



Rôle du TGF β dans un modèle d'anévrisme de l'aorte abdominale chez la souris

Hafid Ait-Oufella, Yu Wang, Olivier Herbin, Alain Tedgui, Ziad Mallat

Centre de recherche cardiovasculaire de Paris, Inserm U970, hôpital européen Georges Pompidou, 56, rue Leblanc, 75015 Paris, France
ziad.mallat@inserm.fr

> Les maladies anévrismales aortiques sont caractérisées par une faiblesse de la paroi aortique qui induit une dilatation progressive de l'aorte pouvant conduire à une rupture aortique. Le diagnostic clinique est difficile, leur découverte est souvent fortuite ou faite lors de complications potentiellement mortelles comme la rupture d'anévrisme [1]. Les anévrismes représentent la troisième cause de décès d'origine cardiovasculaire et leur incidence augmente. Il est donc important d'en comprendre les mécanismes physiopathologiques afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. De façon schématique, les anévrismes syndromiques, qui correspondent aux formes familiales rencontrées dans le syndrome de Marfan¹ ou le syndrome de Loeys-Dietz² [2] se distinguent des formes non syndromiques, beaucoup plus fréquentes et qui compliquent les lésions athéromateuses. Plusieurs travaux menés chez l'animal et chez l'homme suggèrent que le TGF β (*transforming growth factor β*) participe au développement de l'anévrisme [3, 4]. Ces données proviennent essentiellement d'études menées chez les patients atteints du syndrome de Marfan dont la physio-

pathologie est probablement différente de celle de l'anévrisme aortique athéromateux. Ces résultats sont en contradiction avec le fait que le TGF β est un médiateur qui favorise la survie des cellules vasculaires comme les cellules musculaires lisses, induit la synthèse de collagène, inhibe la dégradation de la matrice extracellulaire et possède également des propriétés anti-inflammatoires puissantes [5]. Nous avons étudié le rôle du TGF β dans un nouveau modèle murin d'anévrisme de l'aorte abdominale dont les caractéristiques physiopathologiques sont très proches de celles de l'anévrisme de l'aorte abdominale athéromateuse humaine.

Le modèle d'anévrisme de l'aorte abdominale

L'infusion continue d'angiotensine II chez la souris (fond génétique C57BL/6) induit une hypertension artérielle et s'accompagne d'une dilatation modérée de l'aorte abdominale sans rupture dans 10 à 20 % des cas. Nous avons montré que l'injection répétée d'anticorps bloquants anti-TGF β chez des souris traitées par angiotensine II induisait des anévrismes de l'aorte abdominale chez 100 % des animaux avec des complications mortelles chez 70 % d'entre eux [6]. Les complications visualisées à l'échographie et confirmées par l'examen histologique *post-mortem* comportent des dissections³ avec ou sans faux chenal

et des ruptures rétro-péritonéales. Nous avons confirmé que l'anticorps inhibiteur provoquait une forte diminution de l'activité TGF β dans le plasma des souris traitées ainsi qu'une diminution importante de la phosphorylation de Smad2⁴ dans la paroi aortique.

L'analyse histologique des coupes aortiques montrait une mort des cellules musculaires lisses de la paroi, une dégradation de l'élastine, un amincissement des parois et un infiltrat inflammatoire (*Figure 1*). L'infiltration des cellules inflammatoires débute dès le troisième jour avec une accumulation de macrophages dans la média et l'adventice suivie d'un afflux de lymphocytes T CD3⁺.

Rôle de l'immunité adaptative

L'analyse histologique suggère un rôle des lymphocytes T dans la physiopathologie de l'anévrisme de l'aorte abdominale. Le blocage pharmacologique (par des anticorps anti-interféron [IFN]- γ) ou génétique (souris *Il-4*^{-/-}, invalidées pour l'expression du gène codant l'interleukine 4 [IL-4]) de l'activation des lymphocytes T *helper* ne modifie ni l'incidence ni la gravité des anévrismes de l'aorte abdominale, suggérant que ni les voies d'activation des lymphocytes Th1 ni celles des Th2 ne sont indispensables à la formation de l'anévrisme dans notre modèle murin. En revanche, il existe une diminution modérée mais significative de la mortalité par rupture anévrismale chez les souris *Rag*^{-/-} (souris déficientes

¹ Syndrome de Marfan : maladie génétique à transmission autosomique dominante due à une altération du tissu conjonctif. Les mutations jusqu'à présent identifiées sont dans les gènes *FBN1* codant pour la fibrilline 1, ou *TGFBR2* codant pour le récepteur de type II du TGF β (15 % des cas). Du fait de la fragilité de la paroi aortique, la dilatation aortique est plus rapide que la normale chez les patients (information Orphanet).

² Le syndrome de Loeys-Dietz, récemment décrit, associe des anévrismes aortiques, un hypertélorisme (élargissement de la distance interpupillaire), une fente palatine ou une lèvre bifide et une tortuosité artérielle généralisée. L'affection est de transmission autosomique dominante avec une expressivité variable et des mutations des gènes *TGFBR1* et *TGFBR2* (information Orphanet).

³ La dissection est une déchirure de la paroi artérielle avec une porte d'entrée par laquelle le sang sous pression s'engouffre et participe au décollement des feuillets de la paroi ; ceci peut aboutir à la formation d'une poche de sang circulant dans la paroi même de l'artère, appelée faux chenal et séparée donc du vrai chenal (ou lumière du vaisseau) par le bout de paroi décollée (appelée *flap*).

⁴ Smad2 est un médiateur de la signalisation intracellulaire dépendante du TGF β .

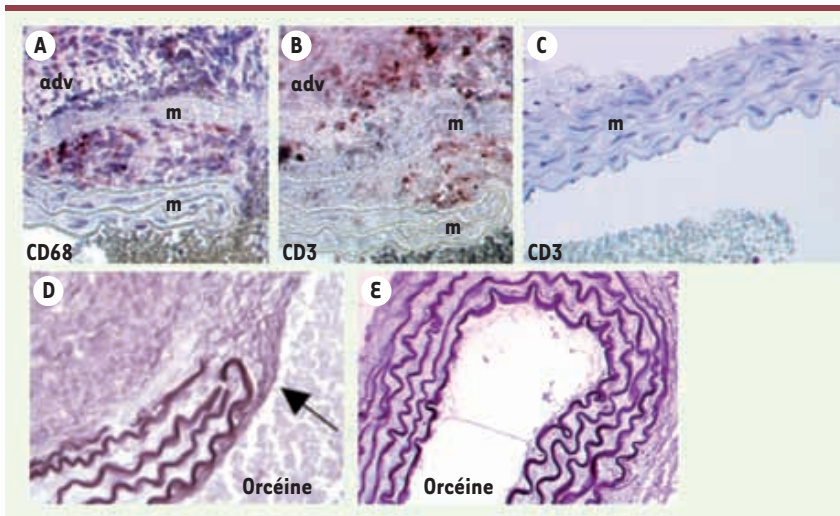


Figure 1. Coupes d'aorte abdominale de souris C57BL/6. Les souris ont reçu une infusion continue sous-cutanée d'angiotensine II avec (A, B, D) ou sans (C, E) administration d'un anticorps neutralisant anti-TGF β : infiltration de macrophages (A, CD68⁺, colorés en violet foncé) et de lymphocytes T (B, CD3⁺, colorés en violet foncé) au niveau de l'adventice (adv) et de la média (m) de la paroi anévrismale. Les couches de la média sont disséquées, séparées les unes des autres et massivement infiltrées de cellules inflammatoires dans le cas de sections provenant de souris ayant reçu l'anti-TGF β (A, B) par comparaison à l'intégrité de la média chez les souris n'ayant pas reçu l'anticorps (C). Destruction et interrup-

tion complète des couches d'élastine marquée à l'orcéine chez les souris ayant reçu l'anti-TGF β (D) par comparaison aux souris n'ayant pas reçu l'anticorps (E) (adapté de Wang *et al.* [6]).

en lymphocytes T et B du fait de l'inactivation du gène *Rag* [*recombination activating gene*]), ce qui suggère le rôle dans la physiopathologie de la maladie de populations lymphocytaires autres que Th1/Th2, comme les lymphocytes B, les lymphocytes Th17 et/ou les Tr régulateurs.

Rôle de l'immunité innée

Pour explorer le rôle des monocytes/macrophages dans la formation des anévrismes, nous avons induit une déplétion des monocytes circulants par des injections répétées de clodronate encapsulé dans des liposomes, un biphosphonate qui induit l'apoptose des monocytes/macrophages. La déplétion monocyttaire s'accompagne d'une réduction de 90 % du taux de mortalité par rupture anévrismale. Chez les souris survivantes 20 jours après le début des injections d'anticorps anti-TGF β , la déplétion monocyttaire induit également une diminution de la sévérité de la maladie. Parallèlement, nous avons mis en évidence une diminution significative de la maladie chez les souris déficientes en CX3CR1 (*CX3C motif chemokine receptor 1*) et/ou CCR2 (*C-C motif chemokine receptor 2*), des récepteurs de chimiokines importants pour le recrutement des

monocytes/macrophages. L'ensemble de ces données *in vivo* conforte l'idée que les monocytes/macrophages jouent un rôle central dans la physiopathologie de l'anévrisme de l'aorte abdominale.

Rôle des métalloprotéases matricielles

Les macrophages produisent de nombreux médiateurs qui peuvent participer à la formation de l'anévrisme de l'aorte abdominale. Dans un premier temps, nous avons examiné le rôle des cytokines. Ni l'injection répétée d'anticorps inhibiteurs anti-TNF α (*tumor necrosis factor*) ni la déficience génétique en IL-6 n'altèrent l'incidence des anévrismes rompus, suggérant qu'aucune de ces deux cytokines ne joue un rôle majeur dans la physiopathologie de l'anévrisme de l'aorte abdominale. Nous avons ensuite examiné l'implication des métalloprotéinases (MMP) dans la dégradation de la matrice induite par le traitement anti-TGF β . L'activité métalloprotéasique d'origine macrophagique, de type MMP-9 et MMP-12, est effectivement augmentée chez les souris traitées par l'anti-TGF β . Surtout, les souris déficientes en MMP-12 sont protégées de la rupture aortique, ce qui souligne le rôle majeur de cette métalloélastase dans les complications de la maladie anévrismale.

Discussion : pertinence

du modèle murin en clinique humaine

Nous avons développé un modèle d'anévrisme de l'aorte abdominale chez la souris en associant une infusion continue d'angiotensine II à des injections répétées d'anticorps neutralisants anti-TGF β . Nous avons montré que le TGF β était important pour la survie des cellules musculaires lisses vasculaires et l'intégrité matricielle de la paroi aortique. Le TGF β diminue l'infiltration inflammatoire lymphocytaire et monocyttaire. Il apparaît que les monocytes/macrophages ont un rôle majeur dans la physiopathologie de la maladie aortique probablement *via* la production de métalloprotéinases, essentiellement la MMP-12. Les propriétés protectrices du TGF β ne sont pas limitées à ce modèle puisque la neutralisation du TGF β chez la souris hypercholestérolémique (modèle des souris *apoE*^{-/-}, déficientes en apolipoprotéine E) aggrave considérablement la maladie anévrismale aortique avec des ruptures fréquentes et précoces. Quelle est la pertinence clinique de ces données nouvelles et peuvent-elles être transposées à la maladie humaine ? Tout d'abord, notre modèle possède de nombreuses similitudes phénotypiques avec la maladie aortique athéromateuse



caractérisée par une localisation préférentiellement abdominale et des complications à type de dissection, faux chenal et rupture. Sur le plan histologique, on retrouve également une infiltration inflammatoire, une apoptose des cellules vasculaires et une dégradation de la matrice extracellulaire [7]. Plusieurs études épidémiologiques ont mis en évidence un lien entre le polymorphisme du gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE DD)⁵ et l'existence d'anévrismes de l'aorte abdominale. Enfin, une étude récente a montré que l'association des polymorphismes ACE DD avec des polymorphismes du gène codant pour le récepteur du TGFβ (TGBR1, 6A) augmentait la prédisposition au développement d'anévrismes de l'aorte abdominale [8]. Nos résultats semblent donc pertinents en ce

⁵ L'ACE catalyse la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II, et ce polymorphisme est un facteur important dans la détermination de la concentration de l'ACE sérique : les taux d'ACE des individus de génotype DD sont le double de ceux des individus du génotype II.

qui concerne la pathologie anévrismale associée à l'athérosclérose, la forme la plus fréquente. En revanche, il n'est pas certain qu'ils puissent s'appliquer aux formes syndromiques d'anévrismes comme le syndrome de Marfan dont la physiopathologie est très différente.

Conclusion

Nous avons développé un modèle murin d'anévrisme qui possède de nombreuses similitudes avec la pathologie anévrismale humaine associée à l'athérosclérose. Nous avons démontré dans ce modèle le rôle protecteur du TGFβ vis-à-vis du développement d'anévrismes et de leurs complications, et l'implication des monocytes/macrophages dans la maladie, via la production de métalloprotéinases, en particulier la MMP-12. Des travaux complémentaires sont nécessaires afin de préciser le rôle d'autres populations comme les mastocytes ou les lymphocytes B. ♦

Role of TGFβ in a model of abdominal aortic aneurysm in mice

CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Ernst CB. Abdominal aortic aneurysm. *N Engl J Med* 1993; 328 : 1167-72.
2. Loeys BL, Schwarze U, Holm T, et al. Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor. *N Engl J Med* 2006; 355 : 788-98.
3. Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking DE, et al. Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet* 2003; 33 : 407-11.
4. Nataatmadja M, West J, West M. Overexpression of transforming growth factor-beta is associated with increased hyaluronan content and impairment of repair in Marfan syndrome aortic aneurysm. *Circulation* 2006; 114 : 1371-7.
5. Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol* 2002; 2 : 46-53.
6. Wang Y, Ait-Oufella H, Herbin O, et al. TGF-beta activity protects against inflammatory aortic aneurysm progression and complications in angiotensin II-infused mice. *J Clin Invest* 2010; 120 : 422-32.
7. Koch AE, Haines GK, Rizzo RJ, et al. Human abdominal aortic aneurysms. Immunophenotypic analysis suggesting an immune-mediated response. *Am J Pathol* 1990; 137 : 1199-213.
8. Lucarini L, Sticchi E, Sofi F, et al. ACE and TGFBR1 genes interact in influencing the susceptibility to abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis* 2009; 202 : 205-10.

NOUVELLE

Identification d'une nouvelle population de cellules souches musculaires

Alice Pannérec, David Sassoon

Groupe myologie, UMR S 787 Inserm, Université Pierre et Marie Curie Paris VI, 105, boulevard de l'Hôpital, 75634 Paris Cedex 13, France. alice.pannerec@gmail.com david.a.sassoon@gmail.com

> Chez l'adulte, le muscle strié squelettique est composé de fibres musculaires. Ces fibres ne sont pas capables de proliférer, mais le muscle peut être régénéré grâce aux cellules souches. Les cellules satellites sont définies comme étant les cellules souches du muscle adulte puisqu'elles sont capables d'une part de se différencier en fibres musculaires permettant la régénération du muscle, et d'autre part de s'autorenouveler pour reconstituer leur niche. Les cellules satellites sont localisées entre la lame basale et la membrane plasmique des fibres, et

expriment des gènes spécifiques tels que celui codant pour le facteur de transcription Pax7 ou celui codant pour la M-cadhérine [1, 2]. Lorsque le muscle subit des lésions (blessure, exercice physique ou vieillissement), les cellules souches sont activées, prolifèrent et se différencient pour former de nouvelles fibres. Chez les patients atteints de myopathies, ce processus de réparation est très affecté et l'on observe une atrophie musculaire qui est due à l'incapacité des cellules souches à régénérer correctement le muscle. Dans les années 1990, la greffe

des cellules souches fonctionnelles, en l'occurrence des cellules satellites, était envisagée pour la régénération musculaire. Des essais thérapeutiques ont été réalisés, mais les résultats n'étaient pas satisfaisants puisque la majeure partie des cellules greffées mouraient et que les autres restaient près du site d'injection [3]. Depuis, d'autres populations cellulaires douées de potentiel myogénique ont été découvertes : certaines cellules hématopoïétiques, des cellules dérivées des vaisseaux sanguins (les mésoangioblastes) ou des populations