maladie présentent des ruptures ou dissections de l'aorte avant 40 ans (Pepin et al. 2000).

La pathologie la plus répandue causée par une mutation d'un gène codant pour un composant de la MEC et associée à des anévrismes et dissections de l'aorte thoracique est le syndrome de Marfan, qui touche 1/5000 à 10 000 personnes. Celui-ci est causé par une mutation du gène *Fbn1* codant pour la Fibrilline-1 (Dietz et al. 1991; Judge et al. 2004). La Fibrilline-1 (FBN-1) est le principal composant des microfibrilles qui confère un soutien architectural des tissus participant à l'assemblage des fibres élastiques au sein du tissu conjonctif. Cette atteinte du tissu conjonctif entraîne des malformations importantes des systèmes oculaires, squelettiques et cardiovasculaires, notamment responsables d'anévrismes et de dissections de l'ATA. Comme dans l'AAA, la paroi aortique de patients atteints du syndrome de Marfan présente une diminution et une fragmentation des fibres élastiques, une augmentation de la quantité de collagène et de protéoglycanes, une production accrue de protéases, un switch phénotypique des CML et une infiltration de cellules inflammatoires (Bunton et al. 2001). En plus de son rôle dans la régulation des composants de la MEC et des CML, la fibrilline-1 participe également à la régulation de certains facteurs de croissance et cytokines (Bunton et al. 2001). Elle est notamment capable d'interagir avec le TGF- $\beta$  et réguler son activation et ainsi influencer la différenciation, la mobilité et la prolifération cellulaires. Ainsi, il est admis que la perte de fonction de la fibrilline-1, que l'on retrouve dans le syndrome de Marfan peut diminuer la séquestration du TGF- $\beta$  et donc augmenter sa bioviabilité, augmentant alors la quantité de TGF- $\beta$  et des voies de signalisation en découlant. Il est aussi supposé que la fibrilline régulerait positivement le TGF- $\beta$ . Ainsi, une diminution de la FBN-1 pourrait diminuer le recrutement du TGF- $\beta$ . En effet, les souris déficientes de la fibrilline-1 présentent une déficience de l'activation et de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  (Neptune et al. 2003; Chou et Lindsay 2020).

En plus de son rôle dans le syndrome de Marfan, la voie de signalisation du TGF- $\beta$  est aussi impliquée dans le syndrome de Loeys-Dietz. En effet, des mutations des gènes codant pour les récepteurs de type I et II du TGF- $\beta$ , TGFBR1 et TGFBR2, ou encore d'autres acteurs de la signalisation du TGF- $\beta$  comme SMAD3, TGFB2 et TGFB3 sont impliqués dans le développement de cette pathologie (Loeys et al. 2005; 2006; Boileau et al. 2012). Le syndrome de Loeys-Dietz présente certaines caractéristiques communes au syndrome de Marfan ainsi qu'une tortuosité artérielle en plus des caractéristiques cardiovasculaires habituelles (Loeys et al. 2005). Le risque majeur pour ces patients est le risque d'AAT et de DAT avant 30 ans (Loeys et al. 2006; Boileau et al. 2012). Ces mutations provoquent la diminution de l'activité du TGF- $\beta$  cellulaire malgré une augmentation de sa quantité tissulaire (Gallo et al. 2014) associée à une fragmentation des fibres élastiques et une augmentation de la quantité de collagène (Loeys et al. 2005).

### e) Modification de l'activité contractile des cellules musculaires lisses

Le deuxième type de mutation importante dans le développement des pathologies de l'aorte thoracique touche des gènes impliqués dans le fonctionnement de l'appareil contractile des CML (*Myh11*, *Acta2*) et des gènes codant pour les kinases régulant la phosphorylation des chaînes légères de myosine (*Mylk*, *Prkg1*) (Milewicz et al. 2017; Chou et Lindsay 2020) (**Figure 28**).



**Figure 28 : Représentation schématique des mutations génétiques prédisposant aux anévrismes et dissections aortiques.**

Adapté de (Milewicz et al. 2017).

La première mutation responsable d'AAT et de DAT est la mutation du gène codant pour la myosine spécifique des CML, *MYH11*. Les patients atteints d'une mutation du gène *Myh11* ont une forte incidence d'AAT et DAT, et présentent une persistance du canal artériel, qui est un court vaisseau reliant l'aorte et l'artère pulmonaire, normalement présent uniquement chez le fœtus, court-circuitant la circulation pulmonaire (Zhu et al. 2006; Pannu et al. 2007; Kuang et al. 2012). Certaines mutations induisent une augmentation de l'expression de *Myh11*. Celle-ci provoque alors un stress du réticulum endoplasmique qui induit la dégradation protéique de la myosine par autophagie (Kwartler et al. 2014). D'autres mutations de *Myh11* ont un impact direct sur l'activité de la myosine, diminuant la force contractile des CML et donc la réponse de l'anneau aortique responsable des pathologies aortiques (Kuang et al. 2012).

Le deuxième gène de la contraction cellulaire impliqué dans le développement d'AAT et de DAT est *Acta2*. Une quarantaine de mutations d'*Acta2* ont été identifiées comme pouvant être à l'origine de ces pathologies (D.-C. Guo et al. 2007; 2009; Regalado et al. 2015). Dans l'ensemble, ces mutations altèrent la fonction de l'actine, rendant les filaments d'actine moins stables. Les tissus aortiques de patients présentant une mutation d'*Acta2* présentent une dégénérescence médiale, des zones d'hyperplasie des CML avec sténose adventitielle (D.-C. Guo et al. 2007).

Du fait de l'interaction entre l'actine et la myosine, on comprend l'importance des mutations de *Myh11* et d'*Acta2* dans le développement des AAT. L'altération des voies de signalisation de ces deux protéines pourrait aussi jouer un rôle important dans la survenue d'AAT et de DAT. Une mutation du gène *Mylk* codant pour la kinase des chaînes légères de myosine (MLCK) pourrait être un bon candidat pour ces pathologies. En effet, certaines sont responsables de l'altération du domaine calmoduline de la protéine et de la réduction de sa capacité de kinase et donc de la diminution de l'activité contractile des CML (L. Wang et al. 2010).

D'autres mutations de protéines impliquées dans l'activité contractile des CML ont été rapportées, comme celle du gène *Prkg1* qui code pour la PKG-1 impliquée dans la relaxation des CML. Ces mutations induisent principalement un gain de fonction de la protéine qui diminue la phosphorylation de la myosine et donc la contraction des CML à l'origine d'anévrismes et de dissections de l'aorte thoracique (Pfeifer et al. 1998; Blanton et al. 2013; D. Guo et al. 2013).

Enfin, en plus de son rôle sur le cytosquelette, le TGF- $\beta$  joue un rôle central dans la modulation des CML dans les anévrismes et dissections de l'aorte thoracique. En effet, étant donné son rôle dans de nombreux mécanismes cellulaires comme la prolifération, l'apoptose, la différenciation, la migration cellulaire et la synthèse de composants de la MEC, toute altération de sa voie de signalisation peut jouer un rôle dans les pathologies vasculaires (Sanford et al. 1997; S. Chen et Lechleider 2004). Des études ont mis en évidence que les mutations de la voie du TGF- $\beta$  provoquent une diminution de la signalisation du TGF- $\beta$  (Regalado et al. 2011; Boileau et al. 2012). Le TGF- $\beta$  est essentiel pour la différenciation des CML dans l'aorte (Sanford et al. 1997; S. Chen et Lechleider 2004). Ainsi, une faible quantité de TGF- $\beta$  perturbe la différenciation des CML peuplant l'aorte. Une étude *in vitro*, basée sur des CML de patients présentant une mutation TGFBR2, met en avant des CML dédifférenciées et qui ne réussissent pas à se différencier en présence de TGF- $\beta$ 1 (Inamoto et al. 2010).

Pour conclure, quelle que soit l'étiologie, l'AAT et la DAT sont caractérisés par une augmentation de la perméabilité de la paroi artérielle qui augmente le passage des éléments du sang à l'intérieur même de la paroi. En effet, des défauts dans l'activité contractile des CML et une dégradation des fibres élastiques jouent un rôle dans le transport radial des éléments figurés du sang comme le plasminogène (Touat et al. 2008; Borges et al. 2010) dans la paroi vasculaire. Dans ce contexte, la conversion du plasminogène en plasmine induit la dégradation de la MEC et le détachement et l'anoïkis des CML (Meilhac et al. 2003), augmentant alors la fragilité de la paroi artérielle.

## 1.4. Place de la mitochondrie dans les pathologies anévrismales et disséquantes de l'aorte

Comme pour l'HTA, la dysfonction mitochondriale est retrouvée dans les pathologies anévrismales (E. Yu, Foote, et Bennett 2018). L'hypertension artérielle étant l'un des facteurs de risques majeurs de l'anévrisme et de la dissection aortique, on retrouve une forte production de ROS mitochondriaux, accompagnée de dommages de l'ADNmt et une diminution de la respiration mitochondriale (Foote et al. 2018).

C'est dans l'AAA que la mitochondrie a été le plus étudiée. Une étude basée sur l'analyse des différences de profil d'expression génique entre des échantillons contrôles et AAA a révélé une modification des gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative (Yuan, Liang, et Zhang 2015). Quelle que soit la localisation aortique touchée, une diminution significative de la biogénèse mitochondriale et principalement de *Pgc1-α* a été retrouvée (Gabrielson et al. 2016; Foote et al. 2018) à l'origine en tout ou partie de la diminution de la respiration mitochondriale (van der Pluijm et al. 2018). Cette diminution de la respiration mitochondriale a aussi été mise en avant dans des modèles murins de Loeys-Dietz et de Marfan (Foote et al. 2018).

Enfin, quelques études commencent à mettre en avant des dérégulations de la dynamique mitochondriale dans l'anévrisme. En effet, une étude récente menée sur des ATA de patients anévrismaux, disséquants et contrôles a démontré la présence d'un plus grand nombre de mitochondries de plus petites tailles dans les tissus anévrismaux par rapport aux contrôles (Gutierrez et al. 2020). Une deuxième étude montre une augmentation de l'expression de DRP1 dans les tissus d'AAA et son inhibition semblerait empêcher le développement anévrisimal (Cooper et al. 2020). De plus, la fission mitochondriale semblerait jouer un rôle dans le remodelage anévrisimal. Nous avons précédemment décrit l'implication de la fission dans la prolifération des CML (Chalmers et al. 2012; Marsboom et al. 2012; L. Wang et al. 2015), ainsi que le rôle de la fusion dans l'apoptose de ces derniers (Guo Xiaomei et al. 2007; D. Li et al. 2015; W. Zhang et al. 2015). Des études plus récentes ont aussi mis en avant la place de la fission, et principalement la protéine DRP1 dans le remodelage adventiciel induit par l'angiotensine II (Huang et al. 2020), mais aussi dans la sécrétion de collagène et la calcification cardiovasculaire (Rogers et al. 2017). En parallèle, la fission serait impliqué dans l'inflammation et la sénescence des cellules endothéliales (Miyao et al. 2020) et des cellules musculaires lisses (Ma et al. 2020, 5). Enfin, notre première étude a clairement identifié le rôle protecteur de la protéine de fusion dans l'hypertension artérielle qui est aujourd'hui l'un des facteurs de risque majoritaire des anévrismes et dissections aortiques.

Tous ces éléments, semblent donc indiquer une implication de la dynamique mitochondriale dans le remodelage anévrisimal mais qui reste encore à définir avec plus de précision.

## 1.5. Objectif de la deuxième étude

Au vu de l'incidence et de la faible compréhension des mécanismes à l'origine de ces pathologies, il est indispensable d'explorer de nouvelles voies pouvant être impliquées dans leur développement et de déterminer des cibles thérapeutiques pour l'amélioration du traitement de ces pathologies. Au regard des premiers éléments de la littérature et des résultats de la première étude, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une « **dérégulation**

**de la dynamique mitochondriale dans l'anévrisme et la dissection aortique qui présenteraient une augmentation de la fission en détriment de la fusion »**. Notre deuxième objectif consiste alors à comprendre la place de la dynamique mitochondriale dans les pathologies anévrismales et disséquantes de l'aorte. Les atteintes étant différentes en fonction des localisations aortiques, il semblait aussi important de comprendre son rôle dans le développement des pathologies anévrismales dans chaque partie de l'aorte. Pour cela, nous avons mené deux études complémentaires. La première est la suite directe du projet visant à comprendre la place d'OPA1 dans l'hypertension artérielle. Nous savons que les souris *Opa1<sup>+/-</sup>*, présentent une déficience de la fusion mitochondriale et sont plus sujettes à des remodelages de type anévrismaux dans l'HTA. Nous avons alors décidé de prolonger le traitement hypertenseur dans le but de comprendre l'implication d'une déficience de la dynamique mitochondriale sur le remodelage aortique dans des conditions d'hypertension poussées, comme chez l'Homme. Pour compléter, nous souhaitons étudier les variations de la dynamique mitochondriale dans un modèle murin d'anévrisme aortique.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Modèles expérimentaux

#### 2.1.1. Modèles animaux

Cette étude a été réalisée à l'aide de deux modèles animaux génétiquement modifiés : l'un pour le gène de la protéine de fusion mitochondriale *Opa1* et l'autre pour le gène du récepteur aux LDL (*Ldlr*).

Le modèle de souris *Opa1*<sup>-/-</sup> étant létal *in utero* (Piquereau et al. 2012; Sarzi et al. 2012), la première partie de cette étude a été menée sur des souris hétérozygotes pour le gène *Opa1* (*Opa1*<sup>+/-</sup>) âgées de 4 à 6 mois. Les souris déficientes en *Opa1* ont été créées par l'institut des neurosciences de Montpellier (INSERM U1051, Université Montpellier I et II). Elles portent une mutation induisant une délétion (c.2708\_2711delTTAG) dans l'exon 27 du gène *Opa1*, provoquant un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré (perte des 58 derniers acides aminés de toutes les isoformes d'OPA1) (Sarzi et al. 2012). La deuxième partie de l'étude a été réalisée sur des souris mâles *Ldlr*<sup>tm1Her</sup> (*Ldlr*<sup>-/-</sup>) sur fond *C57BL6/J* âgées de 4 à 6 mois. L'ensemble du protocole a reçu un avis favorable du comité d'éthique en expérimentation animale des Pays de la Loire (CEEA, Permis #15931-2018061815475007 et #21582-2019072310089316).

Ces deux souches ont été générées par le service de reproduction de l'animalerie centrale de l'Université d'Angers (SCAHU). Les souris ont toutes été hébergées dans une salle à température contrôlée possédant un cycle jour/nuit 12h/12h et ont eu accès à l'eau et la nourriture standard d'animalerie *ad libidum*.

#### 2.1.2. Traitement hypertenseur

L'hypertension a été induite par l'implantation sous-cutanée de mini-pompes osmotiques (ALZET® 2004) permettant l'administration d'angiotensine II à raison de 1mg/kg/j pendant 28 jours. L'AngII (Angiotensin II acetate salt #H-1705.0100 Bachem®) a été dissoute dans du NaCl 0,07% et injectée dans la pompe dans des conditions stériles, sous un PSM (poste de sécurité microbiologique). Les pompes sont ensuite placées à 37°C dans du liquide physiologique toute une nuit pour permettre leur activation avant implantation dans les animaux. L'implantation sous-cutanée des mini-pompes est un acte chirurgical nécessitant une anesthésie et une analgésie des animaux. L'induction de l'anesthésie a été réalisée avec de l'isoflurane 5% à 0,2L/min puis maintenue à 2% sous masque. L'analgésie a été réalisée en sous-cutanée par l'injection de buprénorphine (Temgésic®) à 0,1mg/kg. L'animal a ensuite été placé en décubitus ventral et la nuque a été tonduée puis désinfectée à la Bétadine® scrub puis dermique avant la réalisation d'une incision transversale de la peau. La peau du dos a été décollée pour créer un espace sous-cutané dans lequel la pompe a été glissée. L'incision a été refermée à l'aide de fils de suture 5.0 non-résorbables. Durant toute la procédure chirurgicale et la phase de réveil, l'animal a été placé sur un tapis chauffant ou dans une couveuse thermostatée à 28°C pour prévenir tout risque d'hypothermie. Tous les animaux ont été soumis à une procédure chirurgicale rigoureusement identique. La seule différence pour les groupes contrôles (Sham) est l'absence d'implantation de pompe.

L'état général des souris a été vérifié quotidiennement et elles ont été pesées une fois par semaine pendant toute la durée du traitement.

### 2.1.3. Régimes alimentaires

Les groupes contrôles et *Opa1<sup>+/-</sup>*, ont reçu un régime standard d'animalerie (SAFE – U8959P 0001) tout au long de l'expérimentation. Certaines souris *Ldlr<sup>-/-</sup>* ont été soumises à un régime enrichi en cholestérol. Il s'agissait là du régime standard + 1,25% de cholestérol (SAFE – U8959P 0022) renommé « high fat diet » (HFD), pendant toute la durée du traitement hypertenseur.

### 2.1.4. Groupes expérimentaux

Pour faire suite à la première étude sur l'hypertension artérielle, le traitement hypertenseur a été prolongé à 28 jours afin de se rapprocher des conditions pathologiques des patients avec une hypertension chronique forte et prolongée et présentant une atteinte aortique. Pour comprendre l'impact d'une dysfonction de la fusion mitochondriale en présence d'un traitement hypertenseur poussé, nous avons mis en place quatre groupes expérimentaux :

- WT (contrôles) Sham
- *Opa1<sup>+/-</sup>* Sham
- WT AngII
- *Opa1<sup>+/-</sup>* AngII

Le modèle connu d'anévrisme aortique est décrit sur les souris *Ldlr<sup>-/-</sup>* soumises à un traitement hypertenseur additionné à un régime riche en cholestérol. Afin de pouvoir comprendre la place de la dynamique mitochondriale dans l'anévrisme et la dissection aortique, nous avons reproduit ce modèle et réalisé les contrôles associés. Nous avons donc mis en place quatre groupes expérimentaux :

- *Ldlr<sup>-/-</sup>* Sham ND (Normal Diet)
- *Ldlr<sup>-/-</sup>* Sham HFD (High Fat Diet)
- *Ldlr<sup>-/-</sup>* AngII ND
- *Ldlr<sup>-/-</sup>* AngII HFD

## 2.2. Suivi de la pression artérielle

La pression artérielle a été mesurée à la queue des animaux par pléthysmographie d'occlusion veineuse (Visitech System, BP-2000®, Blood Pressure Analysis System™). Après une semaine d'habituation, les mesures ont été réalisées à l'état basal (avant la chirurgie, J0), durant le traitement (J14) et avant le sacrifice des animaux (J28). Chaque jour, une moyenne de la pression artérielle systolique a été réalisée sur 15 mesures successives. Enfin, une moyenne sur trois jours a été réalisée pour chaque mesure.

## 2.3. Sacrifice et prélèvements

Après 28 jours de traitement, les animaux ont été sacrifiés par inhalation de CO<sub>2</sub>. Le sang, le cœur et l'aorte ont alors été prélevés. Le cœur a été pesé et rapporté au poids de la souris afin d'évaluer l'hypertrophie cardiaque.

Les aortes ont été disséquées de la graisse périvasculaire dans une solution physiologique, PSS (NaCl 130 mM, KCl 78,8 mM, MgSO<sub>4</sub>(7H<sub>2</sub>O) 1,2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 14,9 mM, HEPES 5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, D-glucose 11 mM) à 4°C et à un pH physiologique de 7,4. Les aortes ont ensuite été scindées en cinq fragments :

- Aorte thoracique ascendante (ATA)
- Crosse aortique
- Aorte thoracique descendante (ATD)
- Aorte abdominale péri-rénale (AApr)
- Aorte abdominale sous-rénale (AAsr)

## 2.4. Bilan lipidique

Le sang a été prélevé en intracardiaque au sacrifice des animaux dans un tube hépariné. Ce dernier a ensuite été centrifugé à 4000 rpm pendant 20 minutes pour récupérer le plasma, conservé à -80°C jusqu'à utilisation. Un bilan lipidique a ensuite été réalisé au Pôle Biologie du CHU à l'aide de Madame Françoise Larcher, Monsieur Khaled Messaoudi et du Professeur Pascal Reynier. Ce bilan incluait les dosages du cholestérol total (CT), des HDL-cholestérol (HDL-c) et des triglycérides (TG) et a permis de déterminer la concentration en LDL-cholestérol (LDL-c), calculée par la formule de Friedewald :  $LCL-c = CT - HDLc - TG/2,2$  (en mmol/l).

Enfin, l'indice d'athérogénicité (IA) a été calculé par le calcul suivant :  $IA = CT/HDL$ .

## 2.5. Etudes histologiques

### 2.5.1. Inclusion et coupe des artères

Les cinq fragments d'aorte ont été placés dans une solution de conservation Tissue-tek® ou O.C.T (« Optimal Cutting Temperature Compound », ThermoScientific), congelés dans les vapeurs d'azote et conservés à -80°C. Les blocs ont été coupés transversalement d'une épaisseur de 7µm à l'aide d'un Cryostat® (Leica CM3050 S) à -25°C. Puis les coupes ont été déposées sur des lames ThermoFrost polarisées (SuperFrost Ultra Plus, ThermoScientific) et conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

### 2.5.2. Coloration à l'orcéine

Les lames ont été séchées à température ambiante puis colorées à l'aide d'une solution d'orcéine (Sigma) diluée dans de l'éthanol 70% et du chlorure d'hydrogène (HCL) 15% pendant 20 minutes. Après un rinçage à l'eau distillée, les lames ont été incubées une minute dans une solution d'eau lithinée permettant la coloration des noyaux. Les lames ont ensuite été rincées une nouvelle fois et déshydratées pendant 5 minutes dans l'éthanol absolu puis fixées au xylène. Enfin, les coupes ont été séchées pendant 1 heure sous hotte et montées entre lame et lamelle avec une goutte de milieu de montage Eukitt®.

Les acquisitions d'images ont été réalisées au service commun d'imagerie et d'analyses microscopiques (SCIAM) du CHU d'Angers à l'aide du microscope Keyence (VHX-7000) et du logiciel intégré au microscope. Les aires

totales, de la lumière, de la média et de l'adventice de chaque artère ont été mesurées par l'intermédiaire du logiciel Image J.

### 2.5.3. Coloration à l'Oil Red-O

Les lames ont été placées à température ambiante pour séchage puis fixées 10 min dans une solution de PFA 4% à 4°C. Une fois rincées, les lames ont été plongées dans des bains successifs permettant la coloration à l'Oil-red O pour les dépôts lipidiques et à l'hématoxyline pour les noyaux cellulaires :

- Rinçage à l'isopropanol 60% 1 min
- Coloration à l'Oil-red O pendant 15 min
- Rinçage à l'isopropanol 60% 1 min
- Rinçage à l'eau distillée 30 s
- Coloration à l'hématoxyline pendant 5 min
- Rinçage à l'eau distillée plusieurs fois

Le montage entre lame et lamelle a ensuite été effectué à l'aide de Mowiol®.

Les acquisitions d'images ont été réalisées au service commun d'imagerie et d'analyses microscopiques (SCIAM) du CHU d'Angers à l'aide du microscope Keyence (VHX-7000) et du logiciel intégré au microscope. Puis le pourcentage d'aire positive à la coloration à l'Oil-red-O (ORO<sup>+</sup>) a été quantifié à l'aide du logiciel Image J via une déconvolution des couleurs avec comme vecteur le « Trichrome de Masson ». Les analyses ont été effectuées avec la couleur « rouge ». Les seuils d'intensité de coloration ont été déterminés manuellement dépendamment de la coloration.

Les aires totales, de la lumière, de la média et de l'adventice de chaque artère ont de nouveau été mesurées. Puis, le pourcentage d'aire positive a été quantifié dans chaque partie (aire totale ORO<sup>+</sup>, aire de la lumière ORO<sup>+</sup>, aire de la média ORO<sup>+</sup> et aire de l'adventice ORO<sup>+</sup>) et rapporté aux aires respectives selon la formule suivante :

$$\% \text{ ORO}^+ \text{ area} = \left( \frac{\text{ORO}^+ \text{ area}}{\text{area}} \right) \times 100$$

### 2.5.4. Coloration au rouge sirius

Après séchage à température ambiante, les lames ont été fixées dans l'éthanol 70% pendant 3 min puis plongées dans des bains successifs :

- Lavage dans de l'eau distillée 3 min
- Coloration dans du rouge sirius 1 h
- Deux lavages successifs dans de l'acide acétique 0,5%, 5 min
- Déshydratation à l'éthanol 100%, 5 min
- 3 bains successifs de xylène pendant 1 min chacun

Après séchage, le montage entre lame et lamelle a été effectué en Eukit®.

La coloration au rouge sirius marque le collagène tissulaire en rouge. Les analyses ont été réalisées sous lumière polarisée dans le but de différencier le collagène de type I apparaissant en jaune-rouge et le collagène de type III visible en vert.

Les images ont été acquises *via* un microscope optique (Nikon Eclipse E600) en lumière visible avec caméra numérique (AxioCamERc5s S/N MKG8647), avec un temps d'exposition de 28ms et une résolution de 8 bit RGB (x40 ; 2560 x 1920 pixels ; taille de pixel : 2.2 x 2.2  $\mu\text{m}$ ) *via* le logiciel ZEN lite 2011. Un polariseur circulaire (pouvant pivoter jusqu'à 360°) a été placé entre la source de lumière réglée au maximum et la lame, tandis que l'analyseur a été installé dans le trajet de la lumière entre la lame et la caméra. Le polariseur a été tourné jusqu'à ce qu'une diminution maximale de la lumière soit obtenue avant l'acquisition d'image (arrière-plan le plus « sombre » possible).

La mise au point d'un algorithme est en cours pour l'analyse des différents types de collagène ainsi que l'alignement et l'orientation des fibres.

## 2.6. Etude moléculaire

Les fragments aortiques disséqués ont été conservés à -20°C dans 100  $\mu\text{L}$  de RNA Later (Sigma). Les ARN totaux de chaque fragment ont ensuite été extraits à l'aide du kit miRNeasy® (Qiagen). Une quantité de 200 ng de ces ARN ont ensuite été soumis à une transcription inverse avec le kit QuantiTect® Reverse Transcription (Qiagen). Enfin, une PCR quantitative en temps réel a été réalisée à l'aide du système ABI 7500 SDS Real-Time PCR (Applied Biosystems) avec l'utilisation de Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). L'expression relative des transcrits cibles a été normalisée à la moyenne d'expression de deux gènes de référence : *Gapdh* (D-glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) et *Gusb* ( $\beta$ -glucuronidase), d'après la formule suivante :

$$E = 2^{-(\text{Ct}[\text{Cible}] - \text{Ct}[\text{Référence}])}$$

**Tableau 1 : Liste des oligonucléotides utilisés pour les PCR quantitatives.**

	Gène	Protéine	ID Gène	Taille de l'amplicon	Séquences des amorces	
					Sens	Antisens
Dynamique mitochondriale	<i>Opa1</i>	OPA1	NM_133752.3	66	accaggagaagtagactgtgtcaa	tcttcaataaacagcagaggtg
	<i>Mfn1</i>	MFN1	NM_024200.4	72	aaaacatactggactcagtaaactgtg	ggctctccctctctccattg
	<i>Mfn2</i>	MFN2	NM_133201.2	63	cattcttggtgctggaggag	aaggagagggcgatgagctct
	<i>Dnm1l</i>	DRP1	NM_001276340.1	60	agatcgtcgtagtggaacg	ccactagccttccagcact
	<i>Fis1</i>	FIS1	NM_025562.3	113	ggcaactaccggctcaag	gcctatcaatcaggcgttc
Biogénèse mitochondriale	<i>Tfam</i>	TFAM	NM_009360.4	92	caaaggatgattcggtcag	aagctgaatatatgctgcttttc
	<i>Nrf1</i>	NRF-1	NM_001164229.1	111	ggaaagaaagctgcaagccta	atgacctgggtccatgaaa
Matrice extra cellulaire	<i>Col1a1</i>	COL1A1	NM_007742.3	94	catgttcagcttctgtggacct	gcagctgactcagggatgt
	<i>Col3a1</i>	COL3A1	NM_009930	69	gcacagcagccaactgaga	gacatcttagactcatagactgacc
	<i>Eln</i>	Elastine	NM_007925.4	123	ggcgtcttctgctctctt	accagccctggataatagact
Dégardation de la MEC	<i>Mmp2</i>	MMP2	NM_008610.2	74	gtgggacaagaaccagatcac	gcatcatccacggtttcag
	<i>Timp1</i>	TIMP1	NM_011593.2	93	catggaagcctctgtggat	gatgtgcaaatctcgttcc
	<i>Timp2</i>	TIMP2	NM_011594	60	ttttcaatgcagacgtagtg	ggaaatcacctctctctg
Contraction cellulaire	<i>Myh11</i>	MYH11	NM_001161775.1	73	gaggagcaggttgaacagga	gcttcttctcttttgcctca
	<i>Mylk</i>	MLCK	NM_139300.3	80	caagtgtgtagccaagaacagc	tctcactggtctgagcatcg
	<i>Mlc20</i>	MLC20	NM_172118.1	96	gatcagaaccgagatggcttca	catgccctccagatactcgtc
	<i>Acta2</i>	ACTA2	NM_007392.3	99	taaccttcagcgttcagc	acatagctggagcagcgtct
	<i>Rock1</i>	ROCK1	NM_016802.3	85	gaatgacgagcagcagagac	tcctgtttgccatactctg
	<i>Rhoa</i>	RhoA	NM_172118.1	96	gatcagaaccgagatggcttca	catgccctccagatactcgtc
Stress oxydant	<i>Nox4</i>	NOX4	NM_015760.4	69	ctggaagaaccaagttcca	aaaggcacaaggctccagaa
	<i>Cyba</i>	P22-PHOX	NM_007806.3	94	tgccctccactctctgtt	gcagatagatcacactggcaat
	<i>Ncf2</i>	P67-PHOX	NM_010877.4	75	ccaagacaactttctggcttc	ttctggggtttgggtctg
	<i>Sod1</i>	SOD1	NM_011434.1	78	caggacctcatttaactctcac	tgcccaggtctccaacat
	<i>Sod2</i>	Mn-SOD2	NM_013671.3	68	gacctatgcaaggaacaa	gtagtaagcgtgtcccacac
Survie cellulaire	<i>Bax</i>	BAX	NM_007527.3	186	tcatgaagacagggccttt	caatcatcctctgagctcca
	<i>Bcl2</i>	BCL2	NM_009741.5	77	agtacctgaaccgcatctg	ggggccatatagtccacaaa
	<i>Cyts</i>	Cytochrome c	NM_009071.2	130	accacatctggcttctgt	cacagcagtaggtcacatggta
Sirtuines	<i>Sirt1</i>	SIRT1	NM_019812.2	87	cagtgagaaaatgctggccta	ttggtgtacaacaggtattga
	<i>Sirt3</i>	SIRT3	NM_001177804.1	77	tgctactattcttgggacctc	gggcactgattctgtactgc
Gènes de références	<i>Gapdh</i>	GAPDH	NM_008084.2	121	ccgggctggcattgctctc	gggggtgggtgccagggtt
	<i>Gusb</i>	GUSB	NM_010368.1	72	ctctgggtgcttactgat	cagttgttcaactcacctc

## 2.7. Analyse statistique

Toutes les données ont été analysées à l'aide du logiciel GraphPad Prism® 8.0 (RITME). Les résultats ont été exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (« Standard Error of the Mean »). Les analyses en colonnes des bilans lipidiques, poids et poids des cœurs ont été réalisées par le test de Mann-Whitney. La comparaison des groupes au sein d'une même localisation a été réalisée à l'aide de tests t multiples sans correction. La comparaison de différentes localisations d'un même groupe a été réalisée par le test de comparaison multiple de Turkey's (ANOVA à deux voies). Les tests ont été réalisés avec un risque de 5%. Une valeur de  $p < 0,05$  est donc considérée comme statistiquement significative avec \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$  ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### 3. Résultats

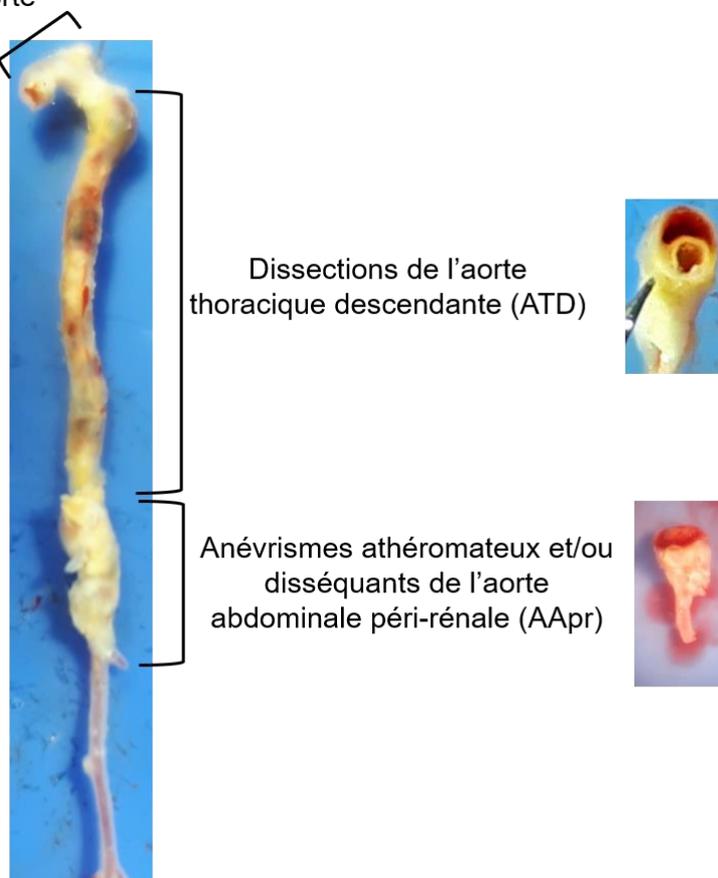
Dans le but de comprendre le rôle de la dynamique mitochondriale dans les pathologies anévrismales et disséquantes de l'aorte, nous avons mené deux études complémentaires. La première vise à déterminer avec plus de précisions le remodelage aortique provoqué par un traitement à l'AngII prolongé et à forte dose sur les souris déficientes en OPA1. La deuxième consiste à comprendre les variations de la dynamique mitochondriale dans un modèle murin d'anévrisme aortique.

#### 3.1. Etude macroscopique des différents segments aortiques

Au commencement de cette étude, nous avons constaté l'apparition de remodelages variables en fonction des différentes parties de l'aorte. C'est pourquoi, nous avons d'abord décidé de scinder chaque aorte en cinq fragments :

- Aorte thoracique ascendante (ATA)
- Crosse aortique
- Aorte thoracique descendante (ATD)
- Aorte abdominale péri-rénale (AApr)
- Aorte abdominale sous-rénale (AAsr)

Anévrismes et dissections de l'aorte thoracique ascendante (ATA)



**Figure 29 : Localisations aortiques présentant des remodelages anévrismaux et /ou disséquants.**

Nous avons ensuite comparé les atteintes entre ces cinq localisations aortiques et, à l'aide de nos observations et des éléments de la littérature, nous avons choisi de nous concentrer sur trois de ces cinq localisations. En effet, nous nous sommes aperçus que l'ATA, l'ATD et l'AApr sont les trois localisations aortiques privilégiées pour la survenue de remodelages anévrismaux ou disséquants (**Figure 29**). L'ATA est un segment aortique sujet à des remodelages anévrismaux et disséquants. L'ATD est principalement le siège de dissections aortiques. Enfin, l'AApr est la localisation privilégiée d'anévrismes athéromateux et/ou disséquants. C'est pourquoi, toute notre étude s'est concentrée sur ces trois segments aortiques.

## 3.2. Modèle de dysfonction mitochondriale (*Opa1*<sup>+/-</sup>)

### 3.2.1. Généralités

Des mesures biométriques ont été effectuées (poids du cœur et de l'animal, pression artérielle systolique) pendant toute la durée du traitement hypertenseur et le pourcentage de mortalité a été quantifié pour chacun des groupes (**Tableau 2**).

**Tableau 2 : Mesure de la masse des animaux, des cœurs, de la pression artérielle systolique et du pourcentage de mortalité des souris contrôles (WT) et *Opa1*<sup>+/-</sup> soumises à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). (n=3 à 25). \* indique une différence significative entre les groupes traités et contrôles respectifs (WT Sham vs WT AngII et *Opa1*<sup>+/-</sup> Sham vs *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII). \$ indique une différence significative entre J0 et J28. \*ou\$ p<0,05 ; \*\*ou \$\$ p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 ; \*\*\*\*p<0,0001. SBP : systolic blood pressure**

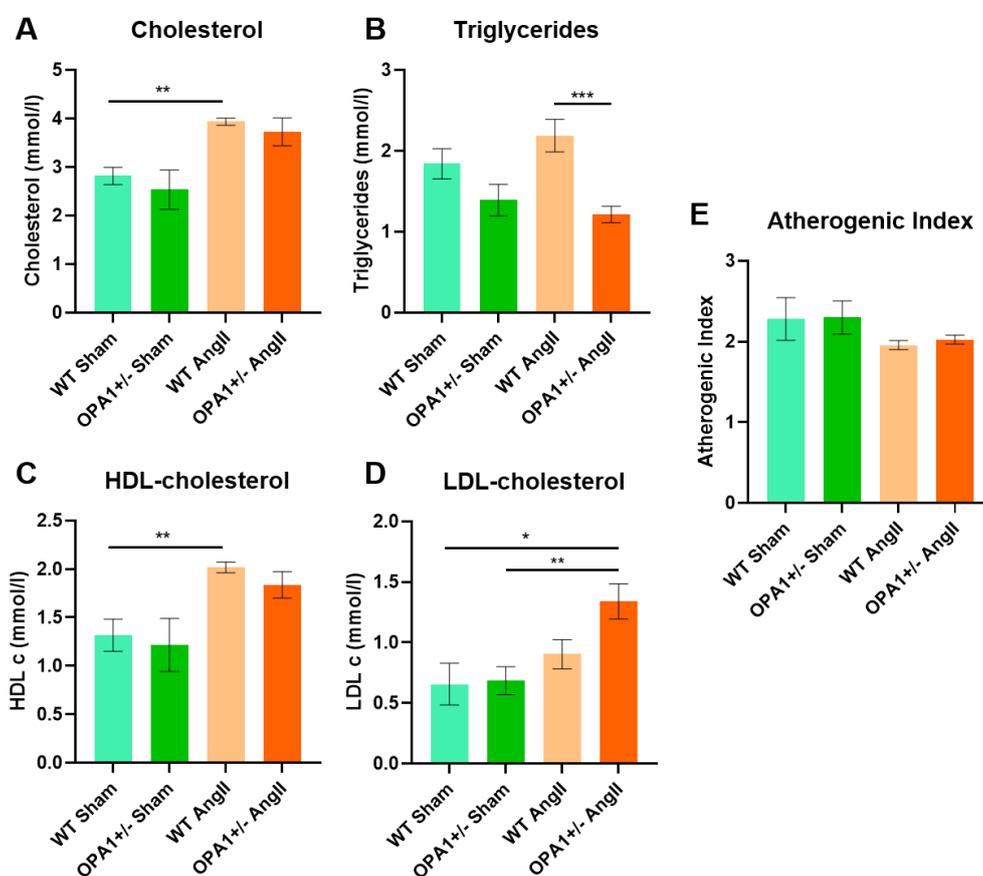
		WT Sham	<i>Opa1</i> <sup>+/-</sup> Sham	WT AngII	<i>Opa1</i> <sup>+/-</sup> AngII
Body weight (g)	J0	32,76 ± 0,96	30,36 ± 0,88	31,42 ± 0,70	29,79 ± 0,78
	J28	32,22 ± 1,07	30,25 ± 0,76	29,44 ± 0,39	28,13 ± 0,52
Heart weight / Body weight (g)	J28	0,47 ± 0,01	0,48 ± 0,01	0,58 ± 0,01****	0,57 ± 0,01****
SBP (mmHg)	J0	126 ± 2,10	114 ± 2,17	125 ± 5,54	124 ± 5,99
	J28	117 ± 2,97	122 ± 3,32	182 ± 3,84****\$	187 ± 8,35****\$\$
Mortality (%)	J28	0	0	5,9	8

Ces mesures n'ont révélé aucune variation de poids des animaux entre le début du traitement et le sacrifice de l'animal ni entre les différents groupes. La mesure des poids des cœurs, rapportée à la masse de chaque animal permet de quantifier l'hypertrophie cardiaque des animaux. Comme décrit dans la littérature (Ruzicka et Leenen 1995), l'AngII a bien induit une augmentation significative de la masse cardiaque des animaux contrôles (0,47±0,01 g vs 0,58±0,01 g). Cette augmentation s'est révélée identique chez les souris *Opa1*<sup>+/-</sup> (0,48±0,01 g vs 0,57±0,01 g), révélant une hypertrophie cardiaque similaire entre les groupes WT et *Opa1*<sup>+/-</sup> sous l'effet de l'angiotensine II. La pléthysmographie d'occlusion veineuse révèle une augmentation significative de la pression artérielle systolique (PAS) chez les animaux WT (125±5,54 mmHg vs 182±3,84 mmHg) et *Opa1*<sup>+/-</sup> (124±5,99 mmHg vs 187±8,35 mmHg) soumis au traitement hypertenseur. Cette augmentation de PAS après 28 jours de traitement hypertenseur est significative par rapport aux groupes WT sham (117±2,97 mmHg) et *Opa1*<sup>+/-</sup> (122±3,32 mmHg). De même que pour l'hypertrophie cardiaque, l'augmentation de PAS est identique entre les souris WT et *Opa1*<sup>+/-</sup> traitées à l'angiotensine II. Enfin, le traitement hypertenseur n'a pas provoqué de variation

significative de la mortalité dans les différents groupes, avec seulement 1 décès sur 17 animaux dans le groupe WT AngII au 24<sup>ème</sup> jour et 2 sur 25 dans le groupe *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII, au 7<sup>ème</sup> et au 10<sup>ème</sup> jour. La mutation du gène d'*Opa1* n'a donc pas eu d'impact sur l'effet du traitement hypertenseur sur les paramètres biométriques observés, ni sur la mortalité des animaux.

### 3.2.2. Bilan lipidique

Une partie des anévrismes aortiques étant souvent associée à des pathologies athéromateuses et à des défauts lipidiques, nous avons décidé de réaliser le bilan lipidique des animaux de chaque groupe. L'objectif de ce dosage plasmatique est de comprendre si l'atteinte de la fusion mitochondriale et le traitement hypertenseur peuvent provoquer un changement des taux plasmatiques de lipides chez ces animaux.



**Figure 30 : Bilan lipidique des souris contrôles (WT) et *Opa1*<sup>+/-</sup> soumises à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham).** Taux plasmatiques de (A) cholestérol total, (B) triglycérides, (C) HDL-cholestérol, (D) LDL-cholestérol et (E) indice d'athérogénicité. (n=4 à 8). \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001.

Dans un premier temps, nous avons remarqué une augmentation significative de la concentration plasmatique de cholestérol total ( $2,82 \pm 0,18$  mmol/L vs  $3,93 \pm 0,07$  mmol/L) et de HDL-cholestérol ( $1,32 \pm 0,17$  mmol/L vs  $2,01 \pm 0,05$  mmol/L) chez les souris WT AngII (**Figure 30A-C**). Malgré une tendance à l'augmentation, nous ne relevons pas de modification significative de la concentration plasmatique de cholestérol total chez les souris *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII (p=0,054). En revanche, nous avons mis en évidence une augmentation significative du taux

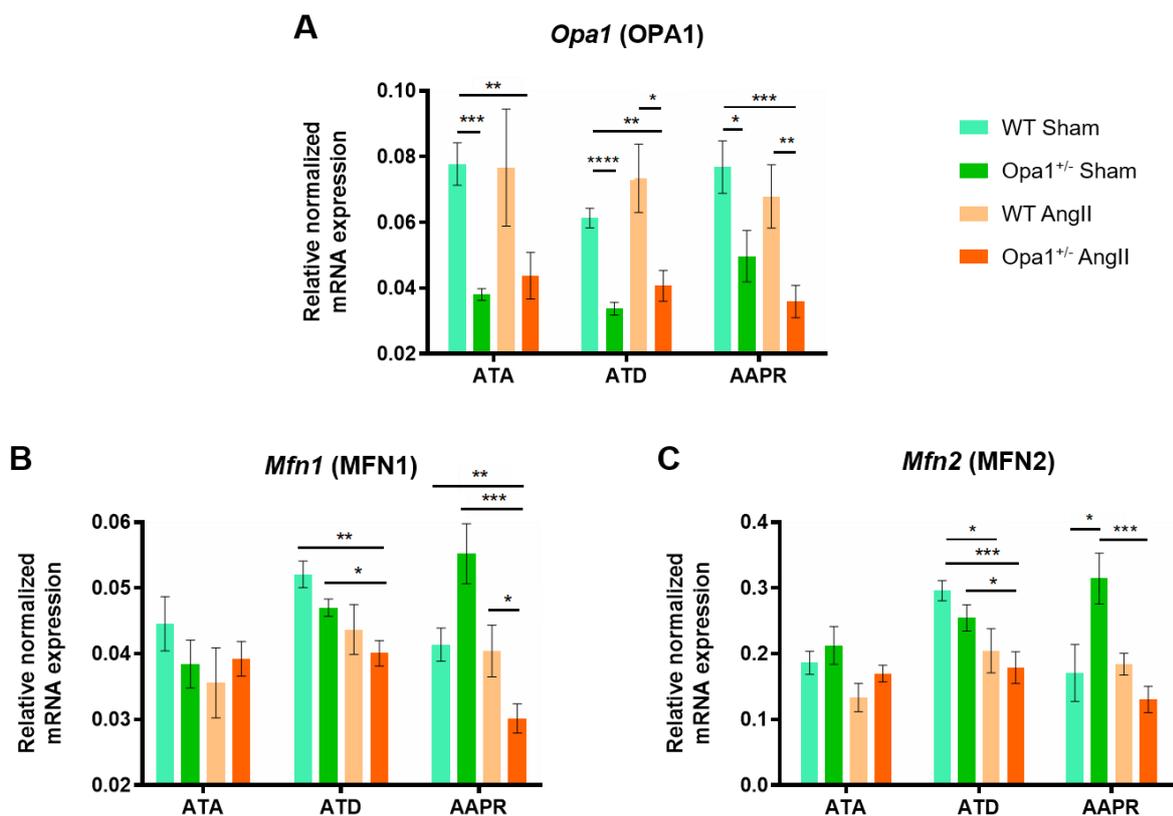
plasmatique de LDL-cholestérol chez les souris *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII par rapport aux contrôles *Opa1*<sup>+/-</sup> sham (0,66±0,17 mmol/L vs 1,34±0,15 mmol/L) (**Figure 30D**).

Enfin, si le diagnostic d'hyper-lipidémie repose classiquement sur le bilan lipidique de base avec la mesure du cholestérol total (CT), des triglycérides (TG) et des HDL-cholestérol (HDL) et le calcul ou la mesure des LDL-cholestérol (LDL), l'indice d'athérogénicité (IA) est calculé à partir des rapports CT/HDL ou LDL/HDL. L'IA permet de conclure à un risque artériel d'athérome. Dans le cas présent, l'IA est calculé à partir des taux de CT et d'HDL. Aucune différence significative n'est observée entre les quatre groupes, prouvant que le traitement hypertenseur et l'altération génétique de la fusion mitochondriale n'ont pas d'influence sur le risque athérogène (**Figure 30E**).

### 3.2.3. Etude de la dynamique mitochondriale

Avant de se concentrer sur le remodelage aortique, il nous semblait indispensable de comprendre l'impact de la sous-expression d'*Opa1* et du traitement hypertenseur sur la dynamique mitochondriale. Pour cela, nous avons étudié les variations d'expressions des gènes codant pour les protéines de fusion : *Opa1*, *Mfn1* et *Mfn2* ; et de fission mitochondriale : *Dnm1l* (DRP1) et *Fis1*.

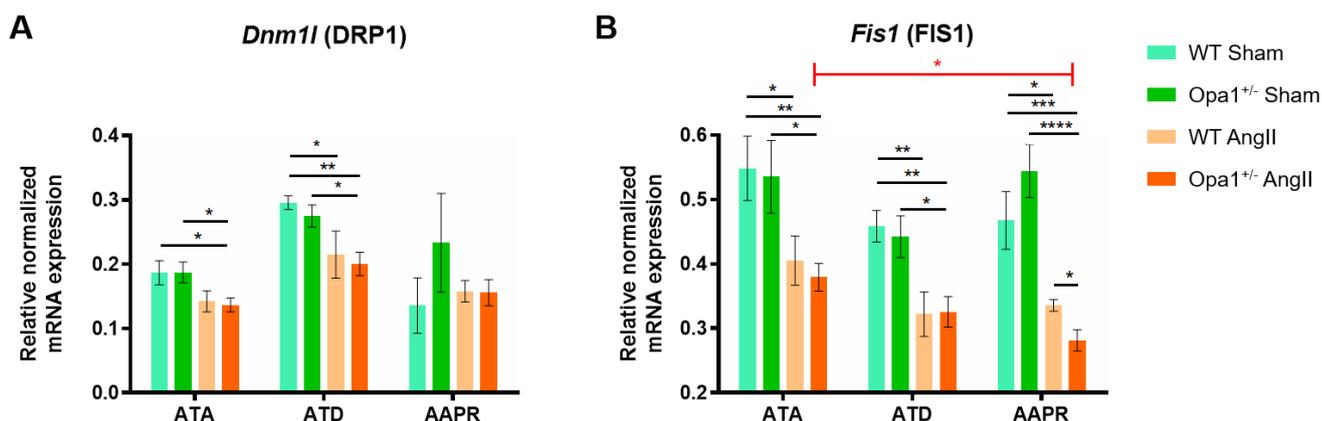
#### a) Fusion mitochondriale



**Figure 31 : Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs de la fusion mitochondriale par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AApr des souris contrôles (WT) et *Opa1*<sup>+/-</sup> soumises à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). (A) *Opa1* codant pour OPA1, (B) *Mfn1* codant pour la mitofusine 1 et (C) *Mfn2* codant pour la mitofusine 2. (n=5 à 8). \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 ; \*\*\*\*p<0,0001.**

Le modèle animal utilisé est décrit dans la littérature comme ayant une expression d'*Opa1* diminuée de 50% (Sarzi et al. 2012). Cette diminution de près de 50% de l'expression d'*Opa1* est retrouvée de façon significative dans les trois localisations aortiques (**Figure 31A**). Le traitement hypertenseur n'a aucun impact sur l'expression de son transcrite, quelle que soit la localisation. En revanche, le traitement hypertenseur modifie l'expression des gènes codant pour les mitofusines dans l'ATD et l'AApr. En effet, on retrouve dans l'ATD une diminution significative de l'expression de *Mfn1* ( $0,05\pm 0,00$  vs  $0,04\pm 0,00$ ) et *Mfn2* ( $0,30\pm 0,02$  vs  $0,18\pm 0,02$ ) chez les animaux *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII par rapport au groupe *Opa1*<sup>+/-</sup> sham (**Figure 31B-C**). Dans l'AApr, l'expression de *Mfn2* est significativement augmentée chez les souris *Opa1*<sup>+/-</sup> sham par rapport aux souris WT sham ( $0,17\pm 0,04$  vs  $0,31\pm 0,04$ ) et là encore, on retrouve une diminution de l'expression des gènes codant pour les deux mitofusines chez les animaux *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII par rapport aux WT sham (*Mfn1* :  $0,041\pm 0,00$  vs  $0,030\pm 0,00$  ; *Mfn2* :  $0,17\pm 0,04$  vs  $0,13\pm 0,02$ ) (**Figure 31B-C**). Le traitement hypertenseur n'a donc pas d'effet sur l'expression d'*Opa1* mais induit une diminution significative de l'expression génique des mitofusines dans l'ATD et l'AApr des souris *Opa1*<sup>+/-</sup>.

## b) Fission mitochondriale



**Figure 32 : Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs de la fission mitochondriale par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AApr des souris contrôles (WT) et *Opa1*<sup>+/-</sup> soumises à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham).** (A) *Dnm1l* codant pour DRP1 et (B) *Fis1* codant pour FIS1. (n=5 à 8). \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 ; \*\*\*\*p<0,0001.

L'analyse transcriptionnelle des acteurs de la fission mitochondriale a révélé une diminution significative de l'expression de *Dnm1l* dans l'ATA ( $0,19\pm 0,02$  vs  $0,14\pm 0,01$ ) et dans l'ATD ( $0,30\pm 0,01$  vs  $0,16\pm 0,02$ ), ainsi que de *Fis1* dans l'ATA ( $0,55\pm 0,05$  vs  $0,41\pm 0,04$ ), l'ATD ( $0,46\pm 0,03$  vs  $0,32\pm 0,04$ ) et l'AApr ( $0,47\pm 0,05$  vs  $0,34\pm 0,01$ ) dépendantes du traitement hypertenseur (**Figure 32**). Cet effet est retrouvé quel que soit le génotype des animaux, sauf dans l'AApr où la diminution de l'expression de *Fis1* est significativement abaissée chez les souris *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII ( $0,28\pm 0,02$ ) par rapport aux animaux WT AngII ( $0,33\pm 0,01$ ). Si l'expression de *Fis1* ne semble pas varier entre les localisations d'un même groupe, les souris *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII présentent une expression significativement plus faible dans les AApr que dans les ATA ( $0,28\pm 0,02$  vs  $0,34\pm 0,01$ ) (**Figure 32B**). En résumé,

une diminution de l'expression des gènes de la fission mitochondriale est observée et semble dépendante du traitement hypertenseur.

De façon générale, on retrouve une diminution de la dynamique mitochondriale dépendante du traitement hypertenseur. La délétion d'*Opa1* semble avoir un effet uniquement sur l'expression de *Mfn1* et *Fis1* dans l'AApr des animaux traités à l'AngII.

### 3.2.4. Etude du remodelage aortique

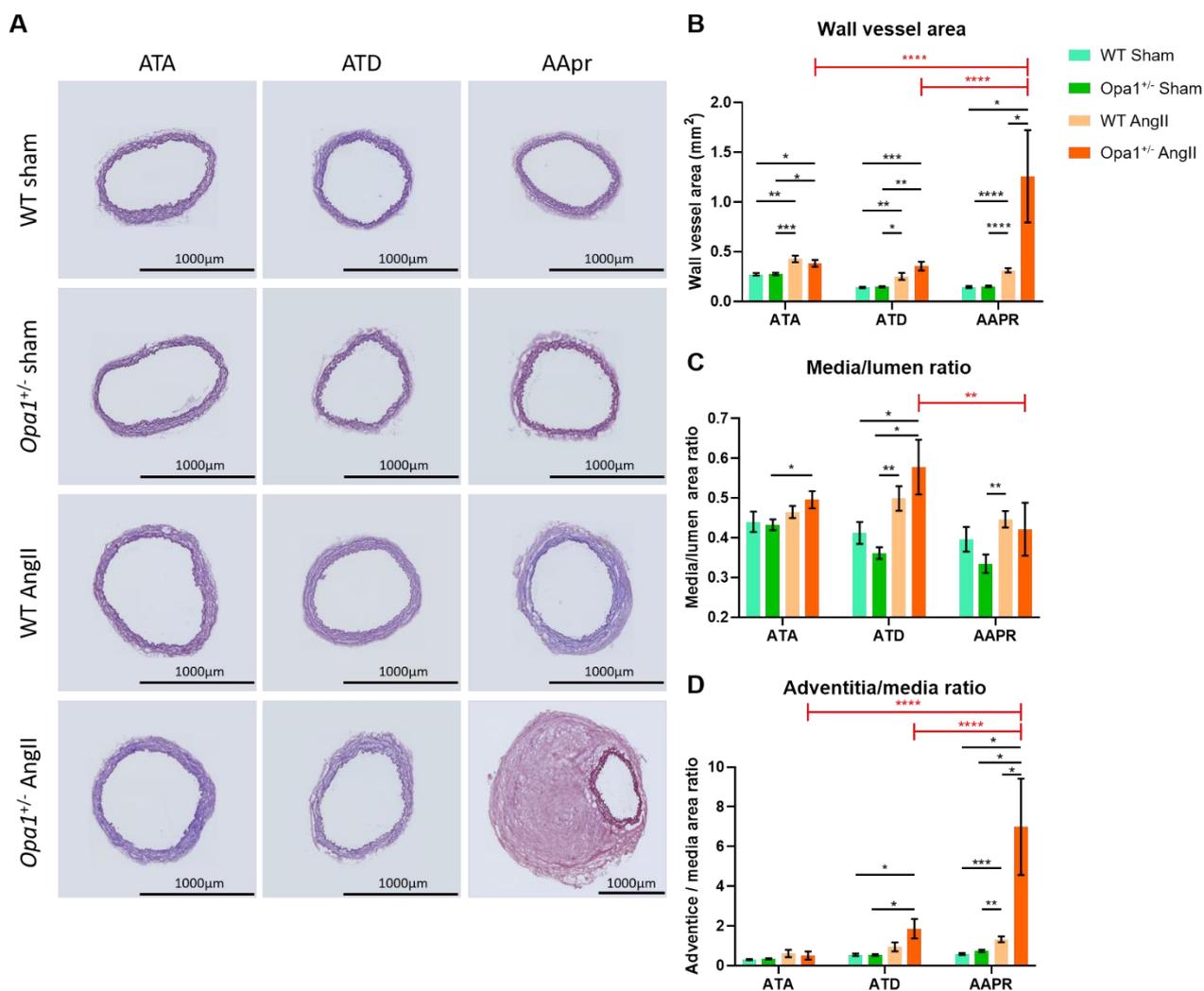
L'objectif de la première partie de cette étude consistait à caractériser avec plus de précision le remodelage aortique observé précédemment chez les souris *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII. Ainsi, différentes mesures histologiques ont été réalisées puis les modifications transcriptionnelles des composants de la MEC et leur dégradation, l'activité contractile des CML, le stress oxydant et l'apoptose des cellules vasculaires dans les trois localisations aortiques d'intérêt ont été quantifiées.

#### a) Remodelage pariétal et fibres élastiques

Le marquage à l'orcéine met en évidence les fibres élastiques du vaisseau. Cette coloration permet de mesurer les paramètres histomorphométriques (tels que l'aire pariétale totale du vaisseau et les ratios média/lumière et adventice/média), le remodelage de chaque segment aortique et l'analyse de la structure des fibres élastiques.

La mesure de l'aire totale du vaisseau permet de visualiser une augmentation significative de l'air des ATA ( $0,27 \pm 0,01 \text{ mm}^2$  vs  $0,43 \pm 0,03 \text{ mm}^2$ ), ATD ( $0,14 \pm 0,01 \text{ mm}^2$  vs  $0,25 \pm 0,04 \text{ mm}^2$ ) et AApr ( $0,14 \pm 0,01 \text{ mm}^2$  vs  $0,31 \pm 0,02 \text{ mm}^2$ ) des souris WT traitées à l'angiotensine II par rapport aux WT sham. Cette augmentation de l'aire pariétale totale est similaire dans l'ATA et l'ATD des animaux *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII. En revanche, cette augmentation est significative dans l'AApr des animaux *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII par rapport aux souris WT traitées à l'AngII ( $0,31 \pm 0,02$  vs  $1,26 \pm 0,46$ ). De ce fait, le remodelage des trois zones aortiques d'intérêt se trouve être significativement différent pour les souris *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII (ATA :  $0,38 \pm 0,03$  ; ATD :  $0,35 \pm 0,05$  ; AApr :  $1,26 \pm 0,46$ ) (**Figure 33B**).

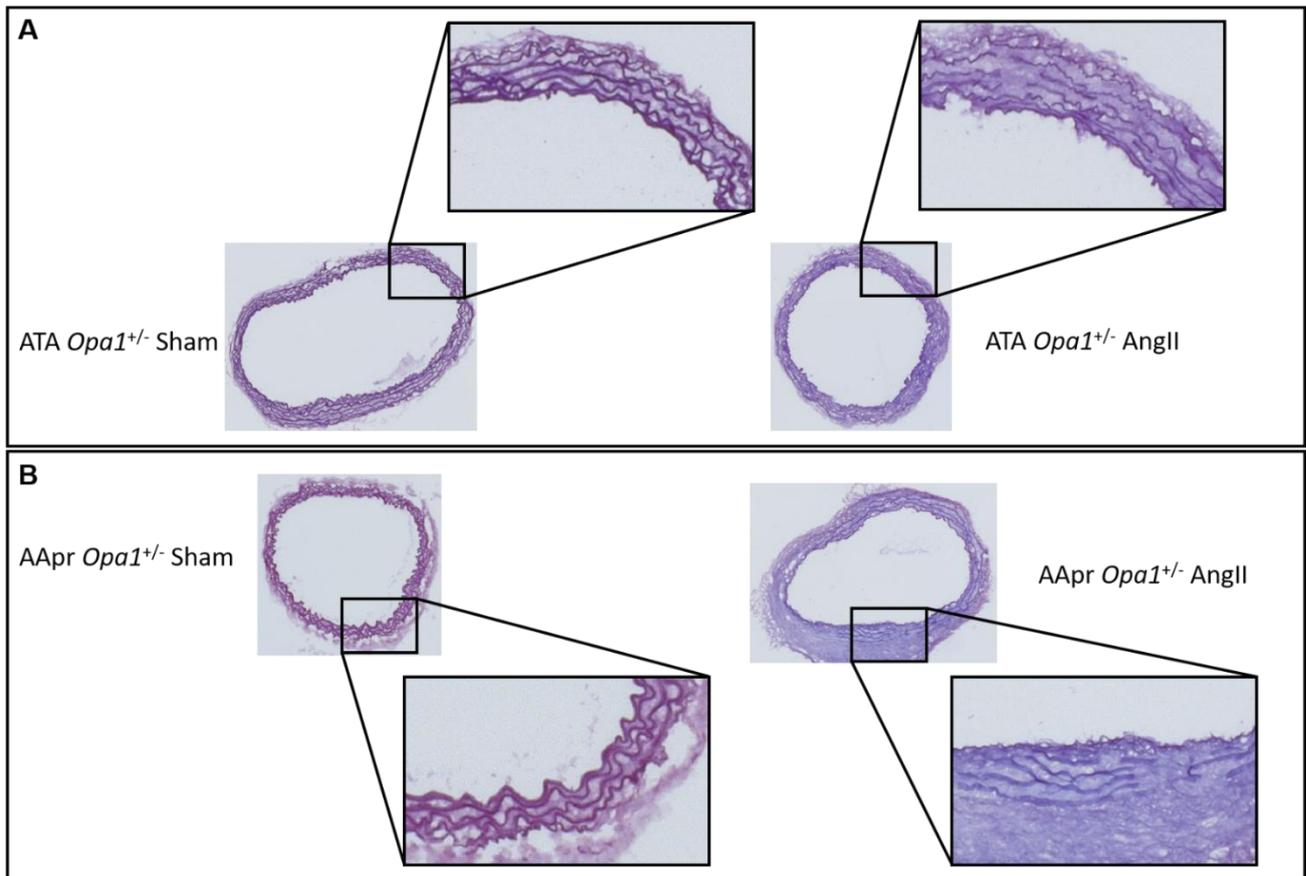
Après s'être intéressé l'aire pariétale totale des fragments d'aorte, nous avons décomposé chaque couche vasculaire dans le but de comprendre la localisation précise du remodelage pariétal pour chacun des groupes. Le ratio média/lumière représentant le remodelage de la média artérielle, est significativement augmenté entre les groupes *Opa1*<sup>+/-</sup> sham et WT AngII à la fois dans l'ATD ( $0,36 \pm 0,02$  vs  $0,50 \pm 0,03$ ) et l'AApr ( $0,34 \pm 0,02$  vs  $0,46 \pm 0,02$ ). En parallèle, l'aire médiale est aussi significativement augmentée avec le traitement hypertenseur chez les souris hétérozygotes pour *Opa1* dans l'ATA ( $0,43 \pm 0,01$  vs  $0,50 \pm 0,02$ ) et l'ATD ( $0,36 \pm 0,2$  vs  $0,58 \pm 0,07$ ). Une hypertrophie médiale est donc observée dans l'ATA et l'ATD des animaux *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII (**Figure 33C**).



**Figure 33 : Mesures histomorphométriques du remodelage aortique des ATA, ATD et AApr des souris contrôles (WT) et *Opa1*<sup>+/-</sup> soumises à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham).** (A) Coupes histologiques colorées à l'orcéine, (B) aire totale, (C) ratio média/lumière et (D) ratio adventice/lumière. ( $n=6$  à  $10$ ). \* $p<0,05$  ; \*\* $p<0,01$  ; \*\*\* $p<0,001$  ; \*\*\*\* $p<0,0001$ .

Enfin, le ratio adventice/média révèle le remodelage adventiciel des artères. Ici, nous relevons une augmentation significative de l'aire adventicielle de l'ATD des animaux *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII par rapport aux *Opa1*<sup>+/-</sup> sham ( $0,55\pm0,06$  vs  $1,86\pm0,49$ ). Chez les souris WT AngII, une augmentation de l'aire adventicielle de l'AApr est retrouvée ( $0,59\pm0,05$  vs  $1,33\pm0,15$ ). Néanmoins, la localisation la plus importante où survient ce remodelage adventiciel est l'AApr des animaux *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII ( $0,59\pm0,05$  vs  $6,99\pm2,43$ ) (**Figure 33D**).

Ainsi, le remodelage relevé sur les aires totales des trois localisations des souris *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII est dû à une hypertrophie de l'ATA et de l'ATD et à un fort remodelage adventiciel de l'AApr. Ces résultats confirment les observations de la première étude.

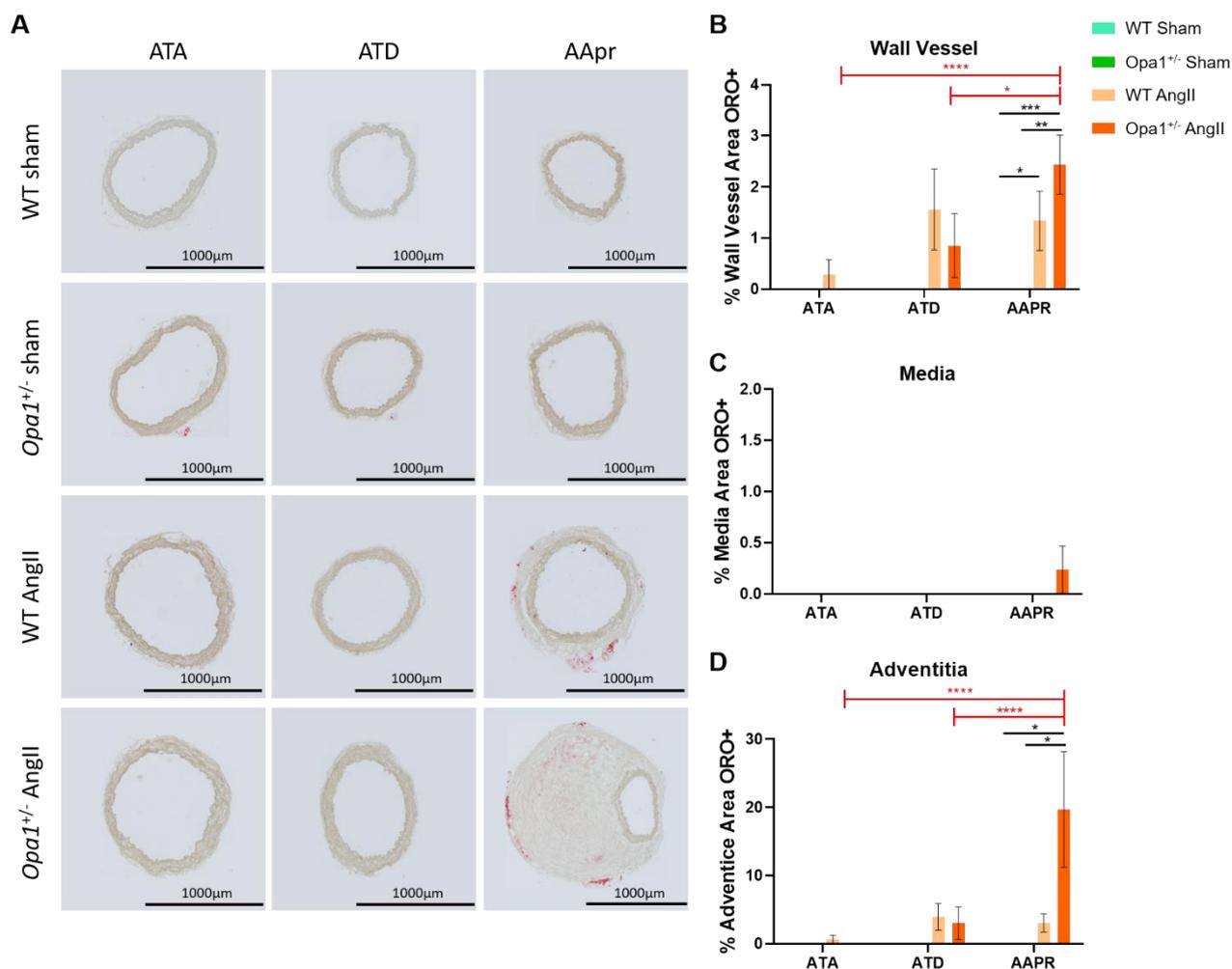


**Figure 34 : Structure des fibres élastiques de l'ATA (A) et l'AApr (B) de souris *Opal1*<sup>+/-</sup> soumises à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). (A) (B) Coupes histologiques colorées à l'orcéine.**

En complément du remodelage adventitial de l'AApr des souris *Opal1*<sup>+/-</sup> AngII, nous avons observé une fragmentation des fibres d'élastine dans l'ATA et l'AApr de ces mêmes animaux. Donc, même si le remodelage pariétal n'est pas avéré dans l'ATA, le traitement hypertenseur a tout de même un effet direct sur la média en provoquant la fragmentation et la déstructuration des fibres élastiques, comme on peut le retrouver dans l'anévrisme (**Figure 34**).

### **b) Dépôts lipidiques pariétaux**

L'anévrisme aortique pouvant être de type athéromateux, il a semblé pertinent de visualiser les dépôts lipidiques par une coloration à l'Oil-Red-O et de les quantifier dans les différents compartiments vasculaires (paroi du vaisseau, média et adventice).



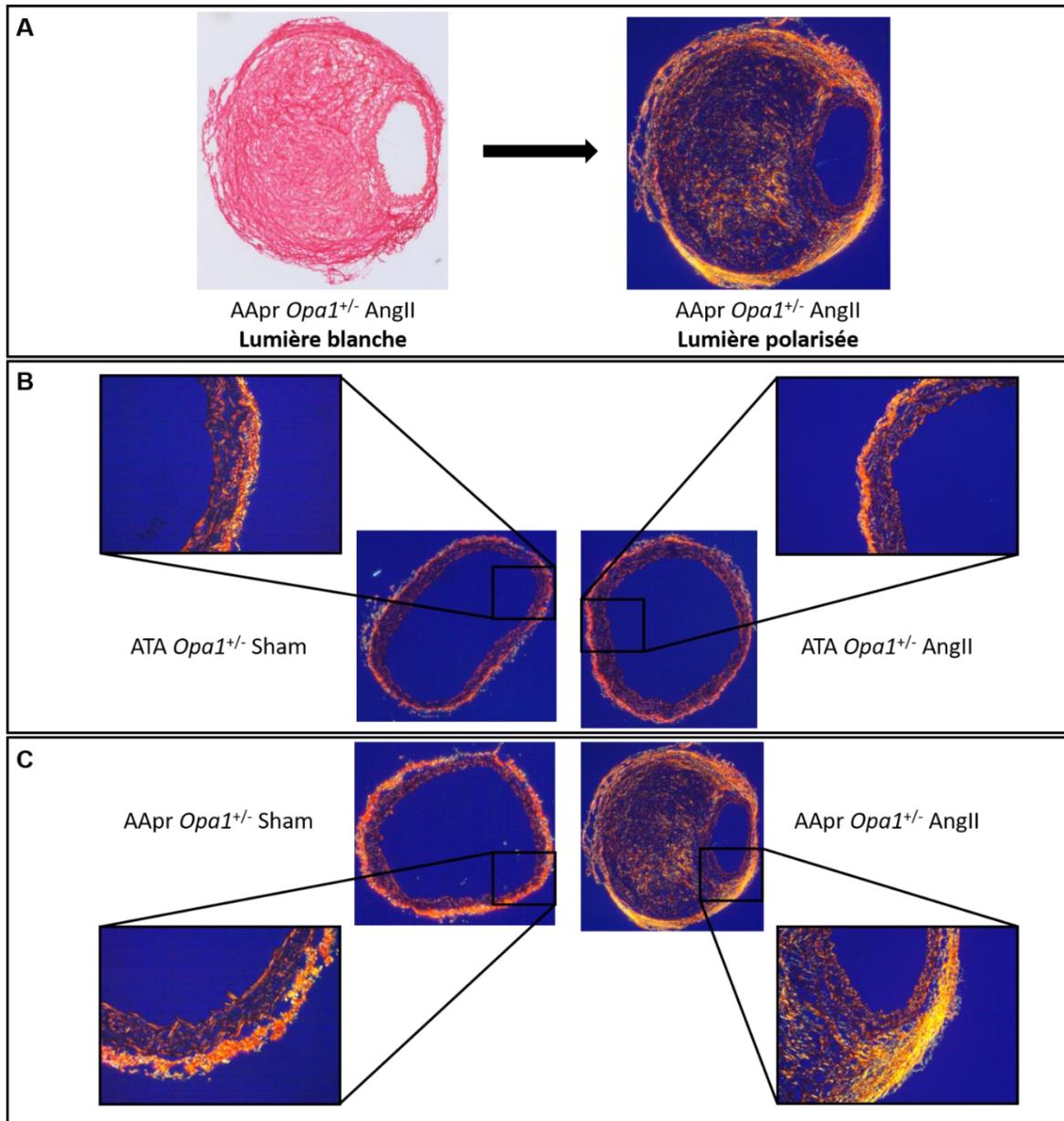
**Figure 35 : Coloration à l’Oil-Red-O des ATA, ATD et AAPr des souris contrôles (WT) et *Opa1*<sup>+/-</sup> soumises à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham).** (A) Coupes histologiques colorées à l’Oil-Red-O, mesure de l’aire positive d’Oil-red-o dans (B) le vaisseau entier, (C) la média et (D) l’adventice. ( $n=6$  à  $10$ ).  $*p<0,05$  ;  $**p<0,01$  ;  $***p<0,001$  ;  $****p<0,0001$ .

Nous avons remarqué une augmentation significative de la coloration à l’Oil-Red-O dans la paroi aortique totale de l’AAPr des animaux WT AngII (0 vs  $1,34\pm 0,58$ ) et *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII (0 vs  $2,44\pm 0,58$ ), induisant une différence significative de coloration entre les trois localisations pour les souris *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII (ATA : 0 ; ATD :  $0,85\pm 0,62$  ; AAPr :  $2,44\pm 0,58$ ) (**Figure 35B**). En détaillant les différentes couches qui composent l’aorte, nous remarquons que l’augmentation de la coloration est localisée dans l’adventice des animaux et principalement dans l’AAPr des souris *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII (0 vs  $19,68\pm 8,49$ ) (**Figure 35D**). Ces informations démontrent une augmentation des dépôts lipidiques dans l’adventice des AAPr des souris *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII.

### c) Collagène pariétal

Le marquage au rouge sirius a été réalisé dans le but de quantifier les modifications pariétales de collagène. L’analyse des coupes en lumière blanche permet de visualiser le collagène total marqué en rouge. L’utilisation de

la lumière polarisée permet de différencier le collagène de type I, coloré en jaune-rouge et le collagène de type III, visible en vert (**Figure 36A**).



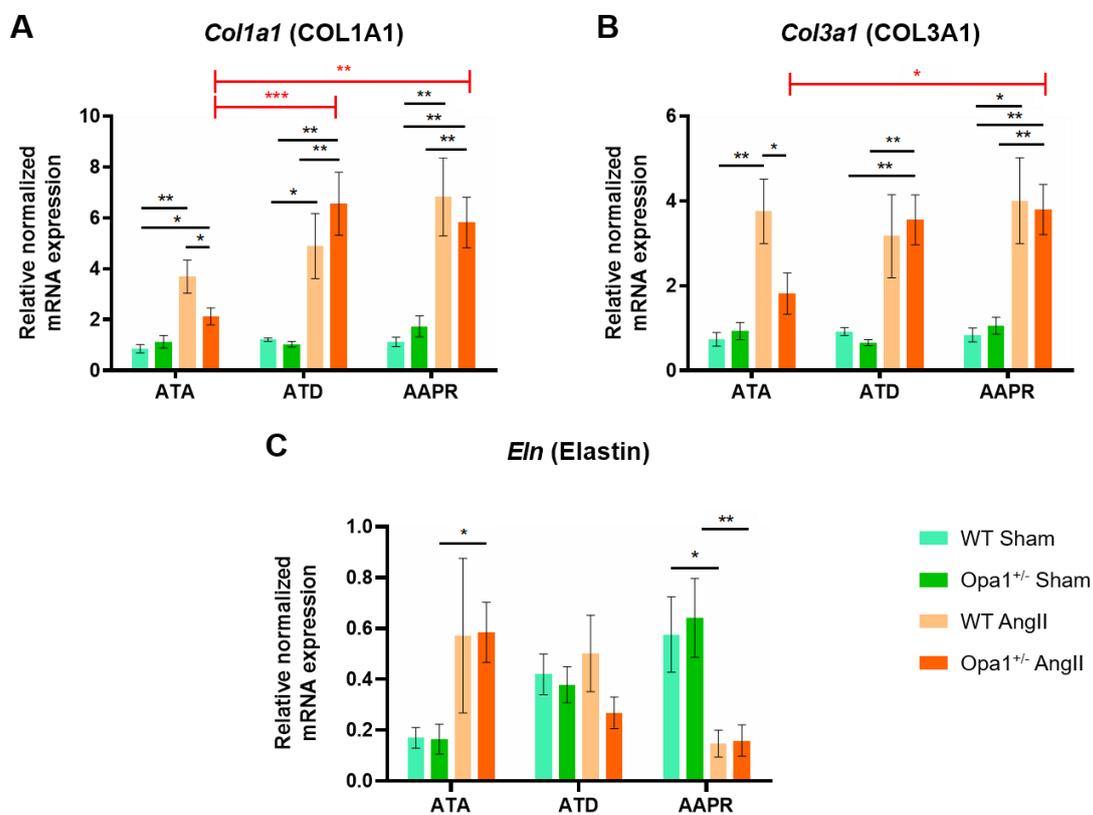
**Figure 36 : Coloration au rouge sirius. Comparaison des lumières blanche et polarisée (A), coloration en lumière polarisée de l'ATA (B) et l'AApr (C) de souris *Opa1*<sup>+/-</sup> soumises à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham).**

Si la lumière blanche donne l'impression d'une répartition homogène du collagène dans tout le vaisseau, la lumière polarisée prouve qu'il est principalement localisé dans l'adventice artérielle et se concentre en périphérie du vaisseau (**Figure 36B-C**). Dans le cas du remodelage anévrysmale que l'on peut retrouver dans l'AApr des animaux *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII, cette localisation périphérique du collagène peut jouer un rôle dans la prévention du risque de rupture.

A l'heure actuelle, un algorithme sur le logiciel MatLab est en cours d'élaboration. Celui-ci nous permettra de comparer les variations d'expression du collagène de type I et de type III, ainsi que l'alignement et l'orientation des fibres de collagène au sein de chaque artère.

#### d) Composants de la matrice extra cellulaire

Pour compléter l'analyse du remodelage pariétal par histomorphométrie, nous nous sommes attardés plus spécifiquement aux mécanismes cellulaires impliqués dans celui-ci. Dans un premier temps, nous avons quantifié l'expression des gènes codant pour les principaux composants de la matrice extra-cellulaire artérielle : les collagènes de type I et III ainsi que l'élastine.



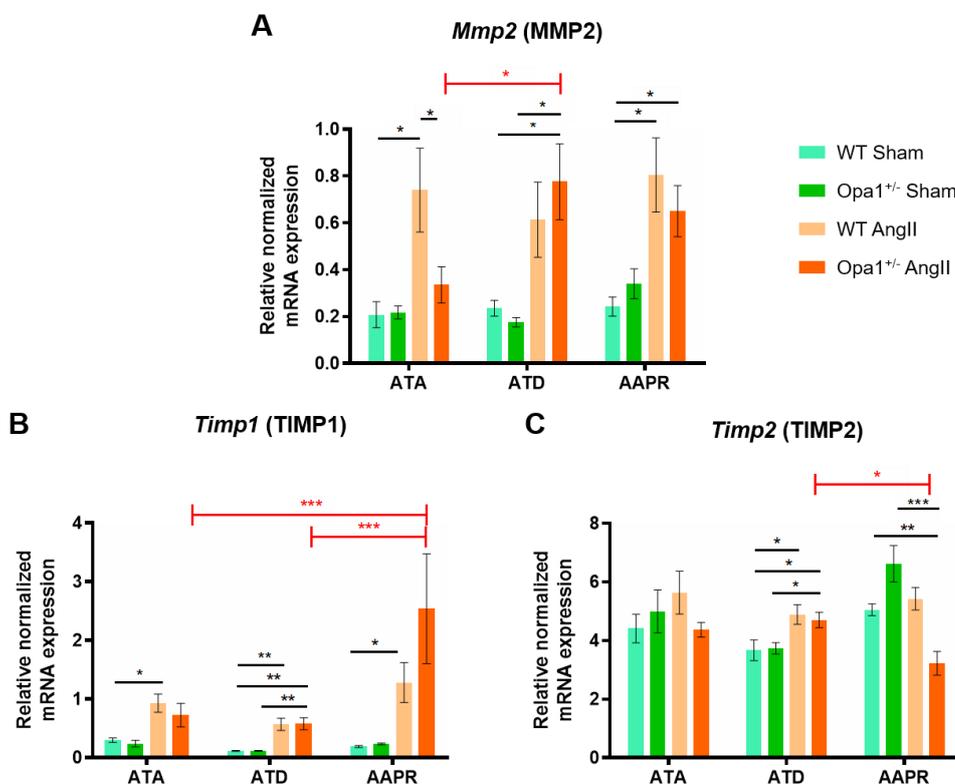
**Figure 37 : Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs de la matrice extra cellulaire par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AApr des souris contrôles (WT) et *Opa1*<sup>+/-</sup> soumises à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham).** (A) *Col1a1* codant pour le collagène de type I, (B) *Col3a1* codant pour le collagène de type III et (C) *Eln* codant pour l'élastine. (n=5 à 8). \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001.

Nous observons d'abord une augmentation significative de l'expression du collagène avec le traitement hypertenseur dans les trois localisations aortiques. En effet, on retrouve une augmentation significative de l'expression de *Col1a1* ( $0,86 \pm 0,16$  vs  $3,70 \pm 0,65$ ) et de *Col3a1* ( $0,74 \pm 0,16$  vs  $3,76 \pm 0,76$ ) dans l'ATA, associée à une augmentation significative de leur expression dans l'ATD (*Col1a1* :  $1,21 \pm 0,07$  vs  $4,90 \pm 1,27$  ; *Col3a1* :  $0,92 \pm 0,09$  vs  $3,17 \pm 0,98$ ) et dans l'AApr (*Col1a1* :  $1,13 \pm 0,18$  vs  $6,83 \pm 1,53$  ; *Col3a1* :  $0,84 \pm 0,16$  vs  $4,01 \pm 1,01$ ) par rapport aux deux groupes sham (**Figure 37A-B**). Dans l'ATD et l'AApr des souris *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII,

l'augmentation de l'expression du collagène de type I et de type III est la même que pour les WT AngII. En revanche, dans l'ATA celle-ci est significativement plus faible entre les animaux *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII (*Col1a1* : 2,13±0,34 et *Col3a1* : 1,82±0,49) et WT AngII (*Col1a1* : 3,70±0,65 et *Col3a1* : 3,76±0,76) (**Figure 37A-B**). Ainsi, l'expression des deux collagènes est significativement plus faible dans l'ATA des souris *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII que dans les deux autres localisations. En parallèle, l'expression du gène *Eln* codant pour l'élastine est significativement diminuée dans l'AApr des souris contrôles (0,58±0,15 vs 0,15±0,05) et *Opa1*<sup>+/-</sup> (0,64±0,16 vs 0,16±0,06) soumises à un traitement hypertenseur. En revanche dans l'ATA, on relève une augmentation significative de l'expression d'*Eln* chez les animaux *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII uniquement (0,17±0,04 vs 0,58±0,12) (**Figure 37C**). On retrouve donc une modification de l'expression des composants de la MEC artérielle : dans les trois localisations aortiques, une forte augmentation de l'expression du collagène est observée, contrebalancée par une diminution de l'expression de l'élastine uniquement dans l'AApr et à l'inverse, une augmentation de son expression dans l'ATA des souris *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII.

### e) Dégradation de la matrice extracellulaire

Pour comprendre l'intégralité des mécanismes du remodelage artériel, il est indispensable de prendre en compte les composants de la MEC mais également les acteurs de leur dégradation. C'est pourquoi nous avons quantifié l'expression du gène codant pour la principale protéase impliquée dans cette dégradation (*Mmp2*) et de ses inhibiteurs (*Timp1* et *Timp2*).



**Figure 38 : Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs de la dégradation de la MEC par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AApr des souris contrôles (WT) et *Opa1*<sup>+/-</sup> soumises à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). (A) *Mmp2* codant pour MMP2, (B) *Timp1* codant pour TIMP1 et (C) *Timp2* codant pour TIMP2. (n=5 à 8).**

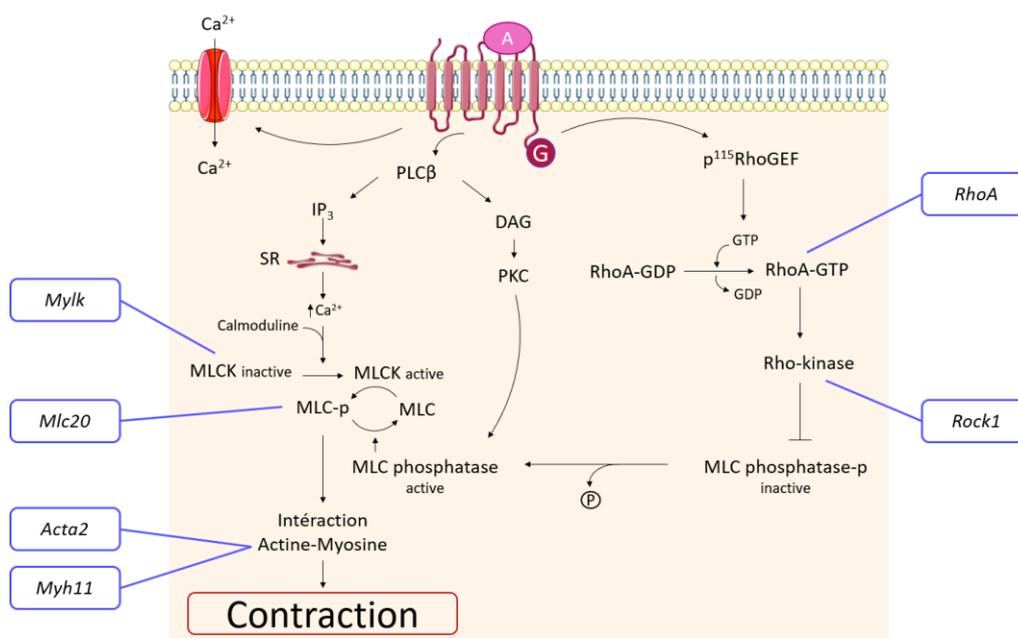
\*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001.

Parallèlement aux variations de collagène, on retrouve une augmentation significative de l'expression de *Mmp2* dépendante du traitement hypertenseur dans l'ATA ( $0,21 \pm 0,06$  vs  $0,74 \pm 0,18$ ), l'ATD ( $0,24 \pm 0,03$  vs  $0,61 \pm 0,16$ ) et l'AApr ( $0,24 \pm 0,04$  vs  $0,81 \pm 0,16$ ) chez les animaux WT. A l'instar du collagène, l'expression de *Mmp2* chez les souris *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII est augmentée de la même manière que chez les WT AngII dans l'ATD et l'AApr mais ne varie pas dans l'ATA des souris *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII ( $0,22 \pm 0,03$  vs  $0,33 \pm 0,08$ ) comparé aux animaux *Opa1*<sup>+/-</sup> sham (**Figure 38A**). Par ailleurs, nous observons une augmentation significative de l'expression de *Timp1* dépendante du traitement hypertenseur dans l'ATA ( $0,3 \pm 0,04$  vs  $0,93 \pm 0,16$ ), l'ATD ( $0,12 \pm 0,01$  vs  $0,57 \pm 0,11$ ) et l'AApr ( $0,20 \pm 0,02$  vs  $1,28 \pm 0,34$ ) des souris WT. Cette variation de *Timp1* est retrouvée dans l'ATA et l'ATD des animaux *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII et est augmentée dans l'AApr de ces animaux, générant un déséquilibre dans le profil d'expression de *Timp1* entre les localisations des souris *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII (ATA :  $0,73 \pm 0,20$  ; ATD :  $0,58 \pm 0,10$  ; AApr :  $2,54 \pm 0,93$ ) (**Figure 38B**). A l'inverse, l'expression de *Timp2* ne varie pas dans l'ATA et semble diminuée dans l'AApr des souris *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII ( $5,06 \pm 0,20$  vs  $3,23 \pm 0,40$ ). On retrouve tout de même une augmentation significative de l'expression de *Timp2* dans l'ATD avec le traitement quel que soit le génotype des animaux ( $3,67 \pm 0,35$  vs  $4,71 \pm 0,26$ ) (**Figure 38C**).

#### f) Acteurs de la contraction cellulaire

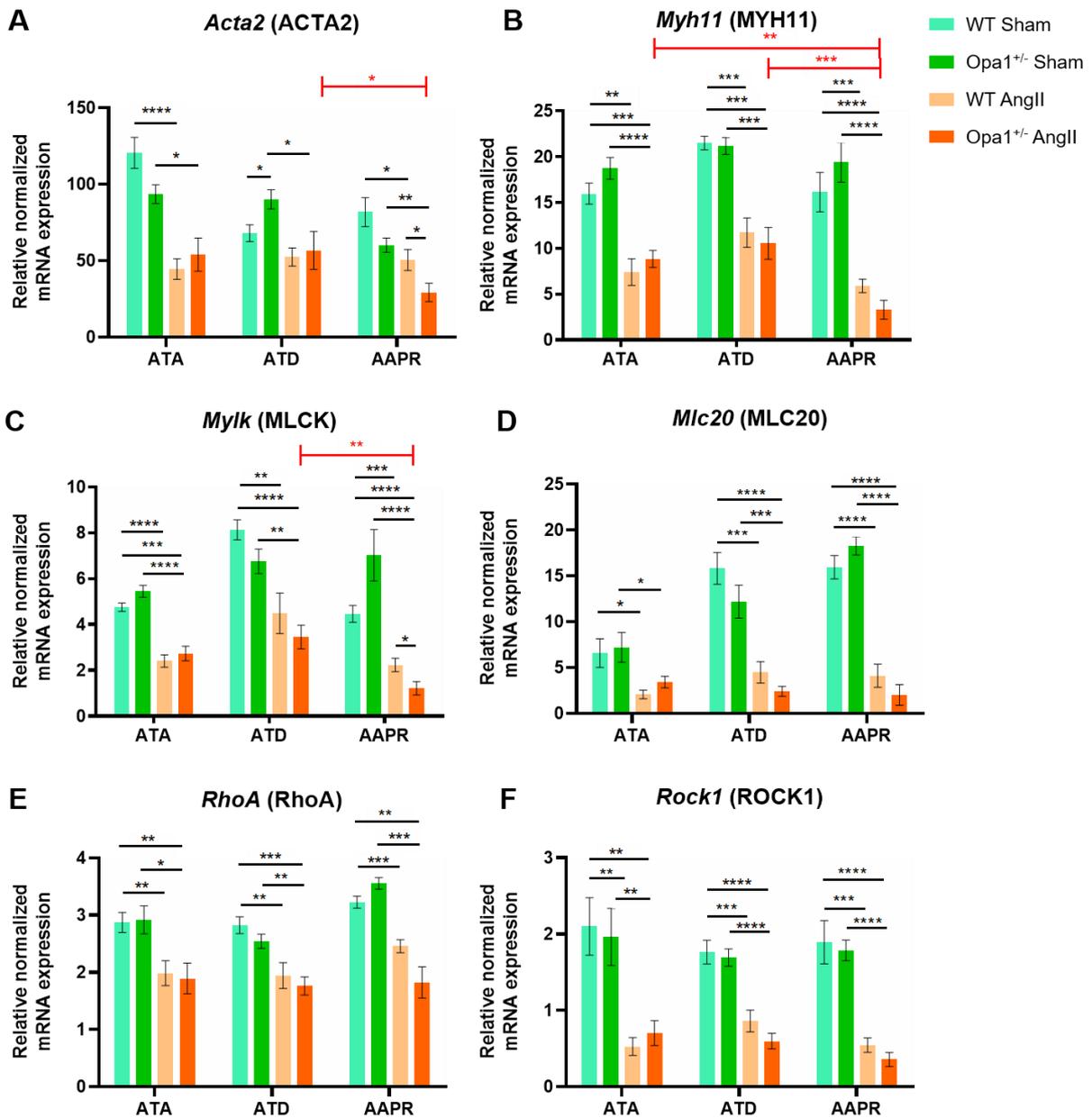
Dans l'anévrisme aortique, la dégradation de la MEC s'accompagne de modifications d'expression de l'appareil contractile des CML. C'est pourquoi nous avons quantifié l'expression de plusieurs gènes de la voie de signalisation de la contraction des CML (**Figure 39**) :

- Acteurs majeurs de la contraction des CML : *Acta2* et *Myh11*
- Voie de phosphorylation des chaînes légères de myosine : *Mylk* et *Mlc20*
- Voie d'inhibition de la phosphatase des chaînes légères de myosine : *RhoA* et *Rock1*



**Figure 39 : Représentation schématique des voies de signalisation de la contraction cellulaire.**

Adapté de (Ernesto L. Schiffrin et Touyz 2004)



**Figure 40 : Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs de la contraction cellulaire par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AApr des souris contrôles (WT) et *Opa1*<sup>+/-</sup> soumises à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham).** (A) *Acta2* codant pour ACTA2, (B) *Myh11* codant pour MYH11, (C) *Mylk* codant pour MLCK, (D) *Mlc20* codant pour MLC20, (E) *RhoA* codant pour RhoA et (F) *Rock1* codant pour ROCK1. ( $n=5$  à  $8$ ). \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ; \*\*\*\* $p<0,0001$ .

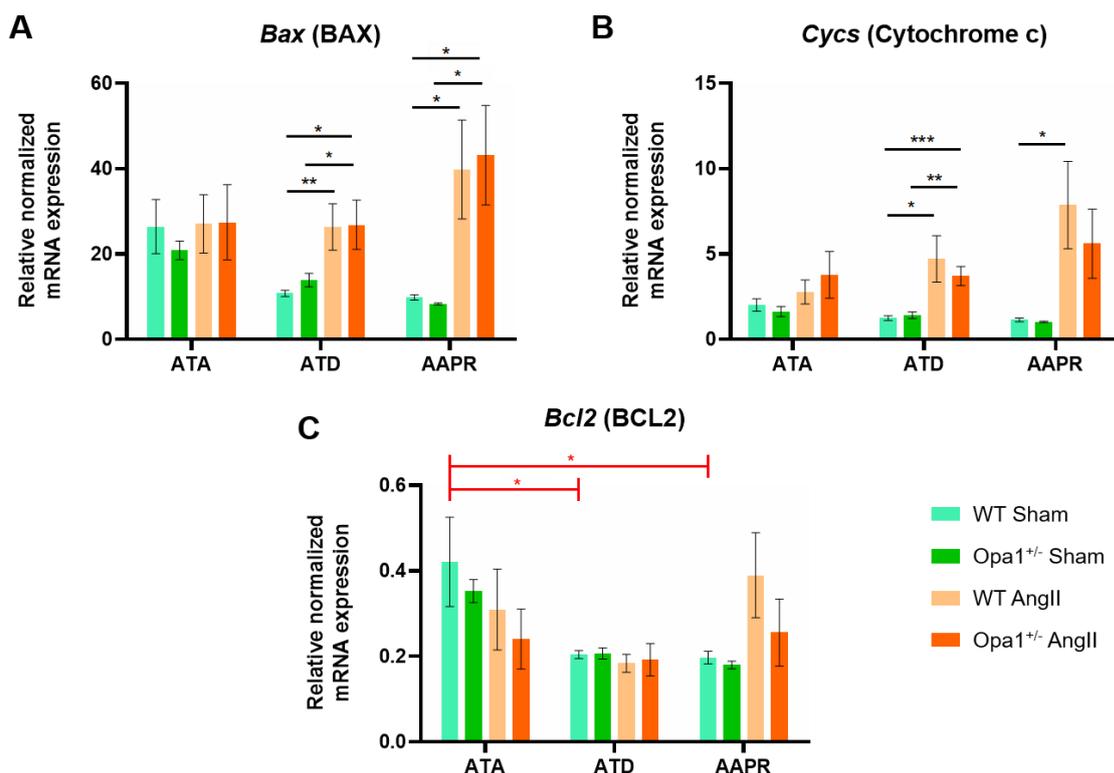
Chez les souris WT, le traitement hypertenseur induit une diminution significative de l'expression de tous les acteurs de la contraction vasculaire dans les trois localisations aortiques, sauf pour *Acta2* qui ne varie pas dans l'ATD ( $67,98\pm 5,51$  vs  $52,38\pm 5,93$ ). Cette diminution retrouvée chez les animaux contrôles est la même chez les souris *Opa1*<sup>+/-</sup> soumises à un traitement hypertenseur. Seule l'expression de *Mylk* est significativement diminuée dans l'AApr des souris *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII par rapport aux WT AngII ( $2,24\pm 0,29$  vs  $1,22\pm 0,29$ ) (**Figure 40**).

De façon générale, on retrouve donc une diminution de l'expression de tous les acteurs de l'appareil contractile des CML, dépendante du traitement hypertenseur mais indépendante du génotype des animaux. Seule

l'expression de *Mylk* est significativement diminuée dans l'AApr des souris *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII mettant en avant une diminution potentielle de la contraction cellulaire chez ces animaux.

### g) Apoptose et survie cellulaire

La modification transcriptionnelle des acteurs de l'appareil contractile dans l'anévrisme et la dissection aortique est principalement due au switch phénotypique et à l'apoptose des CML. C'est pourquoi, nous avons quantifié l'expression génique de quelques marqueurs de l'apoptose et de la survie cellulaire dans la paroi aortique.



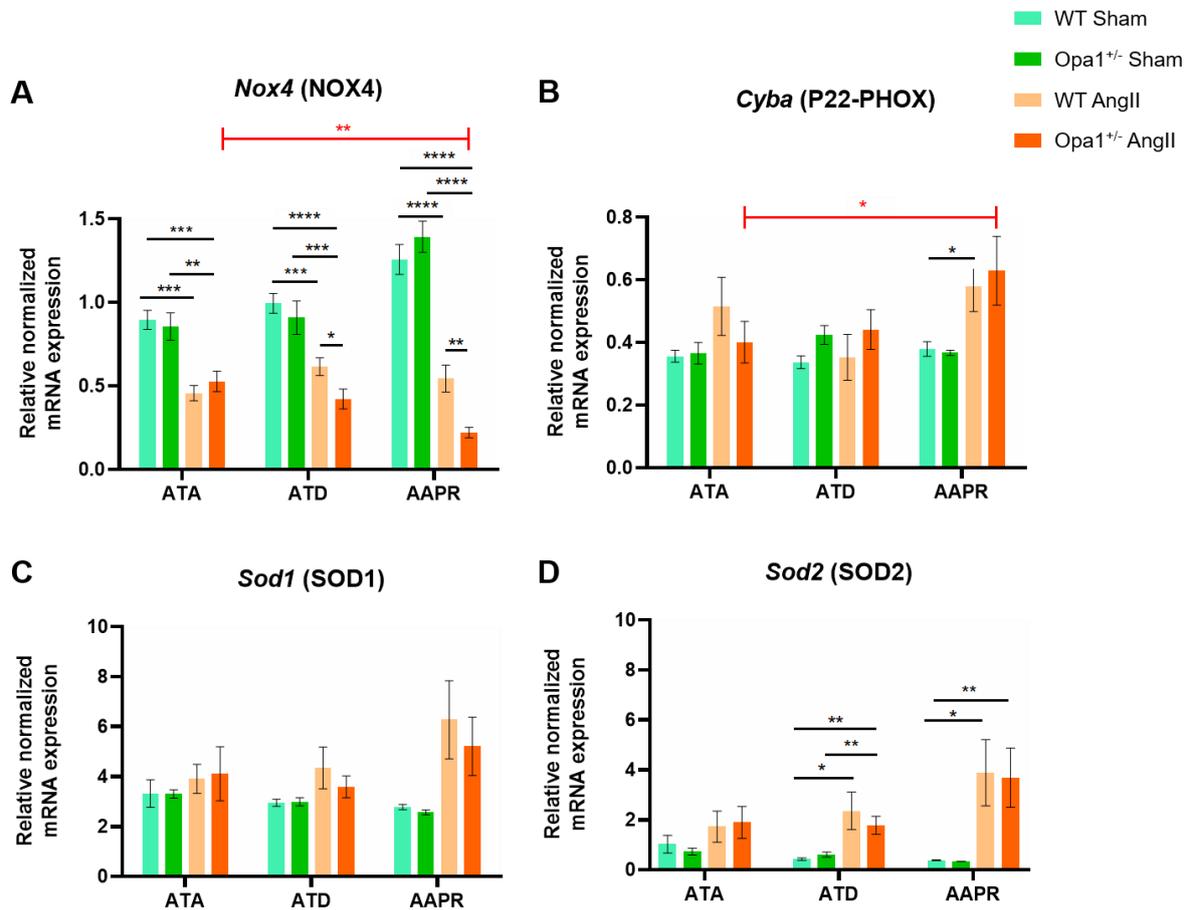
**Figure 41 : Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs de l'apoptose et de la survie cellulaire par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AApr des souris contrôles (WT) et *Opa1*<sup>+/-</sup> soumises à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham).** (A) *Bax* codant pour BAX, (B) *Cycs* codant pour le cytochrome c et (C) *Bcl2* codant pour BCL2. ( $n=5$  à  $8$ ). \* $p<0,05$  ; \*\* $p<0,01$  ; \*\*\* $p<0,001$ .

Le traitement hypertenseur provoque une augmentation significative de l'expression des gènes codant pour les protéines pro-apoptotiques BAX et le Cytochrome c dans l'ATD (*Bax* :  $10,79 \pm 0,76$  vs  $26,33 \pm 5,45$  ; *Cycs* :  $1,25 \pm 0,14$  vs  $4,72 \pm 1,36$ ) et l'AApr (*Bax* :  $9,81 \pm 0,62$  vs  $39,79 \pm 11,57$  ; *Cycs* :  $1,14 \pm 0,11$  vs  $7,87 \pm 2,56$ ) des animaux WT AngII et *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII (**Figure 41A-B**). En parallèle, on ne relève pas de modifications significatives de l'expression du gène codant pour la protéine anti-apoptotique *Bcl2* entre les différents groupes. En revanche, l'expression de *Bcl2* est significativement différente entre les trois localisations du groupe WT sham (ATA :  $0,42 \pm 0,10$  ; ATD :  $0,20 \pm 0,01$  ; AApr :  $0,20 \pm 0,02$ ) (**Figure 41C**).

On retrouve donc une augmentation de l'expression génique des marqueurs de l'apoptose des cellules vasculaires sans modification de l'expression du gène de survie *Bcl2*.

## h) Stress oxydant

Enfin, le stress oxydatif possède une importance majeure à la fois dans l'hypertension artérielle et dans les pathologies anévrismales. C'est pourquoi, nous avons quantifié l'expression génique de certaines sous-unités de la NADPH oxydase et des antioxydants tels que les SOD1 et 2.



**Figure 42 : Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs du stress oxydant par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AApr des souris contrôles (WT) et *Opa1*<sup>+/-</sup> soumises à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham).** (A) *Nox4* codant pour NOX4, (B) *Cyba* codant pour la sous-unité P22-PHOX de la NADPH oxydase, (C) *Sod1* codant pour SOD1 et (D) *Sod2* codant pour SOD2. (n=5 à 8). \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 ; \*\*\*\*p<0,0001.

Nous remarquons une diminution significative de l'expression de *Nox4* dépendante du traitement hypertenseur chez les souris contrôles à la fois dans l'ATA ( $2,00 \pm 0,36$  vs  $2,77 \pm 0,71$ ), l'ATD ( $1,25 \pm 0,36$  vs  $4,72 \pm 1,36$ ) et l'AApr ( $1,14 \pm 0,11$  vs  $7,87 \pm 2,56$ ). Cette diminution est significativement plus forte chez les souris *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII dans l'ATD ( $4,72 \pm 1,36$  vs  $3,71 \pm 0,56$ ) et l'AApr ( $7,87 \pm 2,56$  vs  $5,61 \pm 2,02$ ) (**Figure 42A**). A l'inverse, nous ne constatons pas de modification significative de l'expression de *Cyba* codant pour la sous-unité P22-PHOX de la NADPH oxydase, ni dans l'ATA ni dans l'ATD. L'expression de *Cyba* est cependant significativement augmentée dans l'AApr des animaux WT AngII ( $0,38 \pm 0,02$  vs  $0,58 \pm 0,08$ ) (**Figure 42B**).

En ce qui concerne les antioxydants, nous remarquons que l'expression de *Sod1* ne varie pas dans les trois localisations (**Figure 42C**). En revanche l'expression de *Sod2*, codant pour la SOD mitochondriale (MnSOD) permettant l'élimination des ROS mitochondriaux, est significativement augmentée dans l'ATD ( $0,42 \pm 0,05$  vs

2,37±0,75) et AApr (0,39±0,02 vs 3,89±1,33) des animaux contrôles. Cette augmentation d'expression est retrouvée de la même manière chez les animaux *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII (**Figure 42D**).

On retrouve donc une diminution de l'expression des gènes impliqués dans le stress oxydant associée à une augmentation de l'expression du gène codant pour la SOD mitochondriale.

### 3.3. Modèle anévrisimal (*Ldlr*<sup>-/-</sup>)

#### 3.3.1. Généralités

**Tableau 3 : Mesure de la masse des animaux, des cœurs, de la pression artérielle systolique et du taux de mortalité des souris LDLR<sup>-/-</sup> soumises à un régime normal (ND) ou enrichi en cholestérol (HFD) et à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham).** (n=3 à 68). \* indique une différence significative entre les groupes traités et contrôles respectifs. \$ indique une différence significative entre J0 et J28. £ indique une différence significative entre les groupes AngII ND et AngII HFD. \*, \$ ou £ p<0,05 ; \*\*ou \$\$ p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 ; \*\*\*\*p<0,0001. SBP : systolic blood pressure

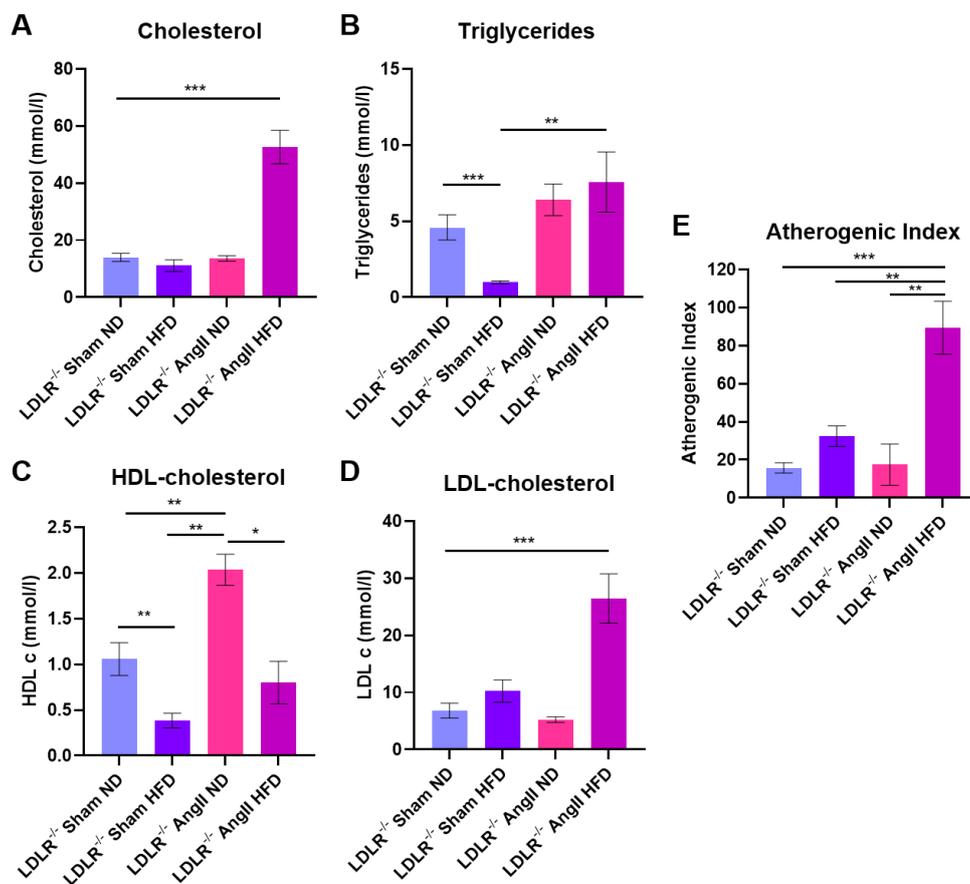
		LDLR <sup>-/-</sup> Sham ND	LDLR <sup>-/-</sup> Sham HFD	LDLR <sup>-/-</sup> AngII ND	LDLR <sup>-/-</sup> AngII HFD
Body weight (g)	J0	31,37 ± 0,60	31,65 ± 0,64	32,94 ± 1,19	31,70 ± 0,68
	J28	31,58 ± 0,62	28,79 ± 0,62*\$\$	30,98 ± 0,53	28,37 ± 0,55**\$\$\$
Heart weight / Body weight (g)	J28	0,47 ± 0,01	0,50 ± 0,01	0,57 ± 0,01***	0,60 ± 0,02****
SBP (mmHg)	J0	122 ± 6,76	120 ± 5,79	117 ± 2,77	125 ± 4,10
	J28	117 ± 4,30	118 ± 5,73	168 ± 2,69****\$\$\$	189 ± 6,88****\$\$\$£
Mortality (%)	J28	0	2,86	11,76	50****

De la même manière que pour le modèle de dysfonction mitochondriale (*Opa1*<sup>+/-</sup>), des mesures biométriques ont été effectuées (poids du cœur et de l'animal, pression artérielle systolique) durant tout le traitement et le pourcentage de mortalité a été quantifié (**Tableau 3**). A l'état basal, nous avons formé des groupes de poids homogènes, entre 31 et 32 g. Les groupes soumis à un régime alimentaire standard ne présentent pas de modification significative de masse corporelle. En revanche, le régime enrichi en cholestérol semble provoquer une perte de poids chez les animaux sham (31,65±0,64 g vs 28,79±0,62 g) et soumis au traitement hypertenseur (31,70±0,68 g vs 28,37±0,55 g). Le traitement hypertenseur, quant à lui, a induit une augmentation de la masse cardiaque des souris sous régime standard (0,47±0,01 g vs 0,57±0,01 g) et HFD (0,50±0,01 g vs 0,60±0,02 g). Cette augmentation se révèle identique entre les deux groupes, mettant en avant une hypertrophie cardiaque identique quel que soit le régime alimentaire des animaux. Par ailleurs, la pression artérielle des animaux s'est révélée homogène entre les quatre groupes à l'état basal. Le traitement hypertenseur a induit une augmentation significative de la PAS dans les groupes soumis à un régime standard (117±2,77 mmHg vs 168±2,69 mmHg) ou HFD (125±4,10 vs 189±6,88 mmHg). Cette augmentation de la PAS est significativement plus importante dans le modèle anévrisimal qu'en présence du traitement hypertenseur seul (168±2,69 vs 189±6,88 mmHg). Enfin, le régime HFD et le traitement hypertenseur seuls n'ont pas induit de variation significative de la mortalité des animaux. En revanche, le cumul des deux, pour recréer le modèle anévrisimal, provoque une mortalité de 50% des animaux par rupture aortique.

L'augmentation de la pression artérielle et de l'hypertrophie cardiaque est donc la même, quel que soit le régime alimentaire des animaux. En revanche, le modèle d'anévrisme aortique basé sur l'addition du régime HFD et du traitement hypertenseur chez les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> a provoqué une forte mortalité par rupture d'anévrisme ou de dissections aortique.

### 3.3.2. Bilan lipidique

Ce modèle étant décrit pour créer des anévrismes de l'aorte abdominale de type athéromateux, il nous a d'abord semblé important de réaliser un bilan lipidique des animaux de chaque groupe.



**Figure 43 : Bilan lipidique des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> soumises à un régime normal (ND) ou enrichi en cholestérol (HFD) et à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham).** Taux plasmatiques de (A) cholestérol total, (B) triglycérides, (C) HDL-cholestérol, (D) LDL-cholestérol et (E) indice d'athérogénicité. ( $n=4$  à 9). \* $p<0,05$  ; \*\* $p<0,01$  ; \*\*\* $p<0,001$ .

Nous remarquons d'abord que le régime HFD seul provoque une diminution significative des concentrations plasmatiques en triglycérides ( $4,58 \pm 0,83$  vs  $0,99 \pm 0,10$ ) et en HDL-cholestérol ( $1,06 \pm 0,18$  vs  $0,39 \pm 0,08$ ) (**Figure 43B-C**). A l'inverse, le traitement hypertenseur seul induit une augmentation significative du taux plasmatique en HDL-cholestérol ( $1,06 \pm 0,18$  vs  $2,03 \pm 0,17$ ) (**Figure 43C**). Le modèle anévrisimal basé sur l'addition du régime enrichi en cholestérol et du traitement hypertenseur provoque une augmentation significative du taux plasmatique en cholestérol ( $10,96 \pm 1,38$  vs  $52,58 \pm 5,84$ ) et LDL-cholestérol ( $6,82 \pm 1,29$  vs  $26,42 \pm 4,31$ ) (**Figure 43A-D**). Tous ces facteurs nous permettent de calculer l'indice d'athérogénicité que l'on trouve significativement augmenté dans

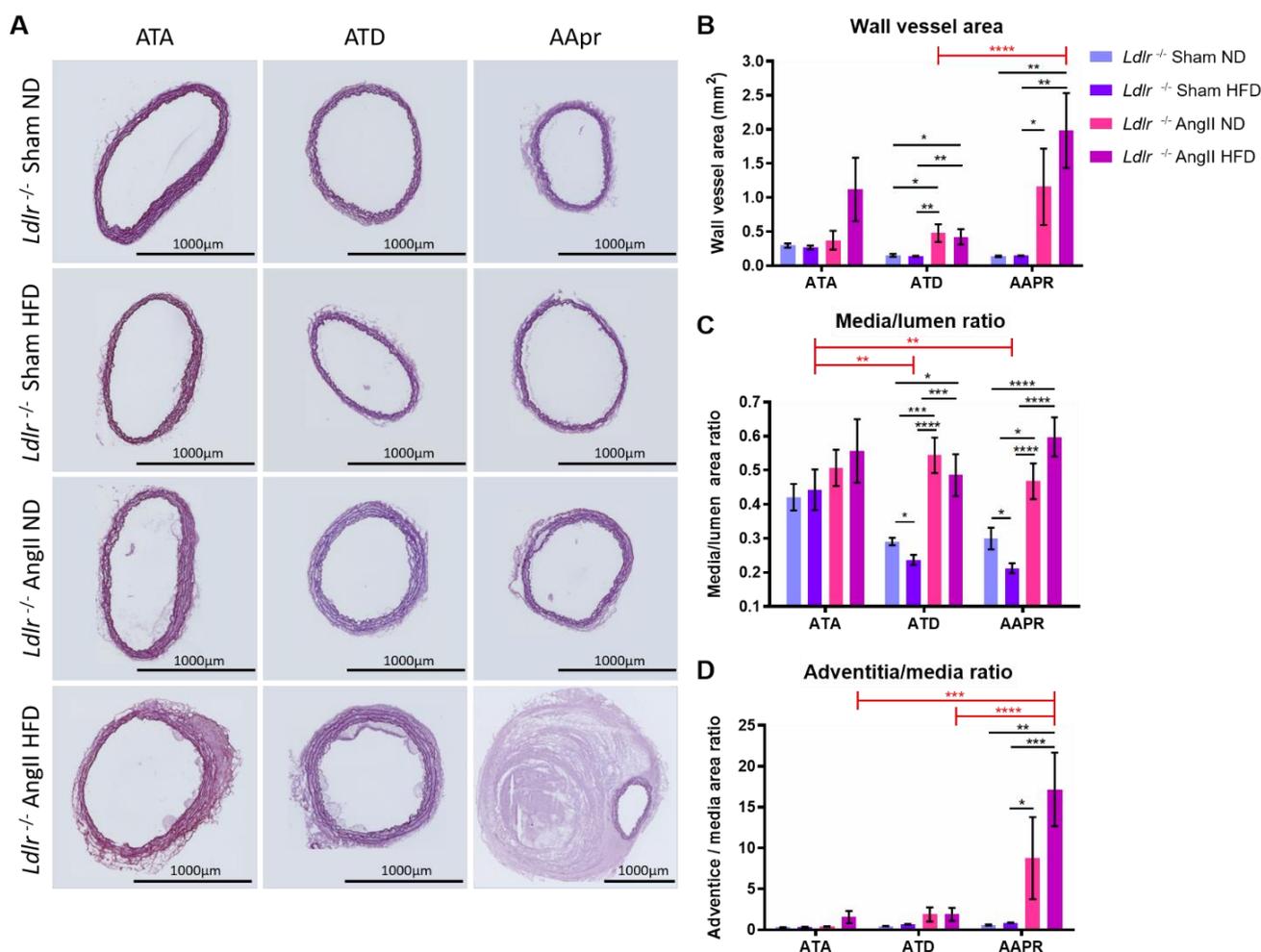
notre modèle d'anévrisme ( $15,72 \pm 2,68$  vs  $89,40 \pm 13,95$ ) (**Figure 43E**). Ceci prouve que ce modèle d'anévrisme aortique possède un risque athérogène important.

### 3.3.3. Validation du remodelage anévrismal

Avant d'analyser les variations d'expression des acteurs de la dynamique mitochondriale, il est important de confirmer la présence d'un remodelage anévrismal de l'aorte abdominale. Pour cela, nous avons d'abord réalisé des mesures histologiques, puis une l'analyse des modifications d'expression des gènes impliqués dans ce remodelage.

#### a) Remodelage pariétal et fibres élastiques

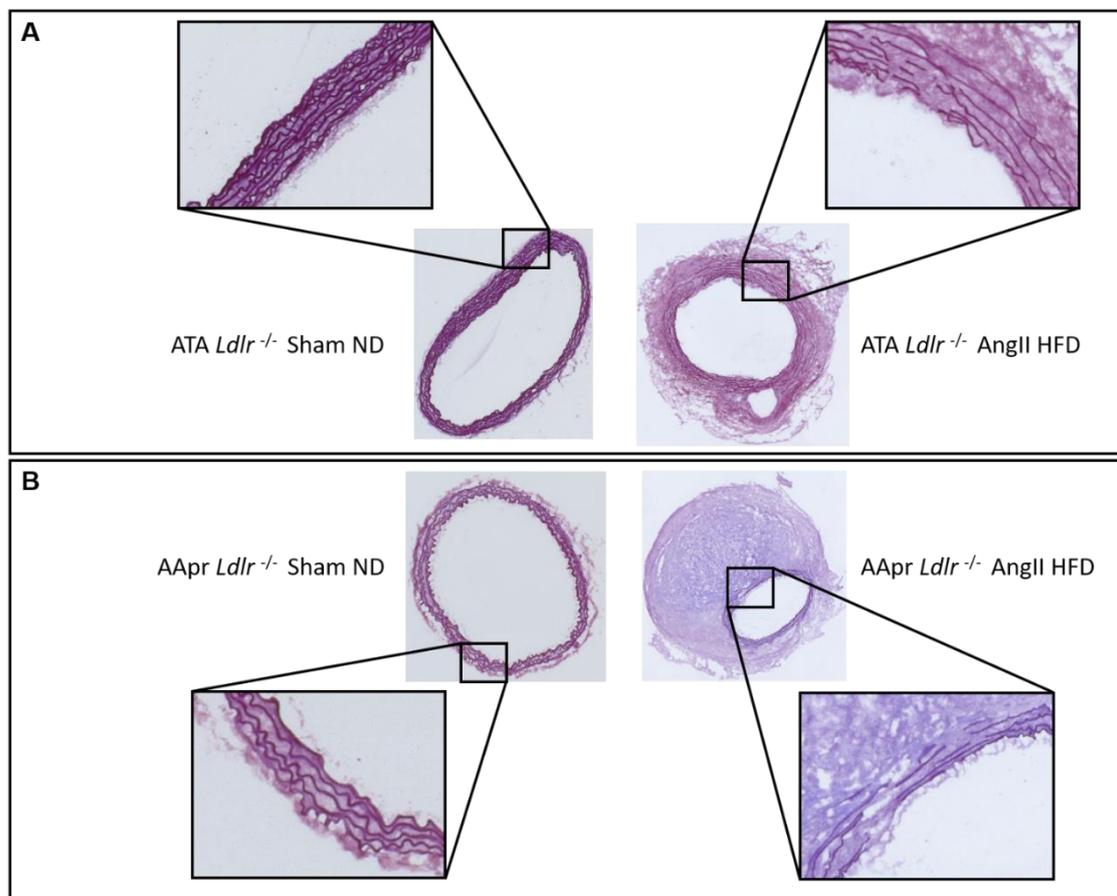
Les coupes d'aorte ont été colorées à l'orcéine afin de marquer les fibres élastiques. Le but de ce marquage est de mesurer les paramètres histomorphométriques, le remodelage de chaque segment aortique, et de quantifier la fragmentation de l'élastine.



**Figure 44 : Mesures histomorphométriques du remodelage aortique des ATA, ATD et AApr de souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> soumises à un régime normal (ND) ou enrichi en cholestérol (HFD) et à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham).** (A) Coupes histologiques colorées à l'orcéine, (B) aire totale, (C) ratio média/lumière et (D) ratio adventice/lumière. ( $n=3$  à  $11$ ). \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$  ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Bien que non significative ( $p=0,054$ ), nous remarquons une augmentation de l'aire pariétale totale dans l'ATA des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> AngII HFD. En parallèle nous relevons une augmentation significative de l'aire pariétale totale dans l'ATD ( $0,15\pm0,02$  mm<sup>2</sup> vs  $0,48\pm0,13$  mm<sup>2</sup>) et l'AApr ( $0,14\pm0,01$  mm<sup>2</sup> vs  $1,16\pm0,56$  mm<sup>2</sup>) dépendante du traitement hypertenseur. Cette augmentation de l'aire totale est encore plus importante dans l'AApr des animaux *Ldlr*<sup>-/-</sup> AngII HFD ( $0,14\pm0,01$  mm<sup>2</sup> vs  $1,98\pm0,55$  mm<sup>2</sup>) créant alors un déséquilibre de cette aire entre l'ATD et l'AApr de ces animaux ( $0,42\pm0,11$  mm<sup>2</sup> vs  $1,98\pm0,55$  mm<sup>2</sup>) (**Figure 44B**). En s'attardant plus précisément sur le ratio média/lumière qui représente l'hypertrophie médiaie, nous remarquons une augmentation significative de cette hypertrophie dans l'ATD ( $0,29\pm0,01$  vs  $0,54\pm0,05$ ) et l'AApr ( $0,30\pm0,03$  vs  $0,47\pm0,05$ ), dépendante du traitement hypertenseur. *A contrario*, le régime enrichi en cholestérol provoque une diminution significative du ratio média/lumière dans l'ATD ( $0,29\pm0,01$  vs  $0,24\pm0,02$ ) et l'AApr ( $0,30\pm0,03$  vs  $0,21\pm0,02$ ) (**Figure 44C**). Le cumul du traitement hypertenseur et du régime HFD provoque une hypertrophie aortique dans ces deux localisations qui est similaire à celle retrouvée avec le traitement hypertenseur seul. En parallèle, le ratio adventice/média, représentant le remodelage adventiciel, révèle une augmentation significative de l'aire adventicielle dans l'AApr des animaux sous traitement hypertenseur seul ( $0,58\pm0,08$  vs  $8,76\pm5,02$ ) ou additionné avec le régime HFD ( $0,58\pm0,08$  vs  $17,17\pm4,51$ ) (**Figure 44D**).

L'augmentation de l'aire totale dans l'ATD est donc principalement liée à l'hypertrophie médiaie provoquée par le traitement hypertenseur. L'augmentation de l'aire totale dans l'AApr des animaux placés sous régime hypertenseur est due à la fois à une hypertrophie de la média mais aussi à l'augmentation de l'aire adventicielle.



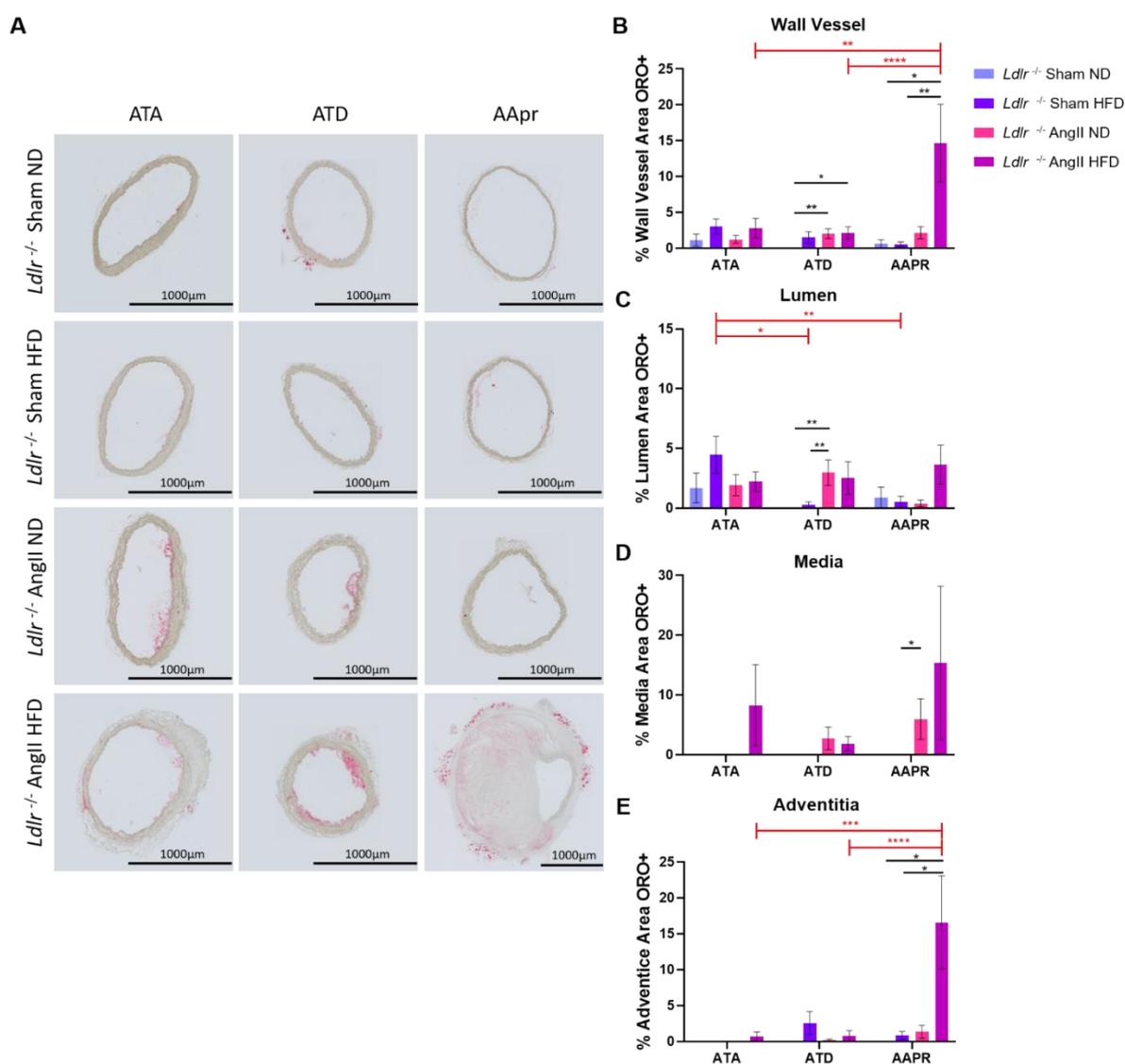
**Figure 45 : Structure des fibres élastiques de l'ATA (A) et l'AApr (B) de souris contrôles (*Ldlr*<sup>-/-</sup> sham ND) et anévrismales (*Ldlr*<sup>-/-</sup> AngII HFD).**

En plus du remodelage pariétal, nous avons aussi mis en évidence une dégradation des lames élastiques dans le modèle anévrisimal à la fois dans l'ATA et l'AApr (**Figure 45**). On observe donc, un remodelage adventitial accompagné d'une dégradation des fibres élastiques à l'intérieur même de la média aortique.

Toutes ces informations prouvent que ce modèle est bien un modèle d'anévrisme de l'aorte abdominale et dans une moindre mesure, de l'ATA.

### b) Dépôts lipidiques pariétaux

L'anévrisme de l'aorte abdominale est principalement de type athéromateux. C'est pourquoi, il nous a semblé indispensable de mesurer les dépôts lipidiques dans les différents compartiments vasculaires par une coloration à l'Oil-Red-O.



**Figure 46 : Coloration Oil-Red-O des ATA, ATD et AAPR des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> soumises à un régime normal (ND) ou enrichi en cholestérol (HFD) et à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham).** (A) Coupes histologiques colorées à l'Oil-Red-O, mesure de l'aire positive d'Oil-red-o dans (B) le vaisseau entier, (C) la lumière, (D) la média et (E) l'adventice. ( $n=3$  à  $11$ ). \* $p<0,05$  ; \*\* $p<0,01$  ; \*\*\* $p<0,001$  ; \*\*\*\* $p<0,0001$ .

Nous avons mesuré le pourcentage de coloration sur l'aire totale du vaisseau ainsi que dans chaque compartiment artériel. Dans un premier temps, nous avons relevé une augmentation significative du marquage dans l'ATD des animaux traités avec de l'angiotensine II (0 vs  $2,04 \pm 0,68$ ). La variation la plus importante se situe dans l'AApr des animaux *Ldlr*<sup>-/-</sup> AngII HFD qui est significativement augmentée par rapport aux groupes sham ( $0,6 \pm 0,6$  vs  $14,68 \pm 5,42$ ), mais aussi par rapport aux deux autres localisations du même groupe (ATA :  $2,81 \pm 1,36$  ; ATD :  $2,16 \pm 0,84$  ; AApr :  $14,68 \pm 5,42$ ) (**Figure 46B**). En décomposant les trois localisations artérielles, nous remarquons d'abord une augmentation des plaques lipidiques dans la lumière aortique de l'ATD des animaux sous régime hypertenseur (0 vs  $2,97 \pm 1,06$ ). De plus, chez les animaux *Ldlr*<sup>-/-</sup> sham HFD, nous avons relevé une quantité de dépôts lipidiques significativement augmentée par rapport aux deux autres localisations (ATA :  $4,47 \pm 1,55$  ; ATD :  $0,26 \pm 0,26$  ; AApr :  $0,50 \pm 0,50$ ) (**Figure 46C**). Dans la média, nous relevons uniquement une augmentation de la coloration dans l'AApr des animaux *Ldlr*<sup>-/-</sup> AngII ND (0 vs  $5,93 \pm 3,40$ ) (**Figure 46D**). C'est dans l'adventice que nous observons les plus grandes variations. Tout comme dans la paroi aortique totale, nous retrouvons une augmentation significative des dépôts lipidiques dans l'adventice des AApr des animaux *Ldlr*<sup>-/-</sup> AngII HFD (0 vs  $16,57 \pm 6,49$ ) (**Figure 46E**).

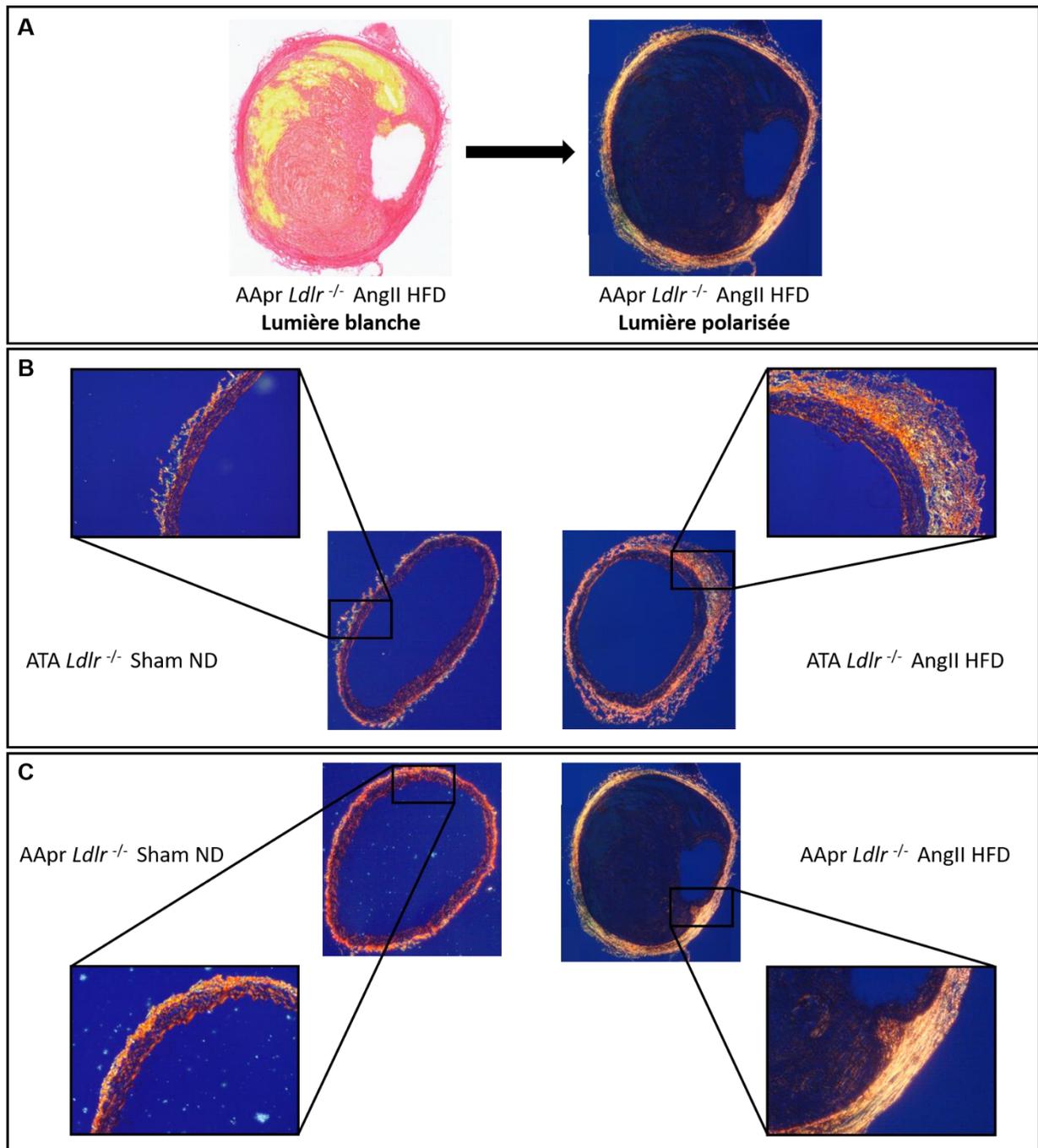
Ainsi, l'augmentation des dépôts lipidiques dans la paroi aortique est située dans l'AApr des animaux *Ldlr*<sup>-/-</sup> AngII HFD et est localisée dans l'adventice de ces derniers.

### c) Collagène pariétal

Le marquage au rouge sirius a été réalisé dans le but de quantifier les modifications pariétales de collagène. L'utilisation de lumières blanche et polarisée ont d'abord permis de visualiser la répartition du collagène dans la paroi aortique (**Figure 47**). La lumière polarisée permet la visualisation du collagène de type I en jaune-rouge et le collène de type III en vert.

La lumière blanche donne l'impression d'une répartition quasi homogène dans toute la paroi artérielle alors que la lumière polarisée met en avant une localisation adventitielle du collagène (**Figure 47B-C**). Dans notre modèle d'anévrisme de l'aorte abdominale nous remarquons que le collagène se situe principalement en périphérie de l'AApr, principalement dans le but de prévenir le risque de rupture aortique (**Figure 47C**).

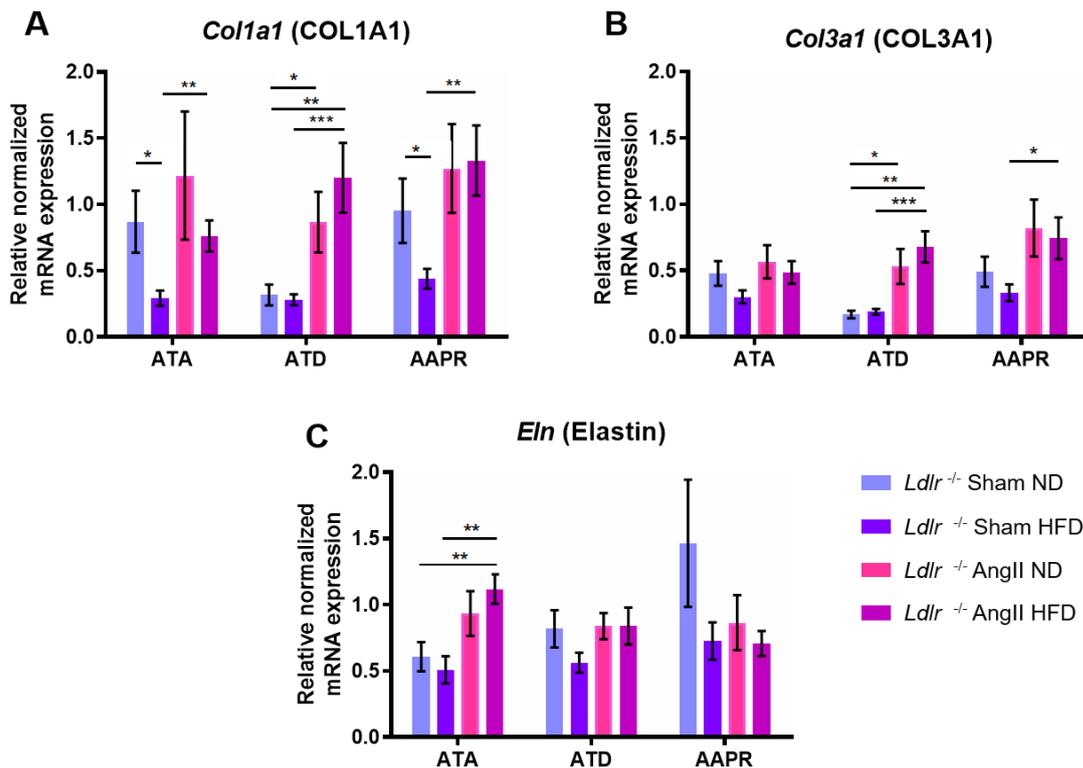
L'algorithme en cours d'élaboration nous permettra de préciser les modifications pariétales d'expression du collagène de type I et de type III, ainsi que l'alignement et l'orientation des fibres de collagène au sein de chaque artère.



**Figure 47 : Coloration au rouge sirius. Comparaison des lumières blanche et polarisée (A), coloration en lumière polarisée de l'ATA (B) et l'AApr (C) de souris contrôles (*Ldlr*<sup>-/-</sup> sham ND) et anévrismales (*Ldlr*<sup>-/-</sup> AngII HFD).**

#### **d) Composants de la matrice extracellulaire**

Après avoir validé notre modèle du point de vue histomorphométrique, nous avons quantifié l'expression génique de différents marqueurs de la MEC et sa dégradation, de la contraction cellulaire, de l'apoptose et du stress oxydant retrouvés dans l'anévrisme aortique.



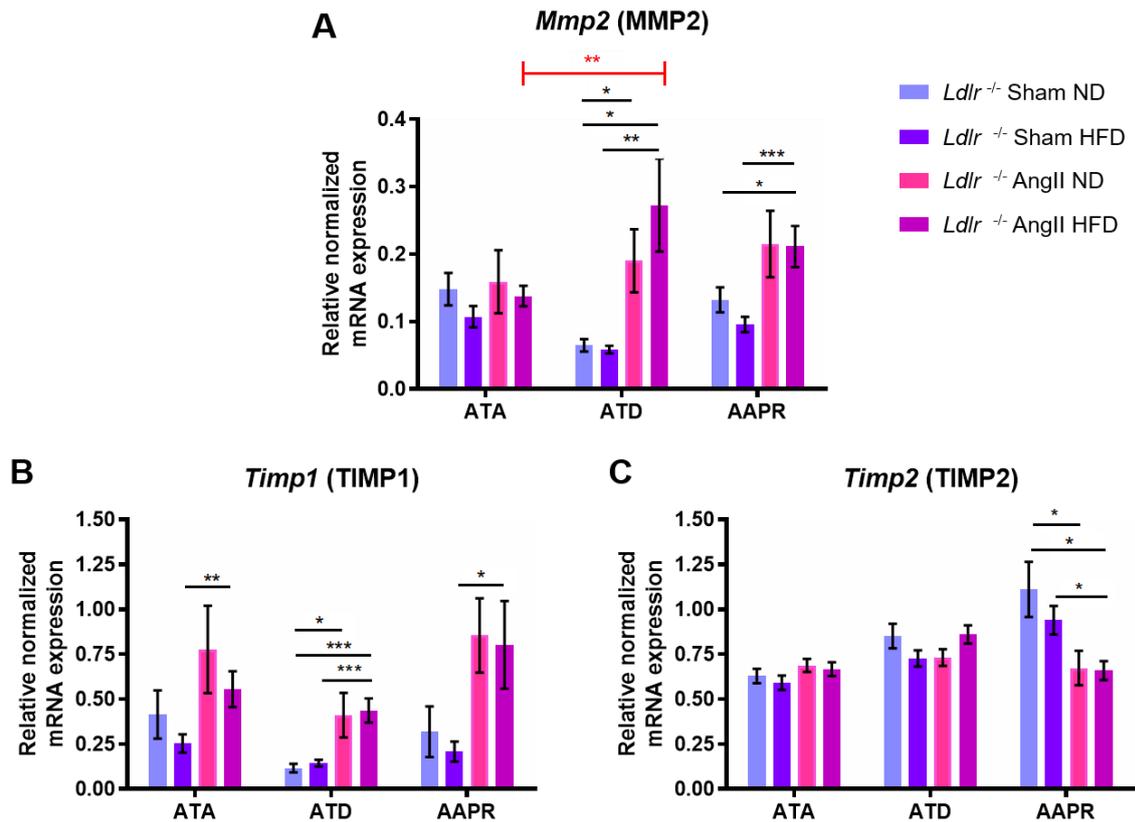
**Figure 48 : Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs de la matrice extracellulaire par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AApr des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> soumises à un régime normal (ND) ou enrichi en cholestérol (HFD) et à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). (A) *Col1a1* codant pour le collagène de type I, (B) *Col3a1* codant pour le collagène de type III et (C) *Eln* codant pour l'élastine. ( $n=5$  à  $11$ ). \* $p<0,05$  ; \*\* $p<0,01$  ; \*\*\* $p<0,001$ .**

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux gènes codant pour les principaux composants de la MEC : le collagène (*Col1a1* et *Col3a1*) et l'élastine (*Eln*). On remarque ici une augmentation de l'expression du collagène de type 1 dans l'ATD ( $0,32\pm 0,08$  vs  $0,87\pm 0,23$ ) et l'AApr ( $0,95\pm 0,24$  vs  $1,27\pm 0,33$ ) dépendante du traitement hypertenseur, mais identique quel que soit le régime alimentaire. Le régime enrichi en cholestérol seul provoque une diminution significative de l'expression de *Col1a1* dans l'ATA ( $0,87\pm 0,23$  vs  $0,29\pm 0,06$ ) et l'AApr ( $0,95\pm 0,24$  vs  $0,44\pm 0,07$ ) (**Figure 48A**). L'expression de *Col3a1* est significativement augmentée dans l'ATD ( $0,17\pm 0,03$  vs  $0,53\pm 0,13$ ) avec le traitement hypertenseur (**Figure 48B**). En parallèle, si ce dernier provoque l'augmentation de l'expression de l'élastine dans l'ATA ( $0,61\pm 0,11$  vs  $0,93\pm 0,17$ ) quel que soit le régime alimentaire, il n'a pas d'effet sur l'ATD et l'AApr (**Figure 48C**).

En résumé, on retrouve donc une augmentation de l'expression des gènes codant pour les collagènes de type I et III, sans modification de l'expression de l'élastine dans l'ATD et l'AApr dépendante du traitement hypertenseur.

### e) Dégradation de la matrice extracellulaire

Après les composants de la MEC, nous nous sommes attardés sur sa dégradation en quantifiant l'expression génique de *Mmp2* et de *Timp1* et *Timp2*.



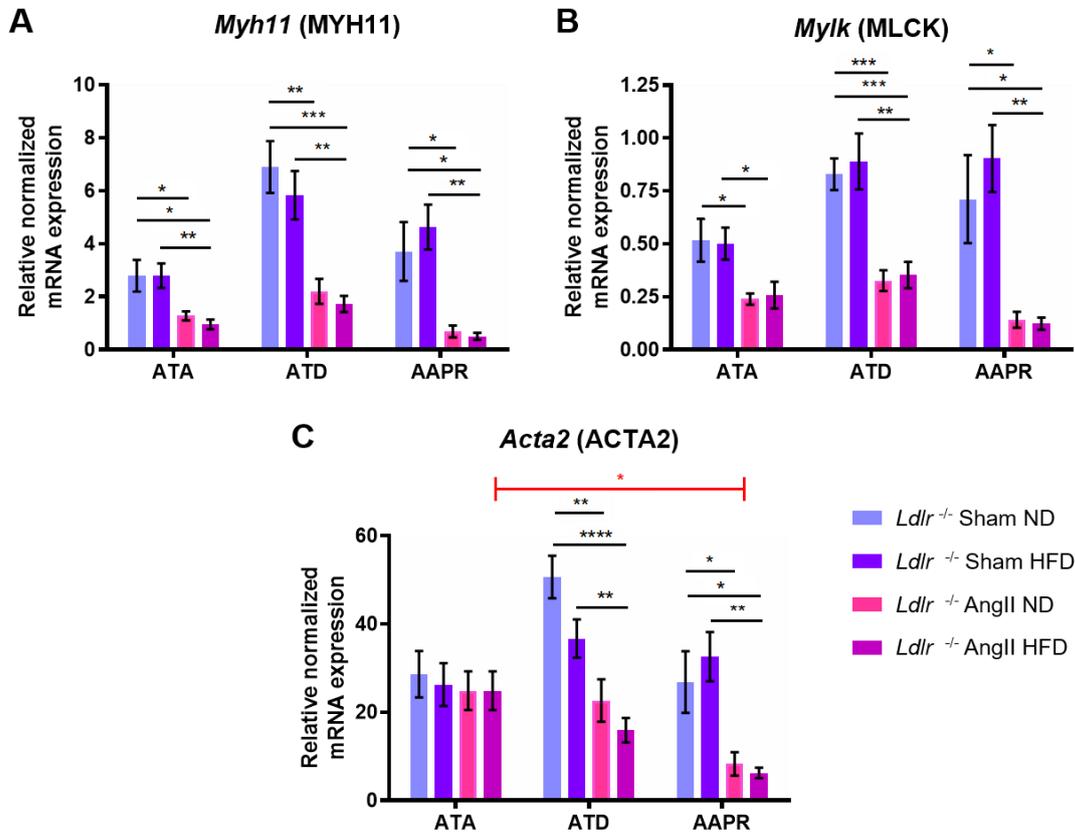
**Figure 49** : Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs de la dégradation de la MEC par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AApr des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> soumises à un régime normal (ND) ou enrichi en cholestérol (HFD) et à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). (A) *Mmp2* codant pour MMP2, (B) *Timp1* codant pour TIMP1, (C) *Timp2* codant pour TIMP2. ( $n=5$  à  $11$ ). \* $p<0,05$  ; \*\* $p<0,01$  ; \*\*\* $p<0,001$ .

Nous remarquons une augmentation de l'expression de *Mmp2* dans l'ATD ( $0,07\pm0,01$  vs  $0,19\pm0,05$ ) et l'AApr ( $0,13\pm0,02$  vs  $0,22\pm0,05$ ) dépendante du traitement hypertenseur. Cette augmentation d'expression de *Mmp2*, qui est identique entre les animaux ND AngII et HFD AngII génère cependant une variation significative de son expression entre l'ATA ( $0,14\pm0,02$ ) et l'ATD ( $0,27\pm0,07$ ) des animaux *Ldlr*<sup>-/-</sup> HFD AngII (**Figure 49A**). En ce qui concerne les inhibiteurs des métalloprotéinases, nous observons d'abord une augmentation significative de l'expression de *Timp1* dans l'ATD des animaux ND AngII ( $0,065\pm0,01$  vs  $0,19\pm0,05$ ) et HFD AngII ( $0,06\pm0,01$  vs  $0,27\pm0,07$ ). Dans l'ATA et l'AApr, cette augmentation est retrouvée uniquement entre les deux groupes sous régime HFD (ATA :  $0,11\pm0,02$  vs  $0,14\pm0,02$  ; AApr :  $0,10\pm0,01$  vs  $0,21\pm0,03$ ) (**Figure 49B**). A l'inverse, nous ne retrouvons aucune variation de l'expression de *Timp2* dans l'ATA et l'ATD, mais son expression est diminuée significativement dans l'AApr ( $1,11\pm0,15$  vs  $0,67\pm0,10$ ), diminution dépendante du traitement hypertenseur et non du régime alimentaire (**Figure 49C**).

Nous retrouvons donc une augmentation de l'expression de *Mmp2* dans l'ATD et l'AApr, dépendante du traitement à l'AngII et qui est contrebalancée par l'augmentation de l'expression de *Timp1* mais pas de *Timp2*.

## f) Acteurs de la contraction cellulaire

Après s'être penché sur le remodelage de la MEC, nous avons choisi d'étudier l'expression des acteurs de la contraction cellulaire, qui ont été décrits comme étant diminué dans l'anévrisme aortique.

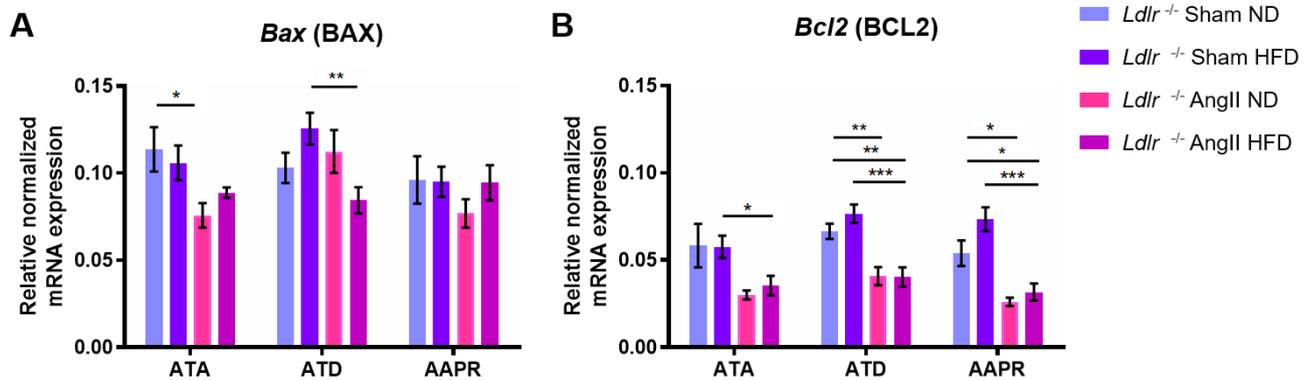


**Figure 50 : Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs de la contraction cellulaire par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AApr des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> soumises à un régime normal (ND) ou enrichi en cholestérol (HFD) et à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham).** (A) *Myh11* codant pour MYH11, (B) *Mylk* codant pour MLCK et (C) *Acta2* codant pour ACTA2. (n=5 à 11). \**p*<0,05 ; \*\**p*<0,01 ; \*\*\**p*<0,001 ; \*\*\*\**p*<0,0001.

Nous relevons ici une diminution significative de l'expression de *Myh11* et *Mylk* dans l'ATA (*Myh11* :  $2,80 \pm 0,60$  vs  $1,28 \pm 0,17$  ; *Mylk* :  $0,52 \pm 0,10$  vs  $0,24 \pm 0,03$ ), l'ATD (*Myh11* :  $6,90 \pm 0,98$  vs  $2,20 \pm 0,47$  ; *Mylk* :  $0,83 \pm 0,07$  vs  $0,33 \pm 0,05$ ) et l'AApr (*Myh11* :  $3,72 \pm 1,11$  vs  $0,69 \pm 0,23$  ; *Mylk* :  $0,71 \pm 0,21$  vs  $0,14 \pm 0,04$ ) dépendante du traitement hypertenseur (**Figure 50A-B**). On remarque aussi une diminution de l'expression d'*Acta2* dans l'ATD ( $50,67 \pm 4,81$  vs  $22,66 \pm 4,80$ ) et l'AApr ( $26,85 \pm 6,99$  vs  $8,30 \pm 2,66$ ), également dépendante de l'AngII. Cette diminution de l'expression d'*Acta2* dans l'AApr induit une différence significative de son expression entre l'ATA et l'AApr des animaux *Ldlr*<sup>-/-</sup> AngII HFD ( $24,89 \pm 4,37$  vs  $15,94 \pm 2,78$ ) (**Figure 50C**). Dans tous les cas, le régime riche en cholestérol n'a pas d'effet sur l'expression des gènes impliqués dans la contraction des CML. Nous avons donc mis en évidence une diminution de l'expression des gènes codant pour les protéines de la contraction cellulaire dans l'anévrisme, diminution qui est dépendante du traitement hypertenseur.

### g) Apoptose et survie cellulaire

Cette diminution de la transcription des acteurs de la contractilité cellulaire étant étroitement liée à l'apoptose des CML dans l'anévrisme, nous avons ensuite quantifié l'expression génique des marqueurs de l'apoptose et de la survie cellulaire.



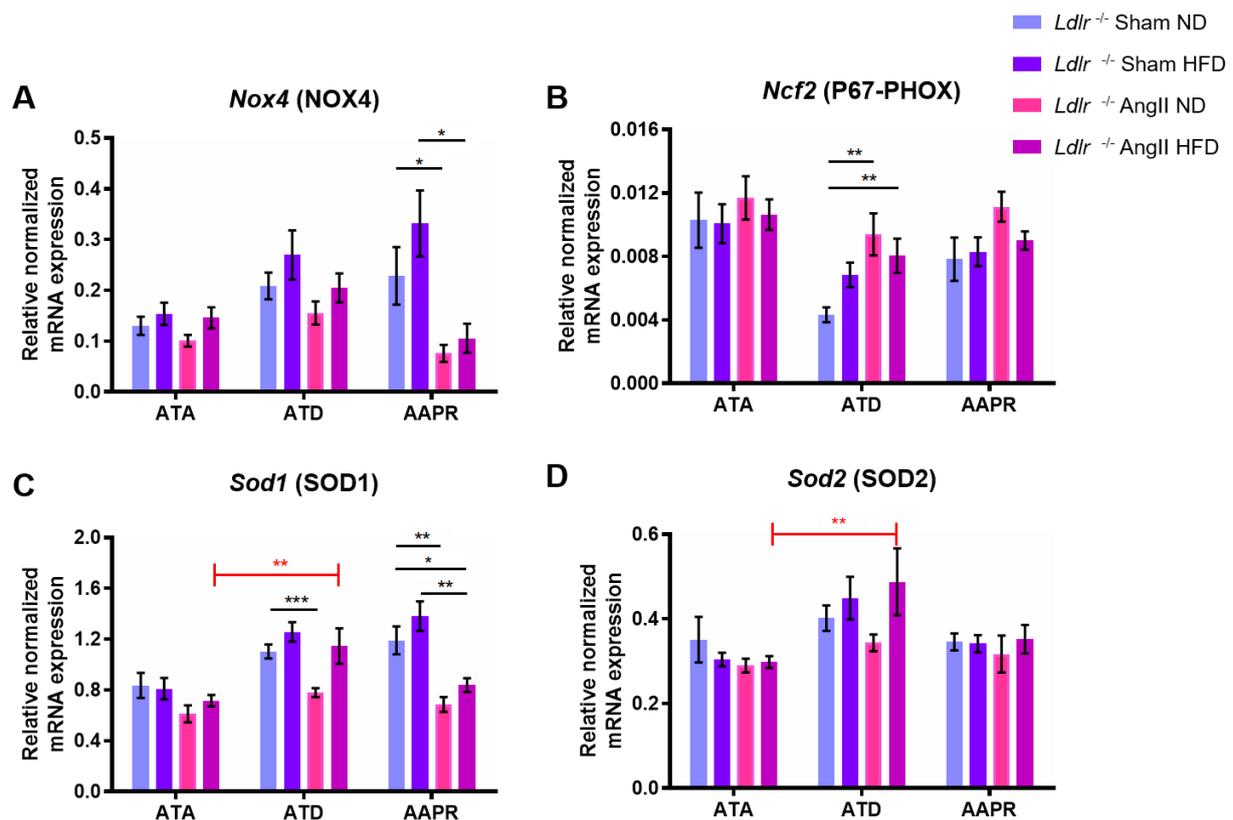
**Figure 51 : Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs de l'apoptose et de la survie cellulaire par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AAPR des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> soumises à un régime normal (ND) ou enrichi en cholestérol (HFD) et à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). (A) *Bax* codant pour BAX et (B) *Bcl2* codant pour BCL2. ( $n=5$  à  $11$ ). \* $p<0,05$  ; \*\* $p<0,01$  ; \*\*\* $p<0,001$ .**

Dans un premier temps, nous remarquons peu de variation de l'expression du gène pro-apoptotique *Bax* dans les trois localisations. Le traitement hypertenseur seul induit une diminution de son expression dans l'ATA ( $0,11\pm 0,01$  vs  $0,076\pm 0,01$ ). De plus, le cumul du traitement hypertenseur et du régime hypercholestérolémiant provoque une diminution significative de l'expression de *Bax* dans l'ATD par rapport au régime HFD seul ( $0,13\pm 0,01$  vs  $0,08\pm 0,01$ ) (**Figure 51A**). A l'inverse, nous avons relevé une diminution significative de l'expression du gène anti-apoptotique *Bcl2* dans l'ATD ( $0,07\pm 0,00$  vs  $0,04\pm 0,01$ ) et l'AAPR ( $0,05\pm 0,01$  vs  $0,03\pm 0,00$ ) dépendante du traitement hypertenseur. Cette diminution est la même quel que soit le régime alimentaire des animaux. Dans l'ATA, on relève une diminution significative de l'expression de *Bcl2* entre les deux groupes placés sous régime HFD ( $0,06\pm 0,01$  vs  $0,04\pm 0,01$ ) (**Figure 51B**).

Nous savons donc qu'il y a peu de variations d'expression du gène pro-apoptotique *Bax* mais bien une diminution significative de l'expression du gène *Bcl2*, lié à la survie cellulaire.

### h) Stress oxydant

Enfin, du fait de l'importance du stress oxydatif dans la pathologie anévrismale, nous nous sommes attachés sur l'étude de l'expression génique de certaines sous-unités de la NADPH oxydase, *Nox4* et *Ncf2* et des antioxydants, *Sod1* et *Sod2*.



**Figure 52 : Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs du stress oxydant par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AApr des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> soumises à un régime normal (ND) ou enrichi en cholestérol (HFD) et à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham).** (A) *Nox4* codant pour NOX4, (B) *Ncf2* codant pour la sous-unité P67-PHOX de la NADPH oxydase, (C) *Sod1* codant pour SOD1 et (D) *Sod2* codant pour SOD2. ( $n=5$  à  $11$ ). \* $p<0,05$  ; \*\* $p<0,01$  ; \*\*\* $p<0,001$ .

Nous remarquons une diminution de l'expression de *Nox4* uniquement au niveau de l'AApr ( $0,23\pm 0,06$  vs  $0,08\pm 0,02$ ) qui est dépendante du traitement hypertenseur (**Figure 52A**). A l'inverse, nous constatons une augmentation significative de l'expression de *Ncf2* codant pour la sous-unité P67PHOX de la NADPH oxydase dans l'ATD ( $0,004\pm 0,00$  vs  $0,01\pm 0,00$ ), dépendante également du traitement à l'AngII (**Figure 52B**). En ce qui concerne les antioxydants, nous observons une diminution de l'expression de *Sod1* dans l'ATD ( $1,10\pm 0,06$  vs  $0,78\pm 0,04$ ) et l'AApr ( $1,19\pm 0,11$  vs  $0,69\pm 0,06$ ) entre les deux groupes sous régime standard. Dans l'AApr des animaux dit anévrismaux, on retrouve aussi une diminution significative de l'expression de la *Sod1* ( $1,19\pm 0,11$  vs  $0,84\pm 0,06$ ) (**Figure 52C**). Enfin, cette étude révèle une différence significative d'expression de *Sod1* ( $0,72\pm 0,05$  vs  $1,15\pm 0,14$ ) et de *Sod2* ( $0,30\pm 0,01$  vs  $0,49\pm 0,08$ ) entre l'ATA et l'ATD de notre modèle d'anévrisme (**Figure 52C-D**). Nous retrouvons donc des modifications variables de l'expression des sous-unités de la NADPH oxydase et des antioxydants qu'il reste encore à confirmer.

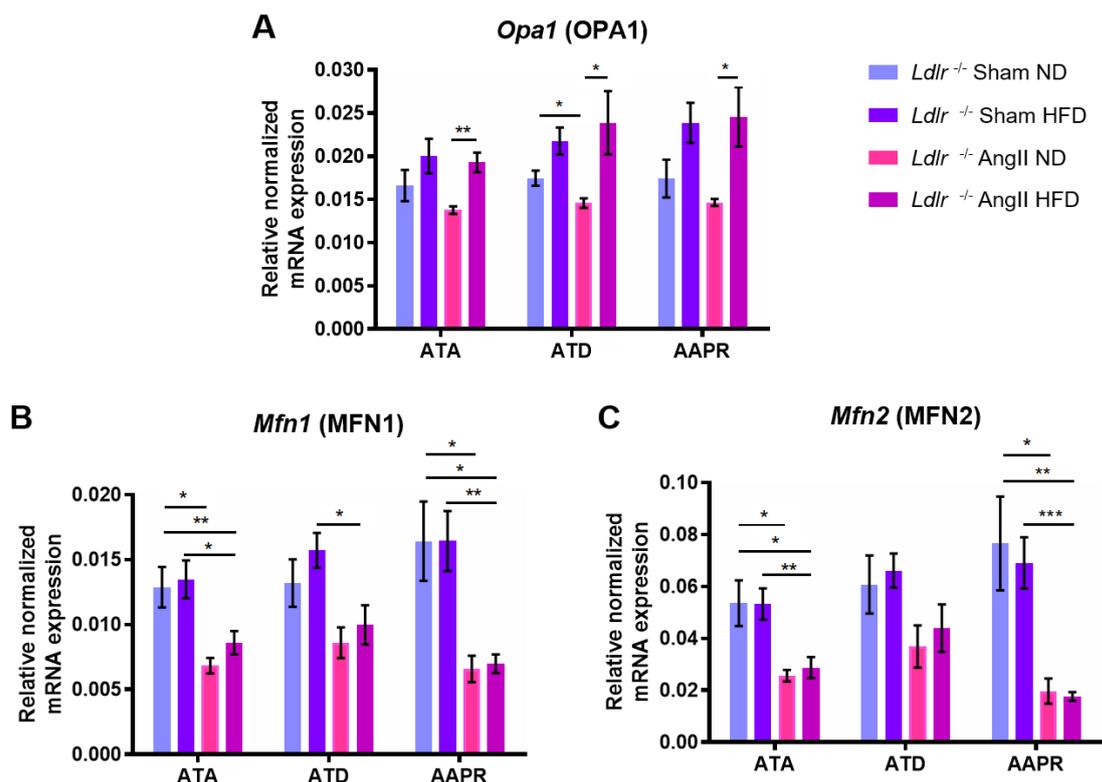
### 3.3.4. Etude de l'homéostasie mitochondriale

Après avoir validé notre modèle en étudiant les modifications pariétales des trois localisations aortiques subissant des remodelages anévrismaux ou disséquants, nous nous sommes consacrés à l'étude de la dynamique

mitochondriale dans ces pathologies. Pour cela, nous avons d'abord réalisé une étude transcriptomique dans le but de quantifier l'expression des gènes codant pour la dynamique et la biogénèse mitochondriales.

### a) Fusion mitochondriale

Dans un premier temps, nous avons étudié les modifications d'expression des gènes impliqués dans la fusion mitochondriale : *Opa1*, *Mfn1* et *Mfn2*.



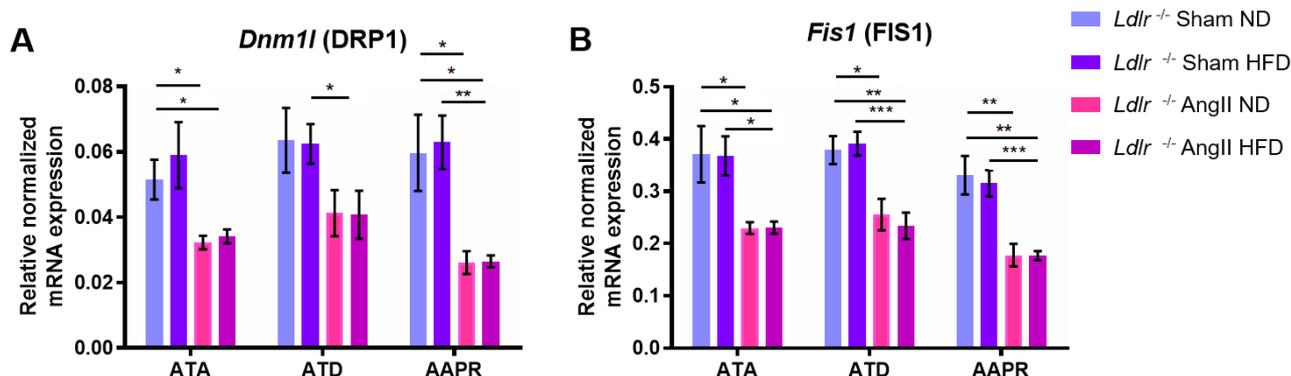
**Figure 53 : Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs de la fusion mitochondriale par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AApr des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> soumises à un régime normal (ND) ou enrichi en cholestérol (HFD) et à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham).** (A) *Opa1* codant pour OPA1, (B) *Mfn1* codant pour la mitofusine 1 et (C) *Mfn2* codant pour la mitofusine 2. (n=5 à 11). \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001.

A l'état basal, le régime enrichi en cholestérol seul ne joue pas sur l'expression des gènes de fusion mitochondriale. A l'inverse, le traitement hypertenseur seul provoque une diminution significative de l'expression d'*Opa1* dans l'ATD (0,017±0,001 vs 0,015±0,001) et une diminution de l'expression des mitofusines dans l'ATA (*Mfn1* : 0,013±0,002 vs 0,007±0,001; *Mfn2* : 0,054±0,009 vs 0,026±0,002) et dans l'AApr (*Mfn1* : 0,016±0,003 vs 0,007±0,001 ; *Mfn2* : 0,077±0,018 vs 0,020±0,005). Le cumul du traitement hypertenseur et du régime HFD dans ce modèle d'anévrisme aortique provoque les mêmes variations de l'expression de *Mfn1* et *Mfn2* qu'avec l'angiotensine II seule. En revanche, il ne provoque pas les mêmes variations de l'expression d'*Opa1*, induisant alors un déséquilibre dans son expression entre les deux groupes sous traitement hypertenseur dans l'ATA (0,014±0,001 vs 0,019±0,001), l'ATD (0,015±0,001 vs 0,024±0,004) et l'AApr (0,015±0,001 vs 0,025±0,003).

(Figure 53). Il y a donc bien des variations de la fusion mitochondriale dans le modèle anévrismal que nous utilisons qui sont plus ou moins dépendantes du régime enrichi en cholestérol ou du traitement hypertenseur.

## b) Fission mitochondriale

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les variations d'expression des deux acteurs principaux de la fission mitochondriale : *Dnm1l* codant pour DRP1 et *Fis1* codant pour FIS1.

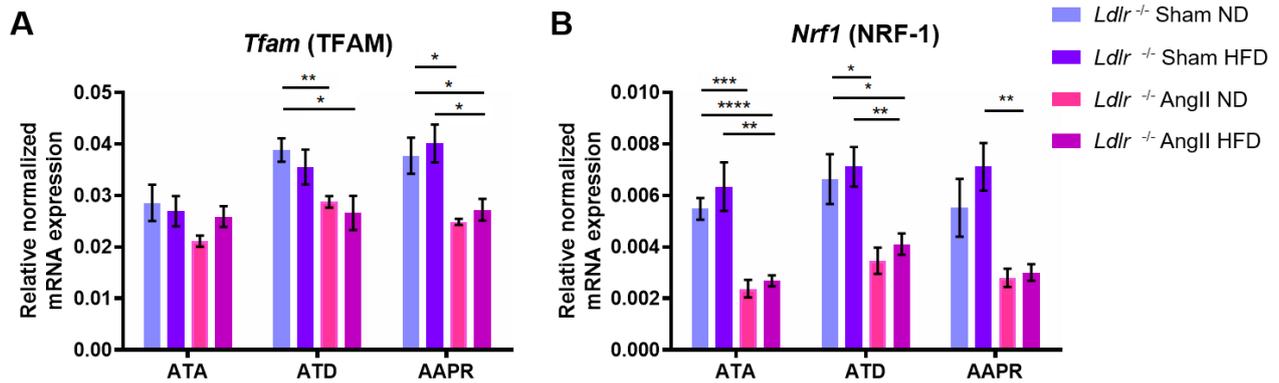


**Figure 54 : Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs de la fission mitochondriale par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AApr des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> soumises à un régime normal (ND) ou enrichi en cholestérol (HFD) et à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham).** (A) *Dnm1l* codant pour DRP1 et (B) *Fis1* codant pour FIS1. ( $n=5$  à  $11$ ). \* $p<0,05$  ; \*\* $p<0,01$  ; \*\*\* $p<0,001$ .

Dans le cas de la fission mitochondriale le régime HFD n'a aucun effet sur l'expression de *Dnm1l* et *Fis1* dans les trois localisations. En revanche, il y a un effet direct du traitement hypertenseur. En effet, ce dernier a induit une diminution significative de l'expression de *Dnm1l* dans l'ATA ( $0,05\pm 0,01$  vs  $0,03\pm 0,00$ ) et l'AApr ( $0,06\pm 0,01$  vs  $0,03\pm 0,00$ ) et de *Fis1* dans l'ATA ( $0,37\pm 0,05$  vs  $0,23\pm 0,01$ ), l'ATD ( $0,38\pm 0,03$  vs  $0,26\pm 0,03$ ) et l'AApr ( $0,33\pm 0,04$  vs  $0,18\pm 0,02$ ) (Figure 54). Ces diminutions d'expression sont identiques quel que soit le régime alimentaire des animaux, sauf pour l'expression de *Dnm1l* qui est significativement diminuée uniquement dans le modèle anévrismal ( $0,06\pm 0,01$  vs  $0,04\pm 0,01$ ). Ainsi, l'expression génique des acteurs de la fission mitochondriale est diminuée de manière dépendante du traitement hypertenseur et indépendante du régime enrichi en cholestérol.

## c) Biogénèse mitochondriale

Enfin, la dynamique et la biogénèse mitochondriale étant intimement liées, il nous a semblé important d'étudier l'expression génique des acteurs de la biogénèse mitochondriale : *Tfam* et *Nrf1*.



**Figure 55 : Niveaux d'expression relative de l'ARNm des marqueurs de la biogénèse mitochondriale par RT-qPCR dans les ATA, ATD et AAPR des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> soumises à un régime normal (ND) ou enrichi en cholestérol (HFD) et à un traitement hypertenseur (AngII) ou non (Sham). (A) *Tfam* codant pour TFAM et (B) *Nrf1* codant pour NRF-1. ( $n=5$  à  $11$ ). \* $p<0,05$  ; \*\* $p<0,01$  ; \*\*\* $p<0,001$  ; \*\*\*\* $p<0,0001$ .**

De manière générale, l'expression des gènes de la biogénèse mitochondriale suit celle des gènes de la dynamique mitochondriale. En effet, nous relevons une diminution significative de l'expression de *Tfam* dans l'ATD ( $0,039\pm 0,002$  vs  $0,029\pm 0,001$ ) et l'AAPR ( $0,038\pm 0,004$  vs  $0,025\pm 0,001$ ) et de *Nrf1* dans l'ATA ( $0,005\pm 0,000$  vs  $0,002\pm 0,000$ ), l'ATD ( $0,007\pm 0,001$  vs  $0,003\pm 0,001$ ) et l'AAPR ( $0,006\pm 0,001$  vs  $0,003\pm 0,000$ ) dépendante du traitement hypertenseur (**Figure 55**). Ces variations sont identiques quel que soit le régime alimentaire des animaux.

## Discussion de l'étude 2

La dérégulation de la dynamique mitochondriale a largement été décrite dans les pathologies neurodégénératives et cardiaques. Néanmoins, son implication dans les pathologies vasculaires était jusqu'alors méconnue. L'inactivation des gènes d'*Opa1* ou de *Drp1* étant létale *in utero* (Wakabayashi et al. 2009; Piquereau et al. 2012) nous avons basé notre étude sur l'utilisation d'un modèle hétérozygote pour *Opa1*. La mutation *Opa1<sup>delTTAG</sup>* (renommée ici *Opa1<sup>+/-</sup>*), retrouvée en majorité chez les patients présentant des atrophies optiques, provoque une diminution significative de l'expression d'*Opa1* dans de nombreux organes. En effet, Sarzi et ses collaborateurs ont mis en avant une diminution de près de 25% de son expression dans le cerveau, la rétine, le nerf optique, les muscles glycolytiques et une diminution de près de 50% dans le cœur et les fibres oxydatives (Sarzi et al. 2012). Dans notre étude, nous retrouvons bien cette diminution de 50% de l'expression d'*Opa1*, dans chacun des segments aortiques étudiés des souris *Opa1<sup>+/-</sup>*, sans modification d'expression des autres acteurs de la dynamique mitochondriale.

Il a été prouvé qu'à l'âge de 11 mois, ces animaux présentent un phénotype poly-dégénératif. En revanche, ces dégénérescences n'ont pas été retrouvées chez des animaux de 3 et 5 mois (Sarzi et al. 2012). La fonction cardiaque n'est pas altérée non plus chez les animaux *Opa1<sup>+/-</sup>* de 3 mois mais la fonction ventriculaire commence à être dégradée à partir de 6 mois (Le Page et al. 2016). Cependant, comme nous l'avons prouvé dans notre étude cette altération n'affecte pas le poids des animaux, du cœur et de la pression artérielle entre les animaux *Opa1<sup>+/+</sup>* (WT) et *Opa1<sup>+/-</sup>*.

Dans notre première étude, centrée sur la microcirculation, l'hypertension artérielle a été induite par un traitement au L-NAME. Ainsi, l'utilisation du L-NAME, qui a un impact majeur sur les résistances périphériques (Dornas et Silva 2011), était le traitement le plus approprié dans cette étude. De plus, l'HTA induite par le L-NAME est relativement modérée et permet donc une meilleure observation des différences entre les groupes. Il a été prouvé que le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) était largement impliqué dans le développement de l'HTA induite par L-NAME (Ribeiro et al. 1992). C'est pourquoi, en parallèle de cette première étude, nous avons mis en place un deuxième modèle hypertenseur comprenant l'infusion directe d'AngII.

Ce modèle, également dépendant du SRAA, induit une HTA plus sévère que le modèle précédent (Dornas et Silva 2011) avec une augmentation de la pression artérielle de près de 50 mmHg contre 20 mmHg pour le traitement L-NAME. Même si cette étude était centrée sur les artères de résistance, nous avons gardé un regard sur les artères de compliance. C'est alors que nous avons observé, en plus de l'hypertrophie classiquement retrouvée dans l'HTA, des remodelages de type anévrismaux voire disséquants de certaines artères de compliance et surtout de l'aorte thoracique des animaux *Opa1<sup>+/-</sup>* traités.

Chez l'Homme, les pathologies anévrismales et disséquantes de l'aorte sont largement associées à une hypertension chronique et sévère présente chez 75% des patients (Albornoz et al. 2006). Ces pathologies sont souvent liées à une association entre l'HTA et un facteur de fragilisation de la paroi aortique comme une mutation génétique (Dietz et al. 1991; Judge et al. 2004) ou encore une perturbation métabolique (Xu, Zarins, et Glagov

2001; Weng et al. 2018). Dans notre modèle, l'altération de la fusion mitochondriale pourrait être un nouvel acteur de fragilisation de la paroi et ainsi provoquer des remodelages de la paroi aortique.

Ces observations et les résultats de la première étude nous amènent à penser qu'OPA1 et l'ensemble de la dynamique mitochondriale pourrait jouer un rôle dans les pathologies anévrismales et disséquantes de l'aorte. Pour comprendre leur implication dans ces pathologies, nous avons d'abord étudié le remodelage aortique dans le modèle murin *Opa1<sup>+/-</sup>* en présence d'un traitement hypertenseur sévère et prolongé (AngII, 1 mg/kg/j, 28 jours), facteur retrouvé dans la pathologie humaine. La deuxième partie de cette étude consiste à quantifier les modifications de la dynamique mitochondriale dans un modèle connu d'anévrisme aortique (*Ldlr<sup>-/-</sup>*, AngII, HFD). Enfin, les anévrismes et dissections aortiques survenant principalement dans les aortes thoraciques ascendante, descendante et dans l'aorte abdominale péri-rénale, nous avons concentré notre étude sur ces trois segments aortiques.

### **Remodelage aortique des animaux présentant une dysfonction de la fusion mitochondriale**

Dans un premier temps, le traitement hypertenseur à l'AngII a induit une augmentation de pression artérielle (PA) et une hypertrophie cardiaque identique entre les groupes contrôles et *Opa1<sup>+/-</sup>*, contrairement à la première étude sur l'HTA. Ceci peut être dû au traitement hypertenseur lui-même. En effet, si les deux traitements sont de la même nature, leur différence d'amplitude de l'hypertension créée peut avoir un effet sur les résultats obtenus. L'AngII, qui provoque une HTA sévère, peut masquer les différences de PA visibles entre les animaux contrôles et *Opa<sup>+/-</sup>* avec le traitement hypertenseur plus modéré au L-NAME.

Afin de caractériser le remodelage aortique des souris *Opa1<sup>+/-</sup>*, nous avons réalisé une série d'études histologiques et transcriptionnelles sur les aortes thoraciques ascendante (ATA) et descendante (ATD) et l'aorte abdominale péri-rénale.

Cette étude a révélé une augmentation de l'aire artérielle totale induite par l'AngII dans les trois localisations aortiques quel que soit le génotype des animaux. Chez les animaux WT AngII, cette augmentation de l'aire totale est due à l'hypertrophie de la média décrite précédemment dans la littérature (Laurent et Boutouyrie 2015; I. A. M. Brown et al. 2018). Dans l'ATA et l'ATD des animaux *Opa1<sup>+/-</sup>* AngII, ce remodelage est aussi dû à l'hypertrophie de la média aortique. En revanche, dans le cas de l'AApr, où nous avons mis en évidence les remodelages les plus importants, nous constatons qu'il s'agit d'une hypertrophie de la média accompagnée d'une augmentation de l'aire adventitielle, se rapprochant d'un remodelage anévrisimal.

En parallèle, le marquage à l'orcine a révélé une fragmentation des fibres élastiques dans l'ATA et l'AApr des souris *Opa1<sup>+/-</sup>* AngII, comme retrouvé dans l'anévrisme (Campa, Greenhalgh, et Powell 1987; Carmo et al. 2002). Dans l'AApr, la dégradation des fibres élastiques est associée à une diminution significative de l'expression du gène codant pour l'élastine, dépendante du traitement hypertenseur quel que soit le génotype des animaux. En revanche dans l'ATA, nous observons une augmentation significative de l'expression de l'élastine chez les animaux *Opa1<sup>+/-</sup>* AngII. Même si la littérature décrit principalement une diminution de la quantité d'élastine (Campa,

Greenhalgh, et Powell 1987; Carmo et al. 2002), c'est le ratio élastine/collagène qui est principalement diminué dans l'anévrisme. Ainsi, il peut arriver que la quantité d'élastine soit augmentée (Baxter et al. 1994; Minion et al. 1994), mais qu'elle soit contrebalancée par une augmentation plus importante de collagène. Ainsi, comme décrit dans la littérature (Leung, Glagov, et Mathews 1976; Intengan et Schiffrin 2001) nous retrouvons une augmentation de l'expression des gènes codant pour les collagènes de type I et III dans les trois localisations aortiques chez les souris WT AngII. Cette augmentation est retrouvée dans l'ATD et l'AApr des animaux *Opa1<sup>+/-</sup>* AngII. De plus, nous observons que dans l'AApr, ce collagène est principalement localisé dans l'adventice remodelé, spécifiquement en périphérie aortique pour prévenir le risque de rupture de l'aorte (Abdul-Hussien et al. 2007; Klink et al. 2011). En revanche, cette variation de l'expression du collagène n'est pas retrouvée dans l'ATA des souris *Opa1<sup>+/-</sup>* AngII, pouvant alors induire une fragilisation de la paroi artérielle dans ce segment aortique.

Au-delà des constituants de la matrice extra-cellulaire, il est important de prendre en compte leur dégradation. Nous savons que les acteurs majeurs de la dégradation de la MEC aortique sont les métalloprotéinases, MMP-2 et MMP-9 (Sakalihasan et al. 1996; Wassef et al. 2001; Annabi et al. 2002; Longo et al. 2002) et que leur activité peut être régulée par leurs inhibiteurs, les TIMP (K. Nishimura et al. 2003). Si nous n'avons pas encore pu quantifier l'expression génique de *Mmp9*, nous avons tout de même mis en évidence une augmentation significative de l'expression de *Mmp2* dans les trois localisations aortiques des souris WT AngII. Cette augmentation est aussi retrouvée dans l'ATD et l'AApr des animaux *Opa1<sup>+/-</sup>* AngII. En revanche, comme pour le collagène, l'expression de *Mmp2* n'est pas augmentée dans l'ATA des animaux *Opa1<sup>+/-</sup>* AngII. Quant aux TIMP, nous avons mis en évidence une augmentation significative de l'expression de *Timp1* dépendante de l'hypertension dans les trois localisations aortiques. Bien que non significative, cette augmentation semble plus importante dans l'AApr des animaux *Opa1<sup>+/-</sup>* AngII ( $p=0,08$ ). L'expression de *Timp2*, quant à elle, ne varie pas dans l'ATA et est augmentée dans l'ATD des deux groupes traités à l'AngII. A l'inverse, son expression est diminuée dans l'AApr des animaux *Opa1<sup>+/-</sup>* AngII. Il pourrait donc y avoir un phénomène de compensation des deux TIMP dans le but de contrer l'augmentation de l'expression de *Mmp2* et limiter la dégradation de la MEC.

Ainsi, les observations macroscopiques ont révélé un remodelage anévrisimal et/ou disséquant de l'AApr des animaux *Opa1<sup>+/-</sup>* AngII. Une analyse histologique et transcriptionnelle plus détaillée a permis de confirmer ce remodelage adventiciel et les modifications de la MEC de l'AApr de ces animaux. Celle-ci a aussi permis de visualiser des modifications de la MEC dans l'ATA des animaux *Opa1<sup>+/-</sup>* AngII et ont révélé des faiblesses de la paroi de ce segment aortique, pouvant augmenter le risque de remodelage et de rupture. En revanche, il est indispensable de s'attarder particulièrement sur l'aspect protéique des acteurs de la MEC et de sa dégradation. De plus, l'activité enzymatique des MMP et de leurs inhibiteurs doit être prise en compte afin de comprendre le remodelage pariétal de l'aorte des souris *Opa1<sup>+/-</sup>* AngII.

Pour compléter ces informations, nous savons que l'anévrisme de l'aorte abdominale a une grande part athérogène (Xu, Zarins, et Glagov 2001). Le marquage à l'Oil-Red-O et le bilan lipidique nous ont permis de mettre en évidence une augmentation des dépôts lipidiques dans l'adventice de l'AApr des animaux *Opa1<sup>+/-</sup>* AngII

associée à une augmentation du taux plasmatique de LDL-cholestérol comme décrit dans l'AAA (Weng et al. 2018). En revanche, l'indice d'athérogénéité de ce groupe ne varie pas par rapport aux contrôles, ce qui pourrait expliquer la présence d'anévrismes et de dissection pas ou peu athéromateux retrouvés chez les souris *Opa1<sup>+/-</sup>* AngII.

Deux des facteurs importants dans le développement anévrisimal sont l'apoptose et le « switch phénotypique » des CML (Meilhac et al. 2003; Lacolley et al. 2012), notamment par la répression des gènes contractiles (Salmon et al. 2012; Gomez, Swiatlowska, et Owens 2015). Dans notre étude, nous observons une augmentation de l'expression des acteurs de l'apoptose dans l'ATD et l'AApr induite par le traitement hypertenseur, quel que soit le génotype des animaux. En parallèle, nous observons une diminution de l'expression des acteurs de la contraction vasculaire dépendante du traitement hypertenseur, quel que soit le génotype des animaux et la localisation aortique. Cette diminution est cependant accrue dans l'AApr des animaux *Opa1<sup>+/-</sup>* AngII pour l'expression d'*Acta2* et *Mylk*. Ainsi, si l'apoptose des CML se trouve identique entre les animaux WT et *Opa1<sup>+/-</sup>* traités à l'AngII, le « switch phénotypique » est probablement accru dans l'AApr des *Opa1<sup>+/-</sup>* AngII. Il serait maintenant intéressant de s'intéresser à l'expression protéique de ces différents acteurs ainsi qu'à la capacité sécrétrice des CML qui est augmentée dans l'anévrisme (Hedin et al. 1988; Airhart et al. 2014).

Enfin, le stress oxydatif a été décrit pour jouer un rôle majeur dans l'HTA (Taniyama et Griendling 2003; R. M. Touyz et Schiffrin 2004) et l'anévrisme (Griendling et al. 1994; Yajima et al. 2002; Thomas et al. 2006). Contrairement à la littérature (Griendling et al. 1994; W. Yu et al. 2020) notre étude a mis en avant une diminution significative de l'expression de *Nox4* induite par le traitement hypertenseur dans les trois localisations aortiques. De plus, cette diminution est encore plus importante dans l'ATD et l'AApr des animaux *Opa1<sup>+/-</sup>* AngII. En parallèle, l'expression du gène codant pour la SOD mitochondriale est significativement augmentée dans ces deux segments chez les animaux WT et *Opa1<sup>+/-</sup>* traités. Avec les résultats que nous avons obtenus, il est difficile de conclure quant aux variations de stress oxydant lors d'une altération de la fusion mitochondriale en présence d'un traitement hypertenseur. Pour cela, il sera indispensable de s'attarder spécifiquement sur les différentes sources de ROS, les anti-oxydants, d'un point de vue protéique, mais aussi sur la part du stress oxydant mitochondrial dans toute la paroi vasculaire, notamment par immunohistochimie. L'inflammation ayant un rôle central dans l'HTA et les pathologies aortiques, il sera aussi important de ne pas négliger son implication d'un point de vue tissulaire et plasmatique.

Ainsi notre étude, bien que préliminaire, a bien confirmé la présence d'un remodelage de type anévrisimal au niveau de l'aorte abdominale péri-rénale, ainsi qu'une faiblesse de la paroi de l'aorte thoracique ascendante chez des souris possédant une altération de la fusion mitochondriale soumises à un régime hypertenseur sévère et prolongé. La perturbation de la fusion mitochondriale joue donc bien un rôle dans le développement anévrisimal.

Pour compléter ce travail, nous avons ensuite décidé d'étudier les variations de la dynamique mitochondriale dans un modèle connu d'anévrisme de l'aorte abdominal et de l'aorte thoracique ascendante.

## Choix du modèle d'anévrisme

Il existe différents modèles expérimentaux d'anévrisme de l'aorte : l'infusion intra-aortique d'élastase, l'application péri-aortique de chlorure de calcium, des modèles de xéno greffes ou encore des modèles transgéniques. Le plus répandu comprend l'utilisation d'un modèle murin déficient en apolipoprotéine E ( $ApoE^{-/-}$ ) (Plump et al. 1992; S. H. Zhang et al. 1992; Meir et Leitersdorf 2004) ou comprenant une déficience du récepteur aux lipoprotéines de faible densité ( $Ldlr^{-/-}$ ) (S. Ishibashi et al. 1994; Rateri et al. 2014) qui sont tous les deux des acteurs clés nécessaires à la clairance des lipoprotéines. Ainsi, leur altération entraîne l'accumulation de lipoprotéines athérogènes dans la circulation. Ces souris, soumises à un régime enrichi en cholestérol et à un traitement hypertenseur à l'angiotensine II prolongé, sont sujettes à la formation d'anévrismes de l'aorte abdominale (Manning, Cassis, et Daugherty 2003) et, dans une moindre mesure, à des anévrismes de l'aorte thoracique ascendante (Rateri et al. 2014).

Les souris  $ApoE^{-/-}$  peuvent développer des lésions d'athérosclérose spontanée qui se trouvent drastiquement accélérées par le régime HFD. A l'inverse, les animaux  $Ldlr^{-/-}$  soumis à un régime standard développent des lésions très limitées grâce au faible taux plasmatique en cholestérol. Une alimentation HFD additionnée ou non à un traitement hypertenseur, provoque le développement de pathologie athéromateuses et/ou anévrismale de manière plus lente que chez les souris  $ApoE^{-/-}$ . Ceci permet alors d'étudier avec plus de précision la survenue de ces pathologies et, à terme, de réaliser une cinétique de leur développement. C'est pourquoi, notre étude s'est basée sur l'utilisation du modèle murin  $Ldlr^{-/-}$  soumis à un régime enrichi en cholestérol (HFD) et l'infusion d'angiotensine II (AngII) par mini-pompes osmotiques à 1mg/kg/j pendant 28 jours.

La littérature décrit une augmentation significative de la concentration plasmatique de cholestérol chez les animaux  $Ldlr^{-/-}$  soumis à un régime enrichi en cholestérol (S. Ishibashi et al. 1994; Rateri et al. 2014). Le bilan lipidique réalisé sur nos animaux n'a pas révélé de modification en présence du régime HFD seul mais a bien confirmé l'augmentation plasmatique du cholestérol et des LDL-cholestérol dans notre modèle anévrismal. Ces derniers sont responsables de l'augmentation de l'indice d'athérogénéité mis en évidence dans ce modèle. En effet, une augmentation plasmatique de cholestérol et de LDL-cholestérol a été corrélée avec l'augmentation du risque d'AAA (Weng et al. 2018).

Pour comprendre l'effet de l'augmentation de l'IA, nous avons quantifié les dépôts lipidiques dans les différents compartiments artériel (paroi totale, lumière, média et adventice). Nous avons ainsi, mis en évidence une augmentation des dépôts lipidiques dans l'adventice remodelée de l'AApr des animaux anévrismaux. Ceci pourrait caractériser la présence d'un thrombus intraluminal (ILT) dans cette partie de l'aorte, prouvant alors la présence d'un AAA de type athéromateux. La présence d'un ILT est retrouvé dans 75% des AAA (Harter et al. 1982) mais celui-ci est normalement situé au niveau intimal à l'interface entre le sang et la paroi (Fontaine et al. 2002; Touat et al. 2006; J. B. Michel et al. 2011). Dans l'aorte, la convection radiale impacte l'ILT dans la paroi contribuant à la dilatation progressive de l'artère et ainsi l'expansion de l'ILT vers l'extérieur du vaisseau et non l'intérieur. C'est pourquoi dans notre modèle, l'ILT n'obstrue pas la lumière artérielle mais participe à l'expansion anévrismale.

Le traitement hypertenseur seul a bien provoqué une augmentation de la pression artérielle systolique et une hypertrophie cardiaque, comme décrit dans la littérature (Ruzicka et Leenen 1995; Landmesser et al. 2002), quel que soit le régime alimentaire des animaux. L'addition du régime HFD et du traitement à l'AngII potentialise cette augmentation de la PAS. Si les deux facteurs seuls n'ont pas augmenté la mortalité des animaux, le modèle anévrisimal dans lequel la PAS se trouve significativement augmentée, a provoqué près de 50% de mortalité par rupture aortique.

### **Remodelage aortique dans notre modèle anévrisimal (*Ldlr*<sup>-/-</sup>, *AngII*, *HFD*)**

Pour confirmer la présence d'anévrisme de l'aorte dans le modèle que nous avons choisi, nous avons d'abord étudié le remodelage aortique dans l'ATA, l'ATD et l'AApr, comme nous l'avons fait précédemment pour notre modèle d'altération de la fusion mitochondriale.

Le marquage à l'orcéine a permis de mettre en évidence une hypertrophie de l'ATD et de l'AApr dépendante du traitement hypertenseur, quel que soit le régime alimentaire des animaux. En plus de cette hypertrophie, l'aire adventitielle de l'AApr est augmentée sous l'effet de l'angiotensine II seule. Ce remodelage adventitial se trouve encore plus important lors de l'addition du régime enrichi en cholestérol. Si l'expression du gène codant pour l'élastine ne varie pas dans l'ATD et l'AApr, elle est augmentée dans l'ATA dans les deux groupes sous traitement hypertenseur. Mais, comme décrit dans la littérature (Campa, Greenhalgh, et Powell 1987; Carmo et al. 2002), nous avons révélé une forte dégradation des fibres élastiques dans l'ATA et dans l'AApr des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> AngII HFD. Ainsi, même si la quantité d'élastine ne varie pas ou est augmentée, les fibres se trouvent plus fragmentées et donc plus fragilisées. Comme il est décrit dans la littérature (He et Roach 1994; Minion et al. 1994; Carmo et al. 2002), l'expression des gènes codant pour le collagène de type I et de type III est augmentée dans l'ATD et l'AApr des animaux de notre modèle d'anévrisme. De plus, le marquage au rouge sirius nous permet de prouver que ce collagène s'accumule dans l'adventice et principalement en périphérie du vaisseau, dans le but de prévenir le risque de rupture (Abdul-Hussien et al. 2007; Klink et al. 2011).

En plus de la composition de la MEC, il est important de prendre en compte sa dégradation. Les deux acteurs majeurs de cette dégradation sont MMP-2 et MMP-9 (Sakalihan et al. 1996; Wassef et al. 2001; Annabi et al. 2002; Longo et al. 2002) dont l'activité est régulée par les TIMP (K. Nishimura et al. 2003). Dans notre modèle, nous n'avons pas pu quantifier l'expression du gène codant pour MMP-9, mais nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression de *Mmp2* qui est contrebalancée par une augmentation de l'expression de *Timp1* dans l'ATD et l'AApr. En revanche, l'expression de *Timp2* ne varie pas dans l'ATA et l'ATD et est diminuée dans l'AApr. Ainsi, en plus de l'augmentation de l'expression des gènes codant pour le collagène, nous sommes amenés à penser que sa dégradation pourrait ne pas être suffisante pour contrer son accumulation dans la paroi aortique. Ces résultats, bien qu'en accord avec la littérature (Freestone et al. 1995; Tamarina et al. 1997; Elmore et al. 1998; Crowther et al. 2000), restent encore préliminaires. Pour pouvoir conclure sur les modifications de composition de la MEC dans la paroi aortique de notre modèle, il est indispensable de ne pas s'attarder uniquement sur l'expression génique mais aussi sur les modifications protéiques et l'activité enzymatique des acteurs de sa dégradation.

En parallèle des modifications de la MEC, nous savons que les CML subissent un « switch phénotypique » provoquant une répression des gènes codant pour les protéines contractiles et une apoptose des CML (Meilhac et al. 2003; Ailawadi et al. 2009; Zhong et al. 2019). C'est pourquoi, nous avons quantifié l'expression de certains gènes impliqués dans la contraction et l'apoptose des CML. Comme décrit dans la littérature, nous avons relevé une diminution de l'expression des gènes codant pour les protéines de la contraction cellulaire dans notre modèle anévrisimal. En parallèle nous n'avons pas mis en évidence d'augmentation de l'expression pour la protéine pro-apoptotique BAX mais une diminution significative de l'expression du gène de survie cellulaire *Bcl2* dans ce modèle.

Enfin, la part des ROS dans la pathologie anévrismale n'est plus à prouver (Griendling et al. 1994; Miller et al. 2002; Yajima et al. 2002; Thomas et al. 2006). Ici, l'expression des gènes codant pour différentes sous-unités de la NADPH oxydase est variable tout comme celle des *Sod*. Il est donc difficile de conclure de façon certaine avec les résultats que nous avons obtenus. Il est important d'analyser l'expression d'autres sous-unités de la NADPH mais également de réaliser une étude protéique et une quantification plus générale des ROS totaux et mitochondriaux dans nos groupes et dans les différentes localisations.

Ces premiers éléments nous permettent tout de même de confirmer le remodelage anévrisimal dans l'AApr et une perturbation structurelle de l'ATA, mise en avant dans la littérature dans le modèle choisi pour cette étude (Manning, Cassis, et Daugherty 2003; Rateri et al. 2014).

### **Modulation de l'homéostasie mitochondriale dans l'anévrisme de l'aorte abdominale**

Après avoir confirmé la présence d'anévrismes de l'aorte abdominale dans notre modèle, nous avons débuté l'étude des variations de la dynamique mitochondriale dans cette pathologie. Pour cela, nous avons débuté par l'analyse de l'expression des gènes codant pour les principales protéines de la dynamique et de la biogénèse mitochondriale.

De nombreuses études ont mis en évidence une modulation de l'homéostasie mitochondriale dans l'obésité, en lien direct avec la nourriture HFD. En effet, certaines ont révélé une fragmentation mitochondriale dans les neurones AgRP (« agouti related peptide »), connu pour contrôler la prise alimentaire, de souris soumises à un régime HFD (Dietrich, Liu, et Horvath 2013). En parallèle, chez des rats obèses, le régime HFD est accompagné d'une diminution de la biogénèse et de la fusion mitochondriales avec une augmentation de la fission au sein du tissu adipeux blanc des animaux (Lahera et al. 2017). A l'inverse, une étude plus récente prouve que le régime HFD sur des rats augmente significativement la biogénèse mitochondriale et provoque l'augmentation de DRP1 et de FIS1 (Y. S. Kang et al. 2020). Dans tous les cas, le point commun reste l'augmentation de la fission mitochondriale induite par le régime HFD. De plus, il a été prouvé que l'inhibition de DRP1 réduisait les lésions d'athérosclérose (stress oxydant, dysfonction endothéliale et inflammation) chez des souris diabétiques (Q. Wang et al. 2017). Ainsi, ces différentes études nous permettent de conclure que le régime HFD directement lié au

diabète et à l'obésité, induit une dérégulation de la dynamique mitochondriale en faveur de la fission dans différents compartiments tissulaires.

Dans notre étude, le régime HFD seul n'a provoqué aucune modification significative de l'expression des gènes de la dynamique et de la biogénèse mitochondriale dans les trois localisations aortiques. Il semblerait pourtant induire une augmentation, bien que non significative, de l'expression d'*Opa1* dans l'ATD ( $p=0,051$ ) et dans l'AApr ( $p=0,076$ ). Ainsi, contrairement à la littérature, le régime HFD utilisé dans notre modèle, semblerait favoriser la fusion mitochondriale au détriment de la fission.

Cependant, nous nous sommes uniquement attardés sur une analyse transcriptionnelle. Il est indispensable de réaliser une étude protéique de tous les acteurs de cette dynamique ainsi que de leur différentes formes (OPA1-s, OPA1-L, phosphorylations de DRP1...) ainsi qu'une étude de la structure du réseau mitochondrial en lui-même pour comprendre le réel l'impact du régime sur la mitochondrie des cellules vasculaires. De plus, dans les études citées précédemment, le régime HFD induisait une augmentation significative de la masse des animaux. Or, dans notre étude, nous avons plutôt relevé une diminution de ce poids. Ceci peut être dû au régime qui, dans notre cas, est uniquement enrichi en cholestérol à 1,25%. Les autres études étant basées sur l'obésité et le diabète, les régimes utilisés étaient plus concentrés en lipides et en sucre. De plus, ces régimes sont généralement supérieurs à 6 semaines. Dans notre cas, notre régime a été maintenu à 4 semaines. Mais il est important de noter qu'il existe un grand nombre de régime HFD qui provoquent tous des effets différents dans l'organisme. Ainsi, un autre régime pourrait induire une tout autre modulation de la fusion mitochondriale.

Les études visant à comprendre les modulations de la dynamique mitochondriale dans l'HTA se sont d'abord concentrées sur le cœur, mettant alors en avant une diminution de l'expression génique d'*Opa1*, *Mfn1* et *Mfn2* dans le cœur de rats hypertendus, suggérant une fragmentation du réseau mitochondrial cardiaque dans l'HTA (Lahera et al. 2017). Plus récemment, une étude a démontré l'augmentation de l'activation de DRP1 et la fragmentation mitochondriale dans des CML de souris traitées à l'AngII (Lu et al. 2020). De plus, l'inhibition de la phosphorylation activatrice de DRP1 sur la sérine 616 est à l'origine d'une diminution de la PA, de la rigidité aortique, de la fibrose et de la production de ROS provoqués par l'HTA dans un modèle de rat (Y. Chen et al. 2020).

La première partie de notre étude a permis de mettre en avant l'effet de l'AngII sur l'expression de gènes de la dynamique mitochondriale sur des animaux contrôles. Celle-ci n'a révélée aucune modification d'expression d'*Opa1* dans les trois segments aortiques. En revanche l'AngII a globalement provoqué une diminution d'expression de tous les autres gènes impliqués dans la dynamique mitochondriale.

La deuxième partie de notre étude, a confirmé l'absence de variation de l'expression d'*Opa1* en présence du traitement à l'AngII. Il provoque en revanche une diminution significative de l'expression des mitofusines et de *Drp1* et *Fis1* dans les trois localisations aortiques. Donc, contrairement à la littérature, l'AngII n'induit pas d'augmentation de la fission mitochondriale. Le modèle anévrisimal, basé sur l'addition du régime HFD et du traitement à l'AngII, provoque des variations identiques d'expression de *Mfn1*, *Mfn2*, *Drp1* et *Fis1* qu'en présence de l'AngII seule. En revanche, il induit une augmentation significative de l'expression d'*Opa1* dans les trois localisations aortiques. Ceci prouve que si l'expression des autres gènes de la dynamique mitochondriale est

directement liée au traitement hypertenseur, l'expression d'*Opa1* est modulée par le régime alimentaire et du cholestérol. En parallèle, l'expression des gènes codant pour les acteurs de la biogénèse mitochondriale est aussi significativement diminuée dans les trois localisations aortiques de notre modèle d'anévrisme. Là encore, l'AngII est le facteur clé de cette variation d'expression.

Des études ont récemment mis en évidence une fragmentation mitochondriale dans les anévrismes et dissections de l'ATA ainsi que dans l'AAA (Cooper et al. 2020; Gutierrez et al. 2020) associée à une diminution de la biogénèse mitochondriale (Gabrielson et al. 2016; Foote et al. 2018). Dans notre étude, nous avons globalement observé une diminution de l'expression des acteurs de la dynamique et de la biogénèse mitochondriale. A partir de ces éléments, nous ne pouvons pas conclure sur l'état du réseau mitochondrial et de son activité. Pour cela, nous devons encore nous attarder sur la quantification des protéines et de leur différentes formes (phosphorylations de DRP1, formes courtes et longues d'OPA1...), ainsi que sur l'analyse du réseau mitochondrial et de son fonctionnement.

Dans tous les cas, cette étude a encore prouvé que l'hypertension artérielle est l'acteur majeur dans les modifications tant moléculaires que phénotypiques de l'aorte anévrismale.

### **Les trois localisations aortiques subissant des remodelages anévrismaux et/ou disséquants ont des atteintes différentes**

Les observations macroscopiques de la première étude et la littérature nous ont permis de déterminer les trois segments aortiques sujets à la survenue d'anévrismes et de dissections aortiques : l'aorte thoracique ascendante (ATA), l'aorte thoracique descendante (ATD) et l'aorte abdominale péri-rénale (AApr). C'est pourquoi, toute notre étude s'est concentrée sur les modifications structurelles et transcriptionnelles dans ces trois localisations. Le fait d'avoir scindé l'aorte des animaux permet de mettre en avant certaines différences de remodelage et d'expression génique entre les groupes au sein d'une même localisation mais aussi entre les trois localisations d'un même groupe.

Ainsi, nous avons notamment pu mettre en évidence une fragmentation des fibres élastiques et une modification des niveaux d'expression des gènes codant pour le collagène dans l'ATA des animaux *Opa1*<sup>+/-</sup> AngII et dans le modèle d'anévrisme. Ceci a permis de mettre en avant un remodelage de l'ATA que nous n'avions pas relevé par nos observations macroscopiques. De plus, dans le cas de l'expression de l'élastine, la segmentation nous a révélé des variations opposées entre l'ATA et l'ATD des groupes traités à l'angiotensine II par rapport aux groupes contrôles.

Enfin, nous avons confirmé que le modèle d'anévrisme utilisé avait un impact différent sur les trois localisations aortiques. Ainsi, nous pouvons supposer une variation de la dynamique mitochondriale différente entre l'ATA, l'ATD et l'AApr laissant prévoir une altération différentielle de la physiopathologie de l'aorte.

## Conclusion générale et perspectives

Au vu des éléments de la littérature mettant en avant une dérégulation de la dynamique mitochondriale dans de nombreuses pathologies neurodégénératives et cardiaques, nous nous sommes demandé comment cette dynamique pouvait participer à la physiopathologie vasculaire où les besoins énergétiques sont importants.

Pour ce faire, notre première étude s'est concentrée sur le rôle de la protéine de fusion mitochondriale, OPA1, dans le facteur de risque majeur des pathologies cardiovasculaires, l'hypertension artérielle. Celle-ci a permis de mettre en avant une fragmentation mitochondriale et une aggravation de l'hypertension artérielle et ainsi, démontrer le rôle protecteur d'OPA1 dans l'hypertension artérielle.

Lors de cette première étude, l'observation de remodelages aortiques a permis de soulever une deuxième interrogation, quant à l'implication de la dynamique mitochondriale dans les pathologies anévrismales et disséquantes de l'aorte. Ainsi, notre deuxième étude, encore en cours, nous a permis de mettre en avant d'une part, un remodelage anévrismal dans l'aorte abdominale péri-rénale des souris *Opa1<sup>+/-</sup>* traitées à l'angiotensine II ; et d'autre part, une modification de l'expression des gènes codant pour la dynamique mitochondriale dans l'aorte thoracique ascendante, l'aorte thoracique descendante et l'aorte abdominale péri-rénale dans un modèle connu d'anévrisme aortique.

Cette étude est encore très préliminaire et mérite d'être complétée. Trois axes de recherches doivent être privilégiés en priorité :

- 1) Dans un premier temps, le remodelage aortique du modèle *Opa1<sup>+/-</sup>* doit être approfondi. D'abord il est important de s'intéresser aux principaux acteurs du remodelage anévrismal et leurs expressions d'un point de vue protéique. Puis, le stress oxydant total et mitochondrial doit être étudié d'un point de vue protéique mais aussi par immunohistochimie dans le but de quantifier et localiser les ROS totaux et mitochondriaux. Enfin, il est indispensable de s'attarder sur l'inflammation tant systémique que locale qui a une part importante dans le développement anévrismal. L'inflammation systémique pourra être analysée au niveau plasmatique et l'inflammation tissulaire sera analysée dans chaque localisation aortique. Dans les deux cas, il sera indispensable de mesurer l'expression des cellules immunitaires et cytokines impliquées dans le développement anévrismal (Cf **Figure 26**).

Une fois le remodelage des animaux *Opa1<sup>+/-</sup>* traités à l'angiotensine II bien défini, il pourrait être intéressant de s'attarder sur le remodelage aortique dans d'autres modèles de dysfonction de la dynamique mitochondriale présents au laboratoire : *Drp1<sup>+/-</sup>*, double hétérozygote *Opa1<sup>+/-</sup> Drp1<sup>+/-</sup>* et ces mêmes modèles croisés au *Ldlr<sup>-/-</sup>*.

- 2) Dans un second temps, nous devons préciser la modulation de la dynamique mitochondriale dans notre modèle d'anévrisme. D'abord, il est indispensable de mesurer les modifications protéiques des acteurs de la dynamique et la biogénèse mitochondriale ainsi que de la mitophagie. Ensuite, il est important de prendre en compte la structure du réseau mitochondriale dans les différentes localisations aortiques par microscopie électronique à transmission. La culture de lignées de cellules endothéliales et musculaires lisses pourrait aussi nous permettre d'observer la structure du réseau mitochondrial dans les différents

types cellulaires composant une aorte anévrismale. Il serait aussi très intéressant d'isoler ces types cellulaires directement des aortes anévrismales (cellules endothéliales, musculaires lisses et immunitaires) et comprendre la modulation de la structure du réseau mitochondrial par microscopie électronique et à fluorescence 3D.

Enfin, au vu de l'implication du cholestérol dans la modulation de l'expression d'*Opa1*, il pourrait être intéressant de changer le type de régime HFD en variant la quantité de cholestérol et de lipides. De même, de nouveaux modèles d'anévrisme (modèle murin *ApoE*<sup>-/-</sup>, injection intra-aortique d'élastase...) et de dissection aortique (administration de  $\beta$ -aminopropionitrile) pourraient permettre d'approfondir la compréhension du rôle de la dynamique mitochondriale dans ces pathologies.

- 3) Pour terminer, en plus des modèles murins, il est indispensable de comprendre la modulation et l'implication de la dynamique mitochondriale dans la pathologie humaine. Pour cela, des prélèvements humains provenant du CHU d'Angers (Unité de chirurgie cardiaque vasculaire et thoracique, Professeur C. Baufreton) et de l'Hôpital Bichat (Biobanque cardiovasculaire, Professeur J-B Michel) sont mis à notre disposition. Nous avons actuellement des échantillons de tissus aortiques ainsi que des cellules musculaires lisses provenant d'aortes thoraciques ascendantes de patients (contrôles, anévrismes et dissections), et les plasmas associés. Il est alors important de comprendre la modulation de la dynamique mitochondriale dans ces tissus et cellules par analyse microscopique. En parallèle, des analyses biologiques et biochimiques des différents acteurs de la dynamique, de la biogénèse mitochondriale ou encore de la mitophagie, nous permettrons de comprendre les mécanismes moléculaires liant la dynamique mitochondriale à l'anévrisme et la dissection aortique chez l'Homme.

Enfin, cette deuxième étude, a prouvé le rôle central de l'hypertension artérielle dans la pathologie anévrismale, confirmant l'importance de la régulation de l'HTA dans la prévention des pathologies anévrismales et disséquantes de l'aorte. Au vu des résultats de la première étude quant au rôle protecteur d'OPA1 dans l'HTA, nous pourrions supposer qu'une régulation de la dynamique mitochondriale pourrait prévenir la survenue des pathologies vasculaires comme l'HTA et l'anévrisme. A l'inverse, la modulation de l'HTA dans l'anévrisme aortique pourrait modifier la structure réseau mitochondrial et sa dynamique.

Ainsi, la dynamique mitochondriale semble impliquée à la fois dans le développement de l'hypertension artérielle, et dans l'apparition d'anévrismes aortiques. Sa dérégulation a alors un impact dans l'ensemble des compartiments vasculaires, qu'ils fassent partie de la micro- ou de la macro-circulation. Ces éléments viennent étayer la littérature et démontrer l'importance de la dynamique mitochondriale dans la physiopathologie systémique de l'organisme. Cependant, ce travail nécessite d'être poursuivi et approfondi afin de comprendre la corrélation entre la dynamique mitochondriale et la cinétique de développement des pathologies vasculaires.

## Bibliographie

- Aalkjaer, C., A. M. Heagerty, K. K. Petersen, J. D. Swales, et M. J. Mulvany. 1987. « Evidence for Increased Media Thickness, Increased Neuronal Amine Uptake, and Depressed Excitation--Contraction Coupling in Isolated Resistance Vessels from Essential Hypertensives ». *Circulation Research* 61 (2): 181-86. <https://doi.org/10.1161/01.res.61.2.181>.
- Abdul-Hussien, Hazem, Ratna G. V. Soekhoe, Ekkehard Weber, Jan H. von der Thüsen, Robert Kleemann, Adri Mulder, J. Hajo van Bockel, Roeland Hanemaaijer, et Jan H. N. Lindeman. 2007. « Collagen Degradation in the Abdominal Aneurysm: A Conspiracy of Matrix Metalloproteinase and Cysteine Collagenases ». *The American Journal of Pathology* 170 (3): 809-17. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060522>.
- Abrams, Joshua, Zev Einhorn, Christoph Seiler, Alan B. Zong, H. Lee Sweeney, et Michael Pack. 2016. « Graded effects of unregulated smooth muscle myosin on intestinal architecture, intestinal motility and vascular function in zebrafish ». *Disease Models & Mechanisms* 9 (5): 529-40. <https://doi.org/10.1242/dmm.023309>.
- Adaniya, Stephanie M., Jin O-Uchi, Michael W. Cypress, Yoichiro Kusakari, et Bong Sook Jhun. 2019. « Posttranslational Modifications of Mitochondrial Fission and Fusion Proteins in Cardiac Physiology and Pathophysiology ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 316 (5): C583-604. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00523.2018>.
- Adolph, R., D. A. Vorp, D. L. Steed, M. W. Webster, M. V. Kameneva, et S. C. Watkins. 1997. « Cellular Content and Permeability of Intraluminal Thrombus in Abdominal Aortic Aneurysm ». *Journal of Vascular Surgery* 25 (5): 916-26. [https://doi.org/10.1016/s0741-5214\(97\)70223-4](https://doi.org/10.1016/s0741-5214(97)70223-4).
- Ailawadi, Gorav, Christopher W. Moehle, Hong Pei, Sandra P. Walton, Zequan Yang, Irving L. Kron, Christine L. Lau, et Gary K. Owens. 2009. « Smooth Muscle Phenotypic Modulation Is an Early Event in Aortic Aneurysms ». *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 138 (6): 1392-99. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2009.07.075>.
- Airhart, Nathan, Bernard H Brownstein, J Perren Cobb, William Schierding, Batool Arif, Terri L Ennis, Robert W Thompson, et John A Curci. 2014. « Smooth muscle cells from abdominal aortic aneurysms are unique and can independently and synergistically degrade insoluble elastin. » *Journal of vascular surgery* 60 (4): 1033-41; discussion 1041-2. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2013.07.097>.
- Ait-Oufella, Hafid, Yu Wang, Olivier Herbin, Simon Bourcier, Stephane Potteaux, Jeremie Joffre, Xavier Loyer, et al. 2013. « Natural Regulatory T Cells Limit Angiotensin II-Induced Aneurysm Formation and Rupture in Mice ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 33 (10): 2374-79. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301280>.
- Albornoz, Gonzalo, Michael A. Coady, Michele Roberts, Ryan R. Davies, Maryann Tranquilli, John A. Rizzo, et John A. Elefteriades. 2006. « Familial Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections--Incidence, Modes of Inheritance, and Phenotypic Patterns ». *The Annals of Thoracic Surgery* 82 (4): 1400-1405. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2006.04.098>.
- Aldosari, Sarah, Maan Awad, Elizabeth O. Harrington, Frank W. Sellke, et M. Ruhul Abid. 2018. « Subcellular Reactive Oxygen Species (ROS) in Cardiovascular Pathophysiology ». *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 7 (1). <https://doi.org/10.3390/antiox7010014>.
- Allaire, E., R. Forough, M. Clowes, B. Starcher, et A. W. Clowes. 1998. « Local Overexpression of TIMP-1 Prevents Aortic Aneurysm Degeneration and Rupture in a Rat Model ». *The Journal of Clinical Investigation* 102 (7): 1413-20. <https://doi.org/10.1172/JCI2909>.
- Allaire, E., D. Hasenstab, R. D. Kenagy, B. Starcher, M. M. Clowes, et A. W. Clowes. 1998. « Prevention of Aneurysm Development and Rupture by Local Overexpression of Plasminogen Activator Inhibitor-1 ». *Circulation* 98 (3): 249-55. <https://doi.org/10.1161/01.cir.98.3.249>.
- Allaire, Eric, Béatrice Muscatelli-Groux, Chantal Mandet, Anne-Marie Guinault, Patrick Bruneval, Pascal Desgranges, Alexander Clowes, Didier Méllièrre, et Jean-Pierre Becquemin. 2002. « Paracrine Effect of Vascular Smooth Muscle Cells in the Prevention of Aortic Aneurysm Formation ». *Journal of Vascular Surgery* 36 (5): 1018-26. <https://doi.org/10.1067/mva.2002.127347>.
- Amento, E. P., N. Ehsani, H. Palmer, et P. Libby. 1991. « Cytokines and Growth Factors Positively and Negatively Regulate Interstitial Collagen Gene Expression in Human Vascular Smooth Muscle Cells ». *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology* 11 (5): 1223-30. <https://doi.org/10.1161/01.atv.11.5.1223>.
- Anand, Ruchika, Timothy Wai, Michael J. Baker, Nikolay Kladt, Astrid C. Schauss, Elena Rugarli, et Thomas Langer. 2014. « The I-AAA Protease YME1L and OMA1 Cleave OPA1 to Balance Mitochondrial Fusion and Fission ». *The Journal of Cell Biology* 204 (6): 919-29. <https://doi.org/10.1083/jcb.201308006>.

- Anidjar, S., J. L. Salzmann, D. Gentric, P. Lagneau, J. P. Camilleri, et J. B. Michel. 1990. « Elastase-Induced Experimental Aneurysms in Rats ». *Circulation* 82 (3): 973-81. <https://doi.org/10.1161/01.cir.82.3.973>.
- Annabi, Borhane, Daniel Shédid, Pierre Ghosn, Rhoda L. Kenigsberg, Richard R. Desrosiers, Michel W. Bojanowski, Edith Beaulieu, Edgar Nassif, Robert Moundjian, et Richard Béliveau. 2002. « Differential Regulation of Matrix Metalloproteinase Activities in Abdominal Aortic Aneurysms ». *Journal of Vascular Surgery* 35 (3): 539-46. <https://doi.org/10.1067/mva.2002.121124>.
- Babu, G. J., D. M. Warshaw, et M. Periasamy. 2000. « Smooth Muscle Myosin Heavy Chain Isoforms and Their Role in Muscle Physiology ». *Microscopy Research and Technique* 50 (6): 532-40. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20000915\)50:6<532::AID-JEMT10>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20000915)50:6<532::AID-JEMT10>3.0.CO;2-E).
- Balaban, Robert S., Shino Nemoto, et Toren Finkel. 2005. « Mitochondria, Oxidants, and Aging ». *Cell* 120 (4): 483-95. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.001>.
- Barallobre-Barreiro, Javier, Bart Loeys, Manuel Mayr, Marieke Rienks, Aline Verstraeten, et Jason C. Kovacic. 2020. « Extracellular Matrix in Vascular Disease, Part 2/4: JACC Focus Seminar ». *Journal of the American College of Cardiology* 75 (17): 2189-2203. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.03.018>.
- Baxter, B. T., V. A. Davis, D. J. Minion, Y. P. Wang, T. G. Lynch, et B. M. McManus. 1994. « Abdominal Aortic Aneurysms Are Associated with Altered Matrix Proteins of the Nonaneurysmal Aortic Segments ». *Journal of Vascular Surgery* 19 (5): 797-802; discussion 803. [https://doi.org/10.1016/s0741-5214\(94\)70004-4](https://doi.org/10.1016/s0741-5214(94)70004-4).
- Baynes, J. W., et S. R. Thorpe. 2000. « Glycooxidation and Lipoxidation in Atherogenesis ». *Free Radical Biology & Medicine* 28 (12): 1708-16. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00228-8](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00228-8).
- Bian, Xiyun, Jingman Xu, Huanhuan Zhao, Quan Zheng, Xiaolin Xiao, Xiaofang Ma, Yanxia Li, Xiping Du, et Xiaozhi Liu. 2019. « Zinc-Induced SUMOylation of Dynamin-Related Protein 1 Protects the Heart against Ischemia-Reperfusion Injury ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019: 1232146. <https://doi.org/10.1155/2019/1232146>.
- Biros, Erik, Gabor Gäbel, Corey S. Moran, Charlotte Schreurs, Jan H. N. Lindeman, Philip J. Walker, Maria Nataatmadja, et al. 2015. « Differential Gene Expression in Human Abdominal Aortic Aneurysm and Aortic Occlusive Disease ». *Oncotarget* 6 (15): 12984-96. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3848>.
- Birukov, Konstantin G. 2009. « Cyclic Stretch, Reactive Oxygen Species, and Vascular Remodeling ». *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (7): 1651-67. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2390>.
- Blanton, Robert M., Eiki Takimoto, Mark Aronovitz, Robrecht Thoonen, David A. Kass, Richard H. Karas, et Michael E. Mendelsohn. 2013. « Mutation of the Protein Kinase I Alpha Leucine Zipper Domain Produces Hypertension and Progressive Left Ventricular Hypertrophy: A Novel Mouse Model of Age-Dependent Hypertensive Heart Disease ». *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 68 (11): 1351-55. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt042>.
- Blik, Alexander M. van der, Qinfang Shen, et Sumihiro Kawajiri. 2013. « Mechanisms of Mitochondrial Fission and Fusion ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011072>.
- Boileau, Catherine, Dong-Chuan Guo, Nadine Hanna, Ellen S. Regalado, Delphine Detaint, Limin Gong, Mathilde Varret, et al. 2012. « TGF $\beta$ 2 Mutations Cause Familial Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections Associated with Mild Systemic Features of Marfan Syndrome ». *Nature Genetics* 44 (8): 916-21. <https://doi.org/10.1038/ng.2348>.
- Borges, Luciano F., Delphine Gomez, Mercedes Quintana, Ziad Touat, Guillaume Jondeau, Anne Leclercq, Olivier Meilhac, et al. 2010. « Fibrinolytic Activity Is Associated with Presence of Cystic Medial Degeneration in Aneurysms of the Ascending Aorta ». *Histopathology* 57 (6): 917-32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2010.03719.x>.
- Boyard, Ludovic, Rafaëlle Spear, Giulia Chinetti-Gbaguidi, Adelina E. Acosta-Martin, Jonathan Vanhoutte, Nicolas Lamblin, Bart Staels, Philippe Amouyel, Stephan Haulon, et Florence Pinet. 2013. « Role of Proinflammatory CD68(+) Mannose Receptor(-) Macrophages in Peroxiredoxin-1 Expression and in Abdominal Aortic Aneurysms in Humans ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 33 (2): 431-38. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300663>.
- Brady, Anthony R., Simon G. Thompson, F. Gerald R. Fowkes, Roger M. Greenhalgh, Janet T. Powell, et UK Small Aneurysm Trial Participants. 2004. « Abdominal Aortic Aneurysm Expansion: Risk Factors and Time Intervals for Surveillance ». *Circulation* 110 (1): 16-21. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000133279.07468.9F>.
- Brands, Michael W., Amy K. L. Banes-Berceli, Edward W. Inscho, Hind Al-Azawi, Ashlyn J. Allen, et Hicham Labazi. 2010. « Interleukin 6 Knockout Prevents Angiotensin II Hypertension: Role of Renal Vasoconstriction and Janus Kinase 2/Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Activation ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 56 (5): 879-84. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.158071>.
- Bravo, Yanauri, Yasmir Quiroz, Atilio Ferrebuz, Nosratola D. Vaziri, et Bernardo Rodríguez-Iturbe. 2007. « Mycophenolate Mofetil Administration Reduces Renal Inflammation, Oxidative Stress, and Arterial

- Pressure in Rats with Lead-Induced Hypertension ». *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 293 (2): F616-623. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00507.2006>.
- Brew, K., D. Dinakarparandian, et H. Nagase. 2000. « Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Evolution, Structure and Function ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1477 (1-2): 267-83. [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(99\)00279-4](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(99)00279-4).
- Brewster, David C., Jack L. Cronenwett, John W. Hallett, K. Wayne Johnston, William C. Krupski, Jon S. Matsumura, et Joint Council of the American Association for Vascular Surgery and Society for Vascular Surgery. 2003. « Guidelines for the Treatment of Abdominal Aortic Aneurysms. Report of a Subcommittee of the Joint Council of the American Association for Vascular Surgery and Society for Vascular Surgery ». *Journal of Vascular Surgery* 37 (5): 1106-17. <https://doi.org/10.1067/mva.2003.363>.
- Brown, Isola A. M., Lukas Diederich, Miranda E. Good, Leon J. DeLalio, Sara A. Murphy, Miriam M. Cortese-Krott, Jennifer L. Hall, Thu H. Le, et Brant E. Isakson. 2018. « Vascular Smooth Muscle Remodeling in Conductive and Resistance Arteries in Hypertension ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 38 (9): 1969-85. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311229>.
- Brown, M. R., F. J. Miller, W. G. Li, A. N. Ellingson, J. D. Mozena, P. Chatterjee, J. F. Engelhardt, et al. 1999. « Overexpression of Human Catalase Inhibits Proliferation and Promotes Apoptosis in Vascular Smooth Muscle Cells ». *Circulation Research* 85 (6): 524-33. <https://doi.org/10.1161/01.res.85.6.524>.
- Bunton, T. E., N. J. Biery, L. Myers, B. Gayraud, F. Ramirez, et H. C. Dietz. 2001. « Phenotypic Alteration of Vascular Smooth Muscle Cells Precedes Elastolysis in a Mouse Model of Marfan Syndrome ». *Circulation Research* 88 (1): 37-43. <https://doi.org/10.1161/01.res.88.1.37>.
- Byers, Peter H., John Belmont, James Black, Julie De Backer, Michael Frank, Xavier Jeunemaitre, Diana Johnson, et al. 2017. « Diagnosis, Natural History, and Management in Vascular Ehlers-Danlos Syndrome ». *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics* 175 (1): 40-47. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31553>.
- Callewaert, Bert, Marjolijn Renard, Vishwanathan Huchtagowder, Beate Albrecht, Ingrid Hausser, Edward Blair, Cristina Dias, et al. 2011. « New Insights into the Pathogenesis of Autosomal-Dominant Cutis Laxa with Report of Five ELN Mutations ». *Human Mutation* 32 (4): 445-55. <https://doi.org/10.1002/humu.21462>.
- Campa, J. S., R. M. Greenhalgh, et J. T. Powell. 1987. « Elastin Degradation in Abdominal Aortic Aneurysms ». *Atherosclerosis* 65 (1-2): 13-21. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(87\)90003-7](https://doi.org/10.1016/0021-9150(87)90003-7).
- Carmo, M., L. Colombo, A. Bruno, F. R. M. Corsi, L. Roncoroni, M. S. Cuttin, F. Radice, E. Mussini, et P. G. Settembrini. 2002. « Alteration of Elastin, Collagen and Their Cross-Links in Abdominal Aortic Aneurysms ». *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery: The Official Journal of the European Society for Vascular Surgery* 23 (6): 543-49. <https://doi.org/10.1053/ejvs.2002.1620>.
- Carrell, Tom W. G., Kevin G. Burnand, Graham M. A. Wells, John M. Clements, et Alberto Smith. 2002. « Stromelysin-1 (Matrix Metalloproteinase-3) and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 Are Overexpressed in the Wall of Abdominal Aortic Aneurysms ». *Circulation* 105 (4): 477-82. <https://doi.org/10.1161/hc0402.102621>.
- Castoldi, Giovanna, Cira R. T. Di Gioia, Federico Pieruzzi, Cristina D'Orlando, Willy M. M. Van De Greef, Giuseppe Busca, Giovanni Sperti, et Andrea Stella. 2003. « ANG II Increases TIMP-1 Expression in Rat Aortic Smooth Muscle Cells in Vivo ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 284 (2): H635-643. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00986.2001>.
- Caughey, G. E., L. G. Cleland, P. S. Penglis, J. R. Gamble, et M. J. James. 2001. « Roles of Cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in Prostanoid Production by Human Endothelial Cells: Selective up-Regulation of Prostacyclin Synthesis by COX-2 ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 167 (5): 2831-38. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.5.2831>.
- Chalmers, Susan, Christopher Saunter, Calum Wilson, Paul Coats, John M. Girkin, et John G. McCarron. 2012. « Mitochondrial Motility and Vascular Smooth Muscle Proliferation ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32 (12): 3000-3011. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.255174>.
- Chamberlain, Ciara M., Lisa S. Ang, Wendy A. Boivin, Dawn M. Cooper, Sarah J. Williams, Hongyan Zhao, Alon Hendel, et al. 2010. « Perforin-Independent Extracellular Granzyme B Activity Contributes to Abdominal Aortic Aneurysm ». *The American Journal of Pathology* 176 (2): 1038-49. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090700>.
- Chan, Woon Ling, Nada Pejnovic, Tze Vun Liew, et Hamish Hamilton. 2005. « Predominance of Th2 Response in Human Abdominal Aortic Aneurysm: Mistaken Identity for IL-4-Producing NK and NKT Cells? ». *Cellular Immunology* 233 (2): 109-14. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2005.04.020>.
- Chandramohan, G., Y. Bai, K. Norris, B. Rodriguez-Iturbe, et N. D. Vaziri. 2008. « Effects of Dietary Salt on Intrarenal Angiotensin System, NAD(P)H Oxidase, COX-2, MCP-1 and PAI-1 Expressions and NF-KappaB Activity in Salt-Sensitive and -Resistant Rat Kidneys ». *American Journal of Nephrology* 28 (1): 158-67. <https://doi.org/10.1159/000110021>.

- Chang, Chuang-Rung, et Craig Blackstone. 2007. « Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase Phosphorylation of Drp1 Regulates Its GTPase Activity and Mitochondrial Morphology ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (30): 21583-87. <https://doi.org/10.1074/jbc.C700083200>.
- Chen, Hsiuchen, Scott A. Detmer, Andrew J. Ewald, Erik E. Griffin, Scott E. Fraser, et David C. Chan. 2003. « Mitofusins Mfn1 and Mfn2 Coordinately Regulate Mitochondrial Fusion and Are Essential for Embryonic Development ». *The Journal of Cell Biology* 160 (2): 189-200. <https://doi.org/10.1083/jcb.200211046>.
- Chen, Le, Qizhi Gong, James P. Stice, et Anne A. Knowlton. 2009. « Mitochondrial OPA1, Apoptosis, and Heart Failure ». *Cardiovascular Research* 84 (1): 91-99. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp181>.
- Chen, Shiyu, et Robert J. Lechleider. 2004. « Transforming Growth Factor-Beta-Induced Differentiation of Smooth Muscle from a Neural Crest Stem Cell Line ». *Circulation Research* 94 (9): 1195-1202. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000126897.41658.81>.
- Chen, Yuqiong, Su Li, Yuxuan Guo, Hang Yu, Yandong Bao, Xin Xin, Huimin Yang, Xinzhu Ni, Nan Wu, et Dalin Jia. 2020. « Astaxanthin Attenuates Hypertensive Vascular Remodeling by Protecting Vascular Smooth Muscle Cells from Oxidative Stress-Induced Mitochondrial Dysfunction ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2020: 4629189. <https://doi.org/10.1155/2020/4629189>.
- Chiong, Jun R., Wilbert S. Aronow, Ijaz A. Khan, Chandra K. Nair, Krishnaswami Vijayaraghavan, Richard A. Dart, Thomas R. Behrenbeck, et Stephen A. Geraci. 2008. « Secondary Hypertension: Current Diagnosis and Treatment ». *International Journal of Cardiology* 124 (1): 6-21. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2007.01.119>.
- Chou, Elizabeth L., et Mark E. Lindsay. 2020. « The Genetics of Aortopathies: Hereditary Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections ». *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics*, février. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31771>.
- Choudhury, Nusrat, Olivier Bouchot, Leonie Rouleau, Dominique Tremblay, Raymond Cartier, Jagdish Butany, Rosaire Mongrain, et Richard L. Leask. 2009. « Local Mechanical and Structural Properties of Healthy and Diseased Human Ascending Aorta Tissue ». *Cardiovascular Pathology: The Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 18 (2): 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2008.01.001>.
- Cipolat, Sara, Olga Martins de Brito, Barbara Dal Zilio, et Luca Scorrano. 2004. « OPA1 Requires Mitofusin 1 to Promote Mitochondrial Fusion ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (45): 15927-32. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407043101>.
- Cipolla, Marilyn J., Natalia I. Gokina, et George Osol. 2002. « Pressure-Induced Actin Polymerization in Vascular Smooth Muscle as a Mechanism Underlying Myogenic Behavior ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16 (1): 72-76. <https://doi.org/10.1096/cj.01-0104hyp>.
- Cohen, J. R., L. Keegan, I. Sarfati, D. Danna, C. Iardi, et L. Wise. 1991. « Neutrophil Chemotaxis and Neutrophil Elastase in the Aortic Wall in Patients with Abdominal Aortic Aneurysms ». *Journal of Investigative Surgery: The Official Journal of the Academy of Surgical Research* 4 (4): 423-30. <https://doi.org/10.3109/08941939109141172>.
- Cooper, Hannah A., Stephanie Cicalese, Kyle J. Preston, Tatsuo Kawai, Keisuke Okuno, Eric T. Choi, Shingo Kasahara, et al. 2020. « Targeting Mitochondrial Fission as a Potential Therapeutic for Abdominal Aortic Aneurysm ». *Cardiovascular Research*, mai. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa133>.
- Cotrufo, M., L. De Santo, A. Della Corte, F. Di Meglio, G. Guerra, C. Quarto, S. Vitale, C. Castaldo, et S. Montagnani. 2005. « Basal Lamina Structural Alterations in Human Asymmetric Aneurismatic Aorta ». *European Journal of Histochemistry: EJH* 49 (4): 363-70. <https://doi.org/10.4081/964>.
- Crowley, Steven D., Young-Soo Song, Eugene E. Lin, Robert Griffiths, Hyung-Suk Kim, et Phillip Ruiz. 2010. « Lymphocyte Responses Exacerbate Angiotensin II-Dependent Hypertension ». *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 298 (4): R1089-1097. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00373.2009>.
- Crowther, M., S. Goodall, J. L. Jones, P. R. Bell, et M. M. Thompson. 2000. « Localization of Matrix Metalloproteinase 2 within the Aneurysmal and Normal Aortic Wall ». *The British Journal of Surgery* 87 (10): 1391-1400. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2168.2000.01554.x>.
- Curci, J. A., S. Liao, M. D. Huffman, S. D. Shapiro, et R. W. Thompson. 1998. « Expression and Localization of Macrophage Elastase (Matrix Metalloproteinase-12) in Abdominal Aortic Aneurysms ». *The Journal of Clinical Investigation* 102 (11): 1900-1910. <https://doi.org/10.1172/JCI2182>.
- Curci, John A., et Robert W. Thompson. 2004. « Adaptive Cellular Immunity in Aortic Aneurysms: Cause, Consequence, or Context? ». *The Journal of Clinical Investigation* 114 (2): 168-71. <https://doi.org/10.1172/JCI22309>.
- Dai, Jianping, Franck Losy, Anne-Marie Guinault, Carine Pages, Ignacio Anegón, Pascal Desgranges, Jean-Pierre Becquemin, et Eric Allaire. 2005. « Overexpression of Transforming Growth Factor-Beta1 Stabilizes

- Already-Formed Aortic Aneurysms: A First Approach to Induction of Functional Healing by Endovascular Gene Therapy ». *Circulation* 112 (7): 1008-15. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.523357>.
- Dale, Matthew A., Wanfen Xiong, Jeffrey S. Carson, Melissa K. Suh, Andrew D. Karpisek, Trevor M. Meisinger, George P. Casale, et B. Timothy Baxter. 2016. « Elastin-Derived Peptides Promote Abdominal Aortic Aneurysm Formation by Modulating M1/M2 Macrophage Polarization ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 196 (11): 4536-43. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502454>.
- Dasouki, Majed, Dessislava Markova, Robert Garola, Takako Sasaki, Noe L. Charbonneau, Lynn Y. Sakai, et Mon-Li Chu. 2007. « Compound Heterozygous Mutations in Fibulin-4 Causing Neonatal Lethal Pulmonary Artery Occlusion, Aortic Aneurysm, Arachnodactyly, and Mild Cutis Laxa ». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 143A (22): 2635-41. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31980>.
- Daugherty, Alan, Debra L. Rateri, Israel F. Charo, A. Phillip Owens, Deborah A. Howatt, et Lisa A. Cassis. 2010. « Angiotensin II Infusion Promotes Ascending Aortic Aneurysms: Attenuation by CCR2 Deficiency in ApoE<sup>-/-</sup> Mice ». *Clinical Science (London, England: 1979)* 118 (11): 681-89. <https://doi.org/10.1042/CS20090372>.
- Davis, Frank M., Debra L. Rateri, et Alan Daugherty. 2014. « Mechanisms of Aortic Aneurysm Formation: Translating Preclinical Studies into Clinical Therapies ». *Heart (British Cardiac Society)* 100 (19): 1498-1505. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2014-305648>.
- De Ciuceis, Carolina, Farhad Amiri, Pascal Brassard, Dierk H. Endemann, Rhian M. Touyz, et Ernesto L. Schiffrin. 2005. « Reduced Vascular Remodeling, Endothelial Dysfunction, and Oxidative Stress in Resistance Arteries of Angiotensin II-Infused Macrophage Colony-Stimulating Factor-Deficient Mice: Evidence for a Role in Inflammation in Angiotensin-Induced Vascular Injury ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25 (10): 2106-13. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000181743.28028.57>.
- Delettre, C., J. M. Griffoin, J. Kaplan, H. Dollfus, B. Lorenz, L. Faivre, G. Lenaers, P. Belenguer, et C. P. Hamel. 2001. « Mutation Spectrum and Splicing Variants in the OPA1 Gene ». *Human Genetics* 109 (6): 584-91. <https://doi.org/10.1007/s00439-001-0633-y>.
- Denninger, J. W., et M. A. Marletta. 1999. « Guanylate Cyclase and the .NO/CGMP Signaling Pathway ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1411 (2-3): 334-50. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(99\)00024-9](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(99)00024-9).
- Didion, Sean P., Dale A. Kinzenbaw, Laura I. Schrader, Yi Chu, et Frank M. Faraci. 2009. « Endogenous Interleukin-10 Inhibits Angiotensin II-Induced Vascular Dysfunction ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 54 (3): 619-24. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.137158>.
- Dietrich, Marcelo O., Zhong-Wu Liu, et Tamas L. Horvath. 2013. « Mitochondrial Dynamics Controlled by Mitofusins Regulate Agrp Neuronal Activity and Diet-Induced Obesity ». *Cell* 155 (1): 188-99. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.004>.
- Dietz, H. C., G. R. Cutting, R. E. Pyeritz, C. L. Maslen, L. Y. Sakai, G. M. Corson, E. G. Puffenberger, A. Hamosh, E. J. Nanthakumar, et S. M. Curristin. 1991. « Marfan Syndrome Caused by a Recurrent de Novo Missense Mutation in the Fibrillin Gene ». *Nature* 352 (6333): 337-39. <https://doi.org/10.1038/352337a0>.
- Dikalov, Sergey I., Rafal R. Nazarewicz, Alfiya Bikineyeva, Lula Hilenski, Bernard Lassègue, Kathy K. Griendling, David G. Harrison, et Anna E. Dikalova. 2014. « Nox2-Induced Production of Mitochondrial Superoxide in Angiotensin II-Mediated Endothelial Oxidative Stress and Hypertension ». *Antioxidants & Redox Signaling* 20 (2): 281-94. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4918>.
- Dikalova, Anna E., Alfiya T. Bikineyeva, Klaudia Budzyn, Rafal R. Nazarewicz, Louise McCann, William Lewis, David G. Harrison, et Sergey I. Dikalov. 2010. « Therapeutic Targeting of Mitochondrial Superoxide in Hypertension ». *Circulation Research* 107 (1): 106-16. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.214601>.
- Dillavou, Ellen D., Satish C. Muluk, et Michel S. Makaroun. 2006. « Improving Aneurysm-Related Outcomes: Nationwide Benefits of Endovascular Repair ». *Journal of Vascular Surgery* 43 (3): 446-51; discussion 451-452. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2005.11.017>.
- Dornas, Waleska C., et Marcelo E. Silva. 2011. « Animal Models for the Study of Arterial Hypertension ». *Journal of Biosciences* 36 (4): 731-37. <https://doi.org/10.1007/s12038-011-9097-y>.
- Dubick, M. A., G. C. Hunter, E. Perez-Lizano, G. Mar, et M. C. Geokas. 1988. « Assessment of the Role of Pancreatic Proteases in Human Abdominal Aortic Aneurysms and Occlusive Disease ». *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 177 (1): 1-10. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(88\)90301-4](https://doi.org/10.1016/0009-8981(88)90301-4).
- Dumont, Odile, Laurent Loufrani, et Daniel Henrion. 2007. « Key Role of the NO-Pathway and Matrix Metalloprotease-9 in High Blood Flow-Induced Remodeling of Rat Resistance Arteries ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27 (2): 317-24. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000254684.80662.44>.
- E, Pöschl, Schlötzer-Schrehardt U, Brachvogel B, Saito K, Ninomiya Y, et Mayer U. 2004. « Collagen IV Is Essential for Basement Membrane Stability but Dispensable for Initiation of Its Assembly during Early

- Development ». *Development* (Cambridge, England). *Development*. avril 2004. <https://doi.org/10.1242/dev.01037>.
- Eliason, Jonathan L., Kevin K. Hannawa, Gorav Ailawadi, Indranil Sinha, John W. Ford, Michael P. Deogracias, Karen J. Roelofs, et al. 2005. « Neutrophil Depletion Inhibits Experimental Abdominal Aortic Aneurysm Formation ». *Circulation* 112 (2): 232-40. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.517391>.
- Elmarakby, Ahmed A., Jeffrey E. Quigley, John D. Imig, Jennifer S. Pollock, et David M. Pollock. 2008. « TNF-Alpha Inhibition Reduces Renal Injury in DOCA-Salt Hypertensive Rats ». *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 294 (1): R76-83. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00466.2007>.
- Elmore, J. R., B. F. Keister, D. P. Franklin, J. R. Youkey, et D. J. Carey. 1998. « Expression of Matrix Metalloproteinases and TIMPs in Human Abdominal Aortic Aneurysms ». *Annals of Vascular Surgery* 12 (3): 221-28. <https://doi.org/10.1007/s100169900144>.
- Ernst, C. B. 1993. « Abdominal Aortic Aneurysm ». *The New England Journal of Medicine* 328 (16): 1167-72. <https://doi.org/10.1056/NEJM199304223281607>.
- Eskandari, Mark K., Joseph D. Vijungco, Amy Flores, Jayme Borensztajn, Vera Shively, et William H. Pearce. 2005. « Enhanced Abdominal Aortic Aneurysm in TIMP-1-Deficient Mice ». *The Journal of Surgical Research* 123 (2): 289-93. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2004.07.247>.
- Esposito, L. A., S. Melov, A. Panov, B. A. Cottrell, et D. C. Wallace. 1999. « Mitochondrial Disease in Mouse Results in Increased Oxidative Stress ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (9): 4820-25. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.9.4820>.
- Eto, Hideyuki, Sadatoshi Biro, Masaaki Miyata, Hiroshi Kaieda, Hachiro Obata, Takashi Kihara, Koji Orihara, et Chuwa Tei. 2003. « Angiotensin II Type 1 Receptor Participates in Extracellular Matrix Production in the Late Stage of Remodeling after Vascular Injury ». *Cardiovascular Research* 59 (1): 200-211. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(03\)00356-0](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(03)00356-0).
- Fleming, I., et R. Busse. 1999. « Signal Transduction of ENOS Activation ». *Cardiovascular Research* 43 (3): 532-41. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(99\)00094-2](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(99)00094-2).
- Folkesson, Maggie, Chunjun Li, Siw Frebélius, Jesper Swedenborg, Dick Wågsäter, Kevin Jon Williams, Per Eriksson, Joy Roy, et Ming-Ling Liu. 2015. « Proteolytically Active ADAM10 and ADAM17 Carried on Membrane Microvesicles in Human Abdominal Aortic Aneurysms ». *Thrombosis and Haemostasis* 114 (6): 1165-74. <https://doi.org/10.1160/TH14-10-0899>.
- Fontaine, Vincent, Marie-Paule Jacob, Xavier Houard, Patrick Rossignol, Didier Plissonnier, Eduardo Angles-Cano, et Jean-Baptiste Michel. 2002. « Involvement of the Mural Thrombus as a Site of Protease Release and Activation in Human Aortic Aneurysms ». *The American Journal of Pathology* 161 (5): 1701-10. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64447-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64447-1).
- Fontaine, Vincent, Ziad Touat, El Mostafa Mtairag, Roger Vranckx, Liliane Louedec, Xavier Houard, Bernard Andreassian, et al. 2004. « Role of Leukocyte Elastase in Preventing Cellular Re-Colonization of the Mural Thrombus ». *The American Journal of Pathology* 164 (6): 2077-87. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)63766-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63766-2).
- Foote, Kirsty, Johannes Reinhold, Emma P. K. Yu, Nichola L. Figg, Alison Finigan, Michael P. Murphy, et Martin R. Bennett. 2018. « Restoring Mitochondrial DNA Copy Number Preserves Mitochondrial Function and Delays Vascular Aging in Mice ». *Aging Cell* 17 (4): e12773. <https://doi.org/10.1111/accel.12773>.
- Forester, N. D., S. M. Cruickshank, D. J. A. Scott, et S. R. Carding. 2006. « Increased Natural Killer Cell Activity in Patients with an Abdominal Aortic Aneurysm ». *The British Journal of Surgery* 93 (1): 46-54. <https://doi.org/10.1002/bjs.5215>.
- Freestone, T., R. J. Turner, A. Coady, D. J. Higman, R. M. Greenhalgh, et J. T. Powell. 1995. « Inflammation and Matrix Metalloproteinases in the Enlarging Abdominal Aortic Aneurysm ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 15 (8): 1145-51. <https://doi.org/10.1161/01.atv.15.8.1145>.
- Freestone, T., R. J. Turner, D. J. Higman, M. J. Lever, et J. T. Powell. 1997. « Influence of Hypercholesterolemia and Adventitial Inflammation on the Development of Aortic Aneurysm in Rabbits ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17 (1): 10-17. <https://doi.org/10.1161/01.atv.17.1.10>.
- Frezza, Christian, Sara Cipolat, Olga Martins de Brito, Massimo Micaroni, Galina V. Beznoussenko, Tomasz Rudka, Davide Bartoli, et al. 2006. « OPA1 Controls Apoptotic Cristae Remodeling Independently from Mitochondrial Fusion ». *Cell* 126 (1): 177-89. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.025>.
- Fröhlich, Chris, Stefan Grabiger, David Schwefel, Katja Faelber, Eva Rosenbaum, Jason Mears, Oliver Rocks, et Oliver Daumke. 2013. « Structural Insights into Oligomerization and Mitochondrial Remodelling of Dynamin 1-like Protein ». *The EMBO Journal* 32 (9): 1280-92. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.74>.
- Fukai, Tohru, et Masuko Ushio-Fukai. 2011. « Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases ». *Antioxidants & Redox Signaling* 15 (6): 1583-1606. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3999>.

- Furchgott, R. F., et P. M. Vanhoutte. 1989. « Endothelium-Derived Relaxing and Contracting Factors ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 3 (9): 2007-18.
- Furchgott, R. F., et J. V. Zawadzki. 1980. « The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine ». *Nature* 288 (5789): 373-76. <https://doi.org/10.1038/288373a0>.
- Furusho, Aya, Hiroki Aoki, Satoko Ohno-Urabe, Michihide Nishihara, Saki Hirakata, Norifumi Nishida, Sohei Ito, et al. 2018. « Involvement of B Cells, Immunoglobulins, and Syk in the Pathogenesis of Abdominal Aortic Aneurysm ». *Journal of the American Heart Association* 7 (6). <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.007750>.
- Gabrielson, Marike, Emina Vorkapic, Maggie Folkesson, Martin Welander, Andreas Matussek, Jan Dimberg, Toste Länne, Josefin Skogberg, et Dick Wågsäter. 2016. « Altered PPAR $\gamma$  Coactivator-1 Alpha Expression in Abdominal Aortic Aneurysm: Possible Effects on Mitochondrial Biogenesis ». *Journal of Vascular Research* 53 (1-2): 17-26. <https://doi.org/10.1159/000446653>.
- Galis, Z. S., M. Muszynski, G. K. Sukhova, E. Simon-Morrissey, E. N. Unemori, M. W. Lark, E. Amento, et P. Libby. 1994. « Cytokine-Stimulated Human Vascular Smooth Muscle Cells Synthesize a Complement of Enzymes Required for Extracellular Matrix Digestion ». *Circulation Research* 75 (1): 181-89. <https://doi.org/10.1161/01.res.75.1.181>.
- Galle, C., L. Schandené, P. Stordeur, Y. Peignois, J. Ferreira, J.-C. Wautrecht, J.-P. Dereume, et M. Goldman. 2005. « Predominance of Type 1 CD4+ T Cells in Human Abdominal Aortic Aneurysm ». *Clinical and Experimental Immunology* 142 (3): 519-27. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02938.x>.
- Gallo, Elena M., David C. Loch, Jennifer P. Habashi, Juan F. Calderon, Yichun Chen, Djahida Bedja, Christel van Erp, et al. 2014. « Angiotensin II-Dependent TGF- $\beta$  Signaling Contributes to Loeys-Dietz Syndrome Vascular Pathogenesis ». *The Journal of Clinical Investigation* 124 (1): 448-60. <https://doi.org/10.1172/JCI69666>.
- Geng, Y. J., Q. Wu, M. Muszynski, G. K. Hansson, et P. Libby. 1996. « Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells Induced by in Vitro Stimulation with Interferon-Gamma, Tumor Necrosis Factor-Alpha, and Interleukin-1 Beta ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 16 (1): 19-27. <https://doi.org/10.1161/01.atv.16.1.19>.
- Gibbons, G. H., R. E. Pratt, et V. J. Dzau. 1992. « Vascular Smooth Muscle Cell Hypertrophy vs. Hyperplasia. Autocrine Transforming Growth Factor-Beta 1 Expression Determines Growth Response to Angiotensin II ». *The Journal of Clinical Investigation* 90 (2): 456-61. <https://doi.org/10.1172/JCI115881>.
- Golledge, Alexandra L. V., Philip Walker, Paul E. Norman, et Jonathan Golledge. 2009. « A Systematic Review of Studies Examining Inflammation Associated Cytokines in Human Abdominal Aortic Aneurysm Samples ». *Disease Markers* 26 (4): 181-88. <https://doi.org/10.3233/DMA-2009-0629>.
- Gomez, Delphine, Pamela Swiatlowska, et Gary K. Owens. 2015. « Epigenetic Control of Smooth Muscle Cell Identity and Lineage Memory ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 35 (12): 2508-16. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.305044>.
- Griendling, K. K., C. A. Minieri, J. D. Ollerenshaw, et R. W. Alexander. 1994. « Angiotensin II Stimulates NADH and NADPH Oxidase Activity in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells ». *Circulation Research* 74 (6): 1141-48. <https://doi.org/10.1161/01.res.74.6.1141>.
- Grote, Karsten, Inna Flach, Maren Luchtefeld, Elvan Akin, Steven M. Holland, Helmut Drexler, et Bernhard Schieffer. 2003. « Mechanical Stretch Enhances mRNA Expression and Proenzyme Release of Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H Oxidase-Derived Reactive Oxygen Species ». *Circulation Research* 92 (11): e80-86. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000077044.60138.7C>.
- Grotenhuis, Heynric B., Jaap Ottenkamp, Jos J. M. Westenberg, Jeroen J. Bax, Lucia J. M. Kroft, et Albert de Roos. 2007. « Reduced Aortic Elasticity and Dilatation Are Associated with Aortic Regurgitation and Left Ventricular Hypertrophy in Nonstenotic Bicuspid Aortic Valve Patients ». *Journal of the American College of Cardiology* 49 (15): 1660-65. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.12.044>.
- Guo, Dong-Chuan, Hariyadarshi Pannu, Van Tran-Fadulu, Christina L. Papke, Robert K. Yu, Nili Avidan, Scott Bourgeois, et al. 2007. « Mutations in Smooth Muscle Alpha-Actin (ACTA2) Lead to Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections ». *Nature Genetics* 39 (12): 1488-93. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.6>.
- Guo, Dong-Chuan, Christina L. Papke, Van Tran-Fadulu, Ellen S. Regalado, Nili Avidan, Ralph Jay Johnson, Dong H. Kim, et al. 2009. « Mutations in Smooth Muscle Alpha-Actin (ACTA2) Cause Coronary Artery Disease, Stroke, and Moyamoya Disease, along with Thoracic Aortic Disease ». *American Journal of Human Genetics* 84 (5): 617-27. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.04.007>.
- Guo, Dong-chuan, Ellen Regalado, Darren E. Casteel, Regie L. Santos-Cortez, Limin Gong, Jeong Joo Kim, Sarah Dyack, et al. 2013. « Recurrent Gain-of-Function Mutation in PRKG1 Causes Thoracic Aortic Aneurysms and Acute Aortic Dissections ». *American Journal of Human Genetics* 93 (2): 398-404. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.06.019>.

- Guo Xiaomei, Chen Kuang-Hueih, Guo Yanhong, Liao Hua, Tang Jian, et Xiao Rui-Ping. 2007. « Mitofusin 2 Triggers Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis via Mitochondrial Death Pathway ». *Circulation Research* 101 (11): 1113-22. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.157644>.
- Gutierrez, Paulo Sampaio, Mário Luiz Marques Piubelli, Kalil Georgetto Naal, Ricardo Ribeiro Dias, et Luciano Figueiredo Borges. 2020. « Mitochondria in Aneurysms and Dissections of the Human Ascending Aorta ». *Cardiovascular Pathology: The Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 47 (août): 107207. <https://doi.org/10.1016/j.carp.2020.107207>.
- Guzik, Tomasz J., Nyssa E. Hoch, Kathryn A. Brown, Louise A. McCann, Ayaz Rahman, Sergey Dikalov, Jorg Goronzy, Cornelia Weyand, et David G. Harrison. 2007. « Role of the T Cell in the Genesis of Angiotensin II Induced Hypertension and Vascular Dysfunction ». *The Journal of Experimental Medicine* 204 (10): 2449-60. <https://doi.org/10.1084/jem.20070657>.
- Guzman, R. J., K. Abe, et C. K. Zarins. 1997. « Flow-Induced Arterial Enlargement Is Inhibited by Suppression of Nitric Oxide Synthase Activity in Vivo ». *Surgery* 122 (2): 273-79; discussion 279-280. [https://doi.org/10.1016/s0039-6060\(97\)90018-0](https://doi.org/10.1016/s0039-6060(97)90018-0).
- Hadj-Rabia, Smail, Bert L. Callewaert, Emmanuelle Bourrat, Marlies Kempers, Astrid S. Plomp, Valerie Layet, Deborah Bartholdi, et al. 2013. « Twenty Patients Including 7 Proband with Autosomal Dominant Cutis Laxa Confirm Clinical and Molecular Homogeneity ». *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8 (février): 36. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-36>.
- Hadrava, V., U. Kruppa, R. C. Russo, Y. Lacourcière, J. Tremblay, et P. Hamet. 1991. « Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Its Therapeutic Modulation in Hypertension ». *American Heart Journal* 122 (4 Pt 2): 1198-1203. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(91\)90939-f](https://doi.org/10.1016/0002-8703(91)90939-f).
- Haileselassie, Bereketab, Riddhita Mukherjee, Amit U. Joshi, Brooke A. Napier, Liliana M. Massis, Nicolai Patrick Ostberg, Bruno B. Queliconi, Denise Monack, Daniel Bernstein, et Daria Mochly-Rosen. 2019. « Drp1/Fis1 Interaction Mediates Mitochondrial Dysfunction in Septic Cardiomyopathy ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 130 (mai): 160-69. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.04.006>.
- Hannawa, Kevin K., Jonathan L. Eliason, Derek T. Woodrum, Charles G. Pearce, Karen J. Roelofs, Vladimir Grigoryants, Matthew J. Eagleton, et al. 2005. « L-Selectin-Mediated Neutrophil Recruitment in Experimental Rodent Aneurysm Formation ». *Circulation* 112 (2): 241-47. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.535625>.
- Harrison, Seamus C., Andrew J. P. Smith, Gregory T. Jones, Daniel I. Swerdlow, Riaz Rampuri, Matthew J. Bown, Aneurysm Consortium, et al. 2013. « Interleukin-6 Receptor Pathways in Abdominal Aortic Aneurysm ». *European Heart Journal* 34 (48): 3707-16. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs354>.
- Harter, L. P., B. H. Gross, P. W. Callen, et R. A. Barth. 1982. « Ultrasonic Evaluation of Abdominal Aortic Thrombus ». *Journal of Ultrasound in Medicine: Official Journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine* 1 (8): 315-18. <https://doi.org/10.7863/jum.1982.1.8.315>.
- Hartupee, Justin, Caini Liu, Michael Novotny, Xiaoxia Li, et Thomas Hamilton. 2007. « IL-17 Enhances Chemokine Gene Expression through mRNA Stabilization ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179 (6): 4135-41. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.6.4135>.
- Harvey, Adam, Augusto C. Montezano, Rheure Alves Lopes, Francisco Rios, et Rhian M. Touyz. 2016. « Vascular Fibrosis in Aging and Hypertension: Molecular Mechanisms and Clinical Implications ». *The Canadian Journal of Cardiology* 32 (5): 659-68. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2016.02.070>.
- He, C. M., et M. R. Roach. 1994. « The Composition and Mechanical Properties of Abdominal Aortic Aneurysms ». *Journal of Vascular Surgery* 20 (1): 6-13. [https://doi.org/10.1016/0741-5214\(94\)90169-4](https://doi.org/10.1016/0741-5214(94)90169-4).
- Hedin, U., B. A. Bottger, E. Forsberg, S. Johansson, et J. Thyberg. 1988. « Diverse Effects of Fibronectin and Laminin on Phenotypic Properties of Cultured Arterial Smooth Muscle Cells ». *The Journal of Cell Biology* 107 (1): 307-19. <https://doi.org/10.1083/jcb.107.1.307>.
- Henrion, D., N. Kubis, et B. I. Lévy. 2001. « Physiological and Pathophysiological Functions of the AT(2) Subtype Receptor of Angiotensin II: From Large Arteries to the Microcirculation ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 38 (5): 1150-57. <https://doi.org/10.1161/hy1101.096109>.
- Horiuchi, M., M. Akishita, et V. J. Dzau. 1999. « Recent Progress in Angiotensin II Type 2 Receptor Research in the Cardiovascular System ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 33 (2): 613-21. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.33.2.613>.
- Houard, X., F. Rouzet, Z. Touat, M. Philippe, M. Dominguez, V. Fontaine, L. Sarda-Mantel, et al. 2007. « Topology of the Fibrinolytic System within the Mural Thrombus of Human Abdominal Aortic Aneurysms ». *The Journal of Pathology* 212 (1): 20-28. <https://doi.org/10.1002/path.2148>.
- Houard, Xavier, Ziad Touat, Véronique Ollivier, Liliane Louedec, Monique Philippe, Uriel Sebbag, Olivier Meilhac, Patrick Rossignol, et Jean-Baptiste Michel. 2009. « Mediators of Neutrophil Recruitment in Human Abdominal Aortic Aneurysms ». *Cardiovascular Research* 82 (3): 532-41. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp048>.

- Hovsepian, D. M., S. J. Ziporin, M. K. Sakurai, J. K. Lee, J. A. Curci, et R. W. Thompson. 2000. « Elevated Plasma Levels of Matrix Metalloproteinase-9 in Patients with Abdominal Aortic Aneurysms: A Circulating Marker of Degenerative Aneurysm Disease ». *Journal of Vascular and Interventional Radiology: JVIR* 11 (10): 1345-52. [https://doi.org/10.1016/s1051-0443\(07\)61315-3](https://doi.org/10.1016/s1051-0443(07)61315-3).
- Howard, Dominic P. J., Amitava Banerjee, Jack F. Fairhead, Jeremy Perkins, Louise E. Silver, Peter M. Rothwell, et Oxford Vascular Study. 2013. « Population-Based Study of Incidence and Outcome of Acute Aortic Dissection and Premorbid Risk Factor Control: 10-Year Results from the Oxford Vascular Study ». *Circulation* 127 (20): 2031-37. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000483>.
- Hsueh, Willa A., et Kathleen Wyne. 2011. « Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Diabetes and Hypertension ». *Journal of Clinical Hypertension (Greenwich, Conn.)* 13 (4): 224-37. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7176.2011.00449.x>.
- Hu, Qingxun, Huiliang Zhang, Nicolas Gutierrez Cortes, Dan Wu, Pei Wang, Jing Zhang, Julie A. Mattison, et al. 2020. « Increased Drp1 Acetylation by Lipid Overload Induces Cardiomyocyte Death and Heart Dysfunction ». *Circulation Research*, janvier. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.315252>.
- Huang, Gaojian, Zhilei Cong, Xiaoyan Wang, Yanggang Yuan, Renjie Xu, Zhaoyang Lu, Xuelian Wang, et Jia Qi. 2020. « Targeting HSP90 Attenuates Angiotensin II-Induced Adventitial Remodelling via Suppression of Mitochondrial Fission ». *Cardiovascular Research* 116 (5): 1071-84. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz194>.
- Huchtagowder, Vishwanathan, Nina Sausgruber, Katherine H. Kim, Brad Angle, Lihua Y. Marmorstein, et Zsolt Urban. 2006. « Fibulin-4: A Novel Gene for an Autosomal Recessive Cutis Laxa Syndrome ». *American Journal of Human Genetics* 78 (6): 1075-80. <https://doi.org/10.1086/504304>.
- Inamoto, Sakiko, Callie S. Kwartler, Andrea L. Lafont, Yao Yun Liang, Van Tran Fadulu, Senthil Duraisamy, Marcia Willing, et al. 2010. « TGFBR2 Mutations Alter Smooth Muscle Cell Phenotype and Predispose to Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections ». *Cardiovascular Research* 88 (3): 520-29. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq230>.
- Ingerman, Elena, Edward M. Perkins, Michael Marino, Jason A. Mears, J. Michael McCaffery, Jenny E. Hinshaw, et Jodi Nunnari. 2005. « Dnm1 Forms Spirals That Are Structurally Tailored to Fit Mitochondria ». *The Journal of Cell Biology* 170 (7): 1021-27. <https://doi.org/10.1083/jcb.200506078>.
- Intengan, H. D., et E. L. Schiffrin. 2001. « Vascular Remodeling in Hypertension: Roles of Apoptosis, Inflammation, and Fibrosis ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 38 (3 Pt 2): 581-87. <https://doi.org/10.1161/hy09t1.096249>.
- Irizarry, E., K. M. Newman, R. H. Gandhi, G. B. Nackman, V. Halpern, S. Wishner, J. V. Scholes, et M. D. Tilson. 1993. « Demonstration of Interstitial Collagenase in Abdominal Aortic Aneurysm Disease ». *The Journal of Surgical Research* 54 (6): 571-74. <https://doi.org/10.1006/jsre.1993.1087>.
- Ishibashi, Minako, Kensuke Egashira, Qingwei Zhao, Ken-ichi Hiasa, Kisho Ohtani, Yoshiko Ihara, Israel F. Charo, et al. 2004. « Bone Marrow-Derived Monocyte Chemoattractant Protein-1 Receptor CCR2 Is Critical in Angiotensin II-Induced Acceleration of Atherosclerosis and Aneurysm Formation in Hypercholesterolemic Mice ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24 (11): e174-178. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000143384.69170.2d>.
- Ishibashi, S., J. Herz, N. Maeda, J. L. Goldstein, et M. S. Brown. 1994. « The Two-Receptor Model of Lipoprotein Clearance: Tests of the Hypothesis in "Knockout" Mice Lacking the Low Density Lipoprotein Receptor, Apolipoprotein E, or Both Proteins ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (10): 4431-35. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.10.4431>.
- Ishihara, Naotada, Yuu Fujita, Toshihiko Oka, et Katsuyoshi Mihara. 2006. « Regulation of Mitochondrial Morphology through Proteolytic Cleavage of OPA1 ». *The EMBO Journal* 25 (13): 2966-77. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601184>.
- Isselbacher, Eric M., Christian Lacks Lino Cardenas, et Mark E. Lindsay. 2016. « Hereditary Influence in Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection ». *Circulation* 133 (24): 2516-28. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.009762>.
- J, Löhler, Timpl R, et Jaenisch R. 1984. « Embryonic Lethal Mutation in Mouse Collagen I Gene Causes Rupture of Blood Vessels and Is Associated with Erythropoietic and Mesenchymal Cell Death ». *Cell*. Cell. septembre 1984. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90514-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90514-2).
- J, Pincemail, Defraigne Jo, Cheramy-Bien Jp, Dardenne N, Donneau Af, Albert A, Labropoulos N, et Sakalihasan N. 2012. « On the Potential Increase of the Oxidative Stress Status in Patients with Abdominal Aortic Aneurysm ». *Redox Report: Communications in Free Radical Research*. Redox Rep. 2012. <https://doi.org/10.1179/1351000212Y.0000000012>.
- James, Dominic I., Philippe A. Parone, Yves Mattenberger, et Jean-Claude Martinou. 2003. « Hfis1, a Novel Component of the Mammalian Mitochondrial Fission Machinery ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (38): 36373-79. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303758200>.

- Jessup, W., L. Kritharides, et R. Stocker. 2004. « Lipid Oxidation in Atherogenesis: An Overview ». *Biochemical Society Transactions* 32 (Pt 1): 134-38. <https://doi.org/10.1042/bst0320134>.
- Johansson, G., U. Markström, et J. Swedenborg. 1995. « Ruptured Thoracic Aortic Aneurysms: A Study of Incidence and Mortality Rates ». *Journal of Vascular Surgery* 21 (6): 985-88. [https://doi.org/10.1016/s0741-5214\(95\)70227-x](https://doi.org/10.1016/s0741-5214(95)70227-x).
- Johnston, K. W., R. B. Rutherford, M. D. Tilson, D. M. Shah, L. Hollier, et J. C. Stanley. 1991. « Suggested Standards for Reporting on Arterial Aneurysms. Subcommittee on Reporting Standards for Arterial Aneurysms, Ad Hoc Committee on Reporting Standards, Society for Vascular Surgery and North American Chapter, International Society for Cardiovascular Surgery ». *Journal of Vascular Surgery* 13 (3): 452-58. <https://doi.org/10.1067/mva.1991.26737>.
- Joshi, A. U., A. E. Ebert, B. Haileselassie, et D. Mochly-Rosen. 2019. « Drp1/Fis1-Mediated Mitochondrial Fragmentation Leads to Lysosomal Dysfunction in Cardiac Models of Huntington's Disease ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 127: 125-33. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.12.004>.
- Judge, Daniel P., Nancy J. Biery, Douglas R. Keene, Jessica Geubtner, Loretha Myers, David L. Huso, Lynn Y. Sakai, et Harry C. Dietz. 2004. « Evidence for a Critical Contribution of Haploinsufficiency in the Complex Pathogenesis of Marfan Syndrome ». *The Journal of Clinical Investigation* 114 (2): 172-81. <https://doi.org/10.1172/JCI20641>.
- Juvonen, J., H. M. Surcel, J. Satta, A. M. Teppo, A. Bloigu, H. Syrjälä, J. Airaksinen, M. Leinonen, P. Saikku, et T. Juvonen. 1997. « Elevated Circulating Levels of Inflammatory Cytokines in Patients with Abdominal Aortic Aneurysm ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17 (11): 2843-47. <https://doi.org/10.1161/01.atv.17.11.2843>.
- Kaneko, Hidehiro, Toshihisa Anzai, Keisuke Horiuchi, Takashi Kohno, Toshiyuki Nagai, Atsushi Anzai, Toshiyuki Takahashi, et al. 2011. « Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Converting Enzyme Is a Key Mediator of Abdominal Aortic Aneurysm Development ». *Atherosclerosis* 218 (2): 470-78. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.06.008>.
- Kang, Kyu-Tae. 2014. « Endothelium-Derived Relaxing Factors of Small Resistance Arteries in Hypertension ». *Toxicological Research* 30 (3): 141-48. <https://doi.org/10.5487/TR.2014.30.3.141>.
- Kang, Yun Seok, Donghun Seong, Jae Cheol Kim, et Sang Hyun Kim. 2020. « Low-Intensity Exercise Training Additionally Increases Mitochondrial Dynamics Caused by High-Fat Diet (HFD) but Has No Additional Effect on Mitochondrial Biogenesis in Fast-Twitch Muscle by HFD ». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17 (15). <https://doi.org/10.3390/ijerph17155461>.
- Kao, Cheng-Yuan, Fei Huang, Yin Chen, Philip Thai, Shinichiro Wachi, Christy Kim, Lucinda Tam, et Reen Wu. 2005. « Up-Regulation of CC Chemokine Ligand 20 Expression in Human Airway Epithelium by IL-17 through a JAK-Independent but MEK/NF-KappaB-Dependent Signaling Pathway ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (10): 6676-85. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.10.6676>.
- Karangelis, D. E., I. Kanakis, A. P. Asimakopoulou, E. Karousou, A. Passi, A. D. Theocharis, F. Triposkiadis, N. B. Tsiliminas, et Nikos K. Karamanos. 2010. « Glycosaminoglycans as Key Molecules in Atherosclerosis: The Role of Versican and Hyaluronan ». *Current Medicinal Chemistry* 17 (33): 4018-26. <https://doi.org/10.2174/092986710793205354>.
- Kaser, Michael, Melanie Kambacheld, Brigitte Kisters-Woike, et Thomas Langer. 2003. « Oma1, a Novel Membrane-Bound Metalloproteinase in Mitochondria with Activities Overlapping with the m-AAA Protease ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (47): 46414-23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305584200>.
- Kawai, Tatsuo, Takehiko Takayanagi, Steven J. Forrester, Kyle J. Preston, Takashi Obama, Toshiyuki Tsuji, Tomonori Kobayashi, et al. 2017. « Vascular ADAM17 (a Disintegrin and Metalloproteinase Domain 17) Is Required for Angiotensin II/ $\beta$ -Aminopropionitrile-Induced Abdominal Aortic Aneurysm ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 70 (5): 959-63. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09822>.
- Kazi, Monsur, Johan Thyberg, Piotr Religa, Joy Roy, Per Eriksson, Ulf Hedin, et Jesper Swedenborg. 2003. « Influence of Intraluminal Thrombus on Structural and Cellular Composition of Abdominal Aortic Aneurysm Wall ». *Journal of Vascular Surgery* 38 (6): 1283-92. [https://doi.org/10.1016/s0741-5214\(03\)00791-2](https://doi.org/10.1016/s0741-5214(03)00791-2).
- Klink, Ahmed, Joeri Heynens, Beatriz Herranz, Mark E. Lobatto, Teresa Arias, Honorius M. H. F. Sanders, Gustav J. Strijkers, et al. 2011. « In Vivo Characterization of a New Abdominal Aortic Aneurysm Mouse Model with Conventional and Molecular Magnetic Resonance Imaging ». *Journal of the American College of Cardiology* 58 (24): 2522-30. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.09.017>.
- Knot, H. J., et M. T. Nelson. 1998. « Regulation of Arterial Diameter and Wall [Ca<sup>2+</sup>] in Cerebral Arteries of Rat by Membrane Potential and Intravascular Pressure ». *The Journal of Physiology* 508 ( Pt 1) (avril): 199-209. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.199br.x>.

- Knox, J. B., G. K. Sukhova, A. D. Whittemore, et P. Libby. 1997. « Evidence for Altered Balance between Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Aortic Diseases ». *Circulation* 95 (1): 205-12. <https://doi.org/10.1161/01.cir.95.1.205>.
- Ko, Eun A., Farhad Amiri, Nihar R. Pandey, Danesh Javeshghani, Eyal Leibovitz, Rhian M. Touyz, et Ernesto L. Schiffrin. 2007. « Resistance Artery Remodeling in Deoxycorticosterone Acetate-Salt Hypertension Is Dependent on Vascular Inflammation: Evidence from m-CSF-Deficient Mice ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 292 (4): H1789-1795. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01118.2006>.
- Koch, A. E., G. K. Haines, R. J. Rizzo, J. A. Radosevich, R. M. Pope, P. G. Robinson, et W. H. Pearce. 1990. « Human Abdominal Aortic Aneurysms. Immunophenotypic Analysis Suggesting an Immune-Mediated Response ». *The American Journal of Pathology* 137 (5): 1199-1213.
- Koshiba, Takumi, Scott A. Detmer, Jens T. Kaiser, Hsiuchen Chen, J. Michael McCaffery, et David C. Chan. 2004. « Structural Basis of Mitochondrial Tethering by Mitofusin Complexes ». *Science (New York, N.Y.)* 305 (5685): 858-62. <https://doi.org/10.1126/science.1099793>.
- Kozjak-Pavlovic, Vera. 2017. « The MICOS Complex of Human Mitochondria ». *Cell and Tissue Research* 367 (1): 83-93. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2433-7>.
- Kranzhöfer, R., J. Schmidt, C. A. Pfeiffer, S. Hagl, P. Libby, et W. Kübler. 1999. « Angiotensin Induces Inflammatory Activation of Human Vascular Smooth Muscle Cells ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19 (7): 1623-29. <https://doi.org/10.1161/01.atv.19.7.1623>.
- Kuang, Shao-Qing, Callie S. Kwartler, Katerina L. Byanova, John Pham, Limin Gong, Siddharth K. Prakash, Jian Huang, et al. 2012. « Rare, Nonsynonymous Variant in the Smooth Muscle-Specific Isoform of Myosin Heavy Chain, MYH11, R247C, Alters Force Generation in the Aorta and Phenotype of Smooth Muscle Cells ». *Circulation Research* 110 (11): 1411-22. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.261743>.
- Kuzkaya, Nermin, Norbert Weissmann, David G. Harrison, et Sergey Dikalov. 2003. « Interactions of Peroxynitrite, Tetrahydrobiopterin, Ascorbic Acid, and Thiols: Implications for Uncoupling Endothelial Nitric-Oxide Synthase ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (25): 22546-54. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302227200>.
- Kvakan, Heda, Markus Kleinewietfeld, Fatimunnisa Qadri, Joon-Keun Park, Robert Fischer, Ines Schwarz, Hans-Peter Rahn, et al. 2009. « Regulatory T Cells Ameliorate Angiotensin II-Induced Cardiac Damage ». *Circulation* 119 (22): 2904-12. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.832782>.
- Kwartler, Callie S., Jiyuan Chen, Dhananjay Thakur, Shumin Li, Kedryn Baskin, Shanzhi Wang, Zhao V. Wang, et al. 2014. « Overexpression of Smooth Muscle Myosin Heavy Chain Leads to Activation of the Unfolded Protein Response and Autophagic Turnover of Thick Filament-Associated Proteins in Vascular Smooth Muscle Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (20): 14075-88. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.499277>.
- Lacolley, Patrick, Véronique Regnault, Antonino Nicoletti, Zhenlin Li, et Jean-Baptiste Michel. 2012. « The Vascular Smooth Muscle Cell in Arterial Pathology: A Cell That Can Take on Multiple Roles ». *Cardiovascular Research* 95 (2): 194-204. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs135>.
- Lahera, Vicente, Natalia de Las Heras, Antonio López-Farré, Walter Manucha, et León Ferder. 2017. « Role of Mitochondrial Dysfunction in Hypertension and Obesity ». *Current Hypertension Reports* 19 (2): 11. <https://doi.org/10.1007/s11906-017-0710-9>.
- Lai, Chao-Han, Ching-Wen Chang, Fang-Tzu Lee, Cheng-Hsiang Kuo, Jong-Hau Hsu, Chung-Pin Liu, Hua-Lin Wu, et Jwu-Lai Yeh. 2020. « Targeting Vascular Smooth Muscle Cell Dysfunction with Xanthine Derivative KMUP-3 Inhibits Abdominal Aortic Aneurysm in Mice ». *Atherosclerosis* 297 (février): 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2020.01.029>.
- Landmesser, Ulf, Hua Cai, Sergey Dikalov, Louise McCann, Jinah Hwang, Hanjoong Jo, Steven M. Holland, et David G. Harrison. 2002. « Role of P47(Phox) in Vascular Oxidative Stress and Hypertension Caused by Angiotensin II ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 40 (4): 511-15. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.0000032100.23772.98>.
- Landmesser, Ulf, Sergey Dikalov, S. Russ Price, Louise McCann, Tohru Fukai, Steven M. Holland, William E. Mitch, et David G. Harrison. 2003. « Oxidation of Tetrahydrobiopterin Leads to Uncoupling of Endothelial Cell Nitric Oxide Synthase in Hypertension ». *The Journal of Clinical Investigation* 111 (8): 1201-9. <https://doi.org/10.1172/JCI14172>.
- Lareyre, Fabien, Marc Clément, Juliette Raffort, Stefanie Pohlod, Meghana Patel, Bruno Esposito, Leanne Master, et al. 2017. « TGFβ (Transforming Growth Factor-β) Blockade Induces a Human-Like Disease in a Non-dissecting Mouse Model of Abdominal Aortic Aneurysm ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 37 (11): 2171-81. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309999>.

- Larsson, N. G., J. Wang, H. Wilhelmsson, A. Oldfors, P. Rustin, M. Lewandoski, G. S. Barsh, et D. A. Clayton. 1998. « Mitochondrial Transcription Factor A Is Necessary for MtDNA Maintenance and Embryogenesis in Mice ». *Nature Genetics* 18 (3): 231-36. <https://doi.org/10.1038/ng0398-231>.
- Laurent, Stéphane, et Pierre Boutouyrie. 2015. « The Structural Factor of Hypertension: Large and Small Artery Alterations ». *Circulation Research* 116 (6): 1007-21. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303596>.
- Laursen, J. B., S. Rajagopalan, Z. Galis, M. Tarpey, B. A. Freeman, et D. G. Harrison. 1997. « Role of Superoxide in Angiotensin II-Induced but Not Catecholamine-Induced Hypertension ». *Circulation* 95 (3): 588-93. <https://doi.org/10.1161/01.cir.95.3.588>.
- Laviades, C., N. Varo, J. Fernández, G. Mayor, M. J. Gil, I. Monreal, et J. Díez. 1998. « Abnormalities of the Extracellular Degradation of Collagen Type I in Essential Hypertension ». *Circulation* 98 (6): 535-40. <https://doi.org/10.1161/01.cir.98.6.535>.
- Le Page, Sophie, Marjorie Niro, Jérémy Fauconnier, Laura Cellier, Sophie Tamareille, Abdallah Gharib, Arnaud Chevrollier, et al. 2016. « Increase in Cardiac Ischemia-Reperfusion Injuries in Opa1+/- Mouse Model ». *PloS One* 11 (10): e0164066. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164066>.
- LeMaire, Scott A., Xinwen Wang, Jonathan A. Wilks, Stacey A. Carter, Shixiang Wen, Taehee Won, Dominic Leonardelli, et al. 2005. « Matrix Metalloproteinases in Ascending Aortic Aneurysms: Bicuspid versus Trileaflet Aortic Valves ». *The Journal of Surgical Research* 123 (1): 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2004.06.007>.
- Lenk, Guy M., Gerard Tromp, Shantel Weinsheimer, Zoran Gatalica, Ramon Berguer, et Helena Kuivaniemi. 2007. « Whole Genome Expression Profiling Reveals a Significant Role for Immune Function in Human Abdominal Aortic Aneurysms ». *BMC Genomics* 8 (juillet): 237. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-237>.
- Lestienne, P., et N. Bataillé. 1994. « Mitochondrial DNA Alterations and Genetic Diseases: A Review ». *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 48 (5-6): 199-214. [https://doi.org/10.1016/0753-3322\(94\)90134-1](https://doi.org/10.1016/0753-3322(94)90134-1).
- Leung, D. Y., S. Glagov, et M. B. Mathews. 1976. « Cyclic Stretching Stimulates Synthesis of Matrix Components by Arterial Smooth Muscle Cells in Vitro ». *Science (New York, N.Y.)* 191 (4226): 475-77. <https://doi.org/10.1126/science.128820>.
- Li, D. Y., B. Brooke, E. C. Davis, R. P. Mecham, L. K. Sorensen, B. B. Boak, E. Eichwald, et M. T. Keating. 1998. « Elastin Is an Essential Determinant of Arterial Morphogenesis ». *Nature* 393 (6682): 276-80. <https://doi.org/10.1038/30522>.
- Li, D. Y., G. Faury, D. G. Taylor, E. C. Davis, W. A. Boyle, R. P. Mecham, P. Stenzel, B. Boak, et M. T. Keating. 1998. « Novel Arterial Pathology in Mice and Humans Hemizygous for Elastin ». *The Journal of Clinical Investigation* 102 (10): 1783-87. <https://doi.org/10.1172/JCI4487>.
- Li, Dan, Xiaolan Li, Yang Guan, et Xiaomei Guo. 2015. « Mitofusin-2-Mediated Tethering of Mitochondria and Endoplasmic Reticulum Promotes Cell Cycle Arrest of Vascular Smooth Muscle Cells in G0/G1 Phase ». *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 47 (6): 441-50. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmv035>.
- Li, Qiutang, et Inder M. Verma. 2002. « NF-KappaB Regulation in the Immune System ». *Nature Reviews. Immunology* 2 (10): 725-34. <https://doi.org/10.1038/nri910>.
- Li, Yongqi, Weicheng Wang, Lei Li, et Raouf A. Khalil. 2020. « MMPs and ADAMs/ADAMTS Inhibition Therapy of Abdominal Aortic Aneurysm ». *Life Sciences* 253 (juillet): 117659. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117659>.
- Libby, Peter. 2002. « Inflammation in Atherosclerosis ». *Nature* 420 (6917): 868-74. <https://doi.org/10.1038/nature01323>.
- Lindsay, Mark E., et Harry C. Dietz. 2011. « Lessons on the Pathogenesis of Aneurysm from Heritable Conditions ». *Nature* 473 (7347): 308-16. <https://doi.org/10.1038/nature10145>.
- Liu, Jianhua, Fang Yang, Xiao-Ping Yang, Michelle Jankowski, et Patrick J. Pagano. 2003. « NAD(P)H Oxidase Mediates Angiotensin II-Induced Vascular Macrophage Infiltration and Medial Hypertrophy ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23 (5): 776-82. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000066684.37829.16>.
- Liu, Ming-Yu, Jing Jin, Shan-Liang Li, Jie Yan, Chang-Lin Zhen, Jin-Lai Gao, Yong-Hui Zhang, et al. 2016. « Mitochondrial Fission of Smooth Muscle Cells Is Involved in Artery Constriction ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 68 (5): 1245-54. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07974>.
- Loeys, Bart L., Junji Chen, Enid R. Neptune, Daniel P. Judge, Megan Podowski, Tammy Holm, Jennifer Meyers, et al. 2005. « A Syndrome of Altered Cardiovascular, Craniofacial, Neurocognitive and Skeletal Development Caused by Mutations in TGFBR1 or TGFBR2 ». *Nature Genetics* 37 (3): 275-81. <https://doi.org/10.1038/ng1511>.

- Loeys, Bart L., Ulrike Schwarze, Tammy Holm, Bert L. Callewaert, George H. Thomas, Hariyadarshi Pannu, Julie F. De Backer, et al. 2006. « Aneurysm Syndromes Caused by Mutations in the TGF-Beta Receptor ». *The New England Journal of Medicine* 355 (8): 788-98. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa055695>.
- Longo, G. Matthew, Steven J. Buda, Nicola Fiotta, Wanfen Xiong, Timothy Griener, Steven Shapiro, et B. Timothy Baxter. 2005. « MMP-12 Has a Role in Abdominal Aortic Aneurysms in Mice ». *Surgery* 137 (4): 457-62. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2004.12.004>.
- Longo, G. Matthew, Wanfen Xiong, Timothy C. Greiner, Yong Zhao, Nicola Fiotti, et B. Timothy Baxter. 2002. « Matrix Metalloproteinases 2 and 9 Work in Concert to Produce Aortic Aneurysms ». *The Journal of Clinical Investigation* 110 (5): 625-32. <https://doi.org/10.1172/JCI15334>.
- Longstaff, C., et K. Kolev. 2015. « Basic Mechanisms and Regulation of Fibrinolysis ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 13 Suppl 1 (juin): S98-105. <https://doi.org/10.1111/jth.12935>.
- López-Doménech, Guillermo, Christian Covill-Cooke, Davor Ivankovic, Els F. Half, David F. Sheehan, Rosalind Norkett, Nicol Birsa, et Josef T. Kittler. 2018. « Miro Proteins Coordinate Microtubule- and Actin-Dependent Mitochondrial Transport and Distribution ». *The EMBO Journal* 37 (3): 321-36. <https://doi.org/10.15252/embj.201696380>.
- Losón, Oliver C., Zhiyin Song, Hsiuchen Chen, et David C. Chan. 2013. « Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 Mediate Drp1 Recruitment in Mitochondrial Fission ». *Molecular Biology of the Cell* 24 (5): 659-67. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-10-0721>.
- Lu, Zhao-Yang, Jia Qi, Bin Yang, Hui-Li Cao, Rui-Ying Wang, Xuan Wang, Rui-Fang Chi, et al. 2020. « Dialllyl Trisulfide Suppresses Angiotensin II-Induced Vascular Remodeling Via Inhibition of Mitochondrial Fission ». *Cardiovascular Drugs and Therapy*, juin. <https://doi.org/10.1007/s10557-020-07000-1>.
- Lusis, A. J. 2000. « Atherosclerosis ». *Nature* 407 (6801): 233-41. <https://doi.org/10.1038/35025203>.
- M, Nishihara, Aoki H, Ohno S, Furusho A, Hirakata S, Nishida N, Ito S, Hayashi M, Imaizumi T, et Fukumoto Y. 2017. « The Role of IL-6 in Pathogenesis of Abdominal Aortic Aneurysm in Mice ». *PLoS One*. PLoS One. 10 mai 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185923>.
- Ma, Dong, Bin Zheng, He-Liang Liu, Yong-Bo Zhao, Xiao Liu, Xin-Hua Zhang, Qiang Li, Wei-Bo Shi, Toru Suzuki, et Jin-Kun Wen. 2020. « Klf5 Down-Regulation Induces Vascular Senescence through EIF5a Depletion and Mitochondrial Fission ». *PLoS Biology* 18 (8): e3000808. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000808>.
- MacTaggart, Jason Neal, Wanfen Xiong, Rebecca Knispel, et Bernard T. Baxter. 2007. « Deletion of CCR2 but Not CCR5 or CXCR3 Inhibits Aortic Aneurysm Formation ». *Surgery* 142 (2): 284-88. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2007.04.017>.
- MacVicar, Thomas, et Thomas Langer. 2016. « OPA1 Processing in Cell Death and Disease - the Long and Short of It ». *Journal of Cell Science* 129 (12): 2297-2306. <https://doi.org/10.1242/jcs.159186>.
- Madhur, Meena S., Heinrich E. Lob, Louise A. McCann, Yoichiro Iwakura, Yelena Blinder, Tomasz J. Guzik, et David G. Harrison. 2010. « Interleukin 17 Promotes Angiotensin II-Induced Hypertension and Vascular Dysfunction ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 55 (2): 500-507. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.145094>.
- Mäki, Joni M., Juha Räsänen, Hilkka Tikkanen, Raija Sormunen, Kaarin Mäkikallio, Kari I. Kivirikko, et Raija Soininen. 2002. « Inactivation of the Lysyl Oxidase Gene *Lox* Leads to Aortic Aneurysms, Cardiovascular Dysfunction, and Perinatal Death in Mice ». *Circulation* 106 (19): 2503-9. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000038109.84500.1e>.
- Manczak, Maria, Ramesh Kandimalla, David Fry, Hiromi Sesaki, et P. Hemachandra Reddy. 2016. « Protective Effects of Reduced Dynamin-Related Protein 1 against Amyloid Beta-Induced Mitochondrial Dysfunction and Synaptic Damage in Alzheimer's Disease ». *Human Molecular Genetics* 25 (23): 5148-66. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw330>.
- Manning, Michael W., Lisa A. Cassis, et Alan Daugherty. 2003. « Differential Effects of Doxycycline, a Broad-Spectrum Matrix Metalloproteinase Inhibitor, on Angiotensin II-Induced Atherosclerosis and Abdominal Aortic Aneurysms ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23 (3): 483-88. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000058404.92759.32>.
- Mao, D., J. K. Lee, S. J. VanVickle, et R. W. Thompson. 1999. « Expression of Collagenase-3 (MMP-13) in Human Abdominal Aortic Aneurysms and Vascular Smooth Muscle Cells in Culture ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 261 (3): 904-10. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1142>.
- Marsboom, Glenn, Peter T. Toth, John J. Ryan, Zhigang Hong, Xichen Wu, Yong-Hu Fang, Thenappan Thenappan, et al. 2012. « Dynamin-Related Protein 1-Mediated Mitochondrial Mitotic Fission Permits Hyperproliferation of Vascular Smooth Muscle Cells and Offers a Novel Therapeutic Target in Pulmonary Hypertension ». *Circulation Research* 110 (11): 1484-97. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.263848>.

- Martinez-Quinones, Patricia, Cameron G. McCarthy, Stephanie W. Watts, Nicole S. Klee, Amel Komic, Fabiano B. Calmasini, Fernanda Priviero, Alexander Warner, Yu Chenghao, et Camilla F. Wenceslau. 2018. « Hypertension Induced Morphological and Physiological Changes in Cells of the Arterial Wall ». *American Journal of Hypertension* 31 (10): 1067-78. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpy083>.
- Marui, N., M. K. Offermann, R. Swerlick, C. Kunsch, C. A. Rosen, M. Ahmad, R. W. Alexander, et R. M. Medford. 1993. « Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) Gene Transcription and Expression Are Regulated through an Antioxidant-Sensitive Mechanism in Human Vascular Endothelial Cells ». *The Journal of Clinical Investigation* 92 (4): 1866-74. <https://doi.org/10.1172/JCI116778>.
- Matrisian, L. M. 1990. « Metalloproteinases and Their Inhibitors in Matrix Remodeling ». *Trends in Genetics: TIG* 6 (4): 121-25. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(90\)90126-q](https://doi.org/10.1016/0168-9525(90)90126-q).
- McCormick, Michael L., Dan Gavrilu, et Neal L. Weintraub. 2007. « Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Abdominal Aortic Aneurysms ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27 (3): 461-69. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000257552.94483.14>.
- McMillan, W. D., B. K. Patterson, R. R. Keen, et W. H. Pearce. 1995. « In Situ Localization and Quantification of Seventy-Two-Kilodalton Type IV Collagenase in Aneurysmal, Occlusive, and Normal Aorta ». *Journal of Vascular Surgery* 22 (3): 295-305. [https://doi.org/10.1016/s0741-5214\(95\)70144-3](https://doi.org/10.1016/s0741-5214(95)70144-3).
- McMillan, W. D., B. K. Patterson, R. R. Keen, V. P. Shively, M. Cipollone, et W. H. Pearce. 1995. « In Situ Localization and Quantification of mRNA for 92-KD Type IV Collagenase and Its Inhibitor in Aneurysmal, Occlusive, and Normal Aorta ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 15 (8): 1139-44. <https://doi.org/10.1161/01.atv.15.8.1139>.
- Meher, Akshaya K., William F. Johnston, Guanyi Lu, Nicolas H. Pope, Castigliano M. Bhamidipati, Daniel B. Harmon, Gang Su, et al. 2014. « B2 Cells Suppress Experimental Abdominal Aortic Aneurysms ». *The American Journal of Pathology* 184 (11): 3130-41. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.07.006>.
- Meilhac, Olivier, Benoît Ho-Tin-Noé, Xavier Houard, Monique Philippe, Jean-Baptiste Michel, et Eduardo Anglés-Cano. 2003. « Pericellular Plasmin Induces Smooth Muscle Cell Anoikis ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17 (10): 1301-3. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0687fje>.
- Meir, Karen S., et Eran Leitersdorf. 2004. « Atherosclerosis in the Apolipoprotein-E-Deficient Mouse: A Decade of Progress ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24 (6): 1006-14. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000128849.12617.f4>.
- Menashi, S., J. S. Campa, R. M. Greenhalgh, et J. T. Powell. 1987. « Collagen in Abdominal Aortic Aneurysm: Typing, Content, and Degradation ». *Journal of Vascular Surgery* 6 (6): 578-82. <https://doi.org/10.1067/mva.1987.avs0060578>.
- Meng, Shumei, Garrick W. Cason, Anthony W. Gannon, Lorraine C. Racusen, et R. Davis Manning. 2003. « Oxidative Stress in Dahl Salt-Sensitive Hypertension ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 41 (6): 1346-52. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000070028.99408.E8>.
- Michel, J B, J L Martin-Ventura, J Egido, N Sakalihasan, V Treska, J Lindholt, E Allaire, U Thorsteinsdottir, G Cockerill, et J Swedenborg. 2011. « Novel Aspects of the Pathogenesis of Aneurysms of the Abdominal Aorta in Humans ». *Cardiovasc Res* 90 (1): 18-27. <https://doi.org/cvq337> [pii]10.1093/cvr/cvq337.
- Michel, Jean-Baptiste. 2020. « Phylogenetic Determinants of Cardiovascular Frailty, Focus on Hemodynamics and Arterial Smooth Muscle Cells ». *Physiological Reviews*, janvier. <https://doi.org/10.1152/physrev.00022.2019>.
- Michel, Jean-Baptiste, Guillaume Jondeau, et Dianna M. Milewicz. 2018. « From Genetics to Response to Injury: Vascular Smooth Muscle Cells in Aneurysms and Dissections of the Ascending Aorta ». *Cardiovascular Research* 114 (4): 578-89. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy006>.
- Michel, Jean-Baptiste, José-Luis Martin-Ventura, Jesus Egido, Natzi Sakalihasan, Vladislav Treska, Jes Lindholt, Eric Allaire, et al. 2011. « Novel Aspects of the Pathogenesis of Aneurysms of the Abdominal Aorta in Humans ». *Cardiovascular Research* 90 (1): 18-27. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq337>.
- Michel, Jean-Baptiste, Olivier Thaunat, Xavier Houard, Olivier Meilhac, Giuseppina Caligiuri, et Antonino Nicoletti. 2007a. « Topological Determinants and Consequences of Adventitial Responses to Arterial Wall Injury ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27 (6): 1259-68. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.106.137851>.
- . 2007b. « Topological Determinants and Consequences of Adventitial Responses to Arterial Wall Injury ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27 (6): 1259-68. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.106.137851>.
- Middleton, Rachel K., Geraint M. Lloyd, Matthew J. Bown, Nicola J. Cooper, Nicholas J. London, et Robert D. Sayers. 2007. « The Pro-Inflammatory and Chemotactic Cytokine Microenvironment of the Abdominal Aortic Aneurysm Wall: A Protein Array Study ». *Journal of Vascular Surgery* 45 (3): 574-80. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2006.11.020>.

- Mignatti, P., et D. B. Rifkin. 1993. « Biology and Biochemistry of Proteinases in Tumor Invasion ». *Physiological Reviews* 73 (1): 161-95. <https://doi.org/10.1152/physrev.1993.73.1.161>.
- Milewicz, Dianna M., Kathleen M. Trybus, Dong-Chuan Guo, H. Lee Sweeney, Ellen Regalado, Kristine Kamm, et James T. Stull. 2017. « Altered Smooth Muscle Cell Force Generation as a Driver of Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 37 (1): 26-34. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.303229>.
- Miller, Francis J., William J. Sharp, Xiang Fang, Larry W. Oberley, Terry D. Oberley, et Neal L. Weintraub. 2002. « Oxidative Stress in Human Abdominal Aortic Aneurysms: A Potential Mediator of Aneurysmal Remodeling ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 22 (4): 560-65. <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000013778.72404.30>.
- Minion, D. J., V. A. Davis, P. A. Nejezchleb, Y. Wang, B. M. McManus, et B. T. Baxter. 1994. « Elastin Is Increased in Abdominal Aortic Aneurysms ». *The Journal of Surgical Research* 57 (4): 443-46. <https://doi.org/10.1006/jsre.1994.1168>.
- Miyao, Masashi, Stephanie Cicalese, Tatsuo Kawai, Hannah A. Cooper, Michael J. Boyer, Katherine J. Elliott, Steven J. Forrester, et al. 2020. « Involvement of Senescence and Mitochondrial Fission in Endothelial Cell Pro-Inflammatory Phenotype Induced by Angiotensin II ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (9). <https://doi.org/10.3390/ijms21093112>.
- Mollnau, Hanke, Maria Wendt, Katalin Szöcs, Bernard Lassègue, Eberhard Schulz, Mathias Oelze, Huige Li, et al. 2002. « Effects of Angiotensin II Infusion on the Expression and Function of NAD(P)H Oxidase and Components of Nitric Oxide/CGMP Signaling ». *Circulation Research* 90 (4): E58-65. <https://doi.org/10.1161/01.res.0000012569.55432.02>.
- Morciano, Giampaolo, Simone Patergnani, Massimo Bonora, Gaia Pedriali, Anna Tarocco, Esmā Bouhamida, Saverio Marchi, et al. 2020. « Mitophagy in Cardiovascular Diseases ». *Journal of Clinical Medicine* 9 (3). <https://doi.org/10.3390/jcm9030892>.
- Muller, Dominik N., Erdenechimeg Shagdarsuren, Joon-Keun Park, Ralf Dechend, Eero Mervaala, Franziska Hampich, Anette Fiebeler, et al. 2002. « Immunosuppressive Treatment Protects against Angiotensin II-Induced Renal Damage ». *The American Journal of Pathology* 161 (5): 1679-93. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64445-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64445-8).
- Mulvany, M. J., G. L. Baumbach, C. Aalkjaer, A. M. Heagerty, N. Korsgaard, E. L. Schiffrin, et D. D. Heistad. 1996. « Vascular Remodeling ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 28 (3): 505-6.
- Mulvany, Michael J. 2012. « Small Artery Remodelling in Hypertension ». *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 110 (1): 49-55. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00758.x>.
- Murali Krishna, Smriti, Susan K. Morton, Jiaye Li, et Jonathan Golledge. 2020. « Risk Factors and Mouse Models of Abdominal Aortic Aneurysm Rupture ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (19). <https://doi.org/10.3390/ijms21197250>.
- Murphy, J. G., J. D. Marsh, et T. W. Smith. 1987. « The Role of Calcium in Ischemic Myocardial Injury ». *Circulation* 75 (6 Pt 2): V15-24.
- Murphy, Michael P. 2009. « How Mitochondria Produce Reactive Oxygen Species ». *The Biochemical Journal* 417 (1): 1-13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>.
- Nava, Mayerly, Yasmir Quiroz, Nosratola Vaziri, et Bernardo Rodriguez-Iturbe. 2003. « Melatonin Reduces Renal Interstitial Inflammation and Improves Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats ». *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 284 (3): F447-454. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00264.2002>.
- Neptune, Enid R., Pamela A. Frischmeyer, Dan E. Arking, Loretha Myers, Tracie E. Bunton, Barbara Gayraud, Francesco Ramirez, Lynn Y. Sakai, et Harry C. Dietz. 2003. « Dysregulation of TGF-Beta Activation Contributes to Pathogenesis in Marfan Syndrome ». *Nature Genetics* 33 (3): 407-11. <https://doi.org/10.1038/ng1116>.
- Nishimura, Akiyuki, Kakeru Shimoda, Tomohiro Tanaka, Takashi Toyama, Kazuhiro Nishiyama, Yasuhiro Shinkai, Takuro Numaga-Tomita, et al. 2019. « Depolysulfidation of Drp1 Induced by Low-Dose Methylmercury Exposure Increases Cardiac Vulnerability to Hemodynamic Overload ». *Science Signaling* 12 (587). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaw1920>.
- Nishimura, K., M. Ikebuchi, Y. Kanaoka, S. Ohgi, E. Ueta, E. Nanba, et H. Ito. 2003. « Relationships between Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases in the Wall of Abdominal Aortic Aneurysms ». *International Angiology: A Journal of the International Union of Angiology* 22 (3): 229-38.
- Nistri, Stefano, Maria Domenica Sorbo, Cristina Basso, et Gaetano Thiene. 2002. « Bicuspid Aortic Valve: Abnormal Aortic Elastic Properties ». *The Journal of Heart Valve Disease* 11 (3): 369-73; discussion 373-374.

- Nollendorfs, A., T. C. Greiner, H. Nagase, et B. T. Baxter. 2001. « The Expression and Localization of Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase in Human Abdominal Aortic Aneurysms ». *Journal of Vascular Surgery* 34 (2): 316-22. <https://doi.org/10.1067/mva.2001.115962>.
- Norman, P. E., et J. T. Powell. 2007. « Abdominal Aortic Aneurysm: The Prognosis in Women Is Worse than in Men ». *Circulation* 115 (22): 2865-69. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.671859>.
- Ocana, Esther, Juan-Carlos Bohórquez, José Pérez-Requena, José A. Brieva, et Carmen Rodríguez. 2003. « Characterisation of T and B Lymphocytes Infiltrating Abdominal Aortic Aneurysms ». *Atherosclerosis* 170 (1): 39-48. [https://doi.org/10.1016/s0021-9150\(03\)00282-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(03)00282-x).
- Olichon, Aurélien, Laurent Baricault, Nicole Gas, Emmanuelle Guillou, Annie Valette, Pascale Belenguer, et Guy Lenaers. 2003. « Loss of OPA1 Perturbates the Mitochondrial Inner Membrane Structure and Integrity, Leading to Cytochrome c Release and Apoptosis ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (10): 7743-46. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200677200>.
- Ong, Kim-Thanh, Jérôme Perdu, Julie De Backer, Erwan Bozec, Patrick Collignon, Joseph Emmerich, Anne-Laure Fauret, et al. 2010. « Effect of Celiprolol on Prevention of Cardiovascular Events in Vascular Ehlers-Danlos Syndrome: A Prospective Randomised, Open, Blinded-Endpoints Trial ». *Lancet (London, England)* 376 (9751): 1476-84. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60960-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60960-9).
- Osellame, Laura D., Abeer P. Singh, David A. Stroud, Catherine S. Palmer, Diana Stojanovski, Rajesh Ramachandran, et Michael T. Ryan. 2016. « Cooperative and Independent Roles of the Drp1 Adaptors Mff, MiD49 and MiD51 in Mitochondrial Fission ». *Journal of Cell Science* 129 (11): 2170-81. <https://doi.org/10.1242/jcs.185165>.
- Osol, George, Johan Fredrik Brekke, Keara McElroy-Yaggy, et Natalia I. Gokina. 2002. « Myogenic Tone, Reactivity, and Forced Dilatation: A Three-Phase Model of in Vitro Arterial Myogenic Behavior ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 283 (6): H2260-2267. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00634.2002>.
- Otera, Hidenori, Non Miyata, Osamu Kuge, et Katsuyoshi Mihara. 2016. « Drp1-Dependent Mitochondrial Fission via MiD49/51 Is Essential for Apoptotic Cristae Remodeling ». *The Journal of Cell Biology* 212 (5): 531-44. <https://doi.org/10.1083/jcb.201508099>.
- Otera, Hidenori, Chunxin Wang, Megan M. Cleland, Kiyoko Setoguchi, Sadaki Yokota, Richard J. Youle, et Katsuyoshi Mihara. 2010. « Mff Is an Essential Factor for Mitochondrial Recruitment of Drp1 during Mitochondrial Fission in Mammalian Cells ». *The Journal of Cell Biology* 191 (6): 1141-58. <https://doi.org/10.1083/jcb.201007152>.
- Owens, A. Phillip, Debra L. Rateri, Deborah A. Howatt, Kathryn J. Moore, Peter S. Tobias, Linda K. Curtiss, Hong Lu, Lisa A. Cassis, et Alan Daugherty. 2011. « MyD88 Deficiency Attenuates Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation Independent of Signaling through Toll-like Receptors 2 and 4 ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31 (12): 2813-19. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.238642>.
- Palmer, Catherine S., Kirstin D. Elgass, Robert G. Parton, Laura D. Osellame, Diana Stojanovski, et Michael T. Ryan. 2013. « Adaptor Proteins MiD49 and MiD51 Can Act Independently of Mff and Fis1 in Drp1 Recruitment and Are Specific for Mitochondrial Fission ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (38): 27584-93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.479873>.
- Pannu, Hariyadarshi, Van Tran-Fadulu, Christina L. Papke, Steve Scherer, Yaozhong Liu, Caroline Presley, Dongchuan Guo, et al. 2007. « MYH11 Mutations Result in a Distinct Vascular Pathology Driven by Insulin-like Growth Factor 1 and Angiotensin II ». *Human Molecular Genetics* 16 (20): 2453-62. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm201>.
- Panza, J. A., A. A. Quyyumi, J. E. Brush, et S. E. Epstein. 1990. « Abnormal Endothelium-Dependent Vascular Relaxation in Patients with Essential Hypertension ». *The New England Journal of Medicine* 323 (1): 22-27. <https://doi.org/10.1056/NEJM199007053230105>.
- Patel, M. I., J. Melrose, P. Ghosh, et M. Appleberg. 1996. « Increased Synthesis of Matrix Metalloproteinases by Aortic Smooth Muscle Cells Is Implicated in the Etiopathogenesis of Abdominal Aortic Aneurysms ». *Journal of Vascular Surgery* 24 (1): 82-92. [https://doi.org/10.1016/s0741-5214\(96\)70148-9](https://doi.org/10.1016/s0741-5214(96)70148-9).
- Patten, David A., Jacob Wong, Mireille Khacho, Vincent Soubannier, Ryan J. Mailloux, Karine Pilon-Larose, Jason G. MacLaurin, et al. 2014. « OPA1-Dependent Cristae Modulation Is Essential for Cellular Adaptation to Metabolic Demand ». *The EMBO Journal* 33 (22): 2676-91. <https://doi.org/10.15252/embj.201488349>.
- Patterson, C., J. Ruef, N. R. Madamanchi, P. Barry-Lane, Z. Hu, C. Horaist, C. A. Ballinger, A. R. Brasier, C. Bode, et M. S. Runge. 1999. « Stimulation of a Vascular Smooth Muscle Cell NAD(P)H Oxidase by Thrombin. Evidence That P47(Phox) May Participate in Forming This Oxidase in Vitro and in Vivo ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (28): 19814-22. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.28.19814>.

- Pepin, M., U. Schwarze, A. Superti-Furga, et P. H. Byers. 2000. « Clinical and Genetic Features of Ehlers-Danlos Syndrome Type IV, the Vascular Type ». *The New England Journal of Medicine* 342 (10): 673-80. <https://doi.org/10.1056/NEJM200003093421001>.
- Petersen, E., F. Wågberg, et K. A. Angquist. 2002. « Proteolysis of the Abdominal Aortic Aneurysm Wall and the Association with Rupture ». *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery: The Official Journal of the European Society for Vascular Surgery* 23 (2): 153-57. <https://doi.org/10.1053/ejvs.2001.1572>.
- Pfeifer, A., P. Klatt, S. Massberg, L. Ny, M. Sausbier, C. Hirneiss, G. X. Wang, et al. 1998. « Defective Smooth Muscle Regulation in CGMP Kinase I-Deficient Mice ». *The EMBO Journal* 17 (11): 3045-51. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.11.3045>.
- Pham, T., C. Martin, J. Elefteriades, et W. Sun. 2013. « Biomechanical Characterization of Ascending Aortic Aneurysm with Concomitant Bicuspid Aortic Valve and Bovine Aortic Arch ». *Acta Biomaterialia* 9 (8): 7927-36. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.021>.
- Piquereau, Jerome, Fanny Caffin, Marta Novotova, Alexandre Prola, Anne Garnier, Philippe Mateo, Dominique Fortin, et al. 2012. « Down-Regulation of OPA1 Alters Mouse Mitochondrial Morphology, PTP Function, and Cardiac Adaptation to Pressure Overload ». *Cardiovascular Research* 94 (3): 408-17. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs117>.
- Pluijm, Ingrid van der, Joyce Burger, Paula M. van Heijningen, Arne IJpma, Nicole van Vliet, Chiara Milanese, Kees Schoonderwoerd, et al. 2018. « Decreased Mitochondrial Respiration in Aneurysmal Aortas of Fibulin-4 Mutant Mice Is Linked to PGC1A Regulation ». *Cardiovascular Research* 114 (13): 1776-93. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy150>.
- Plump, A. S., J. D. Smith, T. Hayek, K. Aalto-Setälä, A. Walsh, J. G. Verstuyft, E. M. Rubin, et J. L. Breslow. 1992. « Severe Hypercholesterolemia and Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice Created by Homologous Recombination in ES Cells ». *Cell* 71 (2): 343-53. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90362-g](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90362-g).
- Pope, Nicolas H., Morgan Salmon, William F. Johnston, Guanyi Lu, Christine L. Lau, Gilbert R. Upchurch, et Gorav Ailawadi. 2015. « Interleukin-6 Receptor Inhibition Prevents Descending Thoracic Aortic Aneurysm Formation ». *The Annals of Thoracic Surgery* 100 (5): 1620-26. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2015.05.009>.
- Postlethwaite, A. E., et A. H. Kang. 1976. « Collagen-and Collagen Peptide-Induced Chemotaxis of Human Blood Monocytes ». *The Journal of Experimental Medicine* 143 (6): 1299-1307. <https://doi.org/10.1084/jem.143.6.1299>.
- Prachař, Jarmil. 2016. « Ultrastructure of Mitochondrial Nucleoid and Its Surroundings ». *General Physiology and Biophysics* 35 (3): 273-86. [https://doi.org/10.4149/gpb\\_2016008](https://doi.org/10.4149/gpb_2016008).
- Prall, Amy K., G. Matthew Longo, William G. Mayhan, Eugene A. Waltke, Beverly Fleckten, Robert W. Thompson, et B. Timothy Baxter. 2002. « Doxycycline in Patients with Abdominal Aortic Aneurysms and in Mice: Comparison of Serum Levels and Effect on Aneurysm Growth in Mice ». *Journal of Vascular Surgery* 35 (5): 923-29. <https://doi.org/10.1067/mva.2002.123757>.
- Pueyo, M. E., W. Gonzalez, A. Nicoletti, F. Savoie, J. F. Arnal, et J. B. Michel. 2000. « Angiotensin II Stimulates Endothelial Vascular Cell Adhesion Molecule-1 via Nuclear Factor-KappaB Activation Induced by Intracellular Oxidative Stress ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20 (3): 645-51. <https://doi.org/10.1161/01.atv.20.3.645>.
- Pyo, R., J. K. Lee, J. M. Shipley, J. A. Curci, D. Mao, S. J. Ziporin, T. L. Ennis, S. D. Shapiro, R. M. Senior, et R. W. Thompson. 2000. « Targeted Gene Disruption of Matrix Metalloproteinase-9 (Gelatinase B) Suppresses Development of Experimental Abdominal Aortic Aneurysms ». *The Journal of Clinical Investigation* 105 (11): 1641-49. <https://doi.org/10.1172/JCI8931>.
- Qi, Zhihao, Zhen Huang, Feng Xie, et Linxi Chen. 2019. « Dynamin-Related Protein 1: A Critical Protein in the Pathogenesis of Neural System Dysfunctions and Neurodegenerative Diseases ». *Journal of Cellular Physiology* 234 (7): 10032-46. <https://doi.org/10.1002/jcp.27866>.
- Qin, Xiaoteng, Lifan He, Mi Tian, Ping Hu, Jianmin Yang, Huixia Lu, Wenqiang Chen, et al. 2019. « Smooth Muscle-Specific Gsd Deletion Exaggerates Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Mice in Vivo ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 132 (juillet): 49-59. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.05.002>.
- Qin, Yanwen, Xu Cao, Jun Guo, Yaozhong Zhang, Lili Pan, Hongjia Zhang, Huihua Li, Chaoshu Tang, Jie Du, et Guo-Ping Shi. 2012. « Deficiency of Cathepsin S Attenuates Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Apolipoprotein E-Deficient Mice ». *Cardiovascular Research* 96 (3): 401-10. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs263>.
- Quintero, Omar A., Melinda M. DiVito, Rebecca C. Adikes, Melisa B. Kortan, Lindsay B. Case, Audun J. Lier, Niki S. Panaretos, et al. 2009. « Human Myo19 Is a Novel Myosin That Associates with Mitochondria ». *Current Biology: CB* 19 (23): 2008-13. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.10.026>.

- Rafikov, Ruslan, Fabio V. Fonseca, Sanjiv Kumar, Daniel Pardo, Charles Darragh, Shawn Elms, David Fulton, et Stephen M. Black. 2011. « ENOS Activation and NO Function: Structural Motifs Responsible for the Posttranslational Control of Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity ». *The Journal of Endocrinology* 210 (3): 271-84. <https://doi.org/10.1530/JOE-11-0083>.
- Rajagopalan, S., X. P. Meng, S. Ramasamy, D. G. Harrison, et Z. S. Galis. 1996. « Reactive Oxygen Species Produced by Macrophage-Derived Foam Cells Regulate the Activity of Vascular Matrix Metalloproteinases in Vitro. Implications for Atherosclerotic Plaque Stability ». *The Journal of Clinical Investigation* 98 (11): 2572-79. <https://doi.org/10.1172/JCI119076>.
- Rao, G. N., et B. C. Berk. 1992. « Active Oxygen Species Stimulate Vascular Smooth Muscle Cell Growth and Proto-Oncogene Expression ». *Circulation Research* 70 (3): 593-99. <https://doi.org/10.1161/01.res.70.3.593>.
- Rateri, Debra L., Frank M. Davis, Anju Balakrishnan, Deborah A. Howatt, Jessica J. Moorleghen, William N. O'Connor, Richard Charnigo, Lisa A. Cassis, et Alan Daugherty. 2014. « Angiotensin II Induces Region-Specific Medial Disruption during Evolution of Ascending Aortic Aneurysms ». *The American Journal of Pathology* 184 (9): 2586-95. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.05.014>.
- Rateri, Debra L., Deborah A. Howatt, Jessica J. Moorleghen, Richard Charnigo, Lisa A. Cassis, et Alan Daugherty. 2011. « Prolonged Infusion of Angiotensin II in ApoE(-/-) Mice Promotes Macrophage Recruitment with Continued Expansion of Abdominal Aortic Aneurysm ». *The American Journal of Pathology* 179 (3): 1542-48. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.05.049>.
- Razani, Babak, Chu Feng, Trey Coleman, Roy Emanuel, Haitao Wen, Seungmin Hwang, Jenny P. Ting, Herbert W. Virgin, Michael B. Kastan, et Clay F. Semenkovich. 2012. « Autophagy Links Inflammation to Atherosclerotic Progression ». *Cell Metabolism* 15 (4): 534-44. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.02.011>.
- Regalado, Ellen S., Dong-chuan Guo, Siddharth Prakash, Tracy A. Benseid, Kelly Flynn, Anthony Estrera, Hazim Safi, et al. 2015. « Aortic Disease Presentation and Outcome Associated With ACTA2 Mutations ». *Circulation. Cardiovascular Genetics* 8 (3): 457-64. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.114.000943>.
- Regalado, Ellen S., Dong-Chuan Guo, Carlos Villamizar, Nili Avidan, Dawna Gilchrist, Barbara McGillivray, Lorne Clarke, et al. 2011. « Exome Sequencing Identifies SMAD3 Mutations as a Cause of Familial Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection with Intracranial and Other Arterial Aneurysms ». *Circulation Research* 109 (6): 680-86. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.248161>.
- Reusch, P., H. Wagdy, R. Reusch, E. Wilson, et H. E. Ives. 1996. « Mechanical Strain Increases Smooth Muscle and Decreases Nonmuscle Myosin Expression in Rat Vascular Smooth Muscle Cells ». *Circulation Research* 79 (5): 1046-53. <https://doi.org/10.1161/01.res.79.5.1046>.
- Ribeiro, M. O., E. Antunes, G. de Nucci, S. M. Lovisolo, et R. Zatz. 1992. « Chronic Inhibition of Nitric Oxide Synthesis. A New Model of Arterial Hypertension ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 20 (3): 298-303. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.20.3.298>.
- Ricci, M. A., G. Strindberg, J. M. Slaiby, R. Guibord, L. J. Bergersen, P. Nichols, E. D. Hendley, et D. B. Pilcher. 1996. « Anti-CD 18 Monoclonal Antibody Slows Experimental Aortic Aneurysm Expansion ». *Journal of Vascular Surgery* 23 (2): 301-7. [https://doi.org/10.1016/s0741-5214\(96\)70274-4](https://doi.org/10.1016/s0741-5214(96)70274-4).
- Rj, Wenstrup, Florer Jb, Brunskill Ew, Bell Sm, Chervoneva I, et Birk De. 2004. « Type V Collagen Controls the Initiation of Collagen Fibril Assembly ». *The Journal of Biological Chemistry*. 17 décembre 2004. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409622200>.
- Roberts, A. B., M. B. Sporn, R. K. Assoian, J. M. Smith, N. S. Roche, L. M. Wakefield, U. I. Heine, L. A. Liotta, V. Falanga, et J. H. Kehrl. 1986. « Transforming Growth Factor Type Beta: Rapid Induction of Fibrosis and Angiogenesis in Vivo and Stimulation of Collagen Formation in Vitro ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (12): 4167-71. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.12.4167>.
- Rocha, Ricardo, Cynthia L. Martin-Berger, Pochang Yang, Rachel Scherrer, John Delyani, et Ellen McMahon. 2002. « Selective Aldosterone Blockade Prevents Angiotensin II/Salt-Induced Vascular Inflammation in the Rat Heart ». *Endocrinology* 143 (12): 4828-36. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220120>.
- Rodrigues, Stephen F., et Daniel Neil Granger. 2012. « Cerebral Microvascular Inflammation in DOCA Salt-Induced Hypertension: Role of Angiotensin II and Mitochondrial Superoxide ». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32 (2): 368-75. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.139>.
- Rodriguez-Iturbe, Bernardo, Chang-De Zhan, Yasmir Quiroz, Ram K. Sindhu, et Nosratola D. Vaziri. 2003. « Antioxidant-Rich Diet Relieves Hypertension and Reduces Renal Immune Infiltration in Spontaneously Hypertensive Rats ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 41 (2): 341-46. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.0000052833.20759.64>.

- Rogers, Maximillian A., Natalia Maldonado, Joshua D. Hutcheson, Claudia Goettsch, Shinji Goto, Iwao Yamada, Tyler Faits, Hiromi Sesaki, Masanori Aikawa, et Elena Aikawa. 2017. « Dynamin-Related Protein 1 Inhibition Attenuates Cardiovascular Calcification in the Presence of Oxidative Stress ». *Circulation Research* 121 (3): 220-33. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.310293>.
- Romain, Mélissa, Soraya Taleb, Marion Dalloz, Padmapriya Ponnuswamy, Bruno Esposito, Nicolas Pérez, Yu Wang, Akihiko Yoshimura, Alain Tedgui, et Ziad Mallat. 2013. « Overexpression of SOCS3 in T Lymphocytes Leads to Impaired Interleukin-17 Production and Severe Aortic Aneurysm Formation in Mice--Brief Report ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 33 (3): 581-84. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300516>.
- Rubattu, Speranza, Beniamino Pagliaro, Giorgia Pierelli, Caterina Santolamazza, Sara Di Castro, Silvia Mennuni, et Massimo Volpe. 2014. « Pathogenesis of Target Organ Damage in Hypertension: Role of Mitochondrial Oxidative Stress ». *International Journal of Molecular Sciences* 16 (1): 823-39. <https://doi.org/10.3390/ijms16010823>.
- Ruzicka, M., et F. H. Leenen. 1995. « Relevance of Blockade of Cardiac and Circulatory Angiotensin-Converting Enzyme for the Prevention of Volume Overload-Induced Cardiac Hypertrophy ». *Circulation* 91 (1): 16-19. <https://doi.org/10.1161/01.cir.91.1.16>.
- Sakalihan, N., P. Delvenne, B. V. Nussgens, R. Limet, et C. M. Lapière. 1996. « Activated Forms of MMP2 and MMP9 in Abdominal Aortic Aneurysms ». *Journal of Vascular Surgery* 24 (1): 127-33. [https://doi.org/10.1016/s0741-5214\(96\)70153-2](https://doi.org/10.1016/s0741-5214(96)70153-2).
- Sakalihan, N., A. Heyeres, B. V. Nussgens, R. Limet, et C. M. Lapière. 1993. « Modifications of the Extracellular Matrix of Aneurysmal Abdominal Aortas as a Function of Their Size ». *European Journal of Vascular Surgery* 7 (6): 633-37. [https://doi.org/10.1016/s0950-821x\(05\)80708-x](https://doi.org/10.1016/s0950-821x(05)80708-x).
- Salmon, Morgan, Delphine Gomez, Elizabeth Greene, Laura Shankman, et Gary K. Owens. 2012. « Cooperative Binding of KLF4, PELK-1, and HDAC2 to a G/C Repressor Element in the SM22a Promoter Mediates Transcriptional Silencing during SMC Phenotypic Switching in Vivo ». *Circulation Research* 111 (6): 685-96. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.269811>.
- Sanford, L. P., I. Ormsby, A. C. Gittenberger-de Groot, H. Sariola, R. Friedman, G. P. Boivin, E. L. Cardell, et T. Doetschman. 1997. « TGFbeta2 Knockout Mice Have Multiple Developmental Defects That Are Non-Overlapping with Other TGFbeta Knockout Phenotypes ». *Development (Cambridge, England)* 124 (13): 2659-70.
- Saraff, Kiran, Fjoralba Babamusta, Lisa A. Cassis, et Alan Daugherty. 2003. « Aortic Dissection Precedes Formation of Aneurysms and Atherosclerosis in Angiotensin II-Infused, Apolipoprotein E-Deficient Mice ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23 (9): 1621-26. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000085631.76095.64>.
- Sarzi, Emmanuelle, Claire Angebault, Marie Seveno, Naïg Gueguen, Benjamin Chaix, Guy Bielicki, Nathalie Boddaert, et al. 2012. « The Human OPA1delTTAG Mutation Induces Premature Age-Related Systemic Neurodegeneration in Mouse ». *Brain: A Journal of Neurology* 135 (Pt 12): 3599-3613. <https://doi.org/10.1093/brain/aws303>.
- Satoh, Hidetoshi, Motoyuki Nakamura, Mamoru Satoh, Takayuki Nakajima, Hiroshi Izumoto, Chihaya Maesawa, Kouhei Kawazoe, Tomoyuki Masuda, et Katsuhiko Hiramori. 2004. « Expression and Localization of Tumour Necrosis Factor-Alpha and Its Converting Enzyme in Human Abdominal Aortic Aneurysm ». *Clinical Science (London, England: 1979)* 106 (3): 301-6. <https://doi.org/10.1042/CS20030189>.
- Satriano, J. A., M. Shuldiner, K. Hora, Y. Xing, Z. Shan, et D. Schlon dorff. 1993. « Oxygen Radicals as Second Messengers for Expression of the Monocyte Chemoattractant Protein, JE/MCP-1, and the Monocyte Colony-Stimulating Factor, CSF-1, in Response to Tumor Necrosis Factor-Alpha and Immunoglobulin G. Evidence for Involvement of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH)-Dependent Oxidase ». *The Journal of Clinical Investigation* 92 (3): 1564-71. <https://doi.org/10.1172/JCI116737>.
- Scarpulla, Richard C. 2006. « Nuclear Control of Respiratory Gene Expression in Mammalian Cells ». *Journal of Cellular Biochemistry* 97 (4): 673-83. <https://doi.org/10.1002/jcb.20743>.
- Schaheen, Basil, Emily A. Downs, Vlad Serbulea, Camila C. P. Almenara, Michael Spinosa, Gang Su, Yunge Zhao, et al. 2016. « B-Cell Depletion Promotes Aortic Infiltration of Immunosuppressive Cells and Is Protective of Experimental Aortic Aneurysm ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 36 (11): 2191-2202. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307559>.
- Schaper, J., E. Meiser, et G. Stämmler. 1985. « Ultrastructural Morphometric Analysis of Myocardium from Dogs, Rats, Hamsters, Mice, and from Human Hearts ». *Circulation Research* 56 (3): 377-91. <https://doi.org/10.1161/01.res.56.3.377>.
- Schiffrin, E. L. 1996. « The Endothelium of Resistance Arteries: Physiology and Role in Hypertension ». *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids* 54 (1): 17-25. [https://doi.org/10.1016/s0952-3278\(96\)90076-9](https://doi.org/10.1016/s0952-3278(96)90076-9).

- Schiffrin, Ernesto L. 2014. « Immune Mechanisms in Hypertension and Vascular Injury ». *Clinical Science (London, England: 1979)* 126 (4): 267-74. <https://doi.org/10.1042/CS20130407>.
- Schiffrin, Ernesto L., et Rhian M. Touyz. 2004. « From Bedside to Bench to Bedside: Role of Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Remodeling of Resistance Arteries in Hypertension ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 287 (2): H435-446. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00262.2004>.
- Schnackenberg, C. G., et C. S. Wilcox. 1999. « Two-Week Administration of Tempol Attenuates Both Hypertension and Renal Excretion of 8-Iso Prostaglandin F<sub>2</sub>alpha ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 33 (1 Pt 2): 424-28. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.33.1.424>.
- Schrader, Laura I., Dale A. Kinzenbaw, Andrew W. Johnson, Frank M. Faraci, et Sean P. Didion. 2007. « IL-6 Deficiency Protects against Angiotensin II Induced Endothelial Dysfunction and Hypertrophy ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27 (12): 2576-81. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.153080>.
- Schulz, Eberhard, Tommaso Gori, et Thomas Münzel. 2011. « Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction in Hypertension ». *Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension* 34 (6): 665-73. <https://doi.org/10.1038/hr.2011.39>.
- Schwarz, Thomas L. 2013. « Mitochondrial Trafficking in Neurons ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011304>.
- Seidlmayer, Lea K., Vanessa V. Juetner, Sarah Kettlewell, Evgeny V. Pavlov, Lothar A. Blatter, et Elena N. Dedkova. 2015. « Distinct MPTP Activation Mechanisms in Ischaemia-Reperfusion: Contributions of Ca<sup>2+</sup>, ROS, PH, and Inorganic Polyphosphate ». *Cardiovascular Research* 106 (2): 237-48. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv097>.
- Selemidis, Stavros, Christopher G. Sobey, Kirstin Wingler, Harald H. W. Schmidt, et Grant R. Drummond. 2008. « NADPH Oxidases in the Vasculature: Molecular Features, Roles in Disease and Pharmacological Inhibition ». *Pharmacology & Therapeutics* 120 (3): 254-91. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.08.005>.
- Senior, R. M., G. L. Griffin, et R. P. Mecham. 1980. « Chemotactic Activity of Elastin-Derived Peptides ». *The Journal of Clinical Investigation* 66 (4): 859-62. <https://doi.org/10.1172/JCI109926>.
- Shao, Jing, Masaomi Nangaku, Toshio Miyata, Reiko Inagi, Koei Yamada, Kiyoshi Kurokawa, et Toshiro Fujita. 2003. « Imbalance of T-Cell Subsets in Angiotensin II-Infused Hypertensive Rats with Kidney Injury ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 42 (1): 31-38. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000075082.06183.4E>.
- Sharif-Naeini, Reza, Alexandra Dedman, Joost H. A. Folgering, Fabrice Duprat, Amanda Patel, Bernd Nilius, et Eric Honoré. 2008. « TRP Channels and Mechanosensory Transduction: Insights into the Arterial Myogenic Response ». *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 456 (3): 529-40. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0432-y>.
- Sharma, Ashish K., Guanyi Lu, Andrea Jester, William F. Johnston, Yunge Zhao, Vanessa A. Hajzus, M. Reza Saadatzadeh, et al. 2012. « Experimental Abdominal Aortic Aneurysm Formation Is Mediated by IL-17 and Attenuated by Mesenchymal Stem Cell Treatment ». *Circulation* 126 (11 Suppl 1): S38-45. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.083451>.
- Sheng, Zu-Hang. 2014. « Mitochondrial Trafficking and Anchoring in Neurons: New Insight and Implications ». *The Journal of Cell Biology* 204 (7): 1087-98. <https://doi.org/10.1083/jcb.201312123>.
- Shimizu, Koichi, Masayoshi Shichiri, Peter Libby, Richard T. Lee, et Richard N. Mitchell. 2004. « Th2-Predominant Inflammation and Blockade of IFN-Gamma Signaling Induce Aneurysms in Allografted Aortas ». *The Journal of Clinical Investigation* 114 (2): 300-308. <https://doi.org/10.1172/JCI19855>.
- Shibley, J. M., R. L. Wesselschmidt, D. K. Kobayashi, T. J. Ley, et S. D. Shapiro. 1996. « Metalloelastase Is Required for Macrophage-Mediated Proteolysis and Matrix Invasion in Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (9): 3942-46. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.9.3942>.
- Somers, M. J., K. Mavromatis, Z. S. Galis, et D. G. Harrison. 2000. « Vascular Superoxide Production and Vasomotor Function in Hypertension Induced by Deoxycorticosterone Acetate-Salt ». *Circulation* 101 (14): 1722-28. <https://doi.org/10.1161/01.cir.101.14.1722>.
- Spelbrink, Johannes N. 2010. « Functional Organization of Mammalian Mitochondrial DNA in Nucleoids: History, Recent Developments, and Future Challenges ». *IUBMB Life* 62 (1): 19-32. <https://doi.org/10.1002/iub.282>.
- Staiculescu, Marius C., Edgar L. Galiñanes, Guiling Zhao, Uri Ulloa, Minshan Jin, Mirza I. Beig, Gerald A. Meininger, et Luis A. Martinez-Lemus. 2013. « Prolonged Vasoconstriction of Resistance Arteries Involves Vascular Smooth Muscle Actin Polymerization Leading to Inward Remodelling ». *Cardiovascular Research* 98 (3): 428-36. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt034>.

- Stocker, Roland, et John F. Keane. 2004. « Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis ». *Physiological Reviews* 84 (4): 1381-1478. <https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2003>.
- Sturgis, LaShon C., Joseph G. Cannon, Derek A. Schreihof, et Michael W. Brands. 2009. « The Role of Aldosterone in Mediating the Dependence of Angiotensin Hypertension on IL-6 ». *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 297 (6): R1742-1748. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90995.2008>.
- Sullivan, Jennifer C., David M. Pollock, et Jennifer S. Pollock. 2002. « Altered Nitric Oxide Synthase 3 Distribution in Mesenteric Arteries of Hypertensive Rats ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 39 (2 Pt 2): 597-602. <https://doi.org/10.1161/hy0202.103286>.
- Sun, Jiusong, Galina K. Sukhova, Min Yang, Paul J. Wolters, Lindsey A. MacFarlane, Peter Libby, Chongxiu Sun, et al. 2007. « Mast Cells Modulate the Pathogenesis of Elastase-Induced Abdominal Aortic Aneurysms in Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 117 (11): 3359-68. <https://doi.org/10.1172/JCI31311>.
- Sun, Jiusong, Galina K. Sukhova, Jie Zhang, Han Chen, Sara Sjöberg, Peter Libby, Mingcan Xia, Na Xiong, Bruce D. Gelb, et Guo-Ping Shi. 2012. « Cathepsin K Deficiency Reduces Elastase Perfusion-Induced Abdominal Aortic Aneurysms in Mice ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32 (1): 15-23. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.235002>.
- Sun, Jiusong, Galina K. Sukhova, Jie Zhang, Han Chen, Sara Sjöberg, Peter Libby, Meixiang Xiang, et al. 2011. « Cathepsin L Activity Is Essential to Elastase Perfusion-Induced Abdominal Aortic Aneurysms in Mice ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31 (11): 2500-2508. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.230201>.
- Sundaresan, M., Z. X. Yu, V. J. Ferrans, K. Irani, et T. Finkel. 1995. « Requirement for Generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for Platelet-Derived Growth Factor Signal Transduction ». *Science (New York, N.Y.)* 270 (5234): 296-99. <https://doi.org/10.1126/science.270.5234.296>.
- Superti-Furga, A., E. Gugler, R. Gitzelmann, et B. Steinmann. 1988. « Ehlers-Danlos Syndrome Type IV: A Multi-Exon Deletion in One of the Two COL3A1 Alleles Affecting Structure, Stability, and Processing of Type III Procollagen ». *The Journal of Biological Chemistry* 263 (13): 6226-32.
- Suzuki, Jun, Masaru Iwai, Hironori Nakagami, Lan Wu, Rui Chen, Takashi Sugaya, Mareomi Hamada, Kunio Hiwada, et Masatsugu Horiuchi. 2002. « Role of Angiotensin II-Regulated Apoptosis through Distinct AT1 and AT2 Receptors in Neointimal Formation ». *Circulation* 106 (7): 847-53. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000024103.04821.86>.
- Swaminathan, Bhairavi, Haize Goikuria, Reyes Vega, Alfredo Rodríguez-Antigüedad, Antonio López Medina, María del Mar Freijo, Koen Vandenbroeck, et Iraide Alloza. 2014. « Autophagic Marker MAP1LC3B Expression Levels Are Associated with Carotid Atherosclerosis Symptomatology ». *PloS One* 9 (12): e115176. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115176>.
- Swedenborg, Jesper, Mikko I. Mäyränpää, et Petri T. Kovanen. 2011. « Mast Cells: Important Players in the Orchestrated Pathogenesis of Abdominal Aortic Aneurysms ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31 (4): 734-40. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.213157>.
- Sweeney, H. Lee, et David W. Hammers. 2018. « Muscle Contraction ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10 (2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023200>.
- T, Van Agtmael, Bailey Ma, Schlötzer-Schrehardt U, Craigie E, Jackson Ij, Brownstein Dg, Megson Il, et Mullins Jj. 2010. « Col4a1 Mutation in Mice Causes Defects in Vascular Function and Low Blood Pressure Associated with Reduced Red Blood Cell Volume ». *Human Molecular Genetics*. Hum Mol Genet. 15 mars 2010. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp584>.
- Taddei, S., A. Virdis, P. Mattei, et A. Salvetti. 1993. « Vasodilation to Acetylcholine in Primary and Secondary Forms of Human Hypertension ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 21 (6 Pt 2): 929-33. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.21.6.929>.
- Taguchi, Naoko, Naotada Ishihara, Akihiro Jofuku, Toshihiko Oka, et Katsuyoshi Mihara. 2007. « Mitotic Phosphorylation of Dynamin-Related GTPase Drp1 Participates in Mitochondrial Fission ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (15): 11521-29. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607279200>.
- Tamarina, N. A., W. D. McMillan, V. P. Shively, et W. H. Pearce. 1997. « Expression of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Aneurysms and Normal Aorta ». *Surgery* 122 (2): 264-71; discussion 271-272. [https://doi.org/10.1016/s0039-6060\(97\)90017-9](https://doi.org/10.1016/s0039-6060(97)90017-9).
- Taniyama, Yoshihiro, et Kathy K. Griendling. 2003. « Reactive Oxygen Species in the Vasculature: Molecular and Cellular Mechanisms ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 42 (6): 1075-81. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000100443.09293.4F>.
- Taylor, Robert W., et Doug M. Turnbull. 2005. « Mitochondrial DNA Mutations in Human Disease ». *Nature Reviews. Genetics* 6 (5): 389-402. <https://doi.org/10.1038/nrg1606>.
- Thomas, Manesh, Dan Gavrilu, Michael L. McCormick, Francis J. Miller, Alan Daugherty, Lisa A. Cassis, Kevin C. Dellsperger, et Neal L. Weintraub. 2006. « Deletion of P47phox Attenuates Angiotensin II-Induced

- Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Apolipoprotein E-Deficient Mice ». *Circulation* 114 (5): 404-13. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.607168>.
- Thompson, R. W., D. R. Holmes, R. A. Mertens, S. Liao, M. D. Botney, R. P. Mecham, H. G. Welgus, et W. C. Parks. 1995. « Production and Localization of 92-Kilodalton Gelatinase in Abdominal Aortic Aneurysms. An Elastolytic Metalloproteinase Expressed by Aneurysm-Infiltrating Macrophages ». *The Journal of Clinical Investigation* 96 (1): 318-26. <https://doi.org/10.1172/JCI118037>.
- Thorin, Eric, et David J. Webb. 2010. « Endothelium-Derived Endothelin-1 ». *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 459 (6): 951-58. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0763-y>.
- Thum, Thomas, Daniela Fraccarollo, Maximilian Schultheiss, Sabrina Froese, Paolo Galuppo, Julian D. Widder, Dimitrios Tsikas, Georg Ertl, et Johann Bauersachs. 2007. « Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling Impairs Endothelial Progenitor Cell Mobilization and Function in Diabetes ». *Diabetes* 56 (3): 666-74. <https://doi.org/10.2337/db06-0699>.
- Tian, Bin, Jian Liu, Peter Bitterman, et Robert J. Bache. 2003. « Angiotensin II Modulates Nitric Oxide-Induced Cardiac Fibroblast Apoptosis by Activation of AKT/PKB ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 285 (3): H1105-1112. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01139.2002>.
- Tian, Niu, Kristina D. Thrasher, Paul D. Gundy, Michael D. Hughson, et R. Davis Manning. 2005. « Antioxidant Treatment Prevents Renal Damage and Dysfunction and Reduces Arterial Pressure in Salt-Sensitive Hypertension ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 45 (5): 934-39. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000160404.08866.5a>.
- Tilokani, Lisa, Shun Nagashima, Vincent Paupe, et Julien Prudent. 2018. « Mitochondrial Dynamics: Overview of Molecular Mechanisms ». *Essays in Biochemistry* 62 (3): 341-60. <https://doi.org/10.1042/EBC20170104>.
- Tong, Mingming, Toshiro Saito, Peiyong Zhai, Shin-Ichi Oka, Wataru Mizushima, Michinari Nakamura, Shohei Ikeda, Akihiro Shirakabe, et Junichi Sadoshima. 2019. « Mitophagy Is Essential for Maintaining Cardiac Function During High Fat Diet-Induced Diabetic Cardiomyopathy ». *Circulation Research* 124 (9): 1360-71. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.314607>.
- Tostes, Rita C. A., Rhian M. Touyz, Gang He, Xin Chen, et Ernesto L. Schiffrin. 2002. « Contribution of Endothelin-1 to Renal Activator Protein-1 Activation and Macrophage Infiltration in Aldosterone-Induced Hypertension ». *Clinical Science (London, England: 1979)* 103 Suppl 48 (août): 25S-30S. <https://doi.org/10.1042/CS103S025S>.
- Touat, Ziad, Laurent Lepage, Véronique Ollivier, Patrick Nataf, Ulrich Hvass, Julien Labreuche, Martine Jandrot-Perrus, Jean-Baptiste Michel, et Guillaume Jondeau. 2008. « Dilation-Dependent Activation of Platelets and Prothrombin in Human Thoracic Ascending Aortic Aneurysm ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28 (5): 940-46. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.158576>.
- Touat, Ziad, Veronique Ollivier, Jianping Dai, Marie-Genevieve Huisse, Annie Bezeaud, Uriel Sebbag, Tony Palombi, et al. 2006. « Renewal of Mural Thrombus Releases Plasma Markers and Is Involved in Aortic Abdominal Aneurysm Evolution ». *The American Journal of Pathology* 168 (3): 1022-30. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050868>.
- Touyz, R. M., L. Y. Deng, G. He, X. H. Wu, et E. L. Schiffrin. 1999. « Angiotensin II Stimulates DNA and Protein Synthesis in Vascular Smooth Muscle Cells from Human Arteries: Role of Extracellular Signal-Regulated Kinases ». *Journal of Hypertension* 17 (7): 907-16. <https://doi.org/10.1097/00004872-199917070-00006>.
- Touyz, R. M., G. He, M. El Mabrouk, et E. L. Schiffrin. 2001. « P38 Map Kinase Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Collagen Synthesis by Angiotensin II in SHR but Not in WKY ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 37 (2 Pt 2): 574-80. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.37.2.574>.
- Touyz, R. M., et E. L. Schiffrin. 2000. « Signal Transduction Mechanisms Mediating the Physiological and Pathophysiological Actions of Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells ». *Pharmacological Reviews* 52 (4): 639-72.
- . 2004. « Reactive Oxygen Species in Vascular Biology: Implications in Hypertension ». *Histochemistry and Cell Biology* 122 (4): 339-52. <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0696-7>.
- Touyz, Rhian M., Xin Chen, Fatiha Tabet, Guoying Yao, Gang He, Mark T. Quinn, Patrick J. Pagano, et Ernesto L. Schiffrin. 2002. « Expression of a Functionally Active Gp91phox-Containing Neutrophil-Type NAD(P)H Oxidase in Smooth Muscle Cells from Human Resistance Arteries: Regulation by Angiotensin II ». *Circulation Research* 90 (11): 1205-13. <https://doi.org/10.1161/01.res.0000020404.01971.2f>.
- Tremblay, Dominique, Raymond Cartier, Rosaire Mongrain, et Richard L. Leask. 2010. « Regional Dependency of the Vascular Smooth Muscle Cell Contribution to the Mechanical Properties of the Pig Ascending Aortic Tissue ». *Journal of Biomechanics* 43 (12): 2448-51. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2010.04.018>.
- Tronc, F., M. Wassef, B. Esposito, D. Henrion, S. Glagov, et A. Tedgui. 1996. « Role of NO in Flow-Induced Remodeling of the Rabbit Common Carotid Artery ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 16 (10): 1256-62. <https://doi.org/10.1161/01.atv.16.10.1256>.

- Tsai, Emily J., et David A. Kass. 2009. « Cyclic GMP Signaling in Cardiovascular Pathophysiology and Therapeutics ». *Pharmacology & Therapeutics* 122 (3): 216-38. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.02.009>.
- Tsuruda, Toshihiro, Johji Kato, Kinta Hatakeyama, Kazushi Kojima, Mitsuhiro Yano, Yoshikazu Yano, Kunihide Nakamura, et al. 2008. « Adventitial Mast Cells Contribute to Pathogenesis in the Progression of Abdominal Aortic Aneurysm ». *Circulation Research* 102 (11): 1368-77. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.173682>.
- Turrens, Julio F. 2003. « Mitochondrial Formation of Reactive Oxygen Species ». *The Journal of Physiology* 552 (Pt 2): 335-44. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>.
- Uchida, Haruhito A., Fjoralba Kristo, Debra L. Rateri, Hong Lu, Richard Charnigo, Lisa A. Cassis, et Alan Daugherty. 2010. « Total Lymphocyte Deficiency Attenuates AngII-Induced Atherosclerosis in Males but Not Abdominal Aortic Aneurysms in ApoE Deficient Mice ». *Atherosclerosis* 211 (2): 399-403. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.02.034>.
- Ushio-Fukai, M., A. M. Zafari, T. Fukui, N. Ishizaka, et K. K. Griendling. 1996. « P22phox Is a Critical Component of the Superoxide-Generating NADH/NADPH Oxidase System and Regulates Angiotensin II-Induced Hypertrophy in Vascular Smooth Muscle Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 271 (38): 23317-21. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.38.23317>.
- Vanhoutte, P. M. 1998. « Vascular Biology. Old-Timer Makes a Comeback ». *Nature* 396 (6708): 213, 215-16. <https://doi.org/10.1038/24261>.
- Varanita, Tatiana, Maria Eugenia Soriano, Vanina Romanello, Tania Zaglia, Rubén Quintana-Cabrera, Martina Semenzato, Roberta Menabò, et al. 2015. « The OPA1-Dependent Mitochondrial Cristae Remodeling Pathway Controls Atrophic, Apoptotic, and Ischemic Tissue Damage ». *Cell Metabolism* 21 (6): 834-44. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.05.007>.
- Vasic, N., S. Glumac, S. Pejic, L. J. Amidzic, L. J. Tadic Latinovic, B. Dozic, S. Hinic, et Z. Maksimovic. 2017. « Expression of Matrix Metalloproteinases and Endogenous Inhibitors in Abdominal Aortic Aneurysm and Aortoiliac Occlusive Disease (Syndrome Leriche) ». *Folia Biologica* 63 (5-6): 209-16.
- Vásquez-Trincado, César, Ivonne García-Carvajal, Christian Pennanen, Valentina Parra, Joseph A. Hill, Beverly A. Rothmel, et Sergio Lavandero. 2016. « Mitochondrial Dynamics, Mitophagy and Cardiovascular Disease ». *The Journal of Physiology* 594 (3): 509-25. <https://doi.org/10.1113/JP271301>.
- Vásquez-Vivar, Jeannette, Damon Duquaine, Jennifer Whitsett, B. Kalyanaraman, et Sanjay Rajagopalan. 2002. « Altered Tetrahydrobiopterin Metabolism in Atherosclerosis: Implications for Use of Oxidized Tetrahydrobiopterin Analogues and Thiol Antioxidants ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 22 (10): 1655-61. <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000029122.79665.d9>.
- Venegas-Pont, Marcia, Michael B. Manigrasso, Samira C. Grifoni, Babbette B. LaMarca, Christine Maric, Lorraine C. Racusen, Porter H. Glover, Allison V. Jones, Heather A. Drummond, et Michael J. Ryan. 2010. « Tumor Necrosis Factor-Alpha Antagonist Etanercept Decreases Blood Pressure and Protects the Kidney in a Mouse Model of Systemic Lupus Erythematosus ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 56 (4): 643-49. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.157685>.
- Viña, Jose, Mari Carmen Gomez-Cabrera, Consuelo Borras, Teresa Froio, Fabian Sanchis-Gomar, Vladimir E. Martinez-Bello, et Federico V. Pallardo. 2009. « Mitochondrial Biogenesis in Exercise and in Ageing ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (14): 1369-74. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.06.006>.
- Viscardi, Francesca, Christian Vergara, Luca Antiga, Sabrina Merelli, Alessandro Veneziani, Giovanni Puppini, Giuseppe Faggian, Alessandro Mazzucco, et Giovanni Battista Luciani. 2010. « Comparative Finite Element Model Analysis of Ascending Aortic Flow in Bicuspid and Tricuspid Aortic Valve ». *Artificial Organs* 34 (12): 1114-20. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2009.00989.x>.
- Vollmar, J. F., E. Paes, P. Pauschinger, E. Henze, et A. Friesch. 1989. « Aortic Aneurysms as Late Sequelae of Above-Knee Amputation ». *Lancet (London, England)* 2 (8667): 834-35. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(89\)92999-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(89)92999-1).
- Wagenseil, Jessica E., et Robert P. Mecham. 2007. « New Insights into Elastic Fiber Assembly ». *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews* 81 (4): 229-40. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20111>.
- Wai, Timothy, Jaime García-Prieto, Michael J. Baker, Carsten Merkwirth, Paule Benit, Pierre Rustin, Francisco Javier Rupérez, Coral Barbas, Borja Ibañez, et Thomas Langer. 2015. « Imbalanced OPA1 Processing and Mitochondrial Fragmentation Cause Heart Failure in Mice ». *Science (New York, N.Y.)* 350 (6265): aad0116. <https://doi.org/10.1126/science.aad0116>.
- Wakabayashi, Junko, Zhongyan Zhang, Nobunao Wakabayashi, Yasushi Tamura, Masahiro Fukaya, Thomas W. Kensler, Miho Iijima, et Hiromi Sesaki. 2009. « The Dynamin-Related GTPase Drp1 Is Required for Embryonic and Brain Development in Mice ». *The Journal of Cell Biology* 186 (6): 805-16. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903065>.

- Walpole, P. L., A. I. Gotlieb, M. I. Cybulsky, et B. L. Langille. 1995. « Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and Monocyte Adherence in Arteries Exposed to Altered Shear Stress ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 15 (1): 2-10. <https://doi.org/10.1161/01.atv.15.1.2>.
- Wang, Li, Dong-chuan Guo, Jiumei Cao, Limin Gong, Kristine E. Kamm, Ellen Regalado, Li Li, et al. 2010. « Mutations in Myosin Light Chain Kinase Cause Familial Aortic Dissections ». *American Journal of Human Genetics* 87 (5): 701-7. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.10.006>.
- Wang, Li, Tianzheng Yu, Hakjoo Lee, Dawn K. O'Brien, Hiromi Sesaki, et Yisang Yoon. 2015. « Decreasing Mitochondrial Fission Diminishes Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Ameliorates Intimal Hyperplasia ». *Cardiovascular Research* 106 (2): 272-83. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv005>.
- Wang, Qilong, Miao Zhang, Gloria Torres, Shengnan Wu, Changhan Ouyang, Zhonglin Xie, et Ming-Hui Zou. 2017. « Metformin Suppresses Diabetes-Accelerated Atherosclerosis via the Inhibition of Drp1-Mediated Mitochondrial Fission ». *Diabetes* 66 (1): 193-205. <https://doi.org/10.2337/db16-0915>.
- Wang, ShengPeng, Ramesh Chennupati, Harmandeep Kaur, Andras Iring, Nina Wettschureck, et Stefan Offermanns. 2016. « Endothelial Cation Channel PIEZO1 Controls Blood Pressure by Mediating Flow-Induced ATP Release ». *The Journal of Clinical Investigation* 126 (12): 4527-36. <https://doi.org/10.1172/JCI87343>.
- Wang, Yu, Hafid Ait-Oufella, Olivier Herbin, Philippe Bonnin, Bhamu Ramkhalawon, Soraya Taleb, Jin Huang, et al. 2010. « TGF-Beta Activity Protects against Inflammatory Aortic Aneurysm Progression and Complications in Angiotensin II-Infused Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 120 (2): 422-32. <https://doi.org/10.1172/JCI38136>.
- Wang, Zhen, Shi-Peng Wang, Qun Shao, Pei-Feng Li, Yue Sun, Lan-Zi Luo, Xiu-Qing Yan, et al. 2019. « Brain-Derived Neurotrophic Factor Mimetic, 7,8-Dihydroxyflavone, Protects against Myocardial Ischemia by Rebalancing Optic Atrophy 1 Processing ». *Free Radical Biology & Medicine* 145 (décembre): 187-97. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.09.033>.
- Wassef, M., B. T. Baxter, R. L. Chisholm, R. L. Dalman, M. F. Fillinger, J. Heinecke, J. D. Humphrey, et al. 2001. « Pathogenesis of Abdominal Aortic Aneurysms: A Multidisciplinary Research Program Supported by the National Heart, Lung, and Blood Institute ». *Journal of Vascular Surgery* 34 (4): 730-38. <https://doi.org/10.1067/mva.2001.116966>.
- Wassmann, Sven, Kerstin Wassmann, et Georg Nickenig. 2004. « Modulation of Oxidant and Antioxidant Enzyme Expression and Function in Vascular Cells ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 44 (4): 381-86. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000142232.29764.a7>.
- Weber, Christian, et Heidi Noels. 2011. « Atherosclerosis: Current Pathogenesis and Therapeutic Options ». *Nature Medicine* 17 (11): 1410-22. <https://doi.org/10.1038/nm.2538>.
- Wei, Zhanjie, Yu Wang, Kailun Zhang, Yaohang Liao, Ping Ye, Jie Wu, Yang Wang, et al. 2014. « Inhibiting the Th17/IL-17A-Related Inflammatory Responses with Digoxin Confers Protection against Experimental Abdominal Aortic Aneurysm ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 34 (11): 2429-38. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304435>.
- Weng, Lu-Chen, Nicholas S. Roetker, Pamela L. Lutsey, Alvaro Alonso, Weihua Guan, James S. Pankow, Aaron R. Folsom, Lyn M. Steffen, Nathan Pankratz, et Weihong Tang. 2018. « Evaluation of the Relationship between Plasma Lipids and Abdominal Aortic Aneurysm: A Mendelian Randomization Study ». *PLoS One* 13 (4): e0195719. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195719>.
- Wenzel, Philip, Maike Knorr, Sabine Kossmann, Jan Stratmann, Michael Hausding, Swenja Schuhmacher, Susanne H. Karbach, et al. 2011. « Lysozyme M-Positive Monocytes Mediate Angiotensin II-Induced Arterial Hypertension and Vascular Dysfunction ». *Circulation* 124 (12): 1370-81. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.034470>.
- Whitesell, Thomas R., Regan M. Kennedy, Alyson D. Carter, Evvi-Lynn Rollins, Sonja Georgijevic, Massimo M. Santoro, et Sarah J. Childs. 2014. « An  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin (Acta2/Asma) Zebrafish Transgenic Line Marking Vascular Mural Cells and Visceral Smooth Muscle Cells ». *PLoS One* 9 (3): e90590. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090590>.
- Wight, Thomas N., et Mervyn J. Merrilees. 2004. « Proteoglycans in Atherosclerosis and Restenosis: Key Roles for Versican ». *Circulation Research* 94 (9): 1158-67. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000126921.29919.51>.
- X, Liu, Wu H, Byrne M, Krane S, et Jaenisch R. 1997. « Type III Collagen Is Crucial for Collagen I Fibrillogenesis and for Normal Cardiovascular Development ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Proc Natl Acad Sci U S A. 3 avril 1997. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.5.1852>.
- X, Meng, Yang J, Zhang K, An G, Kong J, Jiang F, Zhang Y, et Zhang C. 2014. « Regulatory T Cells Prevent Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm in Apolipoprotein E Knockout Mice ». *Hypertension*

- (Dallas, Tex. : 1979). Hypertension. octobre 2014. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03950>.
- Xanthoulea, Sofia, Melanie Thelen, Chantal Pöttgens, Marion J. J. Gijbels, Esther Lutgens, et Menno P. J. de Winther. 2009. « Absence of P55 TNF Receptor Reduces Atherosclerosis, but Has No Major Effect on Angiotensin II Induced Aneurysms in LDL Receptor Deficient Mice ». *PLoS One* 4 (7): e6113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006113>.
- Xie, B., Z. Dong, et I. J. Fidler. 1994. « Regulatory Mechanisms for the Expression of Type IV Collagenases/Gelatinases in Murine Macrophages ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 152 (7): 3637-44.
- Xiong, Wanfen, Rebecca Knispel, Jason Mactaggart, et B. Timothy Baxter. 2006. « Effects of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2 Deficiency on Aneurysm Formation ». *Journal of Vascular Surgery* 44 (5): 1061-66. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2006.06.036>.
- Xiong, Wanfen, Rebecca Knispel, Jason MacTaggart, Timothy C. Greiner, Stephen J. Weiss, et B. Timothy Baxter. 2009. « Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase Regulates Macrophage-Dependent Elastolytic Activity and Aneurysm Formation in Vivo ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (3): 1765-71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806239200>.
- Xiong, Wanfen, Jason MacTaggart, Rebecca Knispel, Jennifer Worth, Yuri Persidsky, et B. Timothy Baxter. 2009. « Blocking TNF-Alpha Attenuates Aneurysm Formation in a Murine Model ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183 (4): 2741-46. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803164>.
- Xiong, Wanfen, Jason Mactaggart, Rebecca Knispel, Jennifer Worth, Zhen Zhu, Yulong Li, Yimin Sun, B. Timothy Baxter, et Jason Johanning. 2009. « Inhibition of Reactive Oxygen Species Attenuates Aneurysm Formation in a Murine Model ». *Atherosclerosis* 202 (1): 128-34. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.03.029>.
- Xiong, Wanfen, Yong Zhao, Amy Prall, Timothy C. Greiner, et B. Timothy Baxter. 2004. « Key Roles of CD4+ T Cells and IFN-Gamma in the Development of Abdominal Aortic Aneurysms in a Murine Model ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 172 (4): 2607-12. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.4.2607>.
- Xu, C., C. K. Zarins, et S. Glagov. 2001. « Aneurysmal and Occlusive Atherosclerosis of the Human Abdominal Aorta ». *Journal of Vascular Surgery* 33 (1): 91-96. <https://doi.org/10.1067/mva.2001.109744>.
- Yajima, Noriyuki, Masahisa Masuda, Masaru Miyazaki, Nobuyuki Nakajima, Shu Chien, et John Y.-J. Shyy. 2002. « Oxidative Stress Is Involved in the Development of Experimental Abdominal Aortic Aneurysm: A Study of the Transcription Profile with Complementary DNA Microarray ». *Journal of Vascular Surgery* 36 (2): 379-85. <https://doi.org/10.1067/mva.2002.124366>.
- Yamanouchi, Dai, Stephanie Morgan, Kaori Kato, Justin Lengfeld, Fan Zhang, et Bo Liu. 2010. « Effects of Caspase Inhibitor on Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm in Apolipoprotein E-Deficient Mice ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30 (4): 702-7. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.200527>.
- Yang, Xue-yan, Ji-hua Yao, Lu Cheng, Dong-wang Wei, Jing-lun Xue, et Da-ru Lu. 2003. « Molecular Cloning and Expression of a Smooth Muscle-Specific Gene SM22alpha in Zebrafish ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 312 (3): 741-46. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.10.185>.
- Yao, Fengqi, Zhangting Yao, Tiecheng Zhong, Jieqiong Zhang, Tingting Wang, Bo Zhang, Qiaojun He, Ling Ding, et Bo Yang. 2019. « Imatinib Prevents Elastase-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Progression by Regulating Macrophage-Derived MMP9 ». *European Journal of Pharmacology* 860 (octobre): 172559. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172559>.
- Yao, Ren-Qi, Chao Ren, Zhao-Fan Xia, et Yong-Ming Yao. 2020. « Organelle-Specific Autophagy in Inflammatory Diseases: A Potential Therapeutic Target Underlying the Quality Control of Multiple Organelles ». *Autophagy*, février, 1-17. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1725377>.
- Yao, Yuyu, Kai Cheng, et Zhen Cheng. 2020. « Evaluation of a Smart Activatable MRI Nanoprobe to Target Matrix Metalloproteinases in the Early-Stages of Abdominal Aortic Aneurysms ». *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 26: 102177. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2020.102177>.
- Yin, Mingdi, Jian Zhang, Yong Wang, Shaoye Wang, Dittmar Böckler, Zhiquan Duan, et Shijie Xin. 2010. « Deficient CD4+CD25+ T Regulatory Cell Function in Patients with Abdominal Aortic Aneurysms ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30 (9): 1825-31. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.200303>.
- Yoon, Yisang, Eugene W. Krueger, Barbara J. Oswald, et Mark A. McNiven. 2003. « The Mitochondrial Protein Hfis1 Regulates Mitochondrial Fission in Mammalian Cells through an Interaction with the Dynamin-like Protein DLP1 ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (15): 5409-20. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.15.5409-5420.2003>.

- Yu, Emma, Kirsty Foote, et Martin Bennett. 2018. « Mitochondrial Function in Thoracic Aortic Aneurysms ». *Cardiovascular Research* 114 (13): 1696-98. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy180>.
- Yu, Weimin, Li Xiao, Yumei Que, Siqi Li, Lili Chen, Pingping Hu, Rui Xiong, Francesca Seta, Hao Chen, et Xiaoyong Tong. 2020. « Smooth Muscle NADPH Oxidase 4 Promotes Angiotensin II-Induced Aortic Aneurysm and Atherosclerosis by Regulating Osteopontin ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, août, 165912. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165912>.
- Yuan, Kai, Wei Liang, et Jiwei Zhang. 2015. « A Comprehensive Analysis of Differentially Expressed Genes and Pathways in Abdominal Aortic Aneurysm ». *Molecular Medicine Reports* 12 (2): 2707-14. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3709>.
- Zafari, A. M., M. Ushio-Fukai, M. Akers, Q. Yin, A. Shah, D. G. Harrison, W. R. Taylor, et K. K. Griendling. 1998. « Role of NADH/NADPH Oxidase-Derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Angiotensin II-Induced Vascular Hypertrophy ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 32 (3): 488-95. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.32.3.488>.
- Zarins, C. K., C. Xu, et S. Glagov. 2001. « Atherosclerotic Enlargement of the Human Abdominal Aorta ». *Atherosclerosis* 155 (1): 157-64. [https://doi.org/10.1016/s0021-9150\(00\)00527-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(00)00527-x).
- Zhang, S. H., R. L. Reddick, J. A. Piedrahita, et N. Maeda. 1992. « Spontaneous Hypercholesterolemia and Arterial Lesions in Mice Lacking Apolipoprotein E ». *Science (New York, N.Y.)* 258 (5081): 468-71. <https://doi.org/10.1126/science.1411543>.
- Zhang, Wenbo, Chang Shu, Quanming Li, Ming Li, et Xin Li. 2015. « Adiponectin Affects Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Apoptosis through Modulation of the Mitofusin-2-Mediated Ras-Raf-Erk1/2 Signaling Pathway ». *Molecular Medicine Reports* 12 (3): 4703-7. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3899>.
- Zhong, Lintao, Xiang He, Xiaoyun Si, He Wang, Bing Li, Yinlan Hu, Mengsha Li, et al. 2019. « SM22 $\alpha$  (Smooth Muscle 22 $\alpha$ ) Prevents Aortic Aneurysm Formation by Inhibiting Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching Through Suppressing Reactive Oxygen Species/NF-KB (Nuclear Factor-KB) ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 39 (1): e10-25. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311917>.
- Zhou, Rui-Hai, Aleksandr E. Vendrov, Igor Tchivilev, Xi-Lin Niu, Kimberly C. Molnar, Mauricio Rojas, Jacqueline D. Carter, et al. 2012. « Mitochondrial Oxidative Stress in Aortic Stiffening with Age: The Role of Smooth Muscle Cell Function ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32 (3): 745-55. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.243121>.
- Zhou, Yi, Wenxue Wu, Jes S. Lindholt, Galina K. Sukhova, Peter Libby, Xueqing Yu, et Guo-Ping Shi. 2015. « Regulatory T Cells in Human and Angiotensin II-Induced Mouse Abdominal Aortic Aneurysms ». *Cardiovascular Research* 107 (1): 98-107. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv119>.
- Zhu, Limin, Roger Vranckx, Philippe Khau Van Kien, Alain Lalande, Nicolas Boisset, Flavie Mathieu, Mark Wegman, et al. 2006. « Mutations in Myosin Heavy Chain 11 Cause a Syndrome Associating Thoracic Aortic Aneurysm/Aortic Dissection and Patent Ductus Arteriosus ». *Nature Genetics* 38 (3): 343-49. <https://doi.org/10.1038/ng1721>.
- Zorov, Dmitry B., Magdalena Juhaszova, et Steven J. Sollott. 2006. « Mitochondrial ROS-Induced ROS Release: An Update and Review ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1757 (5-6): 509-17. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.04.029>.
- . 2014. « Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release ». *Physiological Reviews* 94 (3): 909-50. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>.
- Zorova, Ljubava D., Vasily A. Popkov, Egor Y. Plotnikov, Denis N. Silachev, Irina B. Pevzner, Stanislovas S. Jankauskas, Valentina A. Babenko, et al. 2018. « Mitochondrial Membrane Potential ». *Analytical Biochemistry* 552: 50-59. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009>.

# ANNEXES

## RESEARCH ARTICLE

# Cardiopulmonary bypass and internal thoracic artery: Can roller or centrifugal pumps change vascular reactivity of the graft? The IPITA study: A randomized controlled clinical trial

Olivier Fouquet<sup>1,2\*</sup>, Simon Dang Van<sup>1,2</sup>, Anna Baudry<sup>1,2</sup>, Philippe Meisnerowski<sup>1,2</sup>, Pauline Robert<sup>2</sup>, Frédéric Pinaud<sup>1,2</sup>, Patrice Binuani<sup>1,2</sup>, Jean-Marie Chrétien<sup>1,3</sup>, Daniel Henrion<sup>2</sup>, Christophe Baufreton<sup>1,2</sup>, Laurent Loufrani<sup>2</sup>

1 Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, University Hospital, Angers, France, 2 MITOVASC Institute CNRS UMR 6214, INSERM U1083, University of Angers, Angers, France, 3 Clinical Research Department, University Hospital, Angers, France

\* These authors contributed equally to this work.

\* [olfouquet@chu-angers.fr](mailto:olfouquet@chu-angers.fr)

## OPEN ACCESS

**Citation:** Fouquet O, Dang Van S, Baudry A, Meisnerowski P, Robert P, Pinaud F, et al. (2020) Cardiopulmonary bypass and internal thoracic artery: Can roller or centrifugal pumps change vascular reactivity of the graft? The IPITA study: A randomized controlled clinical trial. PLoS ONE 15(7): e0235604. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235604>

**Editor:** Salvatore De Rosa, Università degli Studi Magna Graecia di Catanzaro, ITALY

**Received:** November 27, 2019

**Accepted:** June 19, 2020

**Published:** July 9, 2020

**Copyright:** © 2020 Fouquet et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by a research grant from the University Hospital of Angers (France) in 2014 to OF.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

### 1. Background

Cardiopulmonary bypass (CPB) induces a systemic inflammatory response (SIRS) and affects the organ vascular bed. Experimentally, the lack of pulsatility alters myogenic tone of resistance arteries and increases the parietal inflammatory response. The purpose of this study was to compare the vascular reactivity of the internal thoracic arteries (ITAs) due to the inflammatory response between patients undergoing coronary artery bypass grafting (CABG) under CPB with a roller pump or with a centrifugal pump.

### 2. Methods

Eighty elective male patients undergoing CABG were selected using one or two internal thoracic arteries under CPB with a roller pump (RP group) or centrifugal pump (CFP group). ITA samples were collected before starting CPB (Time 1) and before the last coronary anastomosis during aortic cross clamping (Time 2). The primary endpoint was the endothelium-dependent relaxation of ITAs investigated using wire-myography. The secondary endpoint was the parietal inflammatory response of arteries defined by the measurements of super-oxide levels, leukocytes and lymphocytes rate and gene expression of inflammatory proteins using Terminal complement complex activation (SC5b-9) and neutrophil activation (elastase) analysis were performed on arterial blood at the same times.

### 3. Results

Exposure time of ITAs to the pump flow was respectively 43.3 minutes in the RP group and 45.7 minutes in the CFP group. Acetylcholine-dependent relaxation was conserved in the

two groups whatever the time. Gene expression of C3 and C4a in the artery wall decreased from Time 1 to Time 2. No oxidative stress was observed in the graft. There was no difference between the groups concerning the leukocytes and lymphocytes rate. SC5b-9 and elastase increased between Time 1 and Time 2.

#### 4. Conclusion

Endothelium-dependent relaxation of the internal thoracic arteries was preserved during CPB whatever the type of pump used. The inflammatory response observed in the blood was not found in the graft wall within this time frame.

#### 5. Trial registration

Name of trial study protocol: IPITA

Registration number (ClinicalTrials.gov): [NCT04168853](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04168853).

#### 6. Introduction

More than 12000 coronary artery bypass grafting (CABG) procedures under cardiopulmonary bypass (CPB) are performed each year in France, 60% using a roller pump (RP) and 40% using a centrifugal pump (CFP) [1].

The superiority of the CFP over the RP is debated. The CFP is considered safer than the RP by reducing the risk of microgaseous emboli and hemolysis [2]. However, a recent meta-analysis [3] failed to demonstrate any clinical difference between the two types of arterial pumps used for CPB, but this comparison was limited to clinical events and did not focus on the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). Although the CFP was expected to reduce the SIRS, initial comparisons between the two pumps have shown that the RP, when compared to CFP, decreased the terminal complement complex activation (SC5b-9) as well as elastase release during coronary artery bypass grafting (CABG) under CPB [4, 5]. It has long been reported that the RP produces a pulsatile flow, which is responsible for lateral transmission of energy to tissue, whereas the CFP produces a non-pulsatile flow without an add-on device [6, 7]. The lack of pulsatile flow may increase some aspects of SIRS such as endotoxin release during aortic cross clamping in patients undergoing CABG [8]. We previously demonstrated experimentally that an inflammatory reaction was less damaging for the mesenteric arteries of rats subjected to very long pulsatile perfusion than arteries submitted to non-pulsatile perfusion, independently of flow or pressure [9]. In addition, these effects originated directly within the arterial wall and not from a blood activation process, since these mesenteric arteries were perfused with a bloodless saline solution. Interestingly, patients undergoing non pulsatile mechanical circulatory support are prone to gastrointestinal injury and bleeding [10], an effect that is usually related to a shear stress mediated Willebrand factor defect [11] rather than to a local organic inflammatory process. Nevertheless, impaired vasorelaxation and propensity to vasospasm caused by SIRS during CPB may affect several vascular territories such as the pulmonary, mesenteric or cerebral microvascularization [12]. By modifying the SIRS using heparin-coated circuits, we observed a significant reduction of vasospasm in the cerebral arteries using transcranial Doppler ultrasound in patients undergoing CABG [13]. Therefore, we postulated that such a detectable Doppler benefit of SIRS reduction might also be observed in the internal thoracic arteries currently used for myocardial revascularization.

The aim of this prospective randomized clinical trial was to compare the vascular reactivity of the internal thoracic arteries used for CABG depending on the type of pumps used (roller or centrifugal pump) and the impact of the SIRS generated during CPB on parietal inflammatory response of ITAs.

## 7. Materials and methods

### 1. Study design (Fig 1)

The IPITA (Impact of Pumps on Internal Thoracic Arteries) study consisted of two parallel prospective, monocenter, randomized, active-treatment-controlled clinical trials. From November 3, 2015 to December 8, 2017, 80 patients were randomly assigned in a 1:1 ratio to two groups (RP group = Roller pump group; CFP group = Centrifugal pump group) one day before surgery in order to facilitate the perfusionist workup that consisted to install the adequate pump according to the randomization with use of a computer-generated plan. The randomization procedure was carried out by the Department of Methodology and Biostatistics at University Hospital of Angers. All patients provided their written informed consent preoperatively (S1 Appendix). The study and the consent form were approved by the Angers institutional review board (authorization: CNIL: 2015-002 (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés, December 7, 2015) (S2 Appendix). For each patient, the study began at the time of randomization and stopped at discharge of the hospital. No follow-up and no deviations from this study were planned. The authors confirm that all ongoing and related trials for this intervention were registered at ClinicalTrials.gov (Registration number: NCT04168853) after enrolment of participants started. The primary endpoint was the comparative measurement of internal thoracic artery (ITA) vascular reactivity, defined by endothelium-dependent relaxation rate. The secondary

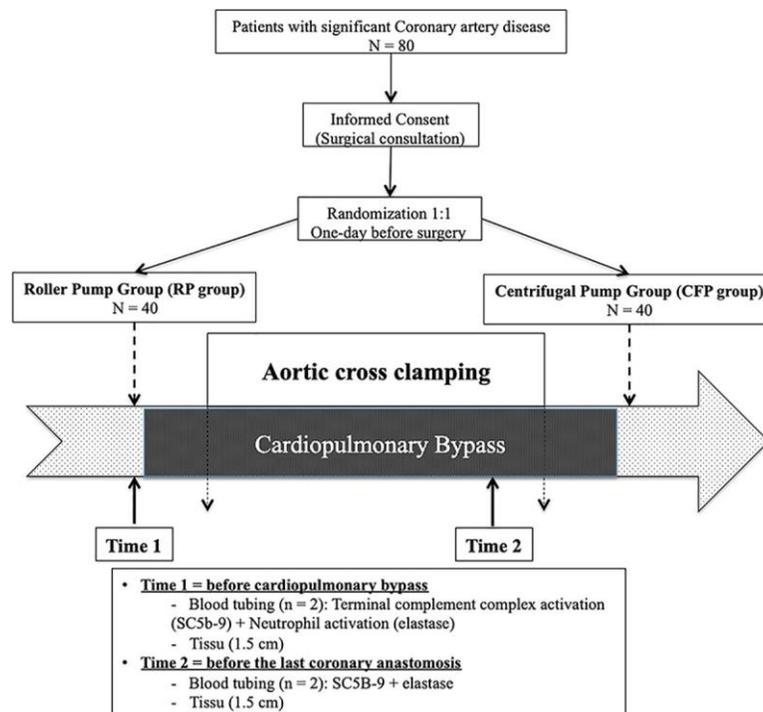


Fig 1. Flow-chart study.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235604.g001>

endpoint was the parietal inflammatory response of ITAs defined by superoxide detection, leu-kocytes and lymphocytes rate and gene expression of inflammatory proteins.

## 8. 2.Population

Inclusion criteria were consecutive male patients and elective coronary artery bypass grafting(CABG) using at least one of the two ITAs. Exclusion criteria were female patients because their complement activation has been shown to be greater than that in men during surgery under CPB [14]; age < 18 years; CABG requiring additional valve repair or replacement; emergency surgery and insufficient length of the ITA. Data were extracted from medical charts. Baseline characteristics, intraoperative and postoperative data were collected using Epidata 3.1 Software.

## 3. Surgical technique and ITAs segment sampling

- Surgical procedure: CABG was performed under normothermic (36–37°C) cardiopulmonary bypass (CPB). All components of the circuits were coated with phosphorylcholine inert surface (PHISIO, Sorin<sup>1</sup>). The pump manufacturers were Maquet<sup>1</sup> and Sorin<sup>1</sup> for the roller pumps and Sorin<sup>1</sup> for the centrifugal pumps respectively. All patients underwent an hyperkalemic antegrade cold blood cardioplegia diluted with a 4:1 dilution Plegisol<sup>1</sup> solution (Pfizer<sup>1</sup>). Heparin was administered after full sternotomy to obtain an activated clotting time (ACT) longer than 250 seconds as a routine procedure previously described in our center [15, 16]. The distal part of ITA was clamped and gathered after take-down and heparin administration.

- ITAs segment samples: 1.5 cm of ITA distality was gathered before blood flow interruption into the graft before starting CPB (**Time 1**) and another segment (1.5 cm) before the last coronary anastomosis during aortic cross clamping (**Time 2**) (Fig 1). Each arterial segment was cut into three parts: a fresh part for arterial myography bathed and stored in a 50 ml organ bath containing a physiological salt solution (PSS). The other two parts were cooled in liquid nitrogen and stored at -80°C for immunohistochemistry and RT-PCR analysis.

## 4. Internal thoracic arteries analysis

**Myography.** For each patient, 2 fresh segments of ITA (Time 1 and Time 2) stored in PSS were analyzed. On day+1, these segments were mounted on a wire-myograph (DMT, Aarhus,DK) [17]. Two tungsten wires (25 μm diameter) were inserted into the lumen of the arteries and connected to a force transducer and a micrometer, respectively. The arteries were bathed in the PSS solution. Wall tension, equivalent to intra-arterial pressure (90 mmHg), was applied and the blood vessels were allowed to stabilize for thirty minutes. Arterial contractility was assessed with phenylephrine (PE, 10 μmol/L). Acetylcholine-induced (Ach 10 μmol/L) relaxation was then obtained after phenylephrine-induced preconstruction (50% of maximal contraction) in the presence or in the absence of the NO synthesis blocker L-NMMA (3.10<sup>-4</sup> mol/L) and in the presence or in the absence of the COX synthesis blocker Indomethacin (10<sup>-5</sup> mol/L).

**Superoxide detection and confocal microscopy.** Dihydroethidium staining (DHE, Sigma-Aldrich) was used to evaluate the in-situ levels of superoxide anions (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). DHE is permeable to cells and is oxidized by superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) to fluorescent products that are trapped by intercalation into the DNA. Sections (10 μm thickness) were incubated with DHE (1 μmol/L) in phosphate-buffered solution (PBS) and DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole-Molecular

probes, Invitrogen) for nuclear cells. Fluorescent images of ethidium bromide were obtained using a confocal microscope (Nikon Eclipse TE2000S).

**Immunocytochemistry.** Sections (10  $\mu\text{m}$  thickness) of arteries were rehydrated by 500  $\mu\text{l}$  of PBS during 10 minutes and fixated with 200  $\mu\text{l}$  of paraformaldehyde (PFA) (pH = 7.4, room temperature) and then were rinsed by PBS. Permeabilization with 200  $\mu\text{l}$  of PBS-BSA (Bovine Serum Albumin—Sigma) 10%—Tween 0.1% during 40 minutes and then saturation with PBS-BSA 10% during 40 minutes were performed. Sections were incubated overnight with 100  $\mu\text{l}$  of anti-CD45 antibody at 1/500th dilution for leukocyte staining or anti-CD80 antibody at 1/200th dilution for lymphocyte staining. Antibodies were labelled with a red fluorochrome (Phycoerythrin). Nuclei were stained blue by DAPI solution. On day+1, sections were rinsed with PBS and analyzed with the confocal microscope. Fluorescent images were quantified with the ImageJ (NIH) software.

#### 9. Quantitative real time transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis.

Sections of ITAs were dried and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in RNA later Stabilization Reagent (Qiagen). RNA extraction was performed using the RNeasy<sup>1</sup> micro kit (Qiagen). 500 ng of RNA extracted from each artery were used to synthesize cDNA using the QuantiTect<sup>1</sup> Reverse Transcription kit (Qiagen). Quantitative real-time PCR was performed with Sybr<sup>1</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) using a Light cycler 480 Real-Time PCR System (Roche). (S1 Table)

### 5. Blood sampling and biochemical analysis

Serial arterial blood samples for SC5b-9, as a marker of terminal complement complex activation, and elastase were collected at Time 1 and Time 2. Specimens were centrifuged (10 minutes, 3,000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ ) immediately to obtain plasma which was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  before analysis.

Enzyme-linked immunosorbent assay techniques were used from 10  $\mu\text{l}$  of plasma to measure terminal complement (SC5b-9; Quidel, San Diego, CA, USA) and 50  $\mu\text{l}$  of plasma for neutrophil elastase (Neutrophil ELA2, Assay pro, St Charles, USA). The limit of sensitivity of each assay undertaken was as follows: SC5b-9 = 16 ng/mL and elastase = 20 ng/mL.

### 6. Statistical analysis

All statistical analysis was done using SPSS software version 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Results were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) or mean and range. Significance of the difference between groups was determined by analysis of variance (two-way ANOVA for consecutive measurements followed by the Bonferroni *t-test*) to compare pressure-diameter curves in the different groups. We assumed a Gaussian distribution. Since the differences between paired values were consistent, a parametric paired *t-test* was used. P-values less than 0.05 were considered to be significant.

**Sample size:** There was no available data to predict the difference in vascular reactivity of ITAs according to the pumps. According to our previous reports comparing SIRS using CFP vs RP [4], vascular reactivity of cerebral arteries after CPB [13] and protection of vascular function from inflammation by pulsatility in resistance arteries of rat [9], we estimated that 20 patients per group could be an adequate sample size to assess whether expected differences of SIRS would affect ITA reactivity. The myocardial revascularization surgical approach being left to surgeon discretion (in-situ vs composite Y anastomosis of both ITAs) and considering that both techniques in our routine practice would be roughly equally performed, we decided to include twice the amount of patients per group to compensate for potential withdrawal of patients due to different arterial grafts handling during aortic cross clamp time.

## 10. Results

### 11. Baseline patient, surgical and postoperative course characteristics

Baseline patient and surgical characteristics are presented in Tables 1 and 2. Y-composite grafts were used in 16 patients of RP group and 19 patients in CFP group. Y-configuration grafting was performed according to the practice of surgeon's usual practice and determined preoperatively. In this case, the segment of RITA was sampled just before the Y-anastomosis and before starting the CPB (Time 1). The duration between Time 1 and Time 2 was 43.3 minutes [11–135] in RP group and 45.7 minutes [11–135] in CFP group.

### 12. Endothelium-dependent relaxation of internal thoracic arteries

Acetylcholine-dependent relaxation was observed in both groups regardless of the time (before CPB = time 1 or before coronary anastomosis = time 2). In both groups, the dilatation induced by acetylcholine stepwise in ITAs of RP group was equivalent to ITAs in CFP group (Fig 2).

NO synthesis blockade with L-NMMA reduced acetylcholine-dependent dilatation in all groups. Sodium nitroprusside induced dilatation in the ITAs, which was not affected by flow characteristics. The same observation was found when Y-graft configuration was excluded (Fig 3).

### 13. Molecular biology (qT-PCR)

RNA extraction was performed in patients without Y-configuration ITAs or samples without vascular reactivity observed during myography (N = 80 analyzed segments corresponding to 21 and 19 patients respectively in the RP group and the CFP group). There was no difference

**Table 1. Characteristics of the study population.**

Variables	RP group	CFP group
	n = 40	n = 40
Age (years)	66 [46–80]	67 [45–82]
Height (cm)	171 [158–187]	169 [152–187]
Weight (kg)	79 [56–113]	80 [56–117]
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27 [20–35]	28 [20–37]
Diabetes mellitus, n (%)	12 (30)	9 (23)
Hypertension, n (%)	32 (80)	25 (64)
Dyslipidemia, n (%)	29 (72)	29 (72)
Current smoking, n (%)	6 (15)	4 (10)
Previous AMI	9 (22)	9 (22)
1 vessel, n (%)	4 (10)	1 (2.5)
2 vessels, n (%)	12 (30)	17 (44)
3 vessels, n (%)	24 (60)	22 (55)
Logistic Euroscore 1 (%)	2.15 [1–3.9]	2.6 [0.5–8.4]
LVEF (%)	58 [35–74]	56 [30–77]
Platelet inhibitors, n (%)	34 (85)	36 (90)
β-blockers, n (%)	35 (87)	33 (84)
ACE-inhibitors, n (%)	29 (72)	27 (69)

BMI, body mass index; AMI, acute myocardial infarction; LVEF, left ventricular ejection; ACE, angiotensin-converting enzyme. Data are presented as mean [min-max] or n (%)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235604.t001>

**Table 2. Surgical data.**

Variables	RP group	CFP group
	n = 40	n = 40
Anastomosis per patients n (%)	2.5 [1–5]	2.5 [1–5]
Conduits		
LITA n (%)	40 (100)	40 (100)
BITA n (%)	27 (67)	26 (65)
SVG n (%)	15 (37)	17 (42)
Y-composite graft n (%)	16 (40)	19 (49)
Sequential grafts		
With LITA n (%)	9 (22)	9 (22)
With RITA n (%)	5 (12)	6 (15)
Cardiopulmonary bypass duration (min)	87 [46–158]	94 [41–184]
Aortic cross-clamping time (min)	61 [23–127]	68 [23–144]
Heparin dose (mg)	157 [50–250]	172 [12–360]
Minimum ACT (sec)	217 [122–250]	222 [122–250]
Maximum ACT (sec)	303 [254–374]	303 [254–442]
Exposure time of ITA to the pump flow (min)	43.3 [11–135]	45.7 [11–135]

LITA, Left internal thoracic artery; BITA, Bilateral internal thoracic artery; SVG, Saphenous vein graft; ACT, Activated Clotting Time. Data are presented as mean [min-max] or n (%).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235604.t002>

between groups concerning macrophages and lymphocytes markers, oxidative stress, mito- chondrial activity, growth and transcription factors, pro-inflammatory factors (Fig 4A and 4B). Gene expression for C3 complement decreased from Time 1 ( $0.21 \pm 0.02$ ) to Time 2 ( $0.14$

$\pm 0.02$ ) ( $p = 0.01$ ) for RP group. Gene coding C4a complement decreased from Time 1 to Time2 for both group ( $p < 0.05$ ).

#### 14. Immunochemistry

No significant difference in superoxide anions level was detected between RP group and CFPgroup and between Time 1 and 2. The same findings were observed for anti-CD45 and anti- CD80 antibody level (Fig 5).

#### 15. Terminal complement complex activation

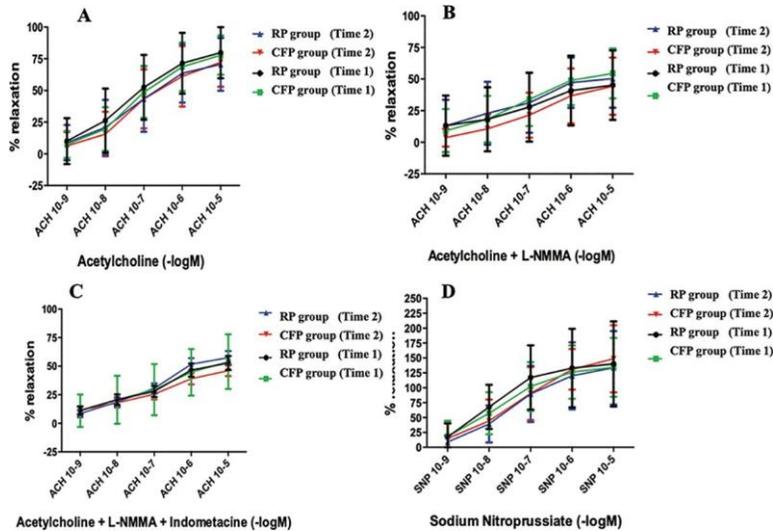
Significant increases in C5b-9 levels were observed in both groups at Time 2 (= before coronary anastomosis) compared to Time 1 (= before starting CPB). The mean value of C5b-9 was  $179 \pm 10.9$  ng/ml at Time 1 and  $2533 \pm 235.2$  at Time 2 in the RP group ( $p < 0.0001$ ) and  $183.5$

$\pm 14.16$  ng/ml and  $2222 \pm 146.5$  in the CFP group. No difference was observed between the RP group and the CFP group (Fig 6A).

#### 16. Neutrophil activation

In both groups, elastase levels at Time 2 were increased compared to Time 1. The mean value of elastase at Time 1 was  $196.5 \pm 13.24$  ng/ml and  $754.5 \pm 74.81$  at Time 2 in the RP group ( $p < 0.0001$ ) and  $182.2 \pm 19.04$  ng/ml and  $565.2 \pm 59.45$  in the CFP group ( $p < 0.0001$ ).

No difference was observed between the RP and the CFP groups (Fig 6B).

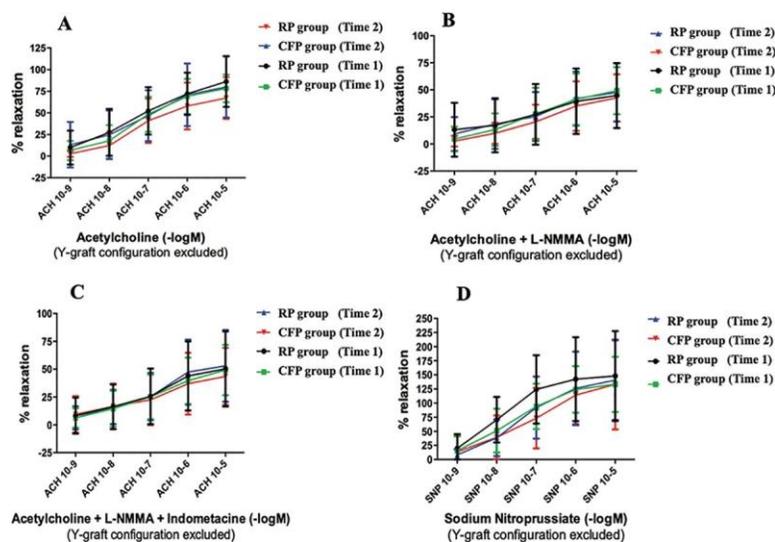


**Fig 2. Myography results with Y-graft configuration.** Dilatation induced by increasing dose of Acetylcholine in phenylephrine pre-constricted artery (A). Reduction of acetylcholine-dependent dilatation with NO synthesis blockade L-NMMA (N-monomethyl-L-Arginine) (B) then Indomethacin (C) was observed. Dilatation was induced by increasing the dose of sodium nitroprusside (D). Ach, acetylcholine; SNP, sodium nitroprusside; Data are presented as mean  $\pm$  SEM.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235604.g002>

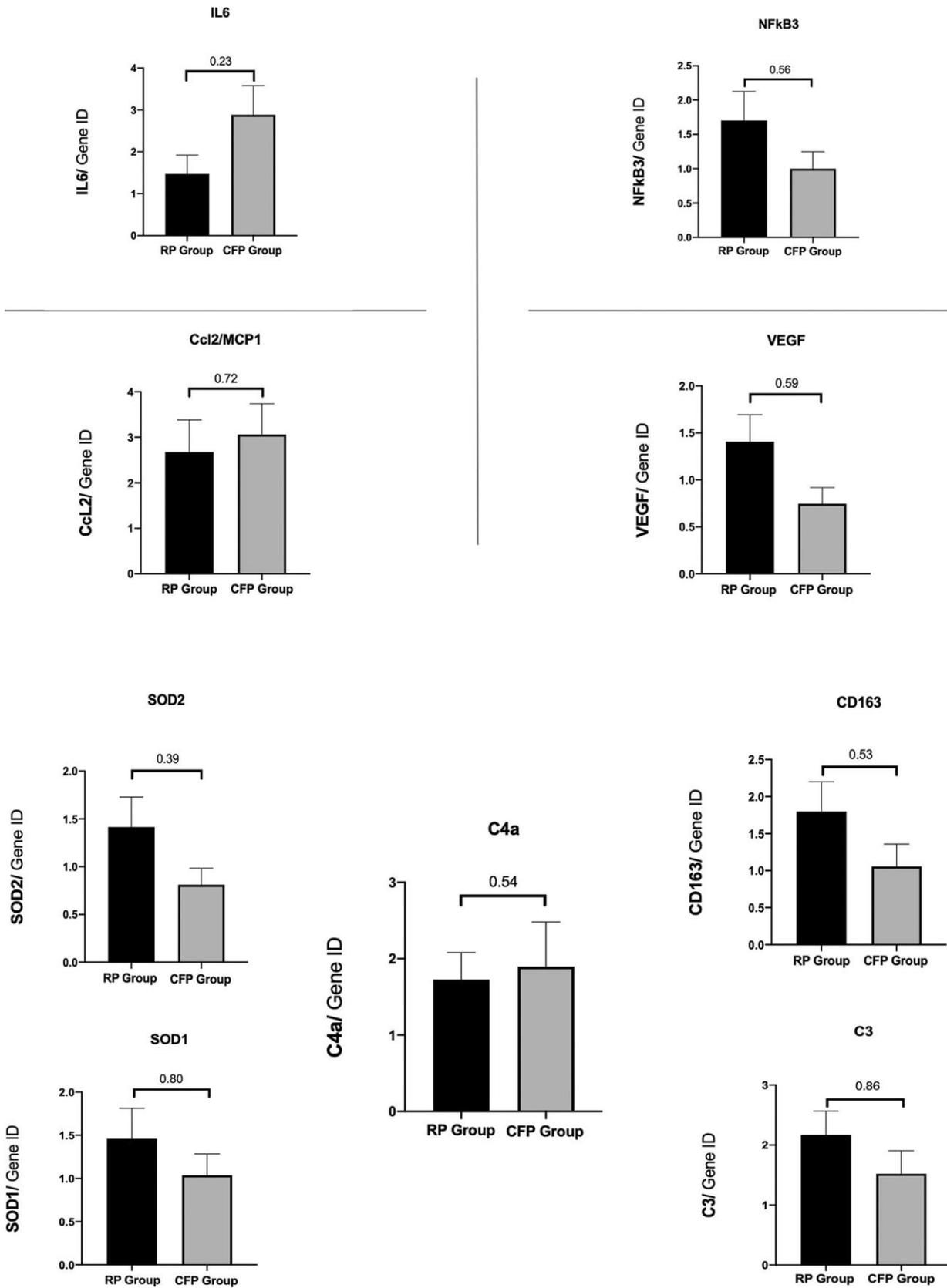
## 17. Discussion

Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) after CPB is considered as an important cause of postoperative events in coronary surgery [18]. The indications for myocardial revascularization of left main coronary artery for stable coronary artery disease were in accordance with the 2018 ESC/EACTS guidelines in our center [19]. The exponential growth in percutaneous coronary intervention procedures due to the results of randomized studies comparing long-term clinical outcomes of CABG or Stent-Percutaneous Coronary Intervention (PCI)



**Fig 3. Myography results without Y-graft configuration.**

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235604.g003>



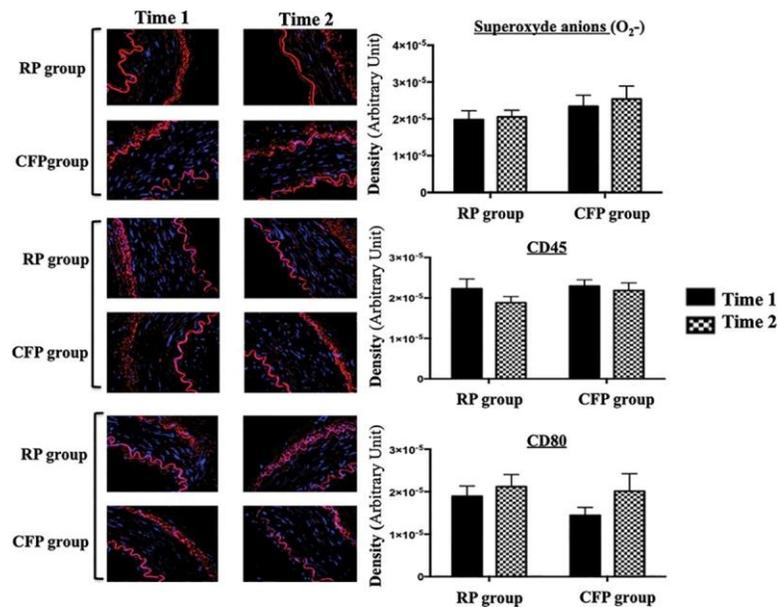
**Fig 4. Protein expression levels from RP group to CFP group at time 1 or time 2 in artery sections.** Expression of genes coding: cytokines, IL-6 (Interleukin-6), MCP-1 (Monocyte Chemotactic protein 1), CCL2; growth and transcription factors, VEGF (Vascular Growth Endothelial Factor), NF $\kappa$ B3 (pro-inflammatory transcription factor) (Fig 4A). CD163, macrophages; oxidative stress, SOD1 and SOD2 (superoxide dismutase 1 and 2), complement complex, C3 and C4a (Fig 4B). Data are presented as mean  $\pm$  SEM (Time 2-Time 1 for RP and CFP groups).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235604.g004>

[20] has led to operate on patients with more co-morbidities and more advanced cardiac disorders, who are even more sensitive to inflammatory response after CPB [21]. There are many causes of inflammatory response and they have been extensively described: surgical trauma, contact between blood and artificial surfaces of CPB equipment, activation of coagulation, cellular and humoral cascade attenuation, hemodilution and uncontrolled suction of pericardial shed blood [22]. The early inflammatory response observed immediately after CPB start, as reflected by markers released during the procedure, is known to affect the complement system and neutrophils [23]. However, no difference was observed between RP and CP unlike data in the literature [16, 24], probably because the blood samples were collected at the end of aortic cross clamp time, before CPB arrest. Moreover, compared to historical comparisons [4, 5], we used a tubing set improved by phosphorylcholine coated surface as well as a cell saver was systematically used to discard highly activated blood from pericardial cavity for better biocompatibility. Hypothermic blood cardioplegia, as used in our study, was associated with a decrease proinflammatory cytokines (IL-6) in the early postoperative period and anti-inflammatory cytokine (IL-10) compared to normothermic blood cardioplegia [25].

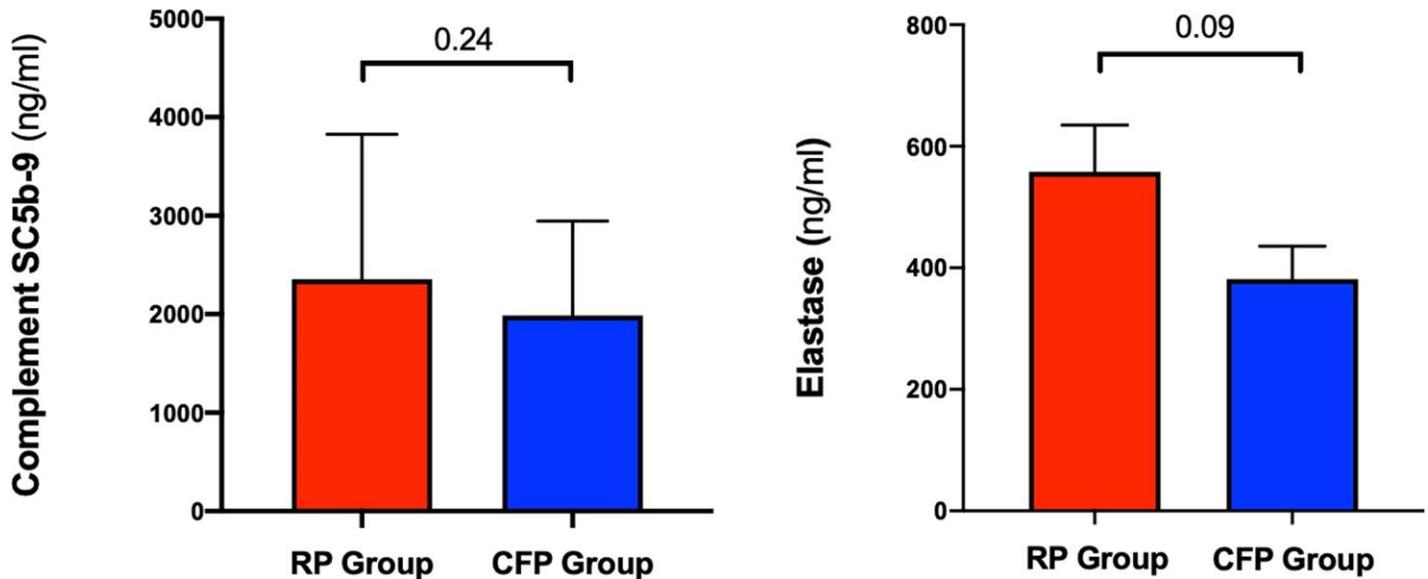
Others experimental studies have shown the impact of CPB on vascular reactivity of small diameter arteries. Early and transient mesenteric or cerebral endothelial dysfunction occurred quickly after starting CPB [12, 26]. CPB and cardioplegic arrest affected the vascular bed, reduced vascular resistance in skeletal muscle and increased the risk of vasospasm in the pulmonary, cardiac, mesenteric and cerebral microvascularization [12].

The debate about the role of pulsatile or non-pulsatile CPB and its impact on the microcirculation has been ongoing for several decades. Roller pump-generated pulsatile flow has been



**Fig 5. In situ detection of superoxide anion, CD 45 and CD80 in RP group and CFP group from Time 1 to Time 2 are shown in the bar graph.**

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235604.g005>



**Fig 6. Complement activation SC5b-9 (Fig 6A) and elastase (Fig 6B) release in the blood are shown in the bar graph for each group (Time 2-Time 1). Data are presented as mean  $\pm$  SEM.**

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235604.g006>

described as « ripple flow » corresponding to the variation in the flow rate of the pump which is different in the centrifugal pump [27]. The microcirculation corresponding to blood vessels with an internal diameter of less than 200  $\mu\text{m}$  is preserved with a pulsatile perfusion compared to non-pulsatile flow because of leukocyte adherence attenuation and the maintenance of the number of perfused vessels [28]. In resistance arteries, such as the mesenteric arteries in rats, pulsatile pressure induced significant dilatation and stepwise increases in pressure induced contraction but less so under non-pulsatile condition [9]. An inflammatory response in the artery wall with a significant ROS level (appearing from 30 minutes), MCP-1 and TNF- $\alpha$  production were significant in arteries subjected to non-pulsatile flow [9]. Regarding these results, it appeared useful to verify if human small arteries such as ITAs, the principal graft conduit used in coronary surgery, alter their vascular reactivity, an effect that we did not observe in the present study. Use of pulsatile CPB attenuates leakage of endothelial markers (vascular endothelial growth factor (VEGF), monocyte chemo-attractant protein (MCP-1) and cytokines (IL-10 and IL-2) [29].

We investigated a wide range of genes coding for the classical and alternative pathways of the complement terminal complex (components C3 and C4a), macrophages (CD163), lymphocytes (PTPRC), mitochondrial activity and cytokines. We observed a decrease in C3 and C4a components at time 2. C3 and C4a components were anaphylatoxin molecules and mediated two major effects, namely enhancement of vascular permeability and induction of smooth muscle contraction [30]. A decrease in gene expression of complement, observed in the present study, could be explained by intravascular complement system activation. An increase in oxidative stress was not found in ITAs contrary to the results of experimental studies [9].

Exposure duration to the flow was relatively short around 45 minutes. A direct correlation between cytokine production and CPB duration, consequently associated with adverse outcomes such as longer stay in the intensive care unit and longer duration mechanical ventilation have been clearly established [28], with altered vascular reactivity during non-pulsatile perfusion starting from 180 minutes of CPB [9].

Use of circulating microRNAs as endothelial miR-16 to monitor the inflammatory impact during extracorporeal circulation was probably an excellent biomarker. Sorrentino et al. demonstrated an increase of miR-16, miR-155, miR-34 and miR-17 expression levels in carotid artery endothelium 14 days from injury. Circulating miR-16 was upregulated after vascular injury in the presence of hindlimb ischemia [31] and exerted a negative effect on vascular remodeling. However, the detection of miRNA required a long period of stimulation or inflammation duration corresponding to vascular injury from several days to several weeks [31, 32]. In our study, the duration of CPB was respectively 87 minutes [46–158] and 94 [41–184] in both groups and was probably too short to detect circulating miR-16.

Perioperative hemodynamic monitoring including measurement of mean arterial pressure, cardiac index and mean pulmonary pressure classically is performed during cardiac surgery. However, there was no quantification of « pulsatile rate » in our study; this parameter (energy equivalent pressure (EEP) and surplus hemodynamic energy (SHE) according to Shepard's models [33]) could vary during CPB. The main limitation of this study was the evolving surgical technique concerning the arterial graft including Y-graft configuration according to the debate that exists with cardiologists about the improved results expected by the use of multiple arterial grafts. In addition, manipulation of Y composite grafts may expose to disturbed vascular reactivity injury due to local ischemia-reperfusion injury.

## 18. Conclusion

Within the time frame necessary to perform regular CABG in the IPITA study, roller versus centrifugal pumps did not alter endothelium-dependent relaxation of the internal thoracic arteries because no parietal inflammatory response of ITAs appeared despite the initiation of the systemic inflammatory response during CPB.

## 19. Supporting information

**20. S1 Checklist.** CONSORT 2010 checklist of information to include when reporting a randomised trial<sup>□</sup>.

(DOC)

**21. S1 Table.** Primer pairs were designed using 3 reference genes and those presenting a single peak of dissociation and an efficacy were retained.

(DOCX)

**22. S1 Fig.** CONSORT 2010 flow diagram.

(DOC)

**23. S1 Appendix.** The original study protocol in French; translation of the study protocol in English.

(DOC)

**24. S2 Appendix.** The ethics committee approved by the Angers institutional review board (authorization: CNIL: 2015–002).

(PDF)

**25. S3 Appendix.**

(DOC)

**26. S4 Appendix.**

(DOC)

## 27. Acknowledgments

The authors wish to thank Dr Odile Blanchet from the *Center of Biological Resources*, Drs Alain Chevailler and Caroline Poli for their help performing the immunological analysis, Yve-line Hamon and also the contribution of the perfusion team.

## 28. Author Contributions

**Conceptualization:** Olivier Fouquet, Christophe Baufreton, Laurent Loufrani.

**Data curation:** Simon Dang Van, Anna Baudry, Philippe Meisnerowski.

**Formal analysis:** Olivier Fouquet, Simon Dang Van, Anna Baudry, Philippe Meisnerowski, Pauline Robert, Christophe Baufreton, Laurent Loufrani.

**Funding acquisition:** Olivier Fouquet, Pauline Robert.

**Investigation:** Olivier Fouquet, Laurent Loufrani.

**Methodology:** Christophe Baufreton.

**Supervision:** Olivier Fouquet, Patrice Binuani, Daniel Henrion, Christophe Baufreton, Laurent Loufrani.

**Validation:** Olivier Fouquet, Jean-Marie Chrétien, Daniel Henrion, Laurent Loufrani.

**Visualization:** Frédéric Pinaud, Daniel Henrion.

**Writing – original draft:** Olivier Fouquet.

**Writing – review & editing:** Olivier Fouquet, Christophe Baufreton, Laurent Loufrani.

## 29. References

1. Database French Society of Thoracic and CardioVascular Society 2014
2. Haines N, Wang S, Undar A, Alkan T, Akcevin A. Clinical outcomes of Pulsatile and Non-pulsatile mode of perfusion. *J extra Corpor Technol*. Mars 2009; 41(1):p26–9
3. Saczkowski R, Maklin M, Mesana T, Boodhwani M, Ruel M. Centrifugal pump and roller pump in adult cardiac surgery: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Artif Organs*. 2012 Aug 1; 36(8):668–76. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2012.01497.x> PMID: 22804106
4. Ashraf S, Butler J, Tian Y, Cowan D, Lintin S, Saunders NR, et al. Inflammatory mediators in adults undergoing cardiopulmonary bypass: comparison of centrifugal and roller pumps. *Ann Thorac Surg*. 1998 Feb; 65(2):480–4. [https://doi.org/10.1016/s0003-4975\(97\)01349-0](https://doi.org/10.1016/s0003-4975(97)01349-0) PMID: 9485250
5. Baufreton C, Intrator L, Jansen PG, Velthuis te H, Le Besnerais P, Vonk A, et al. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass using roller or centrifugal pumps. *Ann Thorac Surg*. 1999 Apr; 67(4):972–7. [https://doi.org/10.1016/s0003-4975\(98\)01345-9](https://doi.org/10.1016/s0003-4975(98)01345-9) PMID: 10320237
6. James SA, Peters J, Maresca L, Kalush SL, Trigueros EA. The roller pump does produce pulsatile flow. *J Extra Corpor Technol*. 1987 Oct 27; 19:376–83.
7. Wright G. The hydraulic power outputs of pulsatile and nonpulsatile cardiopulmonary bypass pumps. *Perfusion*. SAGE Publications; 1988; 3(4):251–62.
8. Watarida S, Mori A, Onoe M, Tabata R, Shiraiishi S, Sugita T, et al. A clinical study on the effects of pulsatile cardiopulmonary bypass on the blood endotoxin levels. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1994 Oct; 108(4):620–5. PMID: 7934094
9. Pinaud F, Loufrani L, Toutain B, Lambert D, Vandekerckhove L, Henrion D, et al. In vitro protection of vascular function from oxidative stress and inflammation by pulsatility in resistance arteries. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2011 Nov; 142(5):1254–62. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2011.07.007> PMID: 21843894
10. Crow S, John R, Boyle A, Shumway S, Liao K, Colvin-Adams M, et al. Gastrointestinal bleeding rates in recipients of nonpulsatile and pulsatile left ventricular assist devices. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2009; 137(1):208–15. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2008.07.032> PMID: 19154927

11. Bartoli CR, Restle DJ, Zhang DM, Acker MA, Atluri P. Pathologic von Willebrand factor degradation with a left ventricular assist device occurs via two distinct mechanisms: Mechanical demolition and enzymatic cleavage. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2015 Jan; 149(1):281–9. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2014.09.031> PMID: 25439775
12. Ruel M, Khan TA, Voisine P, Bianchi C, Sellke FW. Vasomotor dysfunction after cardiac surgery. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2004 Nov 1; 26(5):1002–14. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2004.07.040> PMID: 15519196
13. Baufreton C, Pinaud F, Corbeau J-J, Chevaller A, Jolivot D, Minassian Ter A, et al. Increased cerebral blood flow velocities assessed by transcranial Doppler examination is associated with complement activation after cardiopulmonary bypass. *Perfusion*. 2011 Mar; 26(2):91–8. <https://doi.org/10.1177/0267659110392439> PMID: 21173036
14. Baufreton C, Jansen PG, Le Besnerais P, te Velthuis H, Thijs CM, Wildevuur CR et al. Heparin coating with aprotinin reduces blood activation during coronary artery operations. *Ann Thorac Surg*. 1997 Jan; 63(1):50–6. [https://doi.org/10.1016/s0003-4975\(96\)00964-2](https://doi.org/10.1016/s0003-4975(96)00964-2) PMID: 8993240
15. Baufreton C, De Brux JL, Binuani P, Corbeau JJ, Subayi JB, Daniel JC et al. A combined approach for improving bypass in coronary surgery: a pilot study. *Perfusion* 2002 Nov; 17(6):407–13. <https://doi.org/10.1191/0267659102pf615oa> PMID: 12470029
16. Shapira OM, Korach A, Pinaud F, Dabah A, Bao A, Corbeau JJ et al. Safety and efficacy of biocompatible perfusion strategy in a contemporary series of patients undergoing coronary artery bypass grafting: a two-center study. *J Cardiothorac Surg*. 2014 Dec 18; 9: 196. <https://doi.org/10.1186/s13019-014-0196-3> PMID: 25519179
17. Henrion D., Laher I and Bevan JA. Intraluminal flow increases vascular tone and  $45\text{Ca}^{2+}$  in flux in the rabbit fascial vein. *Circulation Research*. 1992, vol. 71, no 2, pp. 339–345. <https://doi.org/10.1161/01.res.71.2.339> PMID: 1628391
18. John W, Hammon. Extracorporeal circulation: the response of humoral and cellular elements of blood extracorporeal circulation. In: Cohn LH, editor. *Cardiac surgery in the adult*, vol. 3. New-York: McGraw-Hill. 2008 p.370–89.
19. Neumann FJ, Sousa-Uva M, Ahlsson A, Alfonso F, Banning AP, Benedetto U, et al. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *Eur Heart J*. 2019 Jan 7; 40(2):87–165. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy394> PMID: 30165437
20. De Rosa S, Polimeni A, Sabatino J, Indolfi C. Long-term outcomes of coronary artery bypass grafting versus stent-PCI for unprotected left main disease: a meta-analysis. *BMC Cardiovasc Disord*. 2017 Sep 6; 17(1):240. <https://doi.org/10.1186/s12872-017-0664-5> PMID: 28877676
21. Casthelheim A, Hoel TN, Vedem V et al. Biomarker profile in off-pump coronary artery bypass grafting surgery in low-risk patients. *Ann Thorac Surg* 2008; 85:1994–2002. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2008.03.012> PMID: 18498809
22. Onorati F, Esposito A, Comi MC et al. Intra-aortic balloon pump-induced pulsatile flow reduces coagulative and fibrinolytic response to cardiopulmonary bypass. *Artif Organs* 2008; 32:433–41. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2008.00563.x> PMID: 18422802
23. Boyle EM, Pohlman TH, Johnson MC, Verrier ED. Endothelial cell injury in cardiovascular response. *Ann Thorac Surg* 1997; 63:277–84. [https://doi.org/10.1016/s0003-4975\(96\)01061-2](https://doi.org/10.1016/s0003-4975(96)01061-2) PMID: 8993292
24. Baufreton C, Intrator L, Jansen PGM et al. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass using roller or centrifugal pumps. *Ann Thorac Surg*. 1 avr 1999; 67(4):972–7 [https://doi.org/10.1016/s0003-4975\(98\)01345-9](https://doi.org/10.1016/s0003-4975(98)01345-9) PMID: 10320237
25. Sacli H, Kara I, Diler MS, Percin B, Turan AI, Kirali K. The relationship between the use of cold and isothermic blood cardioplegia solution for myocardial protection during cardiopulmonary bypass and the ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2019 Jul 12.
26. Doguet F, Litzler PY, Tamion F et al. Changes in mesenteric vascular reactivity and inflammatory response after cardiopulmonary bypass in a rat model. *Ann Thorac Surg*. 2004 Jun; 77(6):2130–7 <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2003.10.034> PMID: 15172281
27. Sunagawa G, Koprivanac M, Karimov JH, Moazami N, Fukamachi K. Is a pulse absolutely necessary during cardiopulmonary bypass ? *Expert Rev Med Devices*. 2017 jan; 14(1):27–35. <https://doi.org/10.1080/17434440.2017.1265445> PMID: 27892719
28. O'Neil MP, Fleming JC, Badhwar A, Guo L. Pulsatile versus nonpulsatile flow during cardiopulmonary bypass: microcirculatory and systemic effects. *Ann Thorac Surg*. 2012 Dec; 94(6):2046–53. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2012.05.065> PMID: 22835552
29. Onorati F, Rubino AS, Nucera S et al. Off-pump coronary artery bypass surgery versus standard linear or pulsatile cardiopulmonary bypass: endothelial activation and inflammatory response. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2010 Apr; 37(4):897–904.

30. Hugli TE. Structure and function of the anaphylatoxins. *Springer Semin Immunopathol.* 1984; 7(2–3):193–219. Review. <https://doi.org/10.1007/BF01893020> PMID: 6387982
31. Sorrentino S, Iaconetti C, De Rosa S, Polimeni A, Sabatino J, Gareri C, et al. Hindlimb Ischemia Impairs Endothelial Recovery and Increases Neointimal Proliferation in the Carotid Artery. *Sci Rep.* 2018 Jan 15; 8(1):761. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-19136-6> PMID: 29335599
32. Farina FM, Hall IF, Serio S, Zani SM, Climent M, Salvarani N et al. miR-128-3p Is a Novel Regulator of Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Switch and Vascular Diseases. *Circ Res.* 2020 Mar 27.
33. Shepard RB, Simpson DC, Sharp JF. Energy equivalent pressure. *Arch Surg* 1966; 93:730–40. <https://doi.org/10.1001/archsurg.1966.01330050034005> PMID: 5921294

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Do storage solutions protect endothelial function of arterialized vein graft in an experimental rat model?

Olivier Fouquet<sup>1,2\*</sup>, Jean-David Blossier<sup>2,3</sup>, Simon Dang Van<sup>1,2</sup>, Pauline Robert<sup>2</sup>, Agnès Barbelivien<sup>2</sup>, Frédéric Pinaud<sup>1,2</sup>, Patrice Binuani<sup>1</sup>, Maroua Eid<sup>1</sup>, Daniel Henrion<sup>2,4</sup>, Christophe Baufreton<sup>1,2†</sup> and Laurent Loufrani<sup>2,4†</sup>

## Abstract

**Background:** This study aims to compare the effects of storage solutions commonly used in coronary artery bypass grafting on the vascular reactivity in vein graft interposed in arterial position in syngeneic rats.

**Methods:** Twenty-seven male Lewis rats were sacrificed to sample a vein graft implanted 6 weeks ago into abdominal aorta position. The vein grafts were inferior venae cavae initially pretreated with heparinized saline solution (HS) or autologous heparinized blood (AHB) or our referent solution, GALA. The endothelial functionality, the in situ Reactive Oxygen Species (ROS) levels and the histological characteristics were conducted from segments of arterialized vein graft.

**Results:** At 6 weeks, graft thrombosis occurred respectively in 22% of AHB group, 62.5% in the HS group and 82.5% in the GALA group. In each group, significative intimal hyperplasia was observed. After 6 weeks, an endothelium-remodeling layer associated with an increase of wall thickness was observed in each group. Endothelium-dependent tone was reduced in the vein graft regardless of the group. No difference was observed concerning the ROS in vein graft between the different groups. In distal aortic sections, ROS levels were increased in HS and GALA groups.

**Conclusions:** Storage solutions used in this experimental model of vein graft implanted in arterial position cause graft injury and a complete disappearance of vascular reactivity. GALA solution did not reduce intimal risk hyperplasia when the vein graft was exposed to arterial flow in a rat model.

**Keywords:** Coronary artery bypass grafting, Venous graft, Storage solutions, Vascular reactivity

## Background

Ischemic heart disease remains the leading cause of death [1] in developed countries and higher life expectancy increases its incidence. Coronary artery bypass grafting (CABG) is considered the best treatment in most cases [2]. The success of surgical approach depends on the long-term patency rate of the grafts used. Saphenous vein graft remains the most frequently conduit used in CABG but early occlusion rates were reported ranged from 15 to 26% at 1 year resulting of vein graft dysfunction [3]. The principle etiologies of early

postoperative graft failure are technical operative errors, low flow, thrombosis and vasospasm. At mild term a graft failure can appear, and it is histologically characterized by an intimal hyperplasia (IH) which is a proliferation of smooth muscle cells (SMC) and a deposition of extracellular matrix (ECM) in the intima. An atherosclerosis mechanism is observed with a risk of vein graft thrombosis [4, 5]. To preserve the SVG quality as well as endothelial cells (EC) viability and functionality, some intraoperative graft storage solutions have been evaluated in-vitro [6, 7]

and some were developed for vascular conduit preservation [8, 9]. The GALA solution (Glutathione, L-ascorbic acid, L-arginine and glucose; pH = 7.4), being widely recognized in this purpose; its effects compared to other solutions (saline and autologous blood with

\* Correspondence: [olfouquet@chu-angers.fr](mailto:olfouquet@chu-angers.fr)

†Christophe Baufreton and Laurent Loufrani contributed equally to this work.

<sup>1</sup>Department of Cardiac Surgery, University Hospital of Angers, France, 4 rue Larrey, 49933 CHU Angers Cedex 9, France

<sup>2</sup>Institute MITOVASC CNRS UMR 6015, INSERM 1083, Angers, France

Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s). 2020 Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

added heparin) maintained the endothelial function and structural viability of the grafts for 1 to 24 h of storage [10]. A sub study of the PREVENT IV randomized trial demonstrated that buffered saline solution had lower vein graft failure rate studied by angiography 12 to 18 months after surgery and better clinical outcomes compared to saline or autologous blood solutions [11].

When venous graft is exposed to the arterial blood flow, hemodynamic strengths (shear stress (SS) and cyclic strain (CS)) are applied on the vascular wall. The impact of SS on EC depends on the type flow applied on the venous graft [12]. IH occurs in approximately 50% of SVG and is characterized by SMC migration from the media to the intima through metalloproteinase (MMPs) activation [13]. Vein graft failure response to hypoxia-reoxygenation injury associates mechanisms of vasospasm, adhesion cascade, ROS (Reactive Oxygen Species) production, platelet aggregation, endothelial cells loss, and shear stress stimulation during the first week [14].

The research concerning storage solutions is in vitro human studies and it is clearly accepted that they have a

fundamental role in the early preservation of the endothelium of the vein graft [15]. However, when the venous graft was exposed to arterial shear-stress and cyclic strain, smooth muscle cells change their phenotype from a contractile to a secretory stage [16]. Physiologically, venous endothelium produces small amount of NO while in arterial position, the production decreases. The storage solution should maintain a physiological pH and support endothelial NO production by provision of an eNOS substrate [17]. A lot of intraoperative vein graft preservation solutions were studied but we focused three of them according to our clinical practice and following the results of experimental study [10]. The purpose of this study was to evaluate if autologous heparinized blood, heparinized saline serum and GALA considered as our referent solution could have a protective effect on an arterialized vein graft in a rat model.

### Methods

Figure 1 shows the flowchart of the different steps.

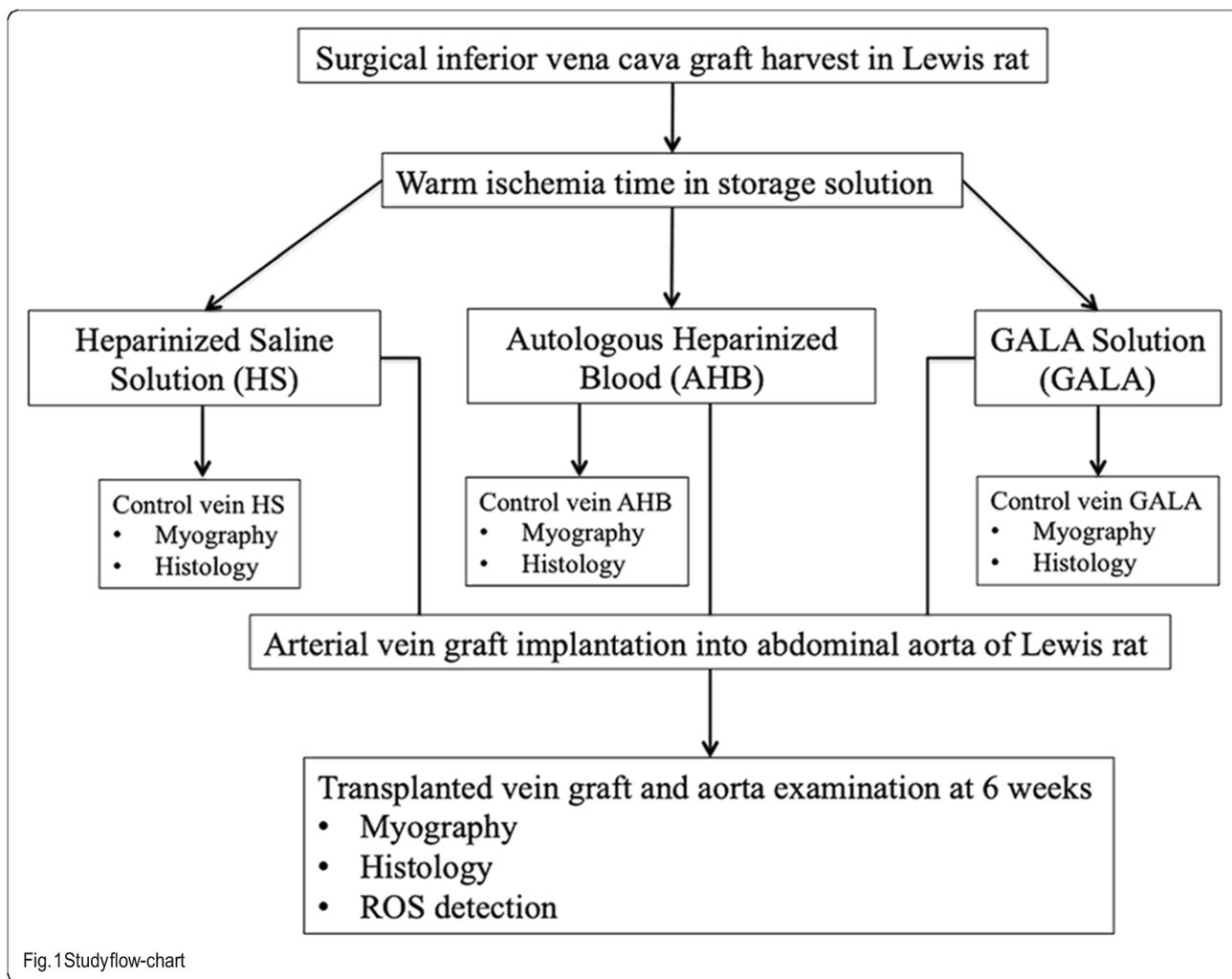


Fig. 1 Study flow-chart

### Preservation solution

The inferior vena cava grafts were randomly stored in the different preservation solutions at room temperature (20 °C) before implantation. Three different storage solutions were used for the ex-vivo preservation of explanted veins. Vein grafts were stored in one of the following solutions: autologous heparinized (40 UI/ml heparin choay) blood (AHB), 0.9% sodium chloride heparinized (40 UI/ml heparin choay) serum (HS); GALA solution (glutathion, ascorbic acid, L-arginine) prepared at the hospital pharmacy which constitutes in our institution the referent storage solution used in CABG for vein grafts. GALA solution was composed of physiologic salt solution to which was added: 0.02 ml magnesium sulfate, 1.785 mg potassium hydrogenophosphate, 0.03 ml magnesium chloride, 0.042 ml calcium chloride, 0.08 ml potassium chloride, 5000 UI/ml heparin choay, L-ascorbic acid (1 g/500 ml), 0.6 ml glucose 5%, 0.75 ml sodium bicarbonate, 1.2 ml sodium chloride, 1.5 ml L-arginine as a substrate for endothelial nitric oxide synthetase (eNOS) and 2.7 ml glutathione. The inferior vena cava segments were collected from 27 donor rats.

### Animals

Inbred male LEWIS (Albino rat, a/a, B/B, Tyr<sup>c</sup>/Tyr<sup>c</sup>, h/h – MHC: RT1<sup>1</sup>) rats weighting  $337 \pm 17$  g and aged  $12.8 \pm 0.75$  weeks (JANVIER LABS, Le Genest Saint Isle, France) were housed in a regulatory pet. No exogenous immunosuppressive drug therapy was employed. All procedures were performed according to the guidelines of the Institutional Animal Care and approved by the Ministère Français de l'enseignement Supérieur et de la Recherche (authorization number December 2014: 000375.01).

### Surgical harvest and implantation of the vein graft

Twenty-seven donor rats were anaesthetized (isoflurane 5%) and pretreated with buprenorphine (Temgesic; 0.1 ml/100 g S.C). A large incision through the abdominal wall allowed to expose the inferior vena cava and the abdominal aorta. The different branches of the vein were ligatured with 8–0 monofilament Prolene®. The donor rats were sacrificed in a CO2 chamber. The inferior vena cava was stored in a preservation solution (9 in AHB, 9 in HS and 9 in GALA) previously described. Each vein was carefully flushed with the storage solution. After storage in one of the preservation solutions and before arterial implantation, a segment of the vena cava was sampled then stored in PSS for myography and corresponding to the control vein group (AHB control vein, HS control vein and GALA control vein).

Twenty-seven recipient rats were anaesthetized and pretreated as described. The abdominal aorta was exposed, isolated from the adjacent inferior vena cava and controlled with a loop between the renal arteries and the

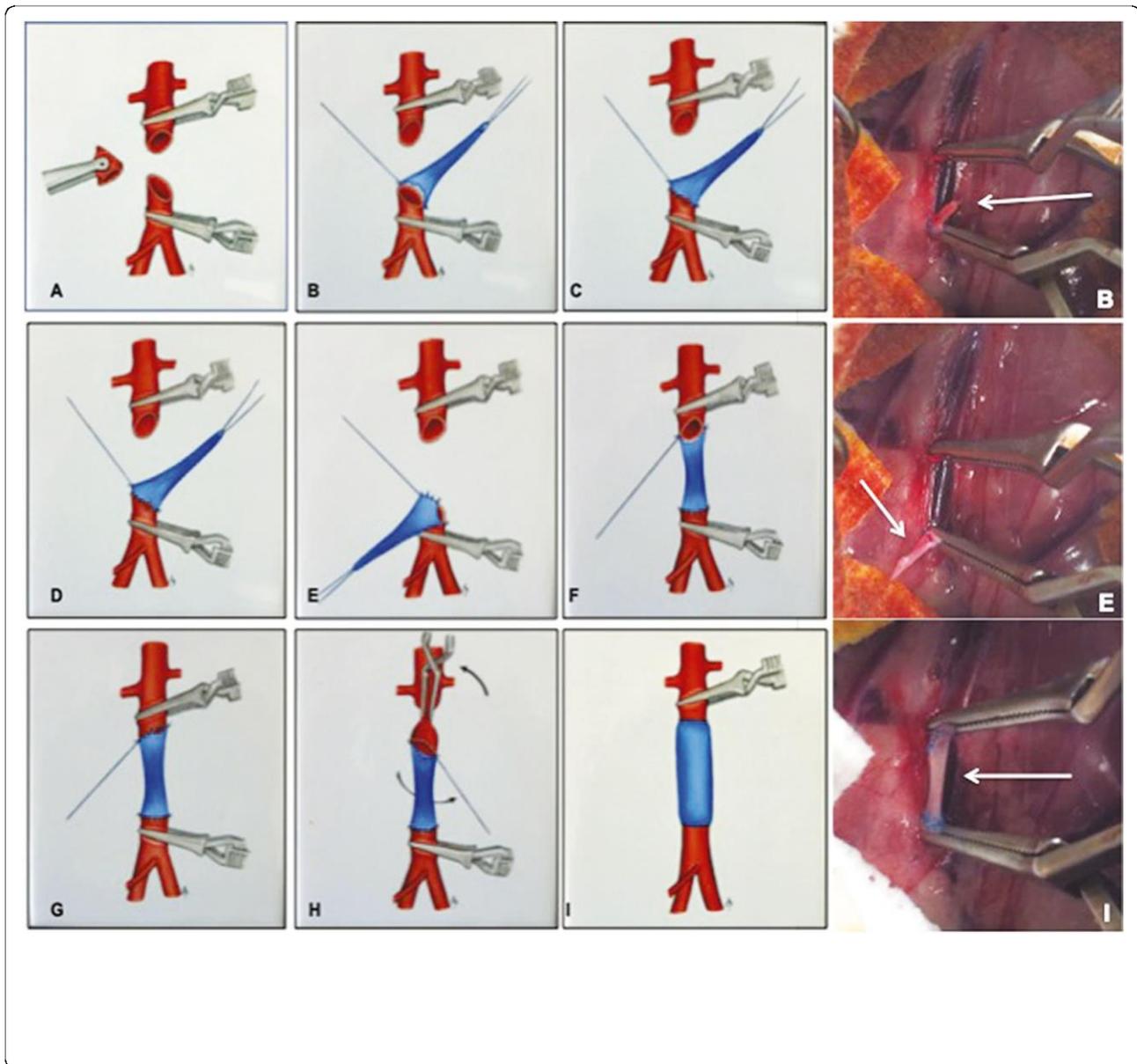
aorta bifurcation. The aorta was clamped, and an arterial segment was removed. Heparin injection (300 UI/kg) was performed during the procedure. The vein graft was interposed into the recipient's abdominal aorta, an end-to-end anastomosis was then established between the donor and the recipient vessels, respectively, using a running 9–0 monofilament suture Prolene® at  $\times 10$  magnification (Fig. 2). At the end of this procedure, the clamps were removed, the patency of transplanted graft was confirmed and blood supply to the pelvis and lower extremities was restored. Rats were placed in an incubator at 29 °C for 20 min until fully awake and monitored for signs of lower limb ischemia, hemorrhage and pain. Antibiotics were administered for 7 days (Bactrim 2.5 ml per liter of drinking water). Buprenorphine from 0.067 to 0.33 ml per 100 g was administered in case of mild, moderate or severe pain (pain scale in rats according to the guidelines of the Institutional Animal Care) The same cardiac surgeon performed all procedures.

### Transplanted vein graft examination

At 6 weeks after transplantation, under anesthesia, the abdomen was exposed, previously implanted vein grafts with a proximal and distal segments of the aorta were removed and subsequently divided into five segments of commensurate length: two segments (proximal aorta and vein graft) were stored in a 10 ml organ bath containing a physiologic salt solution (PSS) for myography and three segments (proximal aorta, distal aorta and vein graft) were cooled in liquid nitrogen and stored at  $-80$  °C for histology and immunohistochemistry.

### Vascular reactivity

Myography: for each sacrificed recipient rat, 3 fresh segments of distal aorta, vein graft and control vein stored in PSS were analyzed. At day+ 1, the fresh segments were mounted on a wire-myograph (DMT, Aarhus, DK) as previously described [18]. Briefly, 2 tungsten wires (25  $\mu$ m diameter) were inserted in the lumen of the grafts and connected to a force transducer and a micrometer, respectively. Vascular grafts were bathed in the PSS described above. A wall tension, equivalent to the intra-arterial tension (20 mN for aortic segment and 5 mN for control vein and vein graft segments), was applied corresponding or equivalent to arterial blood pressure at 90 mmHg. Vessels were allowed to stabilize for 20 min. Contractility was assessed with phenylephrine (PE 10–6 M). Acetylcholine (Ach 10–6 M) induced relaxation was then obtained after phenylephrine-induced precontraction (50% of maximal contraction). Vascular response to PE (from 10 to 9 M to 10–5 M), Ach (from 10 to 9 M to 10–5 M) and SNP (Sodium Nitroprusside) (from 10 to 9 M to 10–5 M) were studied.



### Histology

Vascular segments were embedded in paraffin and cooled at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Sections ( $7\ \mu\text{m}$  thickness) were obtained from the fixed arterial segments and stained with orcein to visualize elastic fibers. External diameter, lumen diameter, and media thickness were determined after images acquisition (Olympus T100 microscope, Sony Camera) and analyzed using the Histolab Software (Microvision, Paris, France) for cross-sectional area (CSA) calculation as previously described [19].

### Detection of reactive oxygen species detection using confocal microscopy

Dihydroethidium staining (DHE, Sigma-Aldrich) was used to evaluate the in-situ levels of superoxide anions

( $\text{O}_2^-$ ) [20]. DHE penetrates cells and is oxidized by superoxide ( $\text{O}_2^-$ ) into fluorescent products that are trapped by intercalation into the DNA. Sections were incubated with DHE ( $1\ \mu\text{mol/L}$ ) in phosphate-buffered solution (PBS) and DAPI (4',6'-diamidino-2-phénulindole- Molecular probes, Invitrogen) for nuclear cells at  $37^{\circ}\text{C}$  for 30 min in a humidified chamber protected from light. Fluorescent images of ethidium bromide were obtained using a confocal microscope (Nikon) and quantified with the ImageJ (NIH) software. The different studied sections were vein graft and distal aorta samples.

### Statistical analysis

Data were reported as mean  $\pm$  standard error the mean unless indicated otherwise. Considering the sample size,

non-parametric tests (t-test or Mann-Whitney test) were conducted to assess the statistically significant of each experiment using Graphpad Prism software (La Jolla, Calif). *P* value of  $\leq .05$  was considered statically significant.

**Sample size:** based on a previous study [21], and to show a difference between the three groups at a power of 90% with a significance level of 5% concerning vascular reactivity and inflammatory response, a sample size of 27 rats was required for this experimental study (9 per group).

## Results

### Surgery and occlusion rate of the venous graft

The mean duration of venous storage and duration of surgery, the weight gain during the follow-up were presented in the Table 1. At 6 weeks, the mortality was 0/9 in the HS group, 1/9 in the AHB group (bleeding,  $n = 1$ ) and 3/9 in the GALA group (bleeding,  $n = 2$ ; mesenteric ischemia,  $n = 1$ ).

Among rats alive, thrombosis occurred respectively in 2/9 (22%) grafts of AHB group, 5/8 (62.5%) in the HS group and 5/6 (83.3%) in the GALA group (Fig. 3). The suture analysis showed no proximal nor distal anastomoses stenosis.

### Histology

The wall thickness of control vein was  $17.75 \pm 3 \mu\text{m}$  in the HS group,  $16.3 \pm 4 \mu\text{m}$  in the AHB group and  $17.3 \pm 5 \mu\text{m}$  in the GALA group (0.7). The wall thickness of vein grafts was  $105 \pm 32 \mu\text{m}$  (+ 83.1% compared with wall thickness of control vein) in the HS group,  $101 \pm 25 \mu\text{m}$  (+ 83.9%) in the AHB group and  $107 \pm 31 \mu\text{m}$  (+ 83.8%) in the GALA group (0.8). The orcein staining showed an important intimal hyperplasia in the vein graft with a disappearance of endothelium layer and a structural media failure regardless the preservation solution used (Fig. 4). The distal aorta retains its histological architecture in each group. An intraluminal fibrosis was observed in the occluded grafts (Fig. 3).

### Myography

Because of the small number of permeable vein grafts at 6 weeks, the analysis concerned the average of the three preservation solutions groups.

Phenylephrine induced a significant contraction in the aorta ( $3.10^{-8} \mu\text{mol/L}$ ), about 50% in the control vein

(from  $10^{-6}$  to  $3.10^{-6} \mu\text{mol/L}$ ). No contraction was observed on the vein graft except for high doses of phenylephrine (from  $10^{-6}$  to  $10^{-5} \mu\text{mol/L}$ ).

Acetylcholine did not induce dilatation neither in the control vein nor the aorta and the vein graft. Sodium nitroprusside induced a significant dilatation in the control vein compared to the vein graft ( $p < 0.01$ ) (Fig. 5). A dilatation was observed in the aorta for high dose of sodium nitroprusside (from  $10^{-7}$  to  $10^{-5} \mu\text{mol/L}$ ).

### ROS detection

In venous graft sections, there was no difference concerning the superoxide formation evaluated by ethidium bromide-enhanced fluorescence (Fig. 6a). Moreover, in distal aorta sections, superoxide anion levels were significantly higher in HS group than AHB and GALA groups (Fig. 6b).

## Discussion

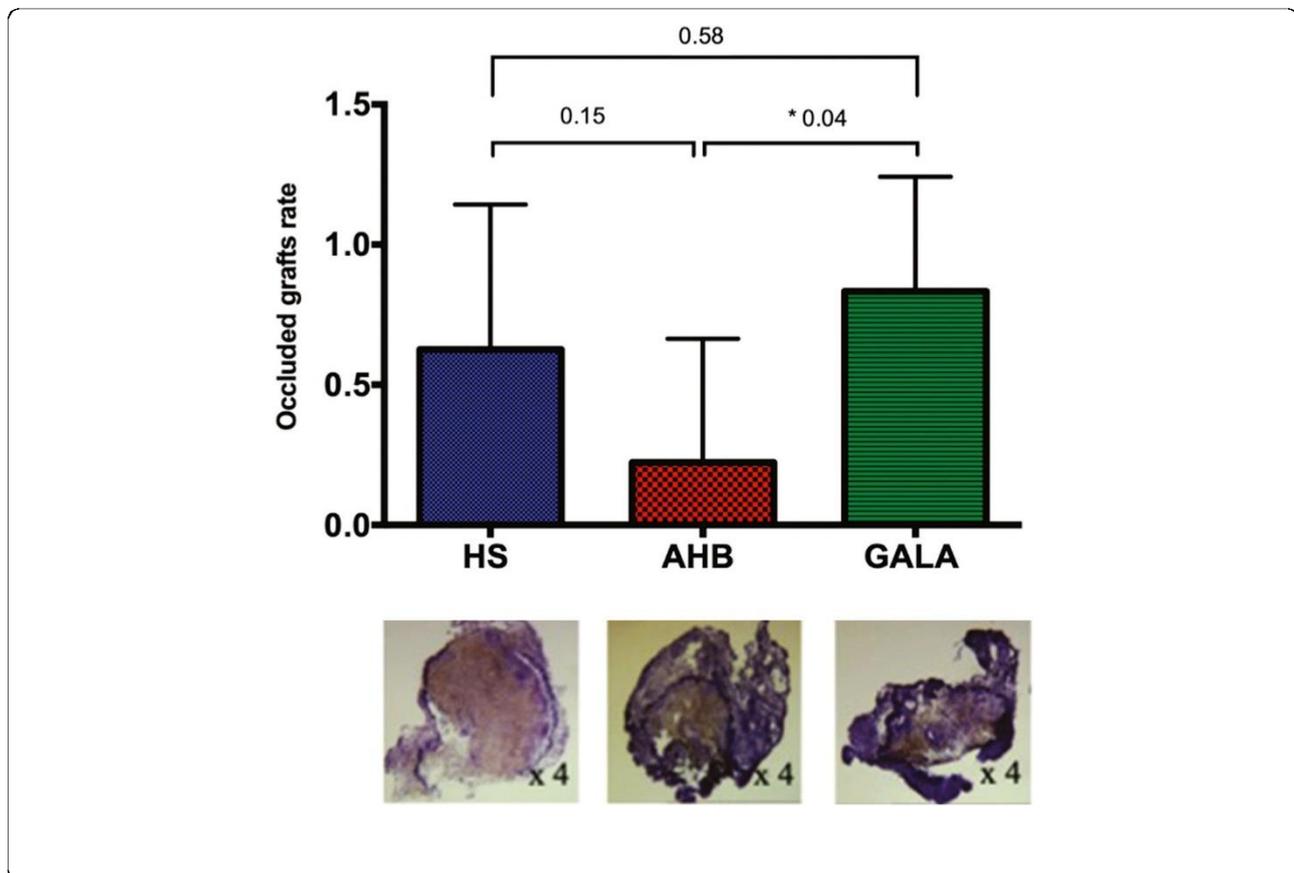
Vein graft failure is the result of a complex mechanism associating endothelial injury which can occur from the surgical harvesting, intimal hyperplasia and atherosclerosis [22]. The main role of storage solutions is to preserve the endothelium of graft conduit and their actions run from storage period to arterial implantation [15].

### Vein graft analysis at 6 weeks

- Saphenous vein graft (SVG) represents an autologous transplantation, as it is explanted, preserved in storage solution into a cup at room temperature and then implanted in arterial system. In clinical practice, the duration of vein graft storage corresponding to the warm ischemia tissue was difficult to evaluate because no data are published. Some surgeons do not store SVG before creating the anastomoses and develop the concept of "no-touch technique" with excellent graft patency [23]. In contrast to what is done for solid organs destined for allotransplantation, where different preservation solutions were developed such as University of Wisconsin solution for pancreas or Celsior solution for heart, the normal saline solution was the first storage solution for SVG. O'Connell et al. demonstrated that 2 h of saline infusion produced an IH [24]. Saline solution has negative effects on the endothelial layers and therefore may compromise graft patency [25]. However, different in-vitro studies cannot conclude on the superiority of autologous

Table 1 Surgical data

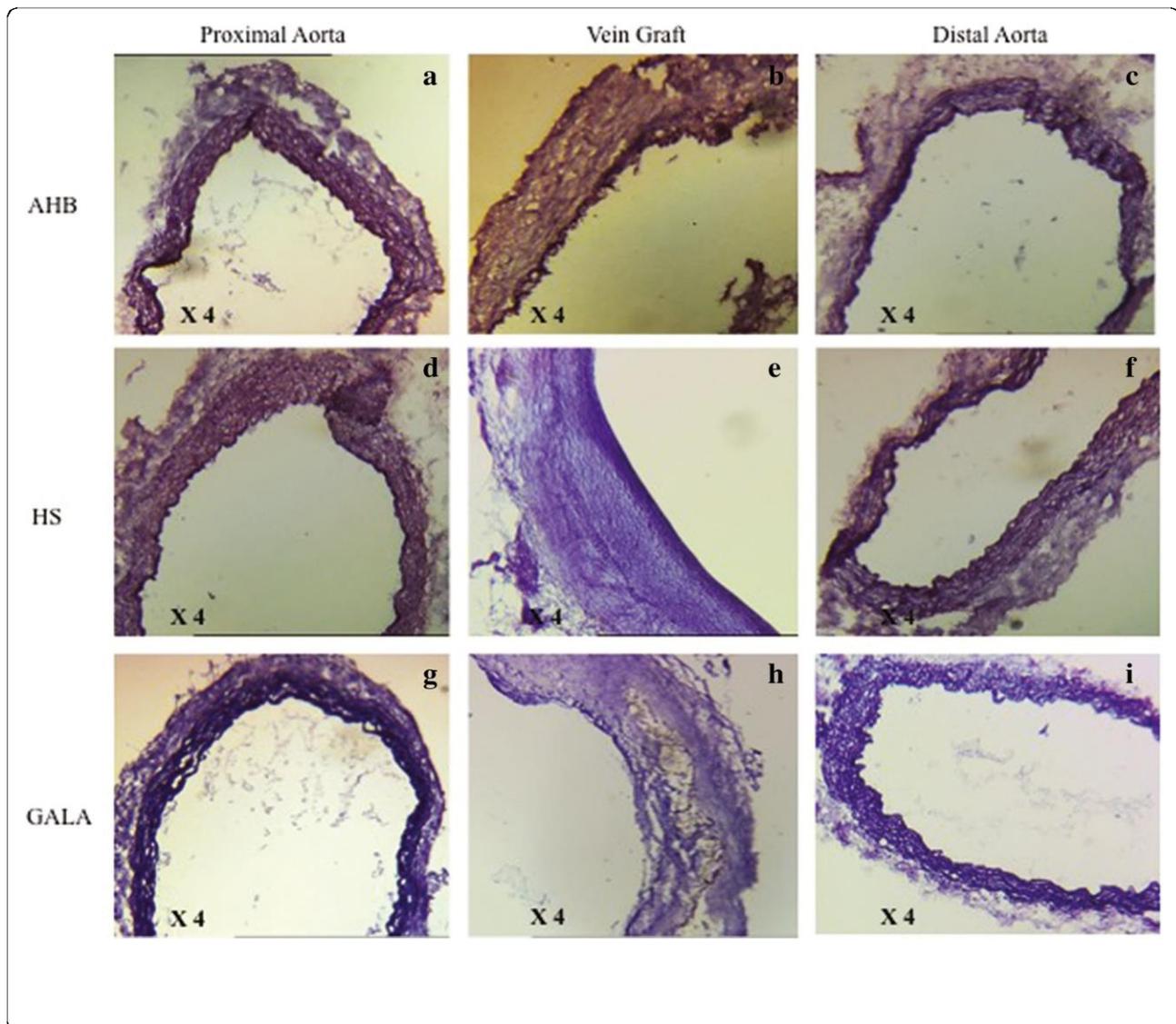
	Heparinized Saline solution HS ( $n = 9$ )	Autologous Heparinized Blood solution AHB ( $n=9$ )	GALA solution ( $n = 9$ )
Duration of venous storage (min)	91 $\pm$ 56	106 $\pm$ 57	88 $\pm$ 57
Duration of venous transplantation (min)	67 $\pm$ 11	63 $\pm$ 10	67 $\pm$ 11
Weight gain during follow-up (gr)	73 $\pm$ 24	79 $\pm$ 22	69 $\pm$ 21



whole blood, alternatives solutions such as storage solutions like Tiprotec™ or Somaluthion™ remain the subject of further clinical trial [25]. Other study showed that autologous whole blood had some clear advantages compared to saline solution, this difference does not persist post-arterialization [26]. In the present study, the duration of vein storage in the different solution was high as to allow preparation of the recipient rat following vein graft harvesting but no relation was found between storage duration and importance of IH. Thatte et al. showed that duration of storage time in GALA solution (from 60 min to 1440 min) did not alter smooth muscle or endothelial cell function [10]. None of the storage solutions used in this study has reduced the intimal hyperplasia. In fact, we observed a significant increase of the wall thickness and histological signs of fibrosis.

- Among the occluded veins, only an important IH could explain the vein graft occlusion. In order to obtain an arterialized vein graft, we analyzed the conduit at 6 weeks when the IH started its process. Similar results were observed in the study published by Wong et al. who performed arteriovenous fistula in a murine model and then collected for analysis at 7, 14 and 28 days post-operatively [27]. They found significant changes in the intima at 7 days, a significant hyperplasia was observed

at 14 days and the patency rates at 28 days were 50%. Sun et al. investigated the efficacy of oral administration of hydrogen-rich water (HW) for prevention of intimal hyperplasia concerning inferior vena cava placed as an interposition graft in the abdominal aorta. Six weeks after bypass procedure, all vein grafts presented SMC and collagen deposits, macrophage infiltration but significantly less in the rats that consumed HW [28]. In our study, the rate of occluded vein grafts among them was greater in the GALA group than AHB and saline solution groups. GALA solution is based on a physiological salt solution and contains glutathione and L-ascorbic acid, antioxidant and arginine, a substrate for NOS (Nitric Oxide Synthetase) in EC to protect the endothelium against ischemic injury during storage. The analysis of GALA effects on EC showed a protecting endothelial structure and function [10]. According to our results, we cannot conclude that GALA solution protects the endothelial layer when the vein graft was arterialized in this rat model. These results should be interpreted with caution if we extrapolated them in human. The occluded vein graft rate at 6 weeks is low after coronary bypass but probably storage solutions did not limit vascular remodeling during the chronic intimal hyperplasia (stage III), their benefits intervening during the first weeks.



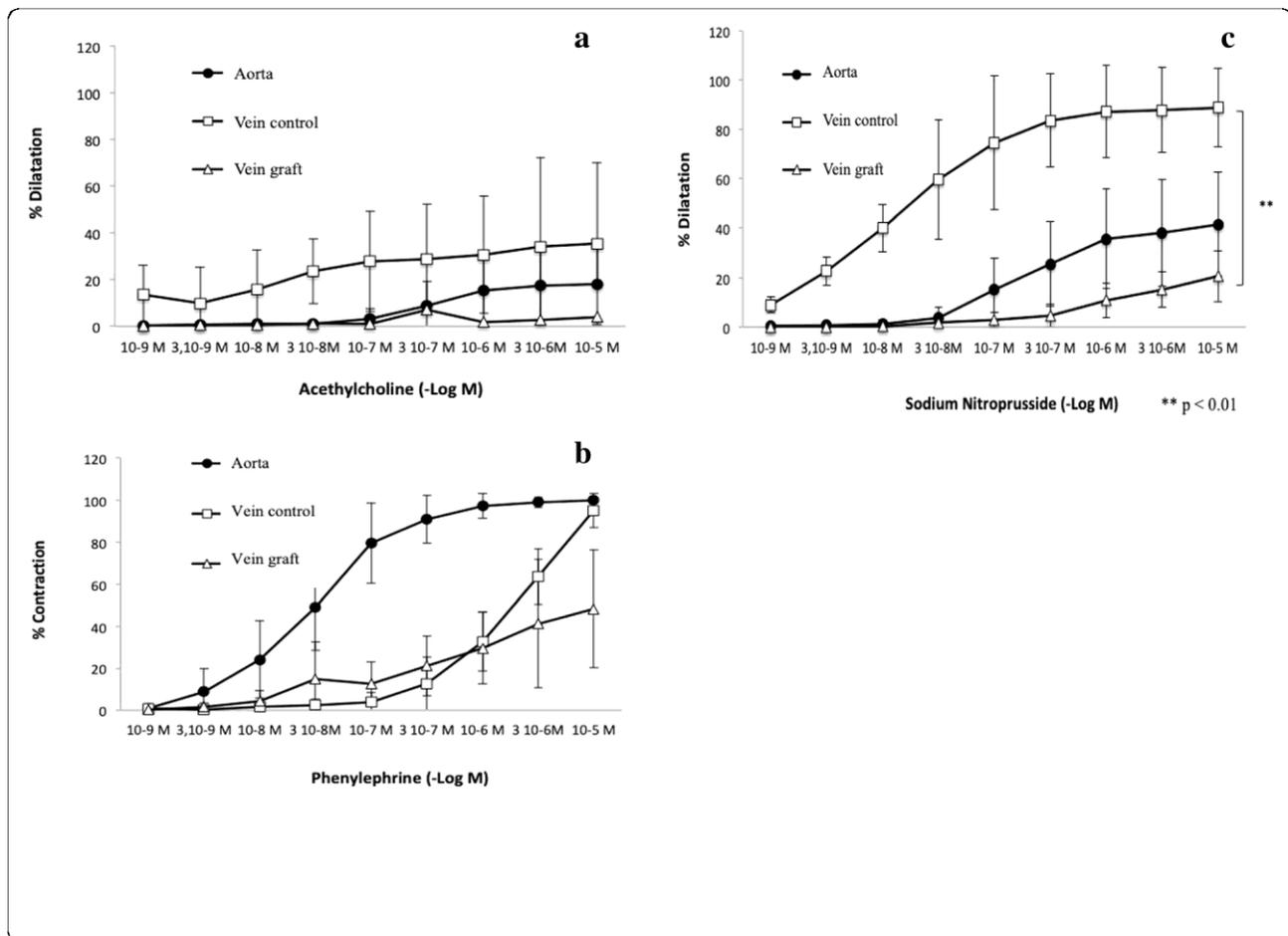
Haime M et al. compared the impact of intraoperative preservation of SVG in GALA solution (Duragraft®) versus heparinized saline on vein-graft failure related outcomes after CABG in 2436 consecutive patients. In this retrospective study, the intraoperative treatment of SVGs with Duragraft was associated with a lower risk of nonfatal myocardial infarction, revascularization [29]. However, these encouraging results must be interpreted with caution and only a well-constructed randomized study will answer the real question “which solution best preserves endothelial integrity from the vein harvesting to the arterial implantation” [17].

Many studies showed that intimal hyperplasia is an adaptive mechanism following arterialization of the vein and is unlikely linked to vein graft thrombosis [30]. Arterialization of a vein appears when the graft is exposed to arterial flow. Contractile SMC become

secretory and proliferative [16]. EC cannot produce NO and endothelial layer damage produces growth factors and proinflammatory cytokines (IL-6, IL-8) [31]. This process promotes leukocytes recruitment and thrombin formation [32].

- In the present study, regardless of the storage solution, no endothelium-dependent dilatation was observed when the vein grafts were mounted on a wire-myograph attesting to endothelial injury. The same findings were showed in the control vein and aorta groups. However, the SMC layer viability was observed in the control vein group, the preservation solutions maintained the SMC functionality from 88 to 106 min of storage.

The implication of the shear stress in vascular biology and inflammation was described by Touys et al. [33]. All vascular cell types produce reactive oxygen species (ROS) that regulate vascular function by modulating cell



growth, apoptosis, migration, inflammation and extracellular matrix protein production. Oxidative stress and associated oxidative damage are mediators of vascular injury and inflammation and constitute the first steps of atherosclerosis development [13]. In our study, we observed an important oxidative stress in the different vein graft segments analyzed. The inflammatory response into the vein wall due to shear stress was also observed in arterial samples explaining the vascular function damage. These results should be interpreted with caution because of the small number of permeable vessels at 6 weeks. In the presence of high levels of sodium nitroprusside, a dilatation was observed in the control vein group. Saad Enouri et al. studied characteristics of myogenic re-activity in isolated rat mesenteric veins. The integrity of the endothelium was assessed by a dilator response to acetylcholine in phenylephrine-precontracted veins. The veins were able to develop significant myogenic tone that appears greater over the low-to-intermediate pressure ranges, but mesenteric veins did not demonstrate myogenic responses unlike mesenteric arteries [34]. In our study, the control vein presented an endothelium-dependent relaxation injury with a

preservation of smooth muscle cell (SMC) activity (endothelium-independent relaxation) while the vein graft was no vascular reactivity because of endothelial injury but conserved a low relaxation mediated by SMC for high dose of sodium nitroprusside.

#### Focus of the model

Models of venous grafting in the arterial position have been used to improve the patency of grafts in humans [35, 36], which is especially relevant in CABG. Goldman et al. [37] reported saphenous vein graft patency of 60% or more at 10 years postoperatively in humans. Animal models are useful to analyze the pathology of vein graft disease and to test therapeutic strategies in vivo [38]. In large animals such as pigs and dogs, the model consists of an interposition of saphenous and jugular veins into common carotid artery. Wan et al. reported rate patency at 4 weeks [39] with saphenous vein-common carotid artery interposition model in large white swine. In rats, different models of inferior vena cava into abdominal aorta interposition have been described as superficial epigastric vein into femoral artery interposition or ileo-lumbar vein into the abdominal aorta interposition [28].

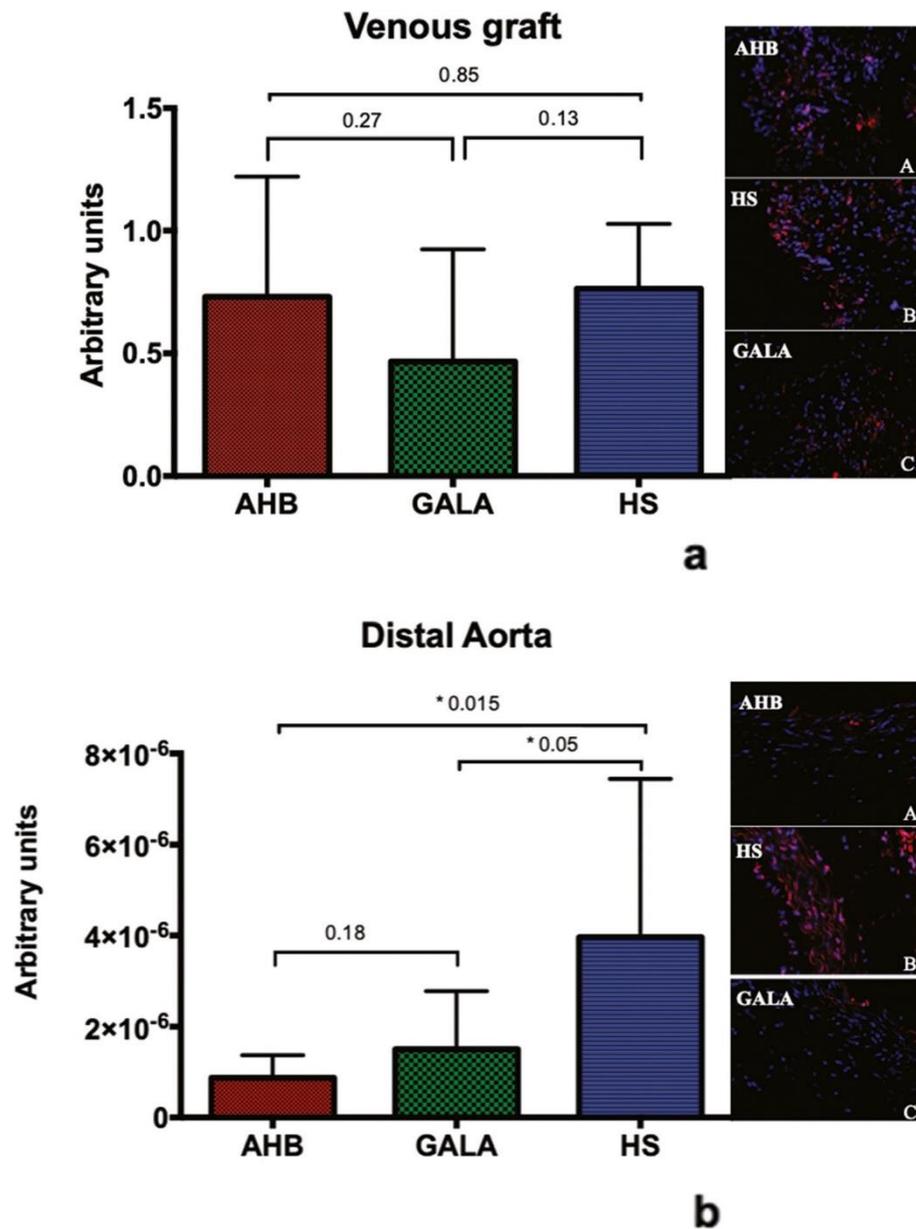


Fig. 6 Superoxide production in the different groups is shown in the bar graphs for venous grafts section (a) and for distal aorta sections (b). Fluorescent images of ethidium bromide (DHE) are colored in red and DAPI in blue

In the surgical model proposed by Sun et al., the vein graft was interposed into the recipient's abdominal aorta using microsurgical techniques in a latero-terminal configuration, and the aorta of the recipients was then ligated between the two anastomoses [28] while we developed an end-to-end anastomosis technique aligning vein and arterial endothelial cells in direction of arterial blood flow, therefore minimizing the effects of shear stress. Vein graft failure is characterized by an inflammatory response with leukocytes recruitment from circulating blood cells as we did not observe on the aorta

segments. Like saphenous vein graft during CABG, our vein graft was submitted to a systolic flow. The vena cava was harvested using state-of-the-art and optimal handling techniques (same surgeon, a traumatic surgical technique, avoiding excessive handling and distortion) in order to reduce traumatic damage to the endothelium layer, which is the first step of the graft failure. The main difficulty in vein graft transplantation was the vein wall's thickness. In fact, the texture of the vein issued from its storage solution makes the wall extremely fine.

### Limitations of the study

The high number of occluded vein grafts reduced the possibilities of analysis. Moreover, intermediate analysis of the vein grafts should have been performed in order to explain the mechanisms of vascular inflammation in relation of each group. Due to the small number of vein grafts sections we combined data from all storage solution groups in order to compare vascular reactivity to each solution.

### Conclusion

The composition of preservation solutions influences vein graft endothelial structural and functional integrity from early graft failure. However, the next crucial step will be conducted randomized clinical trial to compare storage solutions and long-term clinical outcomes because our experimental study show that some solutions do not protect the vein graft from intimal hyperplasia and thrombosis formation during the arterialization stage in this experimental study.

### Abbreviations

CABG: Coronary artery bypass grafting; CS: Cyclic strain; EC: Endothelial cells; ECM: Extracellular matrix; HW: Hydrogen-rich water; IH: Intimal hyperplasia; NOS: Nitric oxide synthetase; SMC: Smooth muscle cells; SS: Shear stress; SVG: Saphenous vein graft

### Acknowledgments

No

### Authors' contributions

OF, substantial contributions to the conception and design of the work, and draft the work; And JDB performed all surgical procedures and the acquisition, interpretation of data for the work; And PR, AB performed ROS detection practice; And SDV, FP, PB, ME, DH, CB, LL, revising it critically for important intellectual content. All authors read and approved the manuscript.

### Funding

This work was supported by a research grant from the French Society of Thoracic and Cardiovascular Surgery (SFCTCV: Société Française de Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire, Paris, France).

### Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during this study available from the corresponding author on reasonable request.

### Ethics approval

This study was conducted in accordance with the guidelines of the institutional animal care of the University of Angers, France. This study was conducted with approval from the "Ministère Français de l'enseignement Supérieur et de la Recherche" (authorization number December 2014: 000375.01).

### Consent for publication

Obtained from the participants.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Author details

<sup>1</sup>Department of Cardiac Surgery, University Hospital of Angers, France, 4 rue Larrey, 49933 CHU Angers Cedex 9, France. <sup>2</sup>Institute MITOVASC CNRSUMR 6015, INSERM 1083, Angers, France. <sup>3</sup>Department of Cardiac Surgery, CHU Dupuytren, Limoges, France. <sup>4</sup>University Hospital of Angers, Angers, France.

Received: 24 September 2019 Accepted: 30 January 2020

Published online: 10 February 2020

### References

1. Timmis A, Townsend N, Gale C, Grobbee R, Maniadakis N, Flather M, et al. European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistic 2017. *Eur Heart J*. 2018;39(7):508-79.
2. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *Eur Heart J*. 2018;35(37):2541-619.
3. Thatté H, Khuri S. The coronary artery bypass conduit: intraoperative endothelial injury and its implication on graft patency. *Ann Thorac Surg*. 2001;72:S2245-52.
4. Davies MG, Hagen PO. Pathophysiology of vein graft failure: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1995;9:7-18.
5. Gaudino M, Antoniadou C, Benedetto U, Deb S, Di Franco A, Di Giammarco G, et al. Mechanisms, consequences, and prevention of coronary graft failure. *Circulation*. 2017;136(18):1749-64.
6. Wise ES, Hocking KM, Eagle S, Absi T, Komalavilas P, Cheung-Flynn J, et al. Preservation solution impacts physiologic function and cellular viability of human saphenous vein graft. *Surgery*. 2015;158:537-46.
7. Tsakok M, Montgomery-Taylor S, Tsakok T. Storage of saphenous vein grafts prior to coronary artery bypass grafting: is autologous whole blood more effective than saline in preserving graft function? *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2012;15(4):720-5.
8. Wilbring M, Tugtekin SM, Zatschler B, Ebner A, Reichenspurner H, Matschke K, et al. Even short-time storage in physiological saline solution impairs endothelial vascular function of saphenous vein grafts. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2011;40(4):811-5.
9. Kay MD, Hosgood SA, Harper SJ, Bagul A, Waller HL, Nicholson ML. Normothermic versus hypothermic ex vivo flush using a novel phosphate-free preservation solution (AQLX) in porcine kidneys. *J Surg Res*. 2011;171:275-82.
10. Thatté HS, Biswas KS, Najjar SF, Birjiniuk V, Crittenden MD, Michel T, Khuri SF. Multi-photon microscopic evaluation of saphenous vein endothelium and its preservation with a new solution. *GALA Ann Thorac Surg*. 2003;75(4):1145-52 discussion 1152.
11. Harskamp RE, Alexander JH, Schulte PJ, Brophy CM, Mack MJ, Peterson ED, et al. Vein graft preservation solutions, patency, and outcomes after coronary artery bypass graft surgery: follow-up from the PREVENT IV randomized clinical trial. *JAMA Surg*. 2014;149(8):798-805.
12. Shigematsu K, Yasuhara H, Shigematsu H, Muto T. Direct and indirect effects of pulsatile shear stress on the smooth muscle cell. *Int Angiol*. 2000;19(1):39-46.
13. Ward AO, Caputo M, Angelini GD, George SJ, Zakkar M. Activation and inflammation of the venous endothelium in vein graft disease. *Atherosclerosis*. 2017;265:266-74.
14. Osgood MJ, Hocking KM, Voskresensky IV, Li FD, Komalavilas P, Cheung-Flynn J, Brophy CM. Surgical vein graft preparation promotes cellular dysfunction, oxidative stress, and intimal hyperplasia in human saphenous vein. *J Vasc Surg*. 60(2014):202-11.
15. Ben Ali W, Bouhout I, Perrault LP. The effect of storage solutions, gene therapy, and antiproliferative agents on endothelial function and saphenous vein graft patency. *J Card Surg*. 2018;33(5):235-42.
16. Cheng J, Du J. Mechanical stretch simulates proliferation of venous smooth muscle cells through activation of the insulin-like growth factor-1 receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(8):1744-51.
17. Woodward LC, Antoniadou C, Taggart DP. Intraoperative vein graft preservation: what is the solution? *Ann Thorac Surg*. 2016;102(5):1736-46.
18. Henrion D, Laher I, Bevan BA. Intraluminal flow increases vascular tone and  $45 \text{ Ca}^{2+}$  in flux in the rabbit fascial vein. *Circ Res*. 1992;71(2):339-45.
19. Vessières E, Belin de Chantemèle EJ, Guihot AL, Jardel A, Toutain B, Loufrani L, Henrion D. Cyclooxygenase-2-derived prostanoids reduce inward arterial remodeling induced by blood flow reduction in old obese Zucker rat mesenteric arteries. *Vasc Pharmacol*. 2013;58(5-6):356-62.
20. Bouvet C, de Chantemèle EB, Guihot AL, Vessières E, Bocquet A, Dumont O. Flow-induced remodeling in resistance arteries from obese Zucker rats is associated with endothelial dysfunction. *Hypertension*. 2007;50:248-54.
21. Pinaud F, Loufrani L, Toutain B, Lambert D, Vandekerckhove L, Henrion D, et al. In vitro protection of vascular function from oxidative stress and inflammation by pulsatility in resistance arteries. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2011;142(5):1254-62.
22. Schachner T. Pharmacologic inhibition of vein graft neointimal hyperplasia. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006;131:1065-72.

23. Samano N, Geijer H, Liden M, Fremes S, Bodin L, Souza D. The no-touch saphenous vein for coronary artery bypass grafting maintains a patency, after 16 years, comparable to the left internal artery: a randomized trial. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2015;150(4):880–8.
24. O'Connell TX, Sanchez M, Mowbray JF, Fonkalsrud EW. Effects on arterial intima of saline infusions. *J Surg Res.* 1974;16:197–203.
25. Winkler B, Reineke D, Heinisch PP, Schönhoff F, Huber C, Kadner A, et al. Graft preservation solutions in cardiovascular surgery. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2016;23(2):300–9.
26. Bush HL, Jakubowski JA, Curl GR, Deykin D, Nabseth DC. The natural history of endothelial structure and function in arterialized vein grafts. *J Vasc Surg.* 1986;3:204–15.
27. Wong CY, de Vries MR, Wang Y, van der Vorst JR, Vahrmeijer AL, Zonneveld AJ, et al. Vascular remodeling and intimal hyperplasia in a novel murine model of arteriovenous fistula failure. *J Vasc Surg.* 2014;59(1):192–201.
28. Sun Q, Kawamura T, Masutani K, Peng X, Sun Q, Stolz DB, et al. Oral intake of hydrogen-rich water inhibits intimal hyperplasia in arterialized vein grafts in rats. *Cardiovasc Res.* 2012;94:144–53.
29. Haime H, McLean RR, Kurgansky KE, Emmert MY, Kosik N, Nelson C, et al. Relationship between intra-operative vein graft treatment with Duragraft<sup>®</sup> or saline and clinical outcomes after coronary artery bypass grafting. *Expert rev Cardiovasc Ther.* 2018;16(12):963-70.
30. Yahagi K, Kolodgie FD, Otsuka F, Finn AV, Davis HR, Joner M, et al. Pathophysiology of native coronary, vein graft, and in-stent atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2015;13:79.
31. Lee MS, David EM, Makkar RR, Wilentz JR. Molecular and cellular basis of restenosis after percutaneous coronary intervention: the intertwining roles of platelets, leukocytes, and the coagulation-fibrinolysis system. *J Pathol.* 2004; 2003(4):861–70. Review.
32. Zhang L, Peppel K, Brian L, Chien L, Freedman NJ. Vein graft neointimal hyperplasia is exacerbated by tumor necrosis factor receptor-1 signaling in graft-intrinsic cells. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(10):1120-2.
33. Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol.* 2004;122(4):339–52.
34. Enouri S, Monteith G, Johnson R. Characteristics of myogenic reactivity in isolated rat mesenteric veins. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011; 300(2):R470-8.
35. Thomas A. Animal models for studying vein graft failure and therapeutic interventions. *Curr Opin Pharmacol.* 2012;12:121-6.
36. Shukla N, Jeremy JY. Pathophysiology of saphenous vein graft failure: a brief overview of interventions. *Curr Opin Pharmacol.* 2012;12:114-20.
37. Goldman S, Zadina K, Moritz T. Long term patency of saphenous vein and left internal mammary artery grafts after coronary artery bypass surgery: results from a Department of Veterans Affairs Cooperative Study. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:2149-56.
38. Schachner T, Laufer G, Bonatti J. In vivo (animal) models of vein graft disease. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006;30:451-63.
39. Wan S, Yim AP, Johnson JL, Shukla N, Angelini GD, Smith FC, et al. The endothelin 1A receptor antagonist BSF 302146 is a potent inhibitor of neointimal and medial thickening in porcine saphenous vein-carotid artery interposition grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;127:1317–22.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)



## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Titre : Place de la dynamique mitochondriale dans l'hypertension artérielle et l'anévrisme aortique**

**Mots clés :** Dynamique mitochondriale, hypertension artérielle, anévrisme aortique

**Résumé :** De nos jours, les pathologies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde. Aujourd'hui, leurs conséquences sur l'Homme sont bien décrites. En revanche, il est souvent difficile de connaître avec précision les mécanismes à l'origine de certaines de ces pathologies. La place de la mitochondrie dans celles-ci a largement été étudiée. Des dysfonctions de la dynamique mitochondriale ont notamment été mises en évidence dans des pathologies cardiaques. En revanche, sa place dans les pathologies vasculaires reste encore inconnue.

C'est pourquoi notre premier objectif a consisté à comprendre la place de la dynamique mitochondriale dans l'un des principaux facteurs de risque des pathologies cardiovasculaires, l'hypertension artérielle. Cette première étude a mis en évidence une aggravation de l'hypertension artérielle dans un modèle murin hétérozygote

pour la protéine de fusion mitochondriale OPA1 (*Opa1<sup>+/-</sup>*), soumis à un traitement au L-NAME.

Notre deuxième objectif a consisté à étudier la place de la dynamique mitochondriale dans l'une des pathologies vasculaires les plus mortelles, l'anévrisme de l'aorte. Dans un premier temps, nous avons mis en évidence un remodelage anévrisimal des aortes provenant de souris *Opa1<sup>+/-</sup>* soumises à un traitement hypertenseur à l'angiotensine II. En parallèle, nous avons observé une modification d'expression des gènes codants pour les protéines de la dynamique mitochondriale dans un modèle reconnu d'anévrisme (*Ldlr<sup>-/-</sup>*, HFD, AngII).

Pour conclure, ce travail a montré pour la première fois, le rôle protecteur d'OPA1 dans l'hypertension artérielle et la dérégulation de la dynamique mitochondriale dans l'anévrisme aortique.

**Title: Role of the mitochondrial dynamics in arterial hypertension and aortic aneurysm**

**Keywords:** Mitochondrial dynamics, arterial hypertension, aortic aneurysm

**Abstract:** Nowadays, cardiovascular diseases are the leading cause of death in the world. Their consequences on human body are well known. However, mechanisms involved in these pathologies are not totally established. Mitochondria has been widely studied in these pathologies. Mitochondrial dynamics' dysfunctions have been widely established on cardiac pathologies but not on vascular pathologies. Thus, in this work, we investigated the role of mitochondrial dynamics in arterial hypertension and aortic aneurysm.

First, we investigated impacts of OPA1 mutation on arterial hypertension. By using an *Opa1<sup>+/-</sup>* heterozygote mouse model, we demonstrated the protective role of OPA1 in arterial hypertension.

Indeed, *Opa1<sup>+/-</sup>* mice treated with L-NAME developed hypertension more severe than control mice.

The second study aimed to investigate mitochondrial dynamics' modulation in aortic aneurysm. First, we show aortic aneurysm remodelling in *Opa1<sup>+/-</sup>* mice treated with angiotensin II. Then, we demonstrated a modification of mitochondrial dynamics' gene expression in our aneurysm model (*Ldlr<sup>-/-</sup>*, HFD, AngII).

To conclude, this work demonstrated, for the first time, a protective role of OPA1 in arterial hypertension and a deregulation of mitochondrial dynamics in aortic aneurysm.

