

UNIVERSITE SORBONNE PARIS CITE

Université Paris 13

ECOLE DOCTORALE

Médicament, Toxicologie, Chimie, Imageries (MTCI)

Doctorat

Discipline : MEDECINE - Génie des procédés, matériaux

Aymeric ROUCHAUD

**Optimisation Biologique du Traitement
Endovasculaire des Anévrismes Intracrâniens**

Thèse dirigée par le Professeur Laurent SPELLE

Soutenue le 31 Mars 2017

JURY

Professeur Jean-Luc DUMAS

Professeur Vincent COSTALAT

Professeur Laurent PIEROT

Professeur Christophe COGNARD

Professeur Emmanuel HOUDART

Professeur Charbel MOUNAYER

Docteur Graciela PAVON-DJAVID

Professeur Laurent SPELLE

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je remercie sincèrement notre Président de jury, le **Professeur Jean-Luc DUMAS** pour l'honneur que vous nous faites de présider ce jury de thèse. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de ma profonde gratitude.

Je remercie le **Professeur Laurent SPELLE** d'avoir accepté de diriger cette thèse. Merci infiniment pour votre confiance, votre soutien sans faille et la liberté que vous m'avez accordés pour mener ce travail à bout. Travailler à vos cotés est un immense plaisir au quotidien ! Merci pour votre sincérité, votre disponibilité en cas de difficulté, pour votre bienveillance et l'attention que vous nous accordez chaque jour, tant sur le plan professionnel que personnel. Merci pour les moments où vous me guidez en salle ; à ces instants j'ai l'impression que mes mains sont téléguidées par vous et je pourrais faire tout et n'importe quoi en toute confiance ! Même si l'avenir m'appelle à quitter bientôt le service, j'espère que nous aurons la possibilité de continuer à travailler ensemble sur de nombreux projets. Je repars avec vos *playlists* et bien plus encore ! Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance pour tout ce vous m'apportez et de mon profond respect.

Je remercie le **Professeur Vincent COSTALAT**, qui a accepté d'être rapporteur de cette thèse. Merci pour tes encouragements, ton énergie et ton optimisme que tu insuffles dans notre spécialité. J'espère que nous pourrions bientôt collaborer autour de futurs projets de recherche.

Je remercie le **Professeur Laurent PIEROT**, qui a accepté d'être rapporteur de cette thèse. Je vous remercie pour le temps que vous m'avez consacré, votre jugement et pour vos commentaires constructifs vis-à-vis de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma considération.

Je remercie le **Professeur Christophe COGNARD** d'avoir accepté de juger ce travail. Merci pour votre disponibilité et votre présence qui m'honorent.

Merci au **Professeur Emmanuel HOUDART** d'avoir accepté de juger ce travail. C'est un grand honneur d'avoir travaillé à vos cotés. Merci de m'avoir inculqué une approche

complémentaire de la neuroradiologie interventionnelle que je connaissais. Merci votre pour votre sens critique et votre rigueur au quotidien. Grâce à vous, je mesure la chance que j'ai d'avoir pu me former dans différentes Ecoles.

Merci au **Docteur Graciela PAVON-DJAVID** qui a accepté de juger ce travail. Son expertise pour la coupe des stents en résine nous a permis d'avoir des images encore meilleure qu'à la Mayo ! Merci pour ta patience et le temps que tu m'as accordé. Merci d'avoir partagé avec nous tes connaissances et de nous les avoir transmises.

Je remercie le **Professeur Charbel MOUNAYER** de me faire l'honneur de juger ce travail. Merci pour votre énergie débordante et votre calme légendaire! Avoir la chance de travailler avec vous est un immense privilège. Merci pour la confiance que vous m'accordez ; J'espère être à la hauteur des espoirs que vous avez placés en moi pour les années à venir. Veuillez trouver ici la promesse de ma fidélité et de beaux projets à réaliser ensemble.

Je remercie infiniment le **Docteur Jean-Baptiste MICHEL**, avec qui j'ai eu le plaisir de réaliser ce travail. Je te remercie pour ta disponibilité, le temps et l'énergie que tu m'accordes, tes conseils et tes remarques constructives. Sans toi, ce travail n'aurait pas la même saveur. Merci de croire en moi en tant que chercheur et pas seulement en tant que "monteur de nouilles" ! J'espère ne pas te décevoir ! Travailler avec toi est un honneur et un plaisir sans cesse renouvelé. Les liens que nous avons tissés sont désormais insolubles et je suis certain qu'il nous reste encore de nombreux projets à concrétiser. Trouve ici l'expression de mon immense reconnaissance et bien plus encore.

Je remercie le **Professeur Jacques MORET** pour tout ce qu'il nous apprend au quotidien. C'est un immense honneur pour moi de travailler dans votre équipe et de faire partie de cette Ecole prestigieuse que vous faites rayonner! Merci pour votre accessibilité, vos enseignements et vos conseils. Vous êtes pour nous un exemple. À vos cotés même les cas impossibles semblent simples! Lorsqu'on a une théorie, il faut l'appliquer jusqu'au bout ! Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

Un immense Merci au **Professeur Mikael MAZIGHI**. Merci de m'avoir pris par la main pour traverser Bichat et me faire découvrir le labo ! C'est grâce à toi que je me suis lancé dans la recherche et je ne saurai jamais assez t'en remercier. Merci pour tous tes

conseils amicaux et ton soutien dans cette belle aventure. Même si les chemins nous ont séparés, je suis certain que nous serons amenés à travailler de nouveau ensemble, pour mon plus grand plaisir ! Avec toute mon Amitié, MERCI !

Merci au **Professeur René CHAPOT** qui m'a donné l'envie d'exercer ce métier alors que je n'étais qu'au lycée ! Je vous revois encore passer par la jambe pour aller dans le cerveau et me dire : "C'est ça que je veux faire !". Quinze ans plus tard j'y suis enfin arrivé ! Merci pour la passion et l'énergie que vous mettez dans notre métier et qui suscitent toute mon admiration et mon respect.

Merci à **l'ensemble de l'équipe de l'unité INSERM U1148 de Bichat** pour leur aide précieuse et leur grande disponibilité. Merci particulièrement à **Liliane LOUEDEC**, sans qui il n'aurait jamais été possible de réintégrer les lapins dans le labo. Merci pour ton dévouement au quotidien. Merci aussi au **Docteur Giuseppina CALIGIURI** pour sa motivation inépuisable et son énergie débordante pour l'optimisation des *flow-diverters* ; j'espère que nous pourrons continuer encore longtemps à travailler ensemble. Merci également à **Christine CHOQUEUX** et à **Guillaume EVEN** pour leur implication et leur disponibilité pour l'inclusion et l'analyse des prélèvements. Merci à **Charlotte RASSER**, la Reine des moules ! Bon courage pour la fin de la thèse ! Merci aussi à **Clément JOURNE** qui a été un des initiateurs du projet de thérapie cellulaire dans les anévrysmes intracrâniens. Un grand Merci au **Docteur Didier LETOURNEUR**, directeur de l'Unité, pour la confiance et l'autonomie qu'il nous a accordées depuis plusieurs années. Merci enfin au **Docteur Sandrine DELBOSC** et au **Professeur Antonino NICOLETTI** pour leur bonne humeur et toutes les discussions que nous avons ensemble.

Merci au **Docteur Jildaz CAROFF** pour nos moments passés au KB et surtout dans la cave de l'Unité à travailler avec nos lapins ! Je suis certain que nous réussirons bientôt à mettre au point ensemble le "stent magique" qui nous permettra de traiter tous les anévrysmes ! Je te souhaite un séjour enrichissant aux US et d'assurer brillamment la relève !

Un grand merci au **Docteur Jean-Philippe DESILLES** sans qui les années passées à Bichat n'auraient pas été les mêmes ! Merci pour toutes nos discussions de tout ordre ! Tu as une énergie débordante que tu sais brillamment mettre à profit pour concrétiser de beaux projets. La neuroradiologie interventionnelle a de la chance de pouvoir accueillir dans ses

rangs un “neuneu“ de si grande qualité ! J’espère que nous pourrons accomplir les nombreux projets que nous avons. Merci pour ta spontanéité et ton amitié sans faille ! Je te souhaite sincèrement tout le succès que tu mérites.

I would like to thank **all the awesome people I met and worked with at Mayo Clinic**, Rochester, Minnesota. Particularly, I have been very fortunate to work with **Professor David KALMMES** who is an incredible hard-worker. His research productivity is amazing. Thank you for having spent time for me! You were my second family while I was in Rochester and I will never forget what you have done for me. A big hug to **Doctor Waleed BRINJIKJI**, more than a co-worker you are for me a close friend. Without you I would have never been able to perform what I did at Mayo. You have a question? Waleed has the answer! I cannot say enough good things about Waleed. I am delighted to have had the opportunity to work with this rare talent! He is one of the finest guys I have ever worked with and I am quite a bit jealous! I wish you and your family all the best for your future. I am sure we will continue to work together! Thank you also to **Professor Ramanathan KADIRVEL** for all the discussions we have had together and the coffee breaks. Thank you for having been there during the hard times and for your support! Many thanks also to **Doctor Daying DAI**, **Doctor Yong-Hong Ding**, **Dana SCHROEDER**, **Tina GUNDERSON** with whom I have been working very closely and in a very good harmony during the year I spent in the US! Thank you also to all the young students I was in charge of during my stay at Mayo, specially **Michael D. BRANDT**, **Evan P. THIELEN**, **Collin JOHNSON**, **Chandru RAMANA** and **Ann-Mary RYDBERG**. It was an immense pleasure to teach you experimental or clinical research and I hope you appreciated the French style! More than my pupils you are now my friends or at least tennis partners! I wish you all the success you deserve for your future medical school. Thank you also to **Kimberley COLLINS** and **Roanna VINE** for their daily support! Finally, my stay at Rochester would not have had the same flavor without my friends **Gianluca**, **Ioanna**, **Jennifer**, **Noemi**, **Ryan**, **Simon**, **Troy**, **Valentina**, **Xavi**, **Divi** and **Emilie...** I miss you guys!

Merci à tous **mes Maîtres** qui m’ont formé et m’ont donné goût à la neuroradiologie interventionnelle : **René CHAPOT**, **Mikael MAZIGHI**, **Michel PIOTIN**, **Raphaël BLANC**, **Hocine REDJEM**, **Charbel MOUNAYER**, **Suzana SALEME**, **Laurent SPELLE**, **Jacques MORET**, **Léon IKKA**, **Georges RODESCH**, **Oguzhan COSKUN**, **Emmanuel HOUDART** et **Jean-Pierre SAINT-MAURICE**. Je mesure l’immense chance

que j'ai d'avoir pu bénéficier de vos enseignements et d'avoir pu être en salle à vos côtés. La diversité de vos approches m'a permis d'avoir une vision intégrale de notre spécialité que vous faites brillamment grandir. J'espère être à la hauteur de tout ce que vous m'avez enseigné !

Merci à tous **mes collègues du Kremlin-Bicêtre** pour leur soutien au quotidien, les bons moments passés ensemble et tout ce qu'ils m'apprennent. Merci à **Nidhal BEN ACHOUR, Jildaz CAROFF, Valerio DA ROS, Marta IACOBUCCI, Léon IKKA, Cristian MIHALEA, Augustin OZANNE**. Merci à tous les internes et fellows du monde entier avec lesquels j'ai eu la chance de travailler pendant toutes ces années et qui m'ont tant apporté. Merci aussi à l'ensemble des manipulateurs et secrétaires pour leur aide qui est si précieuse.

Je remercie l'ensemble des médecins qui m'ont transmis leur savoir durant ma formation en neurologie et en radiologie.

Enfin, je remercie ceux qui ont veillé sur moi depuis toujours, qui m'ont fait confiance et m'ont soutenu sans faille dans tous mes projets. Je remercie infiniment **mes parents** pour leur présence et leurs encouragements qui m'ont accompagné tout au long de ces années. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous faites pour moi.

Je remercie mes sœurs, **Julie et Caroline**, d'être toujours là pour moi. Je vous souhaite tout le bonheur que vous méritez ainsi qu'à **Sébastien et Charles ... (et Baby !)**.

A mes amis pour leur présence, leur fidélité, et tous les bons moments passés ensemble.

Je remercie enfin celle qui a une importance capitale dans ma vie, qui m'accompagne, me soutient et me supporte au quotidien ! Merci à **Alexandra**, ma merveilleuse fiancée et très bientôt femme ! Je vous souhaite une longue et belle vie à deux... ou plus ! Je te remercie infiniment Amor !

A celles et ceux dont nom n'apparaît pas, mais qui m'ont accompagné, guidé et soutenu tout au long de mon parcours...

RESUME

La genèse d'un anévrisme intracrânien n'est pas uniquement due à un effet mécanique mais à un ensemble d'éléments biologiques. Parmi eux, le thrombus intra-anévrysmal a un rôle majeur car il est le site d'activation de nombreuses métalloprotéinases et d'une protéolyse importante. Cependant, le thrombus du sac anévrysmal est également un substrat indispensable à la cicatrisation des anévrysmes après traitement endovasculaire car il sert de support à la recolonisation de l'anévrisme par des cellules mésenchymateuses. Dans les différents travaux présentés dans cette thèse, nous avons pu analyser une partie des phénomènes biologiques impliqués dans le succès ou l'échec des traitements endovasculaires. Les travaux présentés sont basés sur des expérimentations dans le modèle d'anévrisme à l'élastase chez le lapin et traités par coils, *flow-diverters* ou dispositifs intra-sacculaires (WEB). Ces travaux permettent de mieux comprendre les mécanismes biologiques mis en jeu par les différents traitements endovasculaires. L'analyse de ces phénomènes est indispensable pour comprendre les causes d'échec, mais aussi afin de développer de nouveaux outils biologiquement actifs pour le traitement des anévrysmes intracrâniens. Nous proposons ainsi le développement de stents *flow-diverters* biologiquement actifs. Nous proposons également trois approches différentes de thérapie cellulaire par voie endovasculaire, utilisant des cellules souches mésenchymateuses autologues, permettant une recolonisation du thrombus intra-anévrysmal et une cicatrisation accélérée de l'anévrisme.

Au total, le traitement des anévrysmes intracrâniens ne peut plus être basé uniquement sur des considérations mécaniques. Le développement des futurs dispositifs endovasculaires devra inclure une dimension biologique pour optimiser la cicatrisation complète des anévrysmes intracrâniens.

Mots Clés : Anévrisme, Thrombus, Cicatrisation, Coils, *Flow-Diverter*, WEB, Thérapie Cellulaire.

SUMMARY

The genesis of an intracranial aneurysm is not only due to a mechanical effect but to a set of biological elements. Among them, intra-aneurysmal thrombus plays a major role, as it is the site of activation of many metalloproteinases and an important site of proteolysis. However, the thrombus of the aneurysmal sac is also crucial for the healing of the aneurysm after endovascular treatment, because it serves as a support for the recolonization of the aneurysm by mesenchymal cells. In the various works presented in this thesis, we analyzed some of the biological phenomena involved in the success or failure of endovascular treatments. The presented works are based on experiments in the elastase aneurysm model in the rabbit and treated with coils, flow-diverters or intra-saccular devices. This work enables to better understand the biological mechanisms involved in the various endovascular treatments. The analysis of these phenomena is essential to understand the causes of failure, but also to develop new biologically active devices for the treatment of intracranial aneurysms. We propose the development of biologically active flow-diverter stents. We also propose three different approaches of endovascular cell therapy, using autologous mesenchymal stem cells, allowing recolonization of the intra-aneurysmal thrombus and accelerated healing of the aneurysm.

The treatment of intracranial aneurysms can no longer be based solely on mechanical considerations. The development of future endovascular devices should include a biological dimension to improve the complete healing of intracranial aneurysms.

Key Words : Aneurysm, Thrombus, Healing, Coils, Flow-Diverter, WEB, Stem Cells Therapy.

LISTE DES ABBREVIATIONS

AAA	Anévrisme de l'Aorte Abdominale
AI	Anévrisme Intracrânien
ANR	Agence Nationale de la Recherche
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
ARN	Acide RiboNucléique
CD31	Cluster of Differentiation 31
CLEC7A	C-type lectin domain family 7 member A
CML	Cellule Musculaire Lisse
CPE	Cellule Progénitrice Endothéliale
CSM	Cellule Souche Mésoenchymateuse
EMMPRIN	Extracellular Matrix MetalloProteinase INducer
FGFBP1	Fibroblast Growth Factor Binding Protein 1
FITC	Fluorescein IsoThioCyanate
HHIP	HedgeHog Interacting Protein
HLA	Human Leukocyte Antigen
IMPLANTS	Immobilized-on-Metal Peptide Layer for Arterial Next generation Stents
MARCO	Macrophage Receptor with Collagenous Structure
MMP	Protéinases Matricielles
MPO	Myelo PerOxyddase
NF-κB	Facteur Nucléaire κ B
NOS	Nitric Oxide Synthase
PDGF	Platelet-derived growth factor
PED	Pipeline Embolization Device
STMP	TriSodium triMétaPhosphate
SVF	Stroma Vascular Fraction
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
WEB	Woven EndoBridge
WOS	Web Occlusion Scale

Ce qui est simple est toujours faux. Ce qui ne l'est pas est inutilisable.

Paul Valéry, *Mauvaises pensées*, 1941.

SOMMAIRE

PREAMBULE	17
I- INTRODUCTION	19
1. Définition et épidémiologie des anévrysmes intracrâniens	19
2. Phénomènes biologiques impliqués dans la survenue des anévrysmes intracrâniens. 20	20
3. Options mécaniques pour le traitement des anévrysmes intracrâniens	24
<i>a. Place du traitement endovasculaire</i>	24
<i>b. Mécanisme de la cicatrisation des anévrysmes après traitement par coils</i>	24
<i>c. Limites du traitement endovasculaire par coils</i>	26
<i>d. Stents à diversion de flux</i>	28
<i>e. Autres dispositifs intra-sacculaires</i>	30
4. Intérêt et modalités de l'optimisation biologique	32
5. Modèle interventionnel d'anévrysme sacciforme chez le lapin	34
II- Les Flow-diverters	37
1. Principe et efficacité	37
<i>a. Revue de la littérature</i>	37
<i>b. Mécanismes biologiques impliqués dans la cicatrisation des anévrysmes traités par flow-diverter : Analyse par séquençage de l'ARN</i>	40
2. Limites des traitements par flow-diverter	55
<i>a. Non-exclusion de l'anévrysme: importance de l'apposition pariétale</i>	55
<i>b. Risque de rupture retardée</i>	65
➤ <i>Revue de la littérature</i>	65
➤ <i>Intérêt du coiling associé pour la prévention des ruptures retardées</i>	68
<i>c. Branches couvertes et risque d'occlusion</i>	77
➤ <i>Risques liés à la couverture de l'artère ophtalmique</i>	79
3. Perspectives : Revêtement biomimétique pour l'optimisation des flow-diverters	92
III- Les Flow-diverters intra-sacculaires (WEB)	95
1. Principes et efficacité : Revue de la littérature	95
2. Corrélations histologiques avec l'occlusion angiographique	97
IV- Thérapie cellulaire	107
1. Rationnel pour la thérapie cellulaire dans les anévrysmes intracrâniens	107
2. Thérapie cellulaire dans les anévrysmes intracrâniens : revue de la littérature	109
<i>a. Cellules musculaires lisses (CML)</i>	109
<i>b. Fibroblastes</i>	110
<i>c. Cellules Progénitrices Endothéliales (CPE)</i>	111
<i>d. Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM)</i>	112
3. Trois options avec des cellules souches mésoenchymateuses autologues	114
<i>a. Cellules souches mésoenchymateuses autologues seules, sans support</i>	114
<i>b. Cellules souches mésoenchymateuses autologues dans des microbilles</i>	127
<i>c. Cellules souches mésoenchymateuses autologues sur des coils</i>	131
4. Perspectives pour la thérapie cellulaire dans les anévrysmes intracrâniens	148
V- Conclusion et perspectives	151
REFERENCES	153

PREAMBULE

Basé sur des travaux de recherche clinique et de recherche expérimentale en laboratoire, ce travail a pour but de mieux appréhender les phénomènes biologiques aboutissant à l'efficacité ou à l'échec des nouveaux traitements endovasculaires pour la prise en charge des anévrismes intracrâniens. Nous aborderons successivement les stents à diversion de flux et les dispositifs intra-sacculaires et analyserons leur intérêt, leur efficacité et leurs limites en pratique clinique et envisagerons les acteurs biologiques mis en jeu par ces techniques et des options visant à leur optimisation. Enfin, nous aborderons une nouvelle approche thérapeutique que nous proposons pour le traitement endovasculaire des anévrismes intracrâniens : la thérapie cellulaire.

I- INTRODUCTION

1. Définition et épidémiologie des anévrysmes intracrâniens

Un anévrysme se définit anatomiquement par une perte de parallélisme des parois artérielles. Ces lésions vasculaires sont focales, uniques ou multiples. La vascularisation artérielle cérébrale est caractérisée par de très nombreux embranchements permettant un couplage permanent et spécifique entre les apports métaboliques et les fonctions cérébrales. La circulation cérébrale est une localisation fréquente pour la pathologie anévrysmale. Sur le plan morphologique, deux grands types de lésions sont différenciés: les anévrysmes de type fusiforme et les anévrysmes de type sacciforme. Ces derniers représentent plus de 90% des anévrysmes intracrâniens (AI) et se caractérisent par la formation d'une ectasie en forme de sac au niveau des bifurcations artérielles^{1, 2}. L'anévrysme fusiforme est une lésion moins fréquente au niveau cérébral, mais plus fréquente au niveau aortique, que les sacciformes. Les anévrysmes fusiformes se caractérisent par une dilatation de toute la circonférence de la paroi artérielle²⁻⁴. Ces deux anatomies anévrysmales se différencient par leur hémorhéologie intrasacculaire: recirculation complète ou incomplète. Bien que les mécanismes soient différents aux niveaux aortiques et cérébraux, ces deux types d'anévrysmes possèdent des similitudes et nous avons montré une coexistence possible d'AI et d'anévrysmes de l'aorte chez les mêmes patients⁵.

Les AI sont le plus souvent asymptomatiques. Des séries autopsiques ainsi que des séries de dépistage au cours d'imagerie cérébrale réalisée pour diverses indications ont mis en évidence une prévalence globale des AI non-rompus dans la population générale de 3.5%⁶. La prévalence des AI dans la population générale est comprise entre 3.6 et 6.0%² dans les pays occidentaux, ce qui correspond à 1.2-3 millions de patients en France.

Le risque des AI est lié à leur rupture provoquant une hémorragie sous arachnoïdienne, responsable du décès des patients dans 50 % des cas dans le premier mois, et laissant des séquelles permanentes chez près d'un tiers des patients survivants². Dans la population mondiale, l'incidence globale annuelle des ruptures d'AI varie de 2 à 22 pour 100 000 habitants⁷⁻⁹. Le risque absolu de rupture d'un anévrysme non rompu est très faible et la plupart des séries et méta-analyses ont rapporté un risque annuel de rupture de 0.05-2.0%¹⁰⁻¹⁷. Ce risque de rupture dépend de plusieurs critères combinés dans le score PHASES incluant l'âge, le sexe, la taille et la localisation de l'anévrysme, les antécédents médicaux personnels ainsi que les antécédents familiaux d'anévrysmes^{10, 18-20}.

2. Phénomènes biologiques impliqués dans la survenue des anévrysmes intracrâniens.

La biologie des AI est complexe et implique différents phénomènes. Le développement d'un AI peut-être favorisé par une susceptibilité génétique²¹, responsable de formes familiales. De plus, les AI se développent principalement aux sites de bifurcations artérielles, en rapport avec l'augmentation des contraintes hémodynamiques à ce niveau et à la fragilité matricielle des artères²². Ce phénomène est lié aux contraintes de cisaillement (wall-shear stress) imposées par le flux artériel au niveau des bifurcations artérielles²³⁻²⁶. Dans ce contexte un fort niveau de cisaillement, proportionnel à la vitesse du sang, et d'oscillations systolo-diastoliques, semblent impliqués dans l'initiation de la dilatation alors qu'un cisaillement diminué semble impliqué dans le phénomène de rupture^{24, 27}. Histologiquement, le développement d'un AI associe une fragmentation de la limitante élastique interne, un amincissement de la média en rapport avec la perte de cellules musculaires lisses, la présence d'un thrombus intra-sacculaire, une augmentation de l'activité protéolytique de la matrice extracellulaire, une fibrose de l'adventice et une néovascularisation de la paroi artérielle²⁸⁻³². Le développement d'une poche anévrysmale entraîne des variations de l'écoulement du flux sanguin à l'intérieur de celle-ci avec un flux qui devient turbulent avec des phénomènes de ré-entrées (vortex), responsable d'une stagnation du sang dans le sac anévrysmal et d'importantes forces centrifuges³³⁻³⁵ (**Figure 1**).

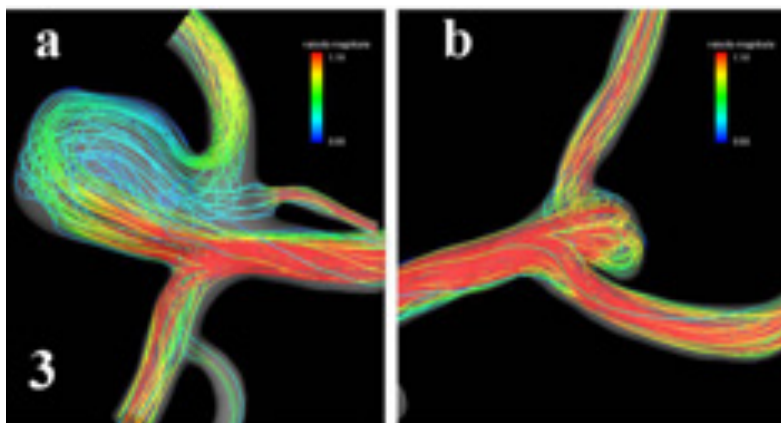


Figure 1. Imagerie de flux: Mise en évidence du flux turbulent à l'intérieur du sac anévrysmal.

Cette stagnation sanguine provoque le développement d'un caillot au fond du sac anévrysmal constitué de l'ensemble des éléments figurés du sang (plaquettes, globules rouges, leucocytes) qui va se déposer et s'organiser en couches successives au fond du sac

anévrismal en “fond de coquetier“. Ceci constitue le thrombus intra-anévrysmal qui est présent dans l’ensemble des AI (**Figure 2**).

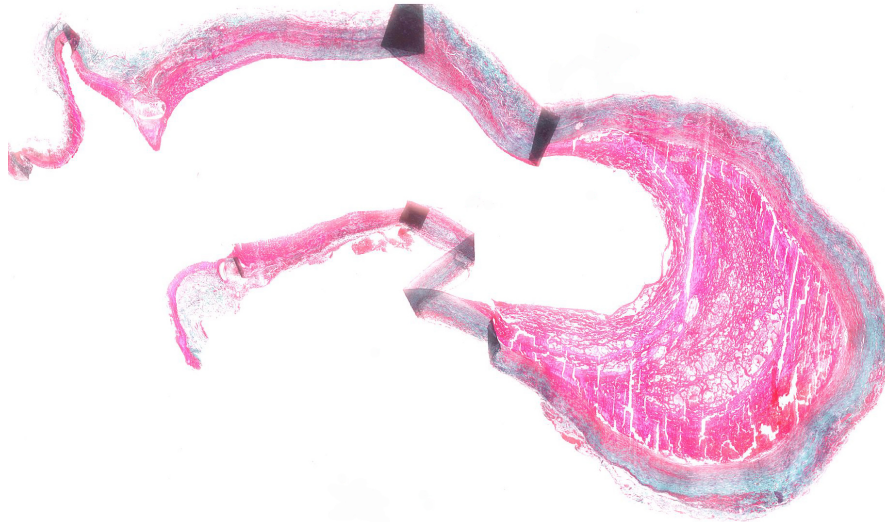


Figure 2. Image de thrombus anévrysmal dans un modèle d’anévrisme sacciforme par xéno greffe chez le rat. Coloration Trichrome de Masson.

Le thrombus intra-anévrysmal peut avoir deux effets contradictoires sur l’évolution des AI : soit il va être le support pour la cicatrisation de l’AI, soit au contraire il va favoriser la dégradation de la paroi artérielle et ainsi augmenter le risque de rupture de l’anévrisme³⁶. En effet, le thrombus intra-anévrysmal peut servir de substrat à la colonisation par des cellules mésenchymateuses, capables de produire du collagène et provoquer la fibrose du sac anévrysmal, devenant ainsi un tissu cicatriciel solide (**Figure 3**).

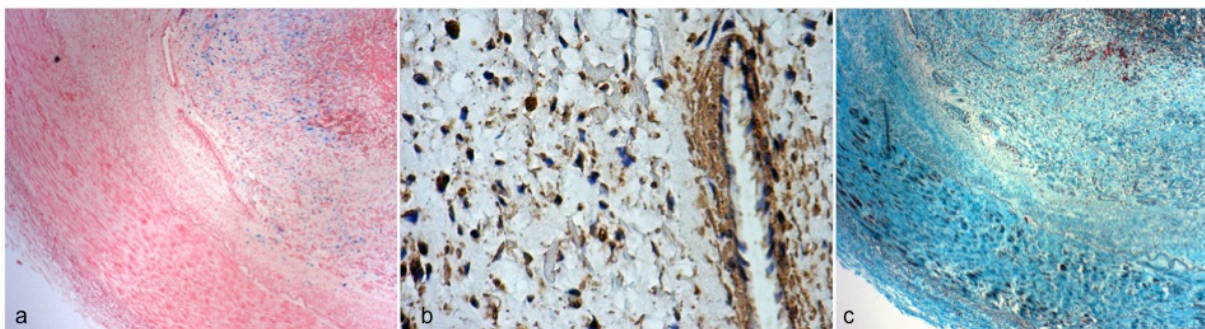


Figure 3. Cicatrisation du thrombus intra-anévrysmal.: a. Coloration au trichrome de Masson : le bleu correspond au collagène, reflet de la fibrose du sac anévrysmal constituant un tissu cicatriciel avec présence d’une neo-angiogénèse à l’intérieur du tissu cicatriciel. b. Immunomarquage de l’alpha-actine, permettant d’identifier les myofibroblastes, cellules mésenchymateuses cicatricielles produisant le collagène. c. Coloration au bleu de Prusse mettant en évidence l’oxydation à l’intérieur du sac anévrysmal secondaire à la présence de Fer lié à la dégradation des globules rouges piégés dans le thrombus intra-anévrysmal.

Dans d'autres circonstances, difficiles à prédire à l'échelle individuelle, particulièrement en rapport avec un enrichissement en neutrophiles, le thrombus intra-anevrismal peut être le site responsable de l'évolutivité de l'anévrisme vers la rupture. Dans ces circonstances, le renouvellement permanent du thrombus intra-anevrismal est responsable de phénomènes protéolytiques et oxydatifs, favorisés par le tabagisme qui est un facteur de risque de rupture des AI, mettant en jeu différentes voies de l'oxydation telles que NFk-B, TNFa et NOS³⁷⁻⁴³. De plus, le thrombus intra-anevrismal, du fait de la présence de plasmine est un site de fibrinolyse intense favorisée par les phénomènes de turbulence du flux et de renouvellement permanent du thrombus intra-anevrismal. Cette fibrinolyse est responsable d'une instabilité du thrombus intra-anevrismal. La plasmine est le principal activateur des protéinases matricielles (MMP) toujours synthétisées en pro-formes inactives. Le thrombus intra-anevrismal est également un site d'interaction avec les neutrophiles et d'activation des protéases neutrophilaires telles que l'élastase, et les métallo-protéases (MMP-9)^{44, 45}, et d'oxydases telles que la myélo-péroxydase (MPO)⁴⁶⁻⁴⁸. Ces phénomènes sont responsables d'une dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire et d'une oxydation des anti protéases (perte de fonction), aboutissant à la dégradation de l'élastine et du collagène, diminuant les capacités de contention de la paroi artérielle. Les polynucléaires neutrophiles présents dans le thrombus mural participent également à la croissance anévrysmale⁴⁹ par l'intermédiaire d'une sécrétion d'élastase qui, une fois piégée dans la fibrine du thrombus, inhibe la recolonisation du thrombus mural par les cellules mésenchymateuses, et empêche la stabilisation de la lésion^{29, 39, 42, 50-54}. Ce phénomène est auto-amplifié car la dégradation de la matrice extracellulaire s'accompagne d'une diminution du nombre de cellules musculaires lisses (CML), principales sources d'anti protéases dans la paroi vasculaire (notamment les inhibiteurs des métalloprotéases matricielles MMP et des serine protéases: élastase, plasmine, t-PA, etc)^{42, 55-59}. Ces activités biologiques jouent ainsi un rôle crucial dans la dilatation anévrysmale et sa rupture^{3, 50, 60, 61}. Enfin, le thrombus intra-anevrismal est un site privilégié de contamination bactérienne par des pathogènes peu offensifs notamment d'origine bucco-dentaire, responsable d'une rétention locale de neutrophiles qui amplifient les phénomènes précédemment décrits^{62, 63}.

Les principaux mécanismes aboutissant au développement d'un anévrisme intracrânien sont résumés dans la **Figure 4**.

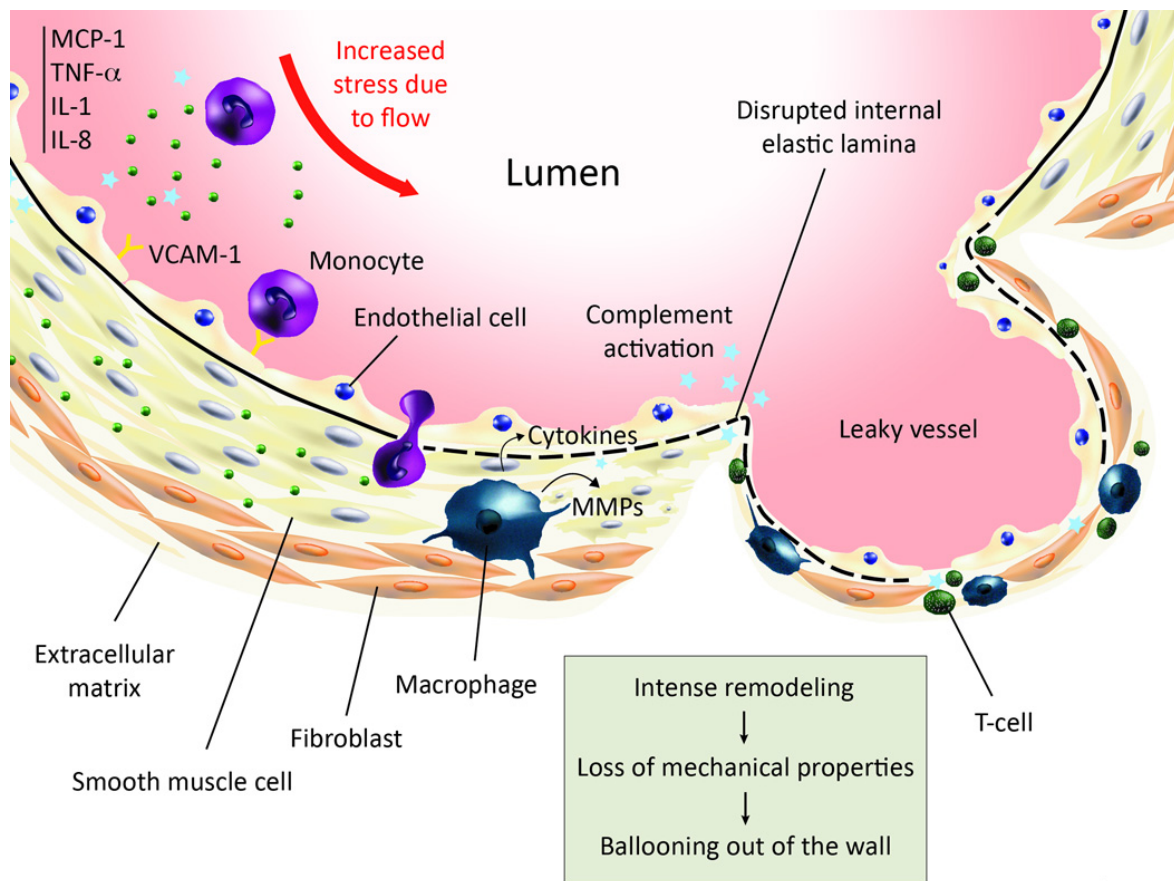


Figure 4 : Principales étapes aboutissant au développement d'un anévrisme intracrânien.
Image issue de Turjman et al.⁶⁴

L'ensemble de ces mécanismes peuvent être impliqués dans la croissance et la rupture des anévrismes. Ces mêmes mécanismes peuvent également être responsables de l'échec de certaines thérapies endovasculaires, voire de complications potentiellement graves. Nous aborderons les mécanismes biologiques mis en jeu par les différentes options thérapeutiques.

3. Options mécaniques pour le traitement des anévrismes intracrâniens

a. Place du traitement endovasculaire

Le traitement actuel d'un anévrisme intracrânien est interventionnel, chirurgical ou endovasculaire (**Figure 5**). La chirurgie a pour but d'exclure l'anévrisme de la circulation en plaçant un clip au niveau du collet de l'anévrisme. Il s'agit d'une technique invasive nécessitant la réalisation d'une craniectomie. De plus l'anévrisme n'est parfois pas accessible pour le neurochirugien.

Le traitement endovasculaire a été développé à partir des années 1990⁶⁵ et est actuellement la référence pour la prise en charge des AI^{66, 67}. Il s'agit d'une approche mini-invasive utilisant des cathéters navigués le plus souvent depuis l'artère fémorale, visant à délivrer sous contrôle scopique à l'intérieur des anévrismes des coils métalliques dans le but de provoquer la thrombose du sac anévrysmal et son occlusion. Les coils sont des spires de platine largables, qui implantés dans l'anévrisme ont pour but de provoquer une stagnation du flux à l'intérieur du sac anévrysmal, favoriser la formation d'un thrombus intra-anévrysmal occlusif qui puisse servir de support pour la cicatrisation du collet de l'anévrisme^{1, 2, 68-72}. Mais comme nous l'avons vu le rôle biologique du thrombus est ambigu pouvant servir de substrat de cicatrisation ou de source d'aggravation.

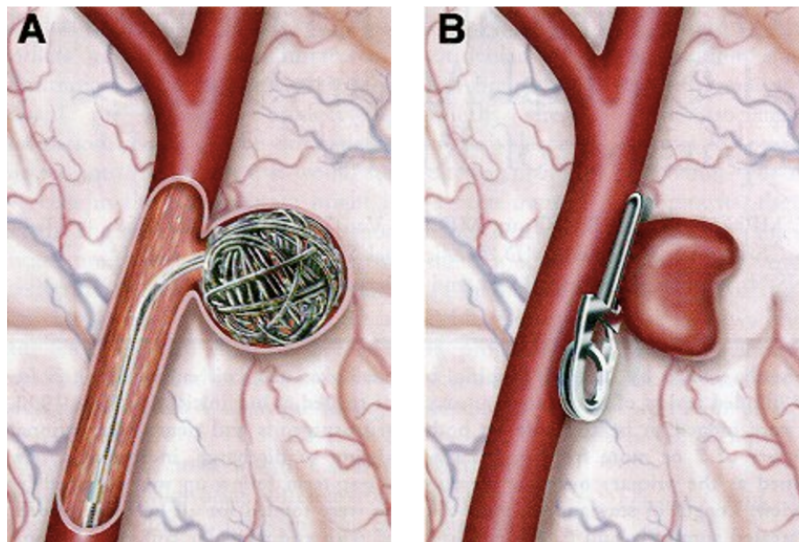


Figure 5: A) Traitement endovasculaire par coils. B) Traitement chirurgical par clip.

b. Mécanisme de la cicatrisation des anévrismes après traitement par coils

La cicatrisation des anévrismes implique plusieurs processus cellulaires notamment la formation d'une couche néo-intimale par la prolifération de cellules mésenchymateuses et

endothéliales et la synthèse de matrice extra-cellulaire⁷²⁻⁷⁴. L'objectif est l'occlusion du collet de l'anévrisme par la couche néo-intimale afin d'isoler totalement le sac anévrysmal du vaisseau porteur. Brinjikji et al. ont récemment résumé les phénomènes impliqués dans la cicatrisation des anévrismes traités par coils ainsi que les phénomènes impliqués dans les cas de récurrence⁷² (**Figure 6**).

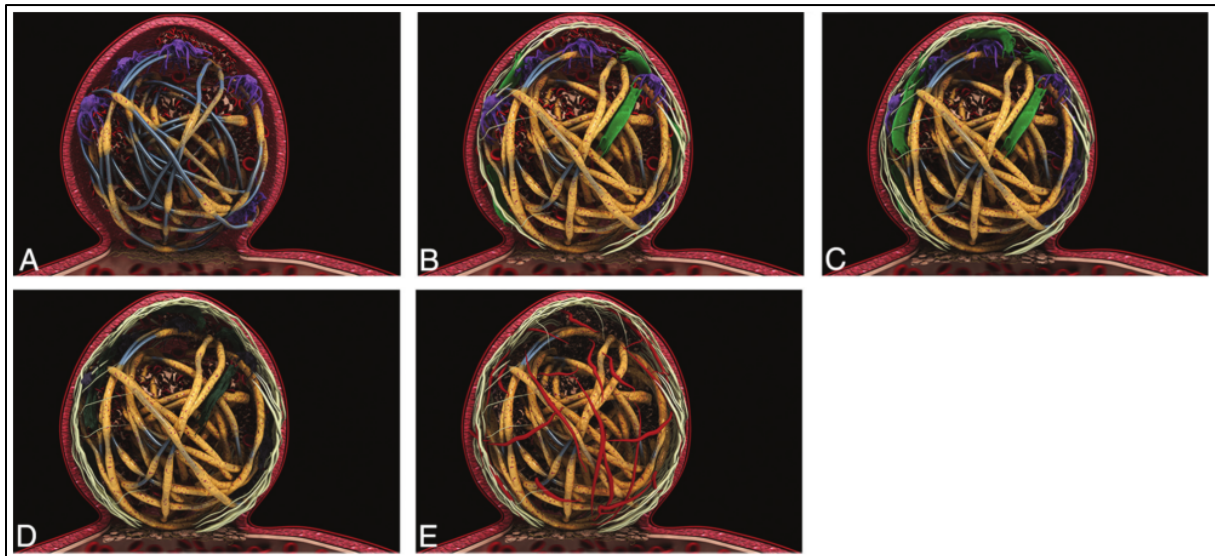


Figure 6: A) **Première semaine** : l'anévrisme est rempli avec un caillot désorganisé (rouge). Des phagocytes (violet) et de la fibrine commencent à recouvrir les coils (jaune). B) **Deuxième semaine**: Poursuite de la couverture des coils par la fibrine (jaune). Colonisation par des phagocytes (violet) et des myofibroblastes (vert). Développement d'une fine couche de fibrine au collet de l'anévrisme. C) **Deuxième à quatrième semaines**: Prolifération des myofibroblastes (vert) avec un thrombus intra-anévrysmal de mieux en mieux organisé, appauvri en globules rouges et enrichi en fibrine pontée et condensée (transglutamination) (rouge). Majoration de l'endothélialisation au collet. D) **Un à trois mois**: début de l'apoptose des myofibroblastes (vert foncé) et des phagocytes (violet foncé). Majoration de l'endothélialisation au collet. E) **A partir du troisième mois**: cellularisation de la poche anévrysmale, constituée principalement d'un tissu conjonctif vascularisé (fibres rouges). Majoration de la couverture des coils par la fibrine (brun) et de l'endothélialisation au collet qui est plus épaisse. Image par Brinjikji et al⁷².

c. Limites du traitement endovasculaire par coils

Le traitement endovasculaire constitue le traitement de première intention pour les anévrysmes rompus depuis qu'il a été prouvé que ce traitement permet de meilleurs résultats en terme de morbi-mortalité comparé au clipping⁷⁵⁻⁷⁸. De façon similaire, l'approche endovasculaire est le traitement de référence pour les AI non rompus^{79,80}. Pour l'ensemble des AI, le taux de succès du traitement par coils est de 91% avec une morbi-mortalité d'environ 4.8% (1.2% de décès)⁸¹.

Malgré son efficacité démontrée, le traitement par coiling n'est pas systématiquement durable dans le temps. En effet, le thrombus intra-anévrysmal induit par les coils peut se rétracter au cours du temps, responsable d'une compaction des coils et de la récurrence de l'anévrysme⁸²⁻⁸⁴ (**Figure 7**).

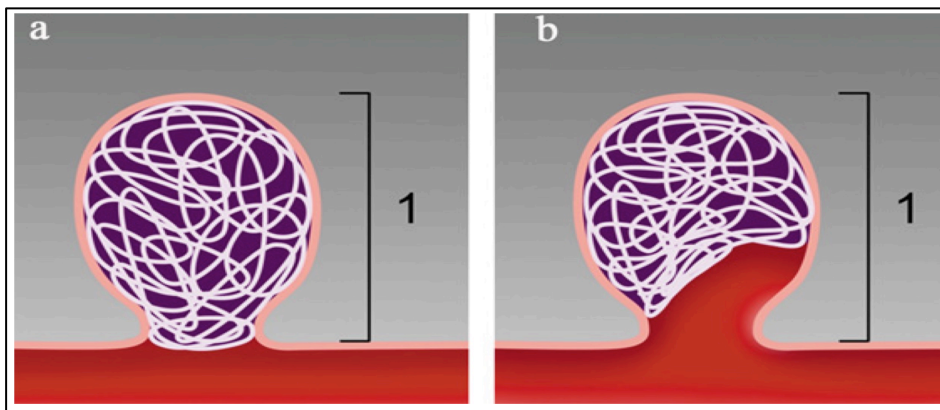


Figure 7: a) Occlusion anévrysmale complète. b) Compaction de coils et récurrence anévrysmale.
Image issue de Dorfer et al⁸⁴.

La récurrence (recanalisation) est une complication fréquente qui survient dans 15 à 25% des cas au cours du suivi et peut nécessiter un ou plusieurs retraitements^{1, 75, 84-87}. L'efficacité à long terme du traitement endovasculaire des anévrysmes est donc une question cruciale notamment dans le cas du traitement préventif des anévrysmes non rompus, même si la rupture d'un anévrysme non rompu préalablement traité est un évènement très exceptionnel⁸⁷⁻⁹⁰. L'occlusion initiale incomplète de l'anévrysme est un des facteurs de risque de récurrence⁸¹. La densité du packing de coils à l'intérieur du sac anévrysmal et le résultat angiographique immédiat après le coiling sont également des facteurs essentiels pour la stabilité à long terme de l'exclusion de l'anévrysme^{87, 91, 92}. Des techniques ont été développées pour augmenter la stabilité de l'occlusion anévrysmale par coils. L'utilisation d'un ballon gonflé transitoirement dans l'artère porteuse en regard du collet de l'anévrysme

permet d'augmenter ce packing en forçant plus de coils à rentrer dans le sac anévrysmal, il s'agit de la technique de remodeling ou *balloon-assisted coiling*⁹³⁻⁹⁸. L'implantation de stents dans l'artère porteuse en regard du collet de l'anévrysmal permet également de diminuer le risque de recanalisation⁹⁹⁻¹⁰² grâce à la possibilité d'augmenter la densité de coils mais également grâce au fait que le stent, par la modification de l'architecture artérielle, modifie les flux entrant dans l'anévrysmal. Enfin le stent, placé en regard du collet de l'anévrysmal sert de support pour la prolifération endothéliale au collet et favorise sa cicatrisation¹⁰³. Cependant, la mise en place d'un stent implique l'utilisation de traitement antiagrégant plaquettaire afin de prévenir le risque de thrombose de stent et de complications ischémiques mais augmente le risque de complications hémorragiques¹⁰⁴. De plus, la sécurité du traitement endovasculaire est limitée en cas d'anévrysmes à collet large, rendant précaire voire impossible le maintien des coils à l'intérieur du sac anévrysmal avec un risque de protrusion de coils dans l'artère porteuse et d'occlusion accidentelle avec ischémie d'aval par thrombose. Dans ces anévrysmes à collet large, l'adjonction de stents intracrâniens permet de maintenir les coils dans le sac anévrysmal (*stent-assisted coiling*)^{68, 99}. Cependant, malgré le développement de nouveaux coils (longueurs et diamètres très variés, formes tridimensionnelles, coils coatés avec des hydrogels) et les techniques de coiling assisté par ballon ou stent, le taux de remplissage du sac anévrysmal par le matériel d'embolisation n'excède pas 30 à 40% même en cas d'occlusion dite « complète »^{105, 106}.

La récurrence anévrysmale étant une limite sérieuse pour la stabilité du traitement par coils, de nombreux travaux de recherche sont actuellement en cours pour limiter sa survenue¹⁰⁷. Il est largement accepté que l'amplification de la réponse cicatricielle anévrysmale est un élément essentiel pour prévenir les récurrences.

d. Stents à diversion de flux

Afin d'optimiser le traitement des anévrismes, une nouvelle approche a vu le jour vers la fin des années 2000 avec le développement de stents à mailles très serrées appelés *flow-diverters* dont le but est de rediriger le flux artériel vers l'artère normale et d'exclure le sac anévrysmal de la circulation. Il s'agit d'une approche hémorhéologique consistant en la mise en place par voie endovasculaire d'un stent auto-expansible à mailles serrées dans l'artère porteuse en regard du collet de l'anévrisme, réduisant de manière importante le flux pénétrant le sac anévrysmal, favorisant sa thrombose et son exclusion de la charge hémodynamique sans introduire aucun matériel au sein du sac anévrysmal¹⁰⁸⁻¹¹² (**Figure 8**).

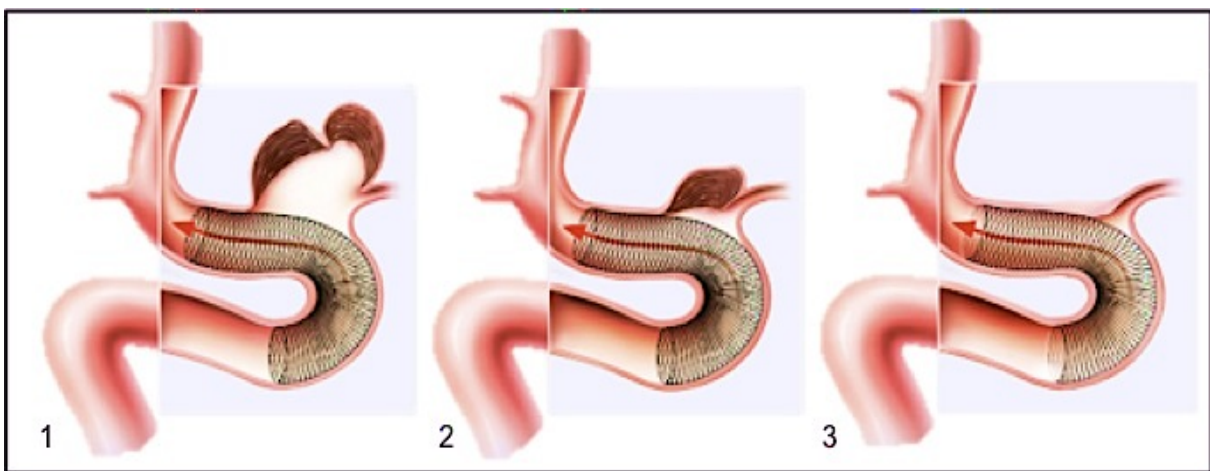


Figure 8: Thrombose de l'anévrisme et reconstruction du vaisseau après mise en place du *flow-diverter*.

Les *flow-diverters* sont une prothèse endovasculaire se présentant sous la forme d'une structure tubulaire composée de fils tressés, permettant un taux de couverture d'environ 30% de la surface du stent¹¹³. La diversion de flux est immédiate après la pose du dispositif qui constitue une barrière physique permettant de rediriger le flux sanguin dans le vaisseau porteur de l'anévrisme avec augmentation de la conductance longitudinale¹¹⁴. Ce mécanisme est responsable d'une réduction significative du débit intra sacculaire (environ 85%) par diminution de la conductance radiale, et d'une augmentation de la viscosité sanguine entraînant la formation d'un caillot. Parallèlement, la barrière physique représentée par le stent se renforce par endothélialisation du stent permettant d'augmenter son "étanchéité" grâce au développement d'une interface imperméable et à la reconstruction vasculaire. La structure du stent sert ainsi de support au développement d'un tissu endothélial et néo-intimal en regard du collet¹¹⁵. La reconstruction vasculaire grâce aux *flow-diverters* est donc un processus évolutif dans le temps qui contrairement au traitement endovasculaire par coils

permet une occlusion progressive de l'anévrisme¹¹⁶. Au final, l'absence de matériel intra-anévrysmal permet d'espérer une réduction de taille de l'anévrisme et la diminution des éventuels symptômes liés à l'effet de masse. Les *flow-diverters* constituent donc un véritable changement de paradigme dans le traitement endovasculaire des anévrysmes car il n'y pas d'introduction de matériel dans le sac anévrysmal. Leur but est une reconstruction du vaisseau porteur, alors que l'embolisation par coils ne traite pas l'altération du vaisseau porteur d'où le risque de récurrence. Les *flow-diverters* sont utilisés en pratique clinique depuis 2011. **Nous rapportons dans la deuxième partie de ce travail les mécanismes biologiques impliqués dans le traitement par *flow-diverters*, ainsi que dans les risques liés à leur utilisation pour tenter d'expliquer et d'optimiser ces dispositifs.**

e. Autres dispositifs intra-sacculaires

Les anévrysmes de bifurcation à collet large sont parmi les plus difficiles à traiter par voie endovasculaire, et nécessitent le plus souvent le recours aux techniques de *stent-assisted coiling* avec un ou plusieurs stents afin de maintenir les coils en place^{99, 117-121}. Cependant cette approche comporte des risques liés à la difficulté technique et ne permet pas toujours une occlusion complète de l'anévrysme^{118, 122, 123}. Les *flow-diverters* sont une autre option stratégique pour ce type d'anévrysmes mais ne sont pas anodins avec le risque d'occlusion de la branche de bifurcation couverte¹²⁴⁻¹³¹. De plus, ces deux options impliquent la mise en place de stents et l'administration d'une double anti-agrégation plaquettaire ayant ses propres risques¹⁰⁴.

Une nouvelle approche pour le traitement des anévrysmes de bifurcation à collet large consiste en l'implantation à l'intérieur du sac anévrysmal d'un dispositif de diversion de flux intra-sacculaire, visant à interrompre le flux au collet de l'anévrysme. Cette interface sert de support pour le développement d'un tissu endothélial au collet de l'anévrysme servant à exclure et à cicatrifier l'anévrysme. L'avantage de ces dispositifs par rapport au *stent-assisted coiling* est qu'ils ne nécessitent pas l'utilisation d'anti-agrégants plaquettaires et qu'ils peuvent ainsi être utilisés en phase aigüe après rupture.

Le WEB (*Woven EndoBridge*, Sequent Medical, Aliso Viejo, California) est un dispositif intra-sacculaire auto-expansible dont la forme expandue se conforme à celle de l'anévrysme et qui sert de barrière au flux, à l'interface entre le collet de l'anévrysme et l'artère porteuse¹³²⁻¹³⁶ (**Figure 9**). Plusieurs séries cliniques ont montré la sécurité et l'efficacité de ce dispositif en pratique clinique¹³⁴⁻¹⁴⁶.

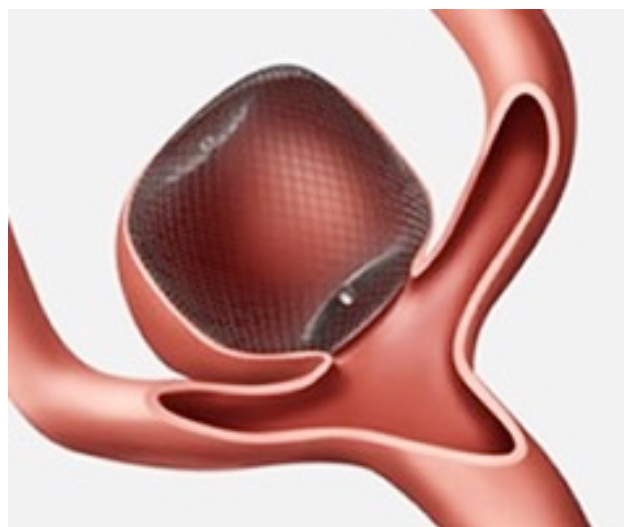


Figure 9 : Anévrysme de bifurcation traité par dispositif WEB.

Afin de mieux analyser les phénomènes biologiques mis en jeu pour la cicatrisation des anévrysmes traités par WEB, **nous présenterons une corrélation histologique entre les phénomènes de cicatrisation de l'anévrysme traité par WEB et l'occlusion angiographique.**

4. Intérêt et modalités de l'optimisation biologique

Comme nous l'avons précédemment décrit, le développement d'un anévrisme intracrânien est lié à la combinaison de plusieurs phénomènes d'ordre génétiques, environnementaux et hémodynamiques résultant en une raréfaction localisée des cellules de la paroi artérielle et à la dégradation de la matrice extracellulaire principale composante de la résistance à la tension exercée par la pression sur la paroi artérielle. Pourtant, même s'ils mettent en jeu des phénomènes biologiques, **les traitements actuellement disponibles sont essentiellement orientés vers une approche mécanique avec pour but l'occlusion de la poche anévrysmale plutôt que vers une approche biologique visant à une cicatrisation de la lésion, à une reconstruction et une recolonisation du segment artériel pathologique.**

Il existe plusieurs objectifs contradictoires pour le traitement des anévrysmes intracrâniens. En effet, le but est de favoriser la thrombose du sac anévrysmal tout en limitant l'extension de la thrombose à l'artère porteuse. C'est pourquoi les traitements avec mise en place d'un stent ou d'un *flow-diverter* dans l'artère porteuse, impliquent l'administration d'un traitement antiplaquettaire adjuvant. Ces traitements antiplaquettaires préviennent les événements thrombotiques dans le vaisseau porteur, mais avec un effet néfaste sur la cicatrisation du thrombus intra-anévrysmal car les plaquettes sont une source importante de PDGF, principal facteur de croissance des cellules mésenchymateuses. Une autre contradiction mise en jeu dans le traitement des anévrysmes intracrâniens est que la cicatrisation des anévrysmes passe par la constitution d'un thrombus intra-anévrysmal alors que ce thrombus lui-même peut avoir des effets délétères en rapport avec ses activités protéolytique et oxydante⁴⁹.

L'objectif idéal du traitement endovasculaire des anévrysmes intracrâniens serait de permettre une cicatrisation du sac anévrysmal, passant par la constitution d'un thrombus limité en activités protéolytiques, et sans risque thrombotique pour les artères porteuses. L'approche biologique est plus ambitieuse encore, avec pour but de modifier la biologie de la paroi artérielle pour reconstituer le segment artériel pathologique plutôt qu'une exclusion mécanique par simple occlusion.

Dans cette optique, **la thérapie cellulaire est une alternative séduisante**, par inhibition de la dégradation protéolytique de la média et recolonisation cellulaire du segment anévrysmal. Plusieurs tentatives de thérapie cellulaire ont été envisagées pour le traitement des AI, utilisant pour la plupart des cellules mûres déjà différenciées¹⁴⁷⁻¹⁵⁷. Cependant, des cellules matures n'ont pas la capacité de se différencier dans les différents types cellulaires

mésenchymateux normalement présents dans la paroi artérielle. Idéalement, les cellules utilisées pour la thérapie cellulaire des AI devraient avoir la capacité de se différencier en cellules endothéliales et en cellules musculaires lisses^{70, 158, 159}. Grâce à leur pluripotence, les cellules souches mésenchymateuses représentent le type cellulaire idéal pour la cicatrisation des anévrysmes intracrâniens^{148, 158, 160-164}.

Nous présentons dans la quatrième partie de ce travail, trois différentes options utilisant des cellules souches mésenchymateuses par voie endovasculaire pour le traitement des anévrysmes intracrâniens.

5. Modèle interventionnel d'anévrisme sacculaire chez le lapin

Les anévrismes spontanés sont rares chez les animaux de laboratoire. Afin de pouvoir mieux comprendre les mécanismes biologiques mis en jeu par les traitements endovasculaires, il est donc nécessaire d'utiliser des modèles animaux. Chaque modèle présente des avantages et des inconvénients. Plusieurs modèles d'AI ont été développés chez différents animaux tels que le lapin, la souris, le rat, le cochon, le chien ou le mouton¹⁶⁵⁻¹⁶⁷. Les modèles développés chez le rongeur présentent l'avantage d'être localisés en position intracrânienne sans nécessiter de manipulation chirurgicale des artères intracrâniennes¹⁶⁸⁻¹⁷². Cependant ces modèles présentent un inconvénient majeur dû à la petite taille des anévrismes et des artères de ces animaux, ne permettant pas l'évaluation des outils endovasculaires.

Une revue systématique de la littérature publiée en 2010 par un consortium d'équipes utilisant des modèles animaux pour l'évaluation des procédures endovasculaires pour le traitement des anévrismes intracrâniens a rapporté l'ensemble des avantages et limites de chacun des modèles disponibles¹⁶⁷. Cette revue systématique a permis de mettre en évidence que les deux modèles les plus appropriés étaient le modèle chirurgical d'anévrisme de bifurcation chez le chien et le modèle d'anévrisme induit par l'élastase chez le lapin. L'intérêt de ce modèle à l'élastase chez le lapin ainsi que ses limites ont été largement décrits dans un article récemment publié par Brinjiki et al¹⁶⁶.

L'ensemble des procédures expérimentales présentées dans ce travail ont utilisé un modèle anévrysmal à l'élastase chez le lapin^{158, 173, 174} (**Figure 10**). Il s'agit d'un modèle d'anévrisme sacculaire dérivé d'un modèle d'anévrisme fusiforme initialement réalisé sur des aortes de rats par Michel et al¹⁷⁵. L'intérêt de ce modèle chez le lapin est la proximité du système de coagulation avec celui de l'homme, l'absence d'inflammation et la faible cellularité (composée de CML, fibroblastes et quelques rares cellules mononuclées) ainsi que la formation d'un thrombus intra-sacculaire¹⁷⁶, des caractéristiques proches des mécanismes physiopathologiques humains. De ce fait, les caractéristiques histologiques et morphologiques des anévrismes obtenus grâce à ce modèle sont proches de celles des anévrismes humains¹⁷⁷. Enfin, la taille des artères du lapin est compatible avec l'utilisation du matériel de traitement endovasculaire utilisé en clinique. Il permet donc de tester des dispositifs utilisés chez l'homme.

Les anévrismes sont réalisés sur des lapins blancs de Nouvelle-Zélande (de 3.5-4kg) sous anesthésie générale par injection intra-musculaire de kétamine (20 mg/kg) + Xylazine (4.5 mg/kg) + Acépromazine 1% (1mg/kg). Après avoir rasé la région cervicale, une

anesthésie locale par injection sous-cutanée de xylocaïne à 2% (Xylocaïne®, ©AstraZeneca) est réalisée, et une incision médiane est pratiquée afin d'exposer l'artère carotide primitive droite. Après dissection de l'artère, une artériotomie est pratiquée, et un désilet de 5 French (Mini guide plastique 5 Fr. Radiofocus®, Introducer II, Terumo Europe) est inséré de façon rétrograde à 1cm de l'origine de la carotide. Deux-mille U.I. d'héparine (Héparine Choay® sodique, 25000 U.I. / 5 mL) sont administrées par injection intraveineuse pour prévenir la formation de thrombus artériel per-procédure. Sous contrôle scopique par rayons X (Mobil C-arm – BV Endura, Philips Medical Systems, Hollande), un cathéter d'embolectomie artérielle de 3 French (EMB 40, Fogarty®, Edwards Lifesciences™, Edwards Lifesciences Germany) est avancé de façon rétrograde jusqu'à l'origine de la carotide primitive droite. A cette position, le ballon d'embolectomie est gonflé avec une solution contenant du produit de contraste (Hexabrix® 320 mg/mL, Guerbet, Roissy CdG, France) afin de créer une chambre de remplissage (Fig. 6). Une solution contenant 45 U.I. d'élastase pancréatique de porc (type I, E1250-50 MG, lot 115K7682, Sigma®, France) est injectée dans cette chambre de remplissage via le désilet, et est laissée en incubation pendant 20 minutes. Le cathéter d'embolectomie et le désilet sont ensuite retirés, et la carotide est ligaturée en distalité.

Après suture des plans musculaires profonds et du plan cutané avec un surget de Vicryl 4-0, le lapin est réintroduit dans sa cage.

L'évolution anévrysmale nécessite 3 semaines après la création chirurgicale de l'anévrysme. Ce modèle expérimental permet d'obtenir des anévrysmes histologiquement comparables aux AI humains (**Figure 11**) avec des tailles d'environ 5 à 10 mm de plus grand diamètre et un collet d'environ 4 mm.

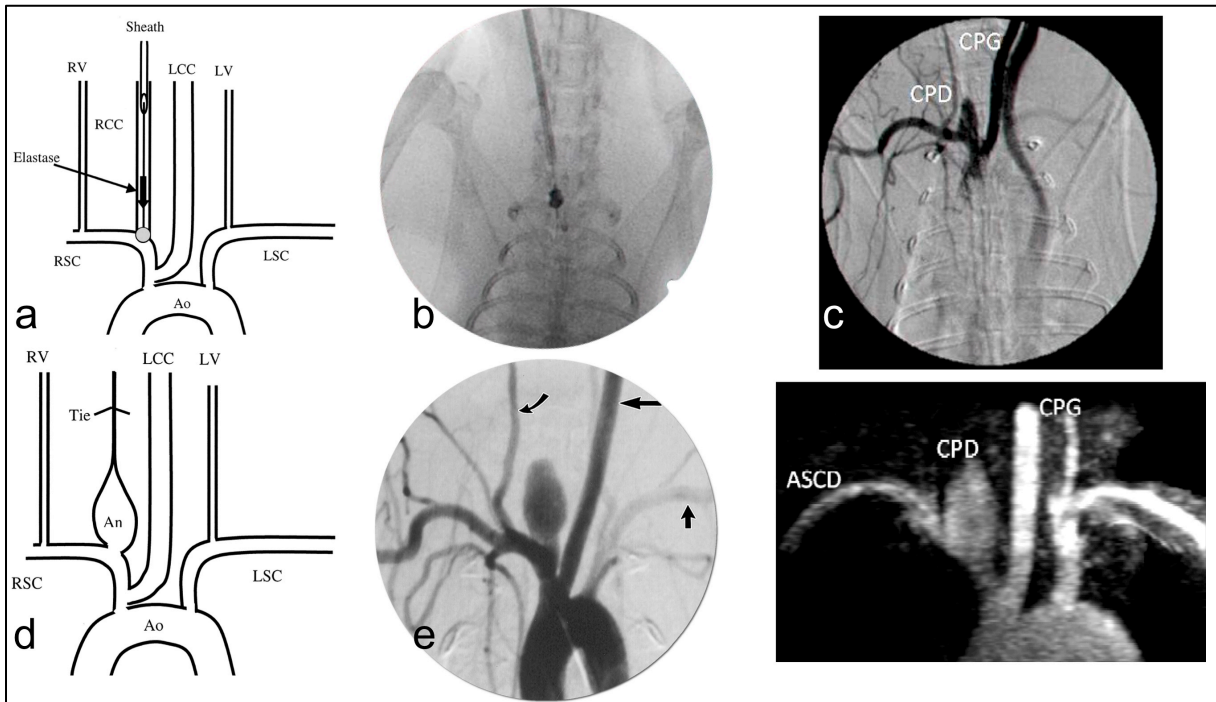


Figure 10: Modèle anévrysmal à l'élastase chez le lapin. Un désilet est inséré de façon rétrograde dans la RCC et un cathéter à ballon est inséré via le désilet et gonflé à l'origine de la RCC (a et b). Après 20 minutes d'incubation d'élastase et ligature de la RCC, on observe une lésion anévrysmale à l'origine de la RCC (c et d). Trois semaines après, on observe un anévrysme sacculaire à l'origine de la RCC (e. DSA et f. IRM TOF)
 RCC : carotide primitive droite ; LCC : carotide primitive gauche ; RSC : sous-clavière droite ; An : Anévrysme.

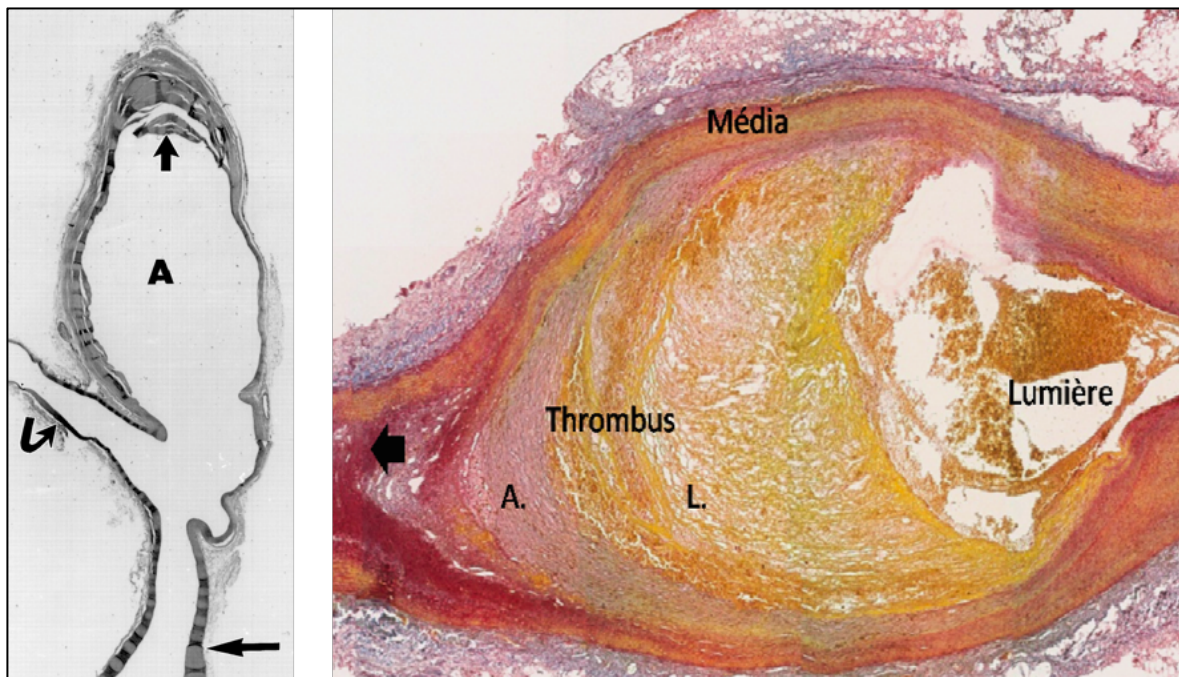


Figure 11: Aspect histologique d'un anévrysme induit à l'élastase chez le lapin. Important thrombus intra-anévrysmal, similairement à ce qui est communément observé dans les anévrysmes intracrâniens chez l'homme (Coloration Picro -Orcein, Hamamatsu nanozoomer) ; Image issue de Rouchaud et al¹⁵⁸.

II- Les Flow-diverters

1. Principe et efficacité

a. Revue de la littérature

En avril 2011 la FDA autorisait aux Etats-Unis l'utilisation *flow-diverters* pour le traitement d'anévrismes larges (taille supérieure à 10 mm), à large collet (supérieur à 4 mm), de l'artère carotide interne entre le sinus caverneux et l'artère hypophysaire supérieure.

En France, les recommandations retenues par l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé) en Novembre 2011, autorisent l'utilisation des *flow-diverters* pour :

- les anévrismes intracrâniens non rompus, sacciformes ou fusiformes, dont le diamètre du sac anévrysmal est supérieur à 15 mm et inaccessibles aux thérapeutiques actuelles (traitement endovasculaire par coils assisté ou non d'un stent; ou traitement chirurgical).

- la prise en charge des anévrismes déjà traités ayant une recanalisation mesurant plus de 7 mm de diamètre et non accessibles au traitement habituel.

L'utilisation actuelle des *flow-diverters* est étendue à tous les anévrismes intracrâniens non rompus et plus particulièrement les anévrismes larges et géants, les anévrismes à collet large, les anévrismes fusiformes, les anévrismes disséquants et les recanalisations, c'est à dire aux lésions dont le traitement par coils n'est pas envisageable ou présente un risque d'échec élevé. Au-delà de ces indications, les *flow-diverters* sont de plus en plus utilisés dans des artères plus distales de plus petit calibre ou pour le traitement d'anévrismes de bifurcation^{131, 178}. Les *flow-diverters* peuvent également parfois être utilisés en phase aigüe d'une hémorragie cérébrale. Malgré la nécessité de double anti-agrégation inhérente à l'utilisation d'un stent, les *flow-diverters* peuvent constituer une alternative envisageable notamment dans les cas d'anévrismes disséquants ou de blister anévrysmes, trop petits pour envisager un traitement par coils^{111, 179, 180}.

La plupart des séries publiées ont montré de bons résultats en terme d'occlusion anévrysmale avec des taux d'occlusion complète allant jusqu'à 95%¹⁸¹⁻¹⁸⁵. Deux méta-analyses publiées en 2013 ont rapporté une efficacité importante des *flow-diverters* pour le traitement des AI avec 76% d'occlusion totale des anévrismes à 6 mois et une morbi-mortalité aux alentours de 9 à 10 %^{109, 186}. Nous avons également publié une revue rapportant les principales données publiées sur les *flow-diverters* pour le traitement des AI¹⁸⁷.

Ces résultats cliniques et angiographiques sont tout à fait encourageants, cependant peu de données sont disponibles pour expliquer les cas de non-occlusion (24% d'occlusion incomplète à 6 mois^{109, 186}) et les mécanismes biologiques liés à la cicatrisation ou au contraire à la non-occlusion des anévrysmes traités par *flow-diverters*. De plus, des complications liées à l'utilisation des *flow-diverters* ont été rapportées, notamment en rapport avec l'occlusion de branches artérielles couvertes par le dispositif^{112, 129, 188} ou des cas rares mais graves de ruptures secondaires de l'anévrysme¹⁸⁹.

Comme nous le rappelions, le traitement par *flow-diverter* consiste en la mise en place par voie endovasculaire d'un stent auto-expansible à mailles très serrées dans l'artère porteuse en regard du collet de l'anévrysme, réduisant de manière importante le flux entrant dans le sac anévrysmal, entraînant sa thrombose et son exclusion de la charge hémodynamique sans introduire aucun matériel au sein de l'anévrysme¹⁰⁸⁻¹¹². Le déploiement d'un *flow-diverter* permet de rediriger le flux vers l'artère porteuse avec augmentation de la conductance longitudinale. Cependant, à la différence d'un stent couvert, les *flow-diverters* sont un treillis perméable permettant de maintenir la perfusion de collatérales couvertes. Ce caractère perméable du stent qui est indispensable, a cependant un inconvénient majeur car il est responsable d'une exclusion incomplète du sac anévrysmal avec persistance d'un certain degré de conductance radiale à travers les pores du stent. La taille des pores des *flow-diverters* est variable d'un dispositif à l'autre et fonction de l'anatomie et du degré de compaction mais selon les études de Gentric et al., la surface de la cellule unitaire varie de 0.02 à 0.05 mm²¹⁹⁰, permettant aux cellules circulantes du sang de passer à travers les interstices et de continuer à alimenter le thrombus intra-anévrysmal. La collision des cellules piégées à l'intérieur du sac anévrysmal peut être responsable de l'activation des polynucléaires neutrophiles de l'activité protéolytique du thrombus intra-anévrysmal dont nous analyserons le potentiel impact délétère.

De plus la taille des pores joue un rôle crucial en cas de couverture d'artères perforantes ou de branches collatérales par le *flow-diverter*¹⁹¹. Les *flow-diverters* sont conçus pour assurer une couverture suffisante au collet de l'anévrysme pour isoler la lésion de la circulation, mais être suffisamment poreuse pour préserver la perméabilité, au travers des mailles du dispositif, des vaisseaux collatéraux couverts par le *flow-diverter*^{112, 129, 188, 191}. Le flux dans les branches couvertes est régi par des régimes de flux et de pression différents de ceux dans l'anévrysme. En effet, comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce travail, le flux intra-anévrysmal est un flux turbulent, vortexiel, avec des phénomènes d'entrées et de ré-entrées du flux^{33, 34, 192} alors que le flux dans les branches artérielles couvertes est un flux

laminaire provoquant un effet aspiratif¹⁹³. Ceci a été étudié par histologie suite au déploiement de *flow-diverters* dans des aortes de lapins, démontrant des défauts d'endothélialisation du dispositif, de forme circulaire, en regard des ostia des artères lombaires couvertes par le *flow-diverter*¹¹⁰. Plusieurs études cliniques ont rapporté l'incidence des occlusions d'artères couvertes par des *flow-diverters*^{125-128, 194-203}.

Nous aborderons dans les sections suivantes les mécanismes biologiques impliqués dans l'efficacité du traitement par *flow-diverter* ainsi que les processus impliqués dans les cas d'occlusion d'artères couvertes par le stent. Enfin, nous discuterons les phénomènes biologiques engagés dans les cas de ruptures secondaires.

b. Mécanismes biologiques impliqués dans la cicatrisation des anévrismes traités par flow-diverter : Analyse par séquençage de l'ARN

Comme précédemment discuté, les mécanismes biologiques de la physiopathologie des anévrismes sont mal connus, y compris les mécanismes de formation, de rupture, de croissance, de cicatrisation ou de complications liées aux dispositifs. En effet, les dispositifs endovasculaires utilisés pour le traitement des AI ne sont pas simplement des dispositifs mécaniques inertes utilisés pour isoler l'anévrisme de la circulation sans aucune interaction avec l'hôte, mais au contraire ils interagissent par différents processus biologiques dans le but de cicatrifier et guérir définitivement l'anévrisme. Ces interactions biologiques peuvent varier en fonction du dispositif utilisé ou en fonction des conditions biologiques et hémodynamiques locales et conduire parfois à une non-occlusion de l'anévrisme ou à des complications très rares mais dévastatrices telles qu'une rupture retardée après traitement par *flow-diverter*^{189, 204, 205}. **Il est primordial de comprendre les processus biologiques mis en jeu après un traitement endovasculaire afin d'optimiser les dispositifs utilisés pour le traitement de l'AI et d'essayer d'en éviter les complications potentielles.**

Certaines études antérieures ont exploré les mécanismes de cicatrisation des anévrismes après traitement endovasculaire, mais se sont surtout concentrées sur les niveaux tissulaire, cellulaire ou moléculaire^{61, 70, 115, 152, 158, 206-209}. Comme nous l'avons vu précédemment, le traitement par coils implique initialement la formation d'un thrombus dans le sac anévrysmal, puis favorise la formation de néo-intima au niveau du collet pour isoler la cavité anévrysmale de la circulation^{70, 210, 211}, cependant les taux d'occlusion à long terme sont décevants avec des taux de recanalisation élevés en raison du manque de cicatrisation des anévrismes^{86, 107}. A l'inverse, le taux d'occlusion définitive des anévrismes traités par *flow-diverters* est très élevé avec une cicatrisation impliquant l'endothélialisation du stent à partir des cellules endothéliales de l'artère porteuse^{70, 115, 212, 213}. Cependant, même si cette complication est très rare et se produit dans moins de 1% des cas, plusieurs cas de ruptures anévrysmales retardées ont été rapportés avec l'utilisation des *flow-diverters*^{189, 205}. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cette complication, comme les modifications de flux²⁰⁴ ou un impact délétère du caillot intra-anévrysmal engendré par le déploiement du *flow-diverter*¹⁸⁹. **Il existe une controverse autour des mécanismes impliqués dans la survenue de ruptures anévrysmales retardées après des *flow-diverters* et il semble important d'essayer de les expliquer.**

Des études génétiques préalables ont étudié l'impact de certaines molécules clés, telles que les metallopeptidases, la fibronectine ou le collagène potentiellement impliquées dans la cicatrisation des anévrysmes²¹⁴⁻²¹⁹. D'autres ont comparé l'expression après traitement par coils ou *flow-diverter* de certains gènes sélectionnés mais n'ont pas donné un aperçu global des voies biologiques impliquées dans ces différentes options de traitement²²⁰. Récemment, plusieurs études ont utilisé le séquençage de l'ARN messager et des microRNA (RNA-seq) pour essayer d'élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans la cicatrisation des anévrysmes^{221, 222}. Cependant, aucune de ces études n'a comparé les anévrysmes coilés à ceux traités par *flow-diverter*²²³. **Afin d'avoir un aperçu global des mécanismes biologiques impliqués, nous avons réalisé une étude utilisant la technologie de séquençage de l'ARN pour identifier les différences entre les anévrysmes traités par coils ou *flow-diverter* dans le modèle d'anévrysme à l'élastase chez le lapin.**



Article 1 : Rouchaud A, Johnson C, Thielen E; Schroeder D, Ding YH, Dai D, Brinjikji W, Cebal J, Kallmes DF, Kadirvel R. Differential Gene Expression In Coiled Versus Flow-diverter-Treated Aneurysms: A RNA sequencing Analysis In Rabbit Aneurysm Model. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2015 Dec 31. [Epub ahead of print]²²⁴

Les parties Méthodes et Résultats sont présentées dans le PDF de l'article.

Cette étude a mis en évidence une expression différentielle de gènes spécifiques, lors de la comparaison de tissus provenant d'anévrysmes traités par coils par rapport à ceux traités par *flow-diverters* ou par rapport aux anévrysmes non traités.

Les gènes exprimés de manière différentielle faisaient principalement partie des groupes liés à la réponse inflammatoire et à la migration cellulaire. Ces résultats sont encourageants pour fournir un aperçu des effets biologiques et également mettre en évidence les voies à analyser afin de mieux comprendre et optimiser les résultats après traitement endovasculaire pour les AI.

Nos résultats ont montré que seulement 13 sur 9982 (0,13%) gènes ont été identifiés comme étant différentiellement exprimés lors de la comparaison entre les anévrysmes traités par coils par rapport à ceux traités par *flow-diverter*. Cela met en évidence le fait que, malgré

deux approches différentes, les réponses aux dispositifs utilisés pour le traitement endovasculaire de l'AI ne sont pas très différentes. Ceci montre que les modifications des gènes observées sont principalement conduites par l'anévrisme lui-même plutôt que par le dispositif et supposent que les mécanismes conduisant à l'occlusion de l'anévrisme sont à peu près similaires quel que soit le dispositif utilisé.

Ces dispositifs favorisent le remodelage de la paroi artérielle par l'implication de différentes métallopeptidases (MMP), notamment MMP1, MMP12 et MMP13. Les métallopeptidases sont connues pour être impliquées dans l'homéostasie du thrombus intracrânien, mais principalement la MMP2 et la MMP9 ont été décrites dans cette pathologie^{42, 44, 225, 226}. Une des raisons pour lesquelles les précédentes études ont essentiellement rapporté l'importance de la MMP-9 plutôt que celle des autres MMP est que la MMP-9 est très diffusible et peut donc être mesuré dans le sang circulant, alors que la MMP-12 ne diffuse pas et s'accroche intensément au tissu. De ce fait, la mesure de l'expression de la MMP-12 nécessite d'avoir accès au tissu car elle ne diffuse pas et n'est pas mesurable dans le sang circulant.

Cette étude met en évidence le rôle important d'autres MMP (MMP1, 12 et 13) qui ont été rapportées comme étant impliquées dans la formation, l'évolution et la stabilisation des anévrysmes de l'aorte abdominale (AAA)²²⁷⁻²³⁹. Cependant, leur impact a été moins décrit dans le cadre de AI sauf un rapport de Zhang et al²³⁶ qui avait mis en évidence le rôle de MMP1 et MMP12 dans la rupture des AI. Le séquençage ARN de notre étude a également découvert que la basigine (également connue sous le nom d'inducteur de métalloprotéinases de la matrice extracellulaire: EMMPRIN) est régulée à la hausse dans les anévrysmes traités par *flow-diverter* comparativement à ceux traités par coils. Cette molécule est impliquée dans la régulation de différentes MMP, en particulier MMP2 et MMP9^{240, 241}. L'expression accrue de basigine dans les anévrysmes traités par *flow-diverter* pourrait expliquer le niveau plus élevé des MMP 2 et 9 dans ces anévrysmes, comme décrit précédemment²²⁰.

De plus, le gène MARCO (Macrophage Receptor with Collagenous Structure) est également différentiellement exprimé dans notre étude. Cette molécule est associée aux anévrysmes sans thrombus intra-sacculaire dans une étude comparant des anévrysmes de l'aorte abdominale avec ou sans thrombus intra-anévrysmal²⁴². Dans notre étude, nous avons observé une régulation négative de MARCO dans le groupe *flow-diverter*, ce qui suggère une implication accrue de la thrombose intra-anévrysmale par rapport aux anévrysmes non traités et le rôle potentiel du thrombus intra-anévrysmal pour la rupture anévrysmale retardée associée aux *flow-diverters*^{189, 243}.

Dans notre étude, la molécule la plus sur-exprimée indépendamment du type de dispositif utilisé pour le traitement des anévrysmes, est la kératine 8, une molécule extracellulaire agissant comme un site de liaison pour le plasminogène²⁴⁴. Cette surexpression des récepteurs du plasminogène pourrait être délétère pour les anévrysmes traités. En effet, l'association du plasminogène avec les récepteurs cellulaires facilite son activation en plasmine^{245, 246}. La plasmine produite à partir du plasminogène est capable de dégrader directement ou indirectement les composants de la matrice extracellulaire en activant les pro-MMP (MMP-1, 2 3 et 9) en MMP actives^{247, 248}. L'hyper-expression de la kératine 8 dans les anévrysmes traités par *flow-diverter* pourrait avoir un rôle potentiellement délétère car la production de plasmine va induire l'agrégation des neutrophiles, la chimiotaxie des monocytes et l'expression de molécules pro-inflammatoires²⁴⁹ par l'intermédiaire de multiples voies de signalisation, notamment le facteur nucléaire κ B (NF- κ B)²⁵⁰. Cette implication du système fibrinolytique a été précédemment mise en évidence dans la physiopathologie des anévrysmes de l'aorte abdominale²⁵¹. Dans les anévrysmes de l'aorte abdominale, il a été décrit que le plasminogène est présent en grande quantité dans le thrombus mural⁴⁹. Ce thrombus mural, en emprisonnant les leucocytes et en adsorbant les composants plasmatiques, est une source de protéases qui jouent un rôle critique dans l'élargissement et la rupture des anévrysmes^{49, 243}. De plus, le diamètre des anévrysmes de l'aorte abdominale est corrélé avec la quantité de plasmine dans la paroi de l'anévrysme⁴⁹. La surexpression de la kératine 8 dans les anévrysmes intracrâniens traités par *flow-diverter* pourrait être une explication pour les cas de ruptures retardées. Cette surexpression de la kératine 8 associée à une grande quantité de thrombus intra-sacculaire après placement du *flow-diverter* soutient que la thrombose intra-anévrysmale est une cause possible de rupture retardée d'anévrysme après un traitement par *flow-diverter*¹⁸⁹, toutefois la confirmation de cette hypothèse nécessite la réalisation d'expérimentations complémentaires pour préciser le rôle de la kératine 8.

Également en lien avec l'inflammation des anévrysmes, notre étude a révélé que l'Apeline est régulée à la hausse dans les anévrysmes traités par *flow-diverter* comparativement aux anévrysmes traités par coils. Cette molécule réduit significativement la formation d'anévrysme dans le modèle d'anévrysme de l'aorte abdominale à l'élastase avec une charge de macrophages réduite, secondaire à une diminution, médiée par l'Apeline, de l'activation des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines²⁵²⁻²⁵⁵. Il a également été démontré que l'Apeline est présente à un degré limité dans les cellules endothéliales, avec une puissante aptitude à stimuler la prolifération de cellules endothéliales de veine ombilicale humaine en culture²⁵⁶. Du et al., dans une étude sur l'intervention coronarienne percutanée et

l'implantation d'un stent à élution médicamenteuse, ont démontré que la régulation positive de l'Apeline après l'angioplastie pouvait faciliter l'auto-renouvellement de l'endothélium coronaire et accélérer la récupération structurelle après une lésion vasculaire²⁵⁷. Dans notre étude, l'Apeline est surexprimée dans les anévrysmes traités par *flow-diverter* comparativement aux anévrysmes traités par coils, ce qui est potentiellement un facteur clé pour la promotion des cellules endothéliales, conduisant à l'endothélialisation de l'endoprothèse vasculaire et à l'occlusion de l'anévrysme.

Une autre fonction importante pour l'occlusion d'un anévrysme après un traitement endovasculaire est la cicatrisation pariétale, consistant successivement en la formation d'un thrombus, l'invasion par des myofibroblastes et un dépôt de matrice extracellulaire^{70, 214, 258}. La CLEC7A (Dectine 1) est une molécule favorisant la cicatrisation par la production accrue de matrice de collagène et de bêta-glycanes²⁵⁹⁻²⁶¹. Nos résultats montrent que la Dectine 1 est environ quatre fois plus exprimée dans les anévrysmes traités par coils que dans ceux traités par *flow-diverter*. Cela suggère que la cicatrisation pariétale est un processus qui est beaucoup plus prépondérant avec les coils qu'avec les *flow-diverters*. Le FGFBP1 est une autre molécule favorisant la cicatrisation²⁶²⁻²⁶⁴. Les résultats de notre étude montrent que FGFBP1 est diminué dans les anévrysmes traités par *flow-diverter*, soutenant que l'occlusion d'un anévrysme après *flow-diverter* n'est pas liée aux mécanismes de cicatrisation, mais surtout à la prolifération des cellules endothéliales provenant de l'artère porteuse comme précédemment démontré¹¹⁵.

Nous avons également identifié une autre molécule d'intérêt, l'HHIP (Hedgehog Interacting Protein), qui est abondamment exprimée dans les cellules endothéliales vasculaires et impliquée dans l'angiogenèse²⁶⁵. Nous avons observé dans notre étude que l'expression de l'HHIP est régulée à la baisse dans les anévrysmes traités par coils. La régulation négative de l'HHIP est impliquée dans la promotion de l'angiogenèse et pourrait promouvoir la néovascularisation de la matrice fibrino-collagénique intra-anévrysmale lors de la guérison des anévrysmes traités par coils^{70, 266}.

Le but de cette étude était de donner un aperçu général des modifications des gènes après traitement par coils et *flow-diverter*. Cette étude identifie de nouveaux paramètres à explorer qui pourraient être des facteurs-clés pour l'amélioration des dispositifs endovasculaires. Ceci nécessitera une validation complémentaire avec des expériences spécifiques pour décrire précisément le rôle de chaque molécule d'intérêt.











Limites

Nous avons dans cette étude utilisé le modèle d'anévrisme à l'élastase chez le lapin qui comme tous les modèles animaux est imparfait pour prédire la réponse chez l'Homme. En effet, les anévrysmes expérimentaux créés chez les lapins se trouvent dans le médiastin plutôt que dans l'espace sous-arachnoïdien et sont donc sujets à différentes modulations péri-anévrysmales par rapport aux anévrysmes sacciformes intracrâniens. Une autre limitation dans l'utilisation d'un modèle est le degré élevé d'homogénéité parmi les différents anévrysmes, ce qui n'est pas le cas avec des anévrysmes intracrâniens chez l'homme. Cependant, ce modèle a été évalué par séquençage ARN (RNA-seq) et présente des expressions protéiques semblables aux anévrysmes intracrâniens humains²²¹. De plus, ce modèle d'anévrisme n'est pas un modèle de rupture spontanée et certaines voies biologiques peuvent différer lorsqu'on considère les anévrysmes susceptibles de rupture. Pour explorer ces mécanismes, il pourrait être intéressant d'analyser les expressions des gènes dans de nouveaux modèles d'anévrysmes actifs avec une inflammation de la paroi ou in thrombus actif^{48, 267}. Enfin, les intervalles de temps entre la création de l'anévrisme et le sacrifice des animaux étaient différents entre les anévrysmes traités et non-traités ce qui peut constituer un biais. Compte tenu des différences entre le génome humain et le génome du lapin, les résultats observés peuvent ne pas être directement applicables à la clinique. Comme pour la plupart des études d'expression génique, nous reconnaissons que les résultats obtenus sont de nature exploratoire et nécessitent d'être validés ; dans ce but, nous avons validé un certain nombre de résultats par RT-PCR mais les autres résultats devront également être validés dans des études animales. De même, en raison de variations aléatoires, il se peut que nos seuils de détections appliqués n'aient pas permis de mettre en évidence de différence même si celles-ci pourraient avoir une influence chez l'homme. Enfin, ce n'est pas parce qu'un gène n'est pas régulé à la hausse qu'il n'est pas pertinent. De même, une variation de l'expression d'un gène n'est pas forcément en rapport avec la question biologique posée. Le but de cette étude était de fournir une vue d'ensemble générale de l'expression des gènes après le traitement par coils ou *flow-diverter* et non pas de décrire chacune des variations suite à l'embolisation par coils ou *flow-diverter* ni pour identifier et se focaliser sur des voies de signalisation ou molécules spécifiques. Cette étude identifie de nouveaux paramètres à explorer qui pourraient potentiellement être des facteurs clés à cibler pour améliorer les dispositifs endovasculaires. Ceci nécessitera une validation supplémentaire avec des expériences spécifiques pour décrire précisément le rôle de chaque molécule d'intérêt.

Conclusion

L'analyse par séquençage de l'ARN des anévrysmes de lapin a montré que, malgré différentes approches endovasculaires (coils ou *flow-diverter*), la réponse au dispositif utilisé pour le traitement endovasculaire de l'AI ne varie pas substantiellement et que les mécanismes conduisant à l'occlusion de l'anévrysme sont à peu près similaires quel que soit le dispositif utilisé. Cependant, la régulation différentielle de certaines voies-clés, y compris l'inflammation et la migration cellulaire pourraient expliquer les différents mécanismes biologiques impliqués dans la guérison des anévrysmes après traitement soit par coils soit par *flow-diverter* et pourraient être des molécules-clés à explorer afin d'expliquer et prévenir les complications. Cette étude confirme que le phénomène de cicatrisation est prépondérant après traitement par coils comparativement aux anévrysmes traités par *flow-diverter*. En outre, cette étude a identifié dans les anévrysmes traités par *flow-diverter* une surexpression de la Kératine 8 et de la Basigine, impliquées dans la réponse inflammatoire et dans le système plasminergique.

Differential Gene Expression in Coiled versus Flow-Diverter-Treated Aneurysms: RNA Sequencing Analysis in a Rabbit Aneurysm Model

 A. Rouchaud,  C. Johnson,  E. Thielen,  D. Schroeder,  Y.-H. Ding,  D. Dai,  W. Brinjikji,  J. Cebal,  D.F. Kallmes, and  R. Kadirvel



ABSTRACT

BACKGROUND AND PURPOSE: The biologic mechanisms leading to aneurysm healing or rare complications such as delayed aneurysm ruptures after flow-diverter placement remain poorly understood. We used RNA sequencing following implantation of coils or flow diverters in elastase aneurysms in rabbits to identify genes and pathways of potential interest.

MATERIALS AND METHODS: Aneurysms were treated with coils ($n = 5$) or flow diverters ($n = 4$) or were left untreated for controls ($n = 6$). Messenger RNA was isolated from the aneurysms at 4 weeks following treatment. RNA samples were processed by using RNA-sequencing technology and were analyzed by using the Ingenuity Pathway Analysis tool.

RESULTS: With RNA sequencing for coiled versus untreated aneurysms, 464/9990 genes (4.6%) were differentially expressed (58 down-regulated, 406 up-regulated). When we compared flow-diverter versus untreated aneurysms, 177/10,041 (1.8%) genes were differentially expressed (8 down-regulated, 169 up-regulated). When we compared flow-diverter versus coiled aneurysms, 13/9982 (0.13%) genes were differentially expressed (8 down-regulated, 5 up-regulated). Keratin 8 was overexpressed in flow diverters versus coils. This molecule may potentially play a critical role in delayed ruptures due to plasmin production. We identified overregulation of apelin in flow diverters, supporting the preponderance of endothelialization, whereas we found overexpression of molecules implicated in wound healing (dectin 1 and hedgehog interacting protein) for coiled aneurysms. Furthermore, we identified metalloproteinases 1, 12, and 13 as overexpressed in coiled versus untreated aneurysms.

CONCLUSIONS: We observed different physiopathologic responses after endovascular treatment with various devices. Flow diverters promote endothelialization but express molecules that could potentially explain the rare delayed ruptures. Coils promote wound healing and express genes potentially implicated in the recurrence of coiled aneurysms.

ABBREVIATIONS: *DAPL1* = death associated protein-like 1; *FGFBP1* = fibroblast growth factor binding protein 1; *HHIP* = hedgehog-interacting protein; IA = intracranial aneurysm; *IL6* = interleukin 6; IPA = Ingenuity Pathway Analysis; *MMP* = matrix metalloproteinase; mRNA = messenger RNA; *PRND* = prion protein 2; RNA-seq = RNA sequencing; *SRCIN1* = SRC kinase signaling inhibitor 1

Endovascular treatment is now considered the standard of care for most intracranial aneurysms (IAs). Numerous endovascular tools exist for the treatment of IAs, and flow-diverting devices


have elicited much interest, with good occlusion rates.¹ However, the biologic mechanisms driving IA physiopathology remain poorly understood, including the mechanisms for formation, rupture, growth, healing, or device-related complications, and need further elucidation. Indeed, endovascular devices used for the treatment of IAs are not simply inert mechanical devices used to seal the aneurysm neck without any interaction with the host; rather, they interact with different biologic processes with the aim of definitely healing the aneurysm. Those biologic interactions may vary according to the device used or depending on the local biologic conditions and sometimes lead to nonocclusion of the aneurysm or to very rare but devastating complications such as delayed rupture.²⁻⁴ It is important to understand the biologic processes after endovascular treatment to optimize the devices used for the treatment of IAs and try to prevent potential complications.


Received September 16, 2015; accepted after revision November 10.

From the Applied Neuroradiology Laboratory (A.R., C.J., E.T., D.S., Y.-H.D., D.D., W.B., D.F.K., R.K.) and Department of Radiology (W.B., D.F.K.), Mayo Clinic, Rochester, Minnesota; and Department of Bioengineering (J.C.), George Mason University, Fairfax, Virginia.

This work was supported by research grant NS076491 from the National Institutes of Health. Aymeric Rouchaud was supported by a research grants from the French Society of Radiology and the Therese Planiol Foundation.

Please address correspondence to Aymeric Rouchaud, MD, Neuroradiology Research Laboratory, Mayo Clinic, 200 First St SW, Rochester, MN 55905; e-mail: Rouchaud.Aymeric@mayo.edu, aymeric.rouchaud@gmail.com

 Indicates open access to non-subscribers at www.ajnr.org

 Indicates article with supplemental on-line tables.

<http://dx.doi.org/10.3174/ajnr.A4648>

Previous studies explored the mechanisms of aneurysm healing following endovascular treatments, but they have mostly focused at the tissue, cellular, or molecular levels.⁵⁻⁷ Endovascular coiling primarily elicits thrombus formation in the aneurysm cavity and then promotes neointima formation across the neck to seal the aneurysm cavity from the circulation,^{5,8} but long-term occlusion rates are poor, with high rates of recanalization due to lack of aneurysm healing.^{9,10} On the contrary, occlusions rates following flow diversion are high and likely driven by endothelialization of the device from endothelial cells originating from the parent artery.^{6,11} However, despite high rates of occlusion and good clinical outcomes,⁵ flow-diverter devices have been associated with the occurrence of previously unobserved complications. Indeed, several cases of delayed aneurysm rupture have been reported with fatal outcomes.^{3,4}

Even if this complication is very rare and occurs in <1% of cases, controversy exists surrounding the mechanism, and it appears important to try to explain it. Several mechanisms have been proposed to explain this complication, such as flow modifications² or a deleterious impact of the intra-aneurysm thrombus trapped by the flow diverter.³ Gene-regulation studies have previously investigated the impact of selected key molecules such as metalloproteinases, fibronectin, and collagen, potentially involved in the healing of aneurysms following coil or flow-diverter embolization.¹²⁻¹⁴ However, these prior studies did not provide a global overview of the biologic pathways involved in those different treatment options.¹⁵ Recently, microarray and RNA sequencing (RNA-seq) have been used to compare messenger RNA (mRNA) and microRNA expression in both humans and animal models to better understand the molecular mechanisms of aneurysm healing.^{16,17} However, none of these previous studies have compared coiled or flow-diverter-treated aneurysms.¹⁸ We used RNA-seq technology following implantation of coils or flow diverters in elastase-induced saccular aneurysms in rabbits to identify genes and pathways of potential clinical interest and to determine whether differential pathways exist for the healing of coiled and flow-diverter-treated aneurysms.

MATERIALS AND METHODS

Aneurysm Creation, Treatment, and Follow-Up

The Mayo Clinic Animal Care and Use Committee approved all procedures before initiation of the study. Some of the rabbits used in this study were originally used as part of another investigation, in which we compared the gene expression between untreated aneurysms with contralateral carotid arteries¹⁶ and prior analyses of the expression of selected vascular remodeling molecules following coil and flow-diverter treatment.¹⁵ Elastase-induced saccular aneurysms were created in 16 New Zealand white rabbits (body weight, 3–4 kg). Detailed procedures for aneurysm creation have been previously described in depth.¹⁹ Aneurysms were permitted to mature for at least 3 weeks after creation. Then they were either embolized with platinum coils ($n = 5$) or treated with flow diverters (Pipeline Embolization Device; Covidien, Irvine, California) as previously described²⁰ ($n = 4$) or left untreated ($n = 6$). At 4 weeks following treatment, follow-up DSA of the

aortic arch was performed. The animals were then euthanized by using a lethal injection of pentobarbital. Animals with untreated aneurysms were euthanized at 12 weeks following aneurysm creation. The aneurysm samples were harvested, and the samples were immediately snap frozen in liquid nitrogen and kept frozen at -70°C until use.

RNA Extraction

RNA was isolated from frozen tissues by using the miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, California). The quantity of the RNA was measured by using spectrophotometry, and the integrity of the RNA was confirmed by electrophoretic separation by using the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, California).

RNA Sequencing

RNA libraries were prepared according to the manufacturer's instructions for the TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 (Illumina, San Diego, California). Then the libraries were loaded onto paired end-flow cells following the standard protocol of Illumina by using the cBot and cBot Paired-End Cluster Kit, Version 3, and HCS, Version 2.0.12 data collection software (Illumina). Base calling was performed by using RTA, Version 1.17.21.3 (Illumina).

Bioinformatics Analysis

The processing of the mRNA and microRNA data was performed by using MAP-RSeq (Version 1.2.1.3).²¹ MAP-RSeq consists of the following steps: alignment, quality control, obtaining genomic features per sample, and finally summarizing the data across samples. The pipeline provides detailed quality control data to estimate the distance between paired-end reads, evaluates the sequencing depth for alternate splicing analysis, determines the rate of duplicate reads, and calculates the read depth across genes by using the RSeQC (Version 2.3.2)²² software. Paired-end reads are aligned by Tophat (Version 2.0.6; <https://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml>)²³ against the April 2009 OryCun2 genome build by using the Bowtie1.aligner²⁴ option (<http://www.broadinstitute.org/cancer/software/genepattern/modules/docs/Bowtie.aligner/4>). Gene counts were generated by using HTSeq (Version 0.5.3p9)²⁵ software, and the gene annotation files were obtained from Ensembl (ftp://ftp.ensembl.org/pub/release75/gtf/oryctolagus_cuniculus/Oryctolagus_cuniculus.OryCun2.0.75.gtf.gz) and the University of California, Santa Cruz (<http://hgdownload.soe.ucsc.edu/downloads.html#rabbit>). Differential expression comparing the normal tissue versus aneurysm in the same rabbit was computed by using the edgeR algorithm (Version 2.6.2) across all samples. Human orthologs were assigned by using ExoLocator (<http://exolocator.bii.a-star.edu.sg/>).²⁶ The pathway analysis leveraged the Ingenuity Pathway Analysis (IPA; <http://www.winsite.com/ingenuity/ingenuity+pathway+analysis/>)²⁷ software to identify pathways enriched with human ortholog targets. IPA identified the involvement of different pathways according to the number of genes of the specific pathway that were differentially expressed in the compared groups. A pathway is considered more involved than another one if more genes of this specific pathway are found up- or down-regulated according to the prespecified values.

Table 1: Top up- and down-regulated molecules comparing coiled versus untreated aneurysms, determined by IPA^a

Top Up-Regulated Molecules			Top Down-Regulated Molecules		
Gene Name	Description	Exp. Value	Gene Name	Description	Exp. Value
<i>MMP1</i>	Matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	8.407	<i>SRCIN1</i>	SRC kinase signaling inhibitor 1	-4.210
<i>MAP3K19</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 19	7.854	<i>DAPL1</i>	Death associated protein-like 1	-3.922
<i>TREML2</i>	Triggering receptor expressed on myeloid cells-like 2	7.583	<i>HHIP</i>	Hedgehog interacting protein	-3.512
<i>FGF23</i>	Fibroblast growth factor 23	7.423	<i>MPZ</i>	Myelin protein zero	-3.400
<i>MMP13</i>	Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)	7.201	<i>MYH7B</i>	Myosin, heavy chain 7B, cardiac muscle, β	-3.342
<i>SLAMF7</i>	SLAM family member 7	6.670	<i>PCDHAC2</i>	Protocadherin α subfamily C, 2	-3.112
<i>CXCL13</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 13	6.490	<i>THrsp</i>	Thyroid hormone responsive	-3.089
<i>XDH</i>	Xanthine dehydrogenase	6.298	<i>CYP2D6</i>	Cytochrome P450, family 2, subfamily D, polypeptide 6	-2.991
<i>IBSP</i>	Integrin-binding sialoprotein	6.221	<i>USH2A</i>	Usher syndrome 2A (autosomal recessive, mild)	-2.932
<i>MMP12</i>	Matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)	6.206	<i>SORCS1</i>	Sortilin-related VPS10 domain containing receptor 1	-2.703

Note:—Exp. indicates expression.

^a Values are expressed as log-fold change.

Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis

The mRNA expression of selected genes was assessed by quantitative real-time polymerase chain reaction. These selected genes were prion protein 2 (*PRND*), fibroblast growth factor-23, matrix metalloproteinase (*MMP*) 1, SRC kinase signaling inhibitor 1 (*SRCIN1*), death associated protein-like 1 (*DAPL1*), and hedgehog-interacting protein (*HHIP*). Briefly, first, strand complementary DNAs were synthesized from 500 ng of total RNA by using a synthesis system (SuperScript III First-Strand Synthesis System; Invitrogen, Grand Island, New York). Then, real-time polymerase chain reaction was performed with a cycler (iCycler; Bio-Rad, Hercules, California) by using the SYBR Green PCR kit (Quantigen, Hilden, Germany). The specific primers were designed from corresponding sequences obtained from the GenBank by using a Web tool (Primer 3; <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>).

Statistical Analysis

The *t* test statistics and corresponding *P* values were used as a measure of the mean change in expression between the test and control groups relative to the variability. The primary assessment compared each treatment group versus the control group. We additionally had a secondary assessment comparing treatment groups against each other. The EdgeR tool was used to test for a normal distribution of the data. The *t* test-based *P* values were adjusted for multiple comparisons by using the false discovery rate multiple-correction approach.²⁸ Genes were considered differentially expressed in case of a fold change of 2 (a log-value of >2 was considered up-regulated, whereas a log-value of ≤ 2 was considered down-regulated), with a false discovery rate ≤ 0.1 and a *P* value < .05.

RESULTS

Coiled versus Untreated Aneurysms

All aneurysm treatments with coils were successful without any recurrence at follow-up. Using the criteria above for differential expression, we identified 464 of 9990 (4.6%) genes as being dif-

ferentially expressed compared with untreated aneurysms. Of these 464 genes, 58 were down-regulated and 406 were up-regulated (On-line Table 1). The most up- and down-regulated molecules are presented in Table 1. Of the 10 most up-regulated, 3 are metalloproteinases: *MMP1* (8.4-fold), *MMP12* (6.1-fold), and *MMP13* (7.2-fold) involved in the breakdown of extracellular matrix and interstitial collagen for tissue remodeling. The most down-regulated protein is *HHIP*, decreased 3.5-fold compared with untreated aneurysms. The most involved pathways are shown in On-line Table 2. Those pathways are generally related to inflammatory responses, including T- and B-cell and interleukin-10 involvement and cell-to-cell signaling as well as granulocyte and agranulocyte adhesion and diapedesis. Those pathways involve up-regulation of *MMPs* such as *MMP1*, *MMP3*, *MMP12*, *MMP13*, and interleukins.

Flow-Diverter-Treated versus Untreated Aneurysms

All aneurysm treatments with flow diverters were successful without any delayed rupture at follow-up. Using the criteria above for differential expression, we identified 177 of 10,041 (1.8%) genes as being differentially expressed. Of these 177 genes, 8 were down-regulated and 169 were up-regulated (On-line Table 3). The most up- and down-regulated molecules are presented in Table 2. Of the 10 most up-regulated, fibroblast growth factor 23 increased 5.7-fold, keratin 8 increased 6.2-fold, *MMP1* increased 4.5-fold, apelin increased 4.4-fold, and interleukin 6 (*IL6*) increased 4.4-fold compared with untreated aneurysms. Of the most down-regulated molecules, *DAPL1* decreased by 3.8-fold, *SRCIN1* decreased by 3.3-fold, macrophage receptor with collagenous structure decreased by 2.4-fold, and fibroblast growth factor binding protein 1 (*FGFBP1*) decreased by 2.2-fold. The most involved pathways are shown in On-line Table 4. The most involved pathway was the atherosclerosis signaling pathway with 9 up-regulated genes compared with nontreated aneurysms. Similar to coiled aneurysms, agranulocyte adhesion and diapedesis pathways and the cell-to-cell signaling pathway were involved with flow diverters.

Table 2: Top up- and down-regulated molecules comparing flow-diverted versus untreated aneurysms, determined by IPA^a

Top Up-Regulated Molecules			Top Down-Regulated Molecules		
Gene Name	Description	Exp. Value	Gene Name	Description	Exp. Value
<i>PRND</i>	Prion protein 2 (dublet)	8.719	<i>DAPL1</i>	Death associated protein-like 1	-3.752
<i>KRT8</i>	Keratin 8	6.233	<i>SRCIN1</i>	SRC kinase signaling inhibitor 1	-3.295
<i>FGF23</i>	Fibroblast growth factor 23	5.662	<i>FAM150A</i>	Family with sequence similarity 150, member A	-2.555
<i>SIRPB1</i>	Signal-regulatory protein β 1	5.463	<i>MARCO</i>	Macrophage receptor with collagenous structure	-2.396
<i>CXCL8</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 8	4.781	<i>LECT1</i>	Leukocyte cell derived chemotaxin 1	-2.373
<i>GPR158</i>	G protein-coupled receptor 158	4.747	<i>SCIN</i>	Scinderin	-2.287
<i>MMP1</i>	Matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	4.467	<i>FGFBP1</i>	Fibroblast growth factor binding protein 1	-2.183
<i>HMGA2</i>	High mobility group AT-hook 2	4.412	<i>MYH7B</i>	Myosin, heavy chain 7B, cardiac muscle, β	-2.107
<i>APLN</i>	Apelin	4.412			
<i>IL6</i>	Interleukin 6 (interferon, β 2)	4.375			

Note:—Exp. indicates expression.

^a Values are expressed as log-fold change.

Table 3: Top up- and down-regulated molecules comparing flow-diverted versus coiled aneurysms, determined by IPA^a

Top Up-Regulated Molecules			Top Down-Regulated Molecules		
Gene Name	Description	Exp. Value	Gene Name	Description	Exp. Value
<i>KRT8</i>	Keratin 8	4.266	<i>PDILT</i>	Protein disulfide isomerase-like, testis expressed	-4.172
<i>BSG</i>	Basigin/EMMPRIN	3.799	<i>LIPA</i>	Lipase A, lysosomal acid, cholesterol esterase	-3.820
<i>TLDC2</i>	TBC/LysM-associated domain containing 2	3.363	<i>EXPH5</i>	Exophilin 5	-2.872
<i>PRPH</i>	Peripherin	2.895	<i>ZNF483</i>	Zinc finger protein 483	-2.667
<i>RMRP</i>	RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease	2.671	<i>KLHL14</i>	Kelch-like family member 14	-2.470
			<i>CLEC7A</i>	C-type lectin domain family 7 member A	-2.451
			<i>TCN1</i>	Transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family)	-2.432
			<i>COL25A1</i>	Collagen, type XXV, α	-2.285

Note:—Exp. indicates expression.

^a Values are expressed as log-fold change.

Flow-Diverter-Treated versus Coiled Aneurysms

Using the criteria above for differential expression, we identified 13 of 9982 (0.13%) genes as being differentially expressed. Of these 13 genes, 8 were down-regulated and 5 were up-regulated (Table 3). Of the 13 differentially expressed molecules when comparing flow-diverter-treated IAs with coiled aneurysms, keratin 8 increased 4.3-fold, and basigin increased 3.8-fold. Protein disulfide isomerase-like was overexpressed in the coiled group compared with the flow-diverter group at 4.2-fold; and C-type lectin domain family 7, member A (also called dectin 1) was over-expressed 2.5-fold in the coiled group. Due to the low number of differentially expressed molecules when comparing coiled with flow-diverter-treated aneurysms, it was not possible to identify specific pathways differentially involved.

Validation of Microarray Data

Verification of differential gene expression in the aneurysm and control artery was performed in 5 selected genes from the top up- or down-regulated genes identified by RNA-seq. Those selected genes were *PRND*, fibroblast growth factor 23, *MMP1*, *SRCIN1*, *DAPL1*, and *HHIP*. Results obtained by reverse transcription polymerase chain reaction for gene expression levels varied in the same way and in comparable amplitude as those obtained with RNA-seq. Results of reverse transcription polymerase chain reaction are presented in On-line Table 5.

DISCUSSION

This study found differential expression in a large assortment of genes in tissue from coiled or flow-diverter-treated aneurysms compared with untreated aneurysms. The differentially expressed genes are mostly related to the inflammatory response and cellular migration. These findings may provide insight into the biologic effects of coils and flow diverters and highlight pathways to better understand and optimize the outcomes after endovascular treatment of intracranial aneurysms.

Our results showed that relatively few genes were differentially expressed when comparing coiled versus flow-diverter-treated aneurysms. These findings show that despite 2 different approaches, the response to the device used for the endovascular treatment of IAs did not vary substantially. These findings further demonstrate that the observed gene modifications were mostly driven by the aneurysm itself rather than by the device and imply that the mechanisms leading to aneurysm occlusion are somewhat similar, regardless of the device used. However, some genes were differentially expressed in the flow-diverter-treated group compared with the coiled group.

Specifically, the most up-regulated molecule was keratin 8, which acts as a binding site for plasminogen.²⁹ This overexpression of plasminogen receptors could be deleterious to the treated aneurysms. Indeed, the association of plasminogen with cellular

receptors facilitates its activation in plasmin.^{30,31} Then, plasmin generated from plasminogen is able to degrade extracellular matrix components directly or indirectly by activating (*MMP-1*, 3, and 9).^{32,33}

Our study also found that apelin is up-regulated in flow-diverter-treated aneurysms compared with coiled aneurysms. This molecule significantly reduces aneurysm formation in the elastase model of abdominal aortic aneurysms by decreasing macrophage burden likely due to an apelin-mediated decrease in proinflammatory cytokine and chemokine activation.^{34,35} It has also been demonstrated that apelin is present to a limited degree in endothelial cells, with a potent ability to stimulate the proliferation of cultured human umbilical vein endothelial cells.³⁶ In our study, apelin was overexpressed in flow-diverter-treated aneurysms compared with coiled aneurysms; this overexpression is potentially a key factor for the promotion of endothelial cells, leading to stent endothelialization and aneurysm occlusion.³⁷

These current results also confirm the role of inflammation after the implantation of devices for the treatment of IAs. Metalloproteinases are known to be involved in thrombus homeostasis in IAs, but mainly *MMP2* and *MMP9* have been described in this pathology.³⁸⁻⁴¹ Here, we report the important role of other *MMP* molecules (*MMP1*, -12, and -13) overexpressed in coiled versus untreated IAs. These *MMPs* have been reported as being implicated in abdominal aortic aneurysm formation and progression.⁴²⁻⁵² However their impact has not been extensively described in the setting of IAs.⁵⁰ We suspect that this increased level of *MMPs* in coiled aneurysms is linked to recanalization because *MMP-9* levels are associated with aneurysm recanalization and recurrence.⁵³ The RNA-seq also found that basigin (also known as extracellular matrix metalloproteinase inducer) is up-regulated in flow-diverter-treated aneurysms compared with coiled aneurysms. This molecule is known to regulate different *MMPs*, especially *MMP2* and *MMP9*.^{54,55} The increased level of basigin in flow diverters could explain the higher level of those *MMPs* in flow-diverter-treated aneurysms as previously described.¹⁵

Furthermore, the macrophage receptor with collagenous structure is another differentially expressed gene in our study. This molecule is associated with thrombus-free aneurysms in a study comparing thrombus-free and thrombus-covered walls of abdominal aortic aneurysms.⁵⁶ In our study, we observed a down-regulation of macrophage receptor with collagenous structure in the flow-diverter group, suggesting an increased implication of intra-aneurysmal thrombosis compared with untreated aneurysms and the potential role of intra-aneurysmal thrombus for delayed aneurysm rupture associated with flow diverters.^{3,57}

Regarding the potential deleterious role of keratin 8 in flow diverters, the generation of plasmin induces neutrophil aggregation, monocyte chemotaxis, and expression of proinflammatory molecules⁵⁸ via multiple signaling pathways, including nuclear factor- κ B.⁵⁹ This involvement of the fibrinolytic system has been previously highlighted in abdominal aortic aneurysm pathology.⁶⁰ In abdominal aortic aneurysms, plasminogen is present in the mural thrombus.⁶¹ This mural thrombus, by trapping polymorphonuclear leukocytes and adsorbing plasma components, could act as a source of proteases in aneurysms, which may play a

critical role in enlargement and rupture.⁵⁷ Furthermore, abdominal aortic aneurysm diameter is correlated with the level of plasmin activity in the abdominal aortic aneurysm wall.⁶¹ The overexpression of keratin 8 in flow-diverter-treated IAs could explain the deleterious issue in the rare cases of delayed aneurysm rupture after flow diverters. This overexpression of keratin 8 associated with a large amount of intrasaccular thrombus after flow-diverter placement supports intra-aneurysmal thrombosis as a possible cause of delayed aneurysm rupture after flow-diversion treatment³; however, the confirmation of this hypothesis would need further dedicated experiments to precisely determine the impact of keratin 8.

Another important function for aneurysm occlusion after endovascular treatment is wound healing, consisting subsequently of thrombus formation, myofibroblast invasion, and extracellular matrix deposition.^{5,12,62} C-type lectin domain family 7, member A (dectin 1) is a molecule promoting wound healing by the enhanced production of collagen matrices with β -glucans.⁶³⁻⁶⁵ Our results show that dectin 1 is approximately 4 times overexpressed in coiled IAs compared with flow-diverter-treated IAs. This finding suggests that wound healing is a process that is much more preponderant in coils than in flow-diverter treatment. *FGFBP1* is another molecule promoting wound healing.^{66,67} The present results show that *FGFBP1* is decreased in flow-diverter-treated aneurysms compared with untreated aneurysms; this decrease supports the idea that aneurysm occlusion after flow-diverter therapy is not related to wound-healing mechanisms but mostly to endothelial cell proliferation originating from the parent artery, as previously demonstrated.⁶ We also identified another molecule of interest, *HHIP*, which is abundantly expressed in vascular endothelial cells and involved in angiogenesis.⁶⁸ We observed in our study that the expression of *HHIP* is down-regulated in coiled aneurysms. *HHIP* down-regulation is involved in the promotion of angiogenesis and could be involved in the neovascularization of the wound during the healing of coiled aneurysms.^{5,69}

Limitations

Our study has several limitations. We used the rabbit elastase model and acknowledge that animal models are imperfect predictors of the human response. Indeed, the created aneurysms are in the mediastinum rather than the subarachnoid space and thus subject to different perianeurysmal modulations compared with berry aneurysms. Another limitation in using a model is the high degree of homogeneity among the different aneurysms, which is not the same in unselected human IAs. However, this model has been evaluated with RNA-seq and has expression patterns similar to those in human intracranial aneurysms.¹⁶ However, this aneurysm model is not one of spontaneous rupture, and some biologic pathways may differ when considering rupture-prone aneurysms. To explore these mechanisms, analyzing gene expressions in new models for active aneurysms with inflamed aneurysm walls or bioactive thrombus would be interesting.^{70,71} Also, time intervals between the creation of an aneurysm and the time of euthanizing the animals were different between untreated and treated aneurysms, which could introduce a difference in the healing process. Given the differences between the human and the rabbit genomes, the observed findings may not be directly applicable to the clinical

system. As with most gene-expression studies, we recognize that any results obtained are exploratory in nature and need to be explored further; to that end, we did validate several results with reverse transcription polymerase chain reaction and will continue to explore these results further in other models.

Likewise, because of normal variations, there very likely are genes for which our threshold levels were not achieved, which may have an effect in humans. Just because a gene is not significantly up- or down-regulated does not necessarily imply that it is not relevant. Similarly, a gene found up- or down-regulated is not necessarily related to the specific question. The aim of this study was to give a general overview of gene modifications after coiling or flow-diverter treatment, not to describe all the gene variations following coil embolization or flow-diverter therapy or to identify and focus on a specific pathways or molecules. This study identifies some new parameters to explore that could be potential key factors in improving endovascular devices. This will require further validation with specific experiments to precisely describe the role of each molecule of interest.

CONCLUSIONS

RNA-sequencing analysis of rabbit aneurysms showed that despite different approaches, the response to the device used for the endovascular treatment of IAs does not vary substantially and that the mechanisms leading to aneurysm occlusion are somewhat similar, regardless of the device used. However, it revealed differential regulation of some key pathways, including inflammation and cellular migration that could explain the different biologic mechanisms implicated in aneurysm healing after either coiling or flow-diverter treatments and could be key molecules to explore to explain related complications. This study confirms wound healing being preponderant after coiling compared with flow-diverter-treated aneurysms. In addition, this study identified in the flow-diverter-treated IAs an overexpression of keratin 8 and basigin, implicated in the inflammatory response and in the plasminogen system.

Disclosures: Juan Cebal—RELATED: Grant: National Institutes of Health;* Comments: research grant; UNRELATED: Grants/Grants Pending: National Institutes of Health, Philips Healthcare, Comments: research grants. David F. Kallmes—RELATED: Grant: Covidien/Medtronic.* Comments: provided devices at no cost; UNRELATED: Board Membership: GE Healthcare (Cost-Effectiveness Board)*; Consultancy: Medtronic.* Comments: planning and implementing clinical trials; Grants/Grants Pending: MicroVention,* Sequent Medical,* SurModics,* Codman Neurovascular,* ev3/Covidien/Medtronic,* NeuroSigma,* Comments: preclinical and clinical research; Travel/Accommodations/Meeting Expenses Unrelated to Activities Listed: Medtronic.* Comments: presentation at FDA panel meeting. Ramanathan Kadirvel—RELATED: Grant: National Institutes of Health (grant number NS076491).* *Money paid to the institution.

REFERENCES

- Brinjikji W, Murad MH, Lanzino G, et al. Endovascular treatment of intracranial aneurysms with flow diverters: a meta-analysis. *Stroke* 2013;44:442–47 CrossRef Medline
- Cebal JR, Mut F, Raschi M, et al. Aneurysm rupture following treatment with flow-diverting stents: computational hemodynamics analysis of treatment. *AJNR Am J Neuroradiol* 2011;32:27–33 CrossRef Medline
- Kulcsár Z, Houdart E, Bonafé A, et al. Intra-aneurysmal thrombosis as a possible cause of delayed aneurysm rupture after flow-diversion treatment. *AJNR Am J Neuroradiol* 2011;32:20–25 CrossRef Medline
- Kulcsár Z, Szikora I. The ESMINT Retrospective Analysis of Delayed Aneurysm Ruptures after flow diversion (RADAR) study. *The eJournal of the European Society of Minimally Invasive Neurological Therapy* 2012. <http://www.ejmint.org/original-article/1244000088>. Accessed December 15, 2015
- Brinjikji W, Kallmes DF, Kadirvel R. Mechanisms of healing in coiled intracranial aneurysms: a review of the literature. *AJNR Am J Neuroradiol* 2015;36:1216–22 CrossRef Medline
- Kadirvel R, Ding YH, Dai D, et al. Cellular mechanisms of aneurysm occlusion after treatment with a flow diverter. *Radiology* 2014;270:394–99 CrossRef Medline
- Rouchaud A, Journé C, Louedec L, et al. Autologous mesenchymal stem cell endografting in experimental cerebrovascular aneurysms. *Neuroradiology* 2013;55:741–49 CrossRef Medline
- Kallmes DF, Helm GA, Hudson SB, et al. Histologic evaluation of platinum coil embolization in an aneurysm model in rabbits. *Radiology* 1999;213:217–22 CrossRef Medline
- Crobeddu E, Lanzino G, Kallmes DF, et al. Review of 2 decades of aneurysm-recurrence literature, part 1: reducing recurrence after endovascular coiling. *AJNR Am J Neuroradiol* 2013;34:266–70 CrossRef Medline
- Raymond J, Guilbert F, Weill A, et al. Long-term angiographic recurrences after selective endovascular treatment of aneurysms with detachable coils. *Stroke* 2003;34:1398–403 CrossRef Medline
- Li ZF, Fang XG, Yang PF, et al. Endothelial progenitor cells contribute to neointima formation in rabbit elastase-induced aneurysm after flow diverter treatment. *CNS Neurosci Ther* 2013;19:352–57 CrossRef Medline
- Kadirvel R, Ding YH, Dai D, et al. Differential gene expression in well-healed and poorly healed experimental aneurysms after coil treatment. *Radiology* 2010;257:418–26 CrossRef Medline
- Mangrum WI, Farassati F, Kadirvel R, et al. mRNA expression in rabbit experimental aneurysms: a study using gene chip microarrays. *AJNR Am J Neuroradiol* 2007;28:864–69 Medline
- Kadirvel R, Ding YH, Dai D, et al. Gene expression profiling of experimental saccular aneurysms using deoxyribonucleic acid microarrays. *AJNR Am J Neuroradiol* 2008;29:1566–69 CrossRef Medline
- Puffer C, Dai D, Ding YH, et al. Gene expression comparison of flow diversion and coiling in an experimental aneurysm model. *J Neurointerv Surg* 2015;7:926–30 CrossRef Medline
- Holcomb M, Ding YH, Dai D, et al. RNA-sequencing analysis of messenger RNA/microRNA in a rabbit aneurysm model identifies pathways and genes of interest. *AJNR Am J Neuroradiol* 2015;36:1710–15 CrossRef Medline
- Nakaoka H, Tajima A, Yoneyama T, et al. Gene expression profiling reveals distinct molecular signatures associated with the rupture of intracranial aneurysm. *Stroke* 2014;45:2239–45 CrossRef Medline
- Roder C, Kasuya H, Harati A, et al. Meta-analysis of microarray gene expression studies on intracranial aneurysms. *Neuroscience* 2012;201:105–13 CrossRef Medline
- Altes TA, Cloft HJ, Short JG, et al. 1999 ARRS Executive Council Award: creation of saccular aneurysms in the rabbit: a model suitable for testing endovascular devices—American Roentgen Ray Society. *AJR Am J Roentgenol* 2000;174:349–54 CrossRef Medline
- Kallmes DF, Ding YH, Dai D, et al. A new endoluminal, flow-disrupting device for treatment of saccular aneurysms. *Stroke* 2007;38:2346–52 CrossRef Medline
- Kalari KR, Nair AA, Bhavsar JD, et al. MAP-RSeq: Mayo Analysis Pipeline for RNA sequencing. *BMC Bioinformatics* 2014;15:224 CrossRef Medline
- Wang L, Wang S, Li W. RSeQC: quality control of RNA-seq experiments. *Bioinformatics* 2012;28:2184–85 CrossRef Medline
- Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 2009;25:1105–11 CrossRef Medline
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, et al. Ultrafast and memory-effi-

- cient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 2009;10:R25 CrossRef Medline
25. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 2015;31:166–69 CrossRef Medline
 26. Khoo AA, Ogrizek-Tomas M, Bulovic A, et al. ExoLocator—an online view into genetic makeup of vertebrate proteins. *Nucleic Acids Res* 2014;42:D879–81 CrossRef Medline
 27. Krämer A, Green J, Pollard J Jr, et al. Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics* 2014;30:523–30 CrossRef Medline
 28. Reiner A, Yekutieli D, Benjamin Y. Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinformatics* 2003;19:368–75 CrossRef Medline
 29. Obermajer N, Doljak B, Kos J. Cytokeratin 8 ectoplasmic domain binds urokinase-type plasminogen activator to breast tumor cells and modulates their adhesion, growth and invasiveness. *Mol Cancer* 2009;8:88 CrossRef Medline
 30. Didiasova M, Wujak L, Wygrecka M, et al. From plasminogen to plasmin: role of plasminogen receptors in human cancer. *Int J Mol Sci* 2014;15:21229–52 CrossRef Medline
 31. Syrovets T, Lunov O, Simmet T. Plasmin as a proinflammatory cell activator. *J Leukoc Biol* 2012;92:509–19 CrossRef Medline
 32. Lijnen HR. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost* 2001;86:324–33 Medline
 33. Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, et al. Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nat Genet* 1997;17:439–44 CrossRef Medline
 34. Leeper NJ, Tedesco MM, Kojima Y, et al. Apelin prevents aortic aneurysm formation by inhibiting macrophage inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;296:H1329–35 CrossRef Medline
 35. Zhou Y, Wang Y, Qiao S. Apelin: a potential marker of coronary artery stenosis and atherosclerotic plaque stability in ACS patients. *Int Heart J* 2014;55:204–12 CrossRef Medline
 36. Masri B, Morin N, Cornu M, et al. Apelin (65–77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *FASEB J* 2004;18:1909–11 Medline
 37. Du X, Kang JP, Wu JH, et al. Elevated high sensitive C-reactive protein and apelin levels after percutaneous coronary intervention and drug-eluting stent implantation. *J Zhejiang Univ Sci B* 2010;11:548–52 CrossRef Medline
 38. Tulamo R, Frösen J, Hernesniemi J, et al. Inflammatory changes in the aneurysm wall: a review. *J Neurointerv Surg* 2010;2:120–30 CrossRef Medline
 39. Frösen J. Smooth muscle cells and the formation, degeneration, and rupture of saccular intracranial aneurysm wall: a review of current pathophysiological knowledge. *Transl Stroke Res* 2014;5:347–56 CrossRef Medline
 40. Aoki T, Kataoka H, Morimoto M, et al. Macrophage-derived matrix metalloproteinase-2 and -9 promote the progression of cerebral aneurysms in rats. *Stroke* 2007;38:162–69 CrossRef Medline
 41. Kadirvel R, Dai D, Ding YH, et al. Endovascular treatment of aneurysms: healing mechanisms in a swine model are associated with increased expression of matrix metalloproteinases, vascular cell adhesion molecule-1, and vascular endothelial growth factor, and decreased expression of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *AJNR Am J Neuroradiol* 2007;28:849–56 Medline
 42. Courtois A, Nusgens BV, Hustinx R, et al. 18F-FDG uptake assessed by PET/CT in abdominal aortic aneurysms is associated with cellular and molecular alterations prefacing wall deterioration and rupture. *J Nucl Med* 2013;54:1740–47 CrossRef Medline
 43. Morris DR, Biros E, Cronin O, et al. The association of genetic variants of matrix metalloproteinases with abdominal aortic aneurysm: a systematic review and meta-analysis. *Heart* 2014;100:295–302 CrossRef Medline
 44. Saracini C, Bolli P, Sticchi E, et al. Polymorphisms of genes involved in extracellular matrix remodeling and abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Res* 2012;55:171–79 e2 CrossRef Medline
 45. Wilson WR, Anderton M, Choke EC, et al. Elevated plasma MMP1 and MMP9 are associated with abdominal aortic aneurysm rupture. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2008;35:580–84 CrossRef Medline
 46. Chase AJ, Newby AC. Regulation of matrix metalloproteinase (matrixin) genes in blood vessels: a multi-step recruitment model for pathological remodelling. *J Vasc Res* 2003;40:329–43 CrossRef Medline
 47. Xiong W, Knispel R, MacTaggart J, et al. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase regulates macrophage-dependent elastolytic activity and aneurysm formation in vivo. *J Biol Chem* 2009;284:1765–71 CrossRef Medline
 48. Dai X, Shen J, Annam NP, et al. SMAD3 deficiency promotes vessel wall remodeling, collagen fiber reorganization and leukocyte infiltration in an inflammatory abdominal aortic aneurysm mouse model. *Sci Rep* 2015;5:10180 CrossRef Medline
 49. Didangelos A, Yin X, Mandal K, et al. Extracellular matrix composition and remodeling in human abdominal aortic aneurysms: a proteomics approach. *Mol Cell Proteomics* 2011;10:M111 008128 CrossRef Medline
 50. Zhang B, Dhillon S, Geary I, et al. Polymorphisms in matrix metalloproteinase-1, -3, -9, and -12 genes in relation to subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 2001;32:2198–202 CrossRef Medline
 51. Curci JA, Liao S, Huffman MD, et al. Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest* 1998;102:1900–10 CrossRef Medline
 52. Tromp G, Gatalica Z, Skunca M, et al. Elevated expression of matrix metalloproteinase-13 in abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg* 2004;18:414–20 CrossRef Medline
 53. Bouzeghrane F, Darsaut T, Salazkin I, et al. Matrix metalloproteinase-9 may play a role in recanalization and recurrence after therapeutic embolization of aneurysms or arteries. *J Vasc Interv Radiol* 2007;18:1271–79 CrossRef Medline
 54. Chen XF, Wang JA, Hou J, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) is present in smooth muscle cells of human aneurysmal aorta and is induced by angiotensin II in vitro. *Clin Sci (Lond)* 2009;116:819–26 CrossRef Medline
 55. Lizarbe TR, Tarín C, Gómez M, et al. Nitric oxide induces the progression of abdominal aortic aneurysms through the matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN. *Am J Pathol* 2009;175:1421–30 CrossRef Medline
 56. Kazi M, Zhu C, Roy J, et al. Difference in matrix-degrading protease expression and activity between thrombus-free and thrombus-covered wall of abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1341–46 CrossRef Medline
 57. Fontaine V, Jacob MP, Houard X, et al. Involvement of the mural thrombus as a site of protease release and activation in human aortic aneurysms. *Am J Pathol* 2002;161:1701–10 CrossRef Medline
 58. Li Q, Laumonier Y, Syrovets T, et al. Plasmin triggers cytokine induction in human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1383–89 CrossRef Medline
 59. Burysek L, Syrovets T, Simmet T. The serine protease plasmin triggers expression of MCP-1 and CD40 in human primary monocytes via activation of p38 MAPK and janus kinase (JAK)/STAT signaling pathways. *J Biol Chem* 2002;277:33509–17 CrossRef Medline
 60. Reilly JM. Plasminogen activators in abdominal aortic aneurysmal disease. *Ann N Y Acad Sci* 1996;800:151–56 CrossRef Medline
 61. Coutard M, Touat Z, Houard X, et al. Thrombus versus wall biological activities in experimental aortic aneurysms. *J Vasc Res* 2010;47:355–66 CrossRef Medline
 62. Killer M, Plenk H, Minnich B, et al. Histological demonstration of healing in experimental aneurysms. *Minim Invasive Neurosurg* 2009;52:170–75 CrossRef Medline
 63. Daley JM, Brancato SK, Thomay AA, et al. The phenotype of murine wound macrophages. *J Leukoc Biol* 2010;87:59–67 CrossRef Medline
 64. van den Berg LM, Zijlstra-Willems EM, Richters CD, et al. Dectin-1 activation induces proliferation and migration of human keratino-

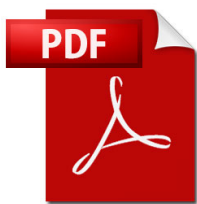
- cytes enhancing wound re-epithelialization. *Cell Immunol* 2014; 289:49–54 CrossRef Medline
65. Roy S, Dickerson R, Khanna S, et al. **Particulate β -glucan induces TNF- α production in wound macrophages via a redox-sensitive NF- κ B-dependent pathway.** *Wound Repair Regen* 2011;19:411–19 CrossRef Medline
 66. Beer HD, Bittner M, Niklaus G, et al. **The fibroblast growth factor binding protein is a novel interaction partner of FGF-7, FGF-10 and FGF-22 and regulates FGF activity: implications for epithelial repair.** *Oncogene* 2005;24:5269–77 CrossRef Medline
 67. Tassi E, McDonnell K, Gibby KA, et al. **Impact of fibroblast growth factor-binding protein-1 expression on angiogenesis and wound healing.** *Am J Pathol* 2011;179:2220–32 CrossRef Medline
 68. Olsen CL, Hsu PP, Glienke J, et al. **Hedgehog-interacting protein is highly expressed in endothelial cells but down-regulated during angiogenesis and in several human tumors.** *BMC Cancer* 2004;4:43 CrossRef Medline
 69. Wong VW, Crawford JD. **Vasculogenic cytokines in wound healing.** *Biomed Res Int* 2013;2013:190486 CrossRef Medline
 70. Gounis MJ, van der Bom IM, Wakhloo AK, et al. **MR imaging of myeloperoxidase activity in a model of the inflamed aneurysm wall.** *AJNR Am J Neuroradiol* 2015;36:146–52 CrossRef Medline
 71. Delbosc S, Alsac JM, Journe C, et al. **Porphyromonas gingivalis participates in pathogenesis of human abdominal aortic aneurysm by neutrophil activation: proof of concept in rats.** *PLoS One* 2011;6:e18679 CrossRef Medline

2. Limites des traitements par *flow-diverter*

a. Non-exclusion de l'anévrisme: importance de l'apposition pariétale

En raison de leurs taux élevés d'occlusion anévrysmale et de bons résultats cliniques, les stents *flow-diverter* sont maintenant de plus en plus utilisés pour le traitement d'anévrismes sélectionnés^{109, 186, 289}. Comme nous l'avons rappelé, le mécanisme d'occlusion des anévrismes après traitement par *flow-diverter* est principalement lié à l'endothélialisation du stent à partir des cellules endothéliales présentes au niveau de l'artère porteuse au contact du stent¹¹⁵. Aussi, il apparaît primordial d'avoir une bonne apposition du stent à la paroi artérielle pour favoriser l'endothélialisation²⁹⁰. Cependant, à notre connaissance, la corrélation entre l'occlusion de l'anévrisme et l'apposition à la paroi artérielle n'a jamais été évaluée auparavant dans les *flow-diverter*. Malgré l'absence d'étude affirmant ce lien entre apposition pariétale et occlusion de l'anévrisme, plusieurs outils sont en cours d'évaluation pour évaluer l'apposition des stents *flow-diverter* à la paroi artérielle²⁹¹⁻²⁹³.

En utilisant une large série d'anévrismes à l'élastase chez des lapins traités avec le *flow-diverter* Pipeline Embolization Device (PED, Covidien Inc, Californie, Etats-Unis), les objectifs de cette étude étaient **1) Evaluer l'accord inter-observateurs pour l'évaluation de l'apposition pariétale du stent sur l'angiographie immédiatement après le déploiement du dispositif et d'évaluer son association avec l'occlusion de l'anévrisme et 2) Mesurer la relation entre l'apposition pariétale évaluée histologiquement et l'occlusion anévrysmale après *flow-diverter*.**



Article 2 : Rouchaud A, Ramana C, Brinjikji W, Ding YH, Dai D, Gunderson T, Cebal J, Kallmes DF, Kadirvel R. Wall Apposition is a Key Factor for Aneurysm Occlusion After Flow-Diverter but is not well assessed with conventional angiography: An Angiographic and Histological Evaluation In 41 Rabbits. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2016 Jul 7. [Epub ahead of print]²⁹⁴

Les parties Méthodes et Résultats sont présentées dans le PDF de l'article.

Cette étude réalisée sur une grande série d'anévrismes expérimentaux démontre que **l'apposition pariétale est un déterminant crucial de l'occlusion anévrysmale après**

traitement par *flow-diverter*. L'apposition pariétale évaluée en histologie est très fortement corrélée avec l'occlusion anévrysmale. Cependant, l'étude montre que l'évaluation de l'apposition pariétale sur l'angiographie a un faible accord inter-observateur et est peu prédictive du résultat final d'exclusion anévrysmale. Ces résultats suggèrent fortement que des méthodes alternatives devraient être développées pour évaluer l'apposition pariétale, mais aussi qu'en cas d'absence de bonne apposition pariétale, des manoeuvres complémentaires comme l'inflation d'un ballonnet devraient être réalisées afin d'améliorer l'exclusion anévrysmale.

À notre connaissance, cette étude est la première à corréler l'apposition pariétale des *flow-diverters* avec l'exclusion anévrysmale à l'aide d'une évaluation histologique. Ceci est d'une grande importance car une mauvaise apposition pariétale peut être considérée comme un facteur-clé pour l'échec du traitement. Le mécanisme biologique qui pourrait expliquer les taux d'exclusion inférieurs dans les cas de mauvaise apposition pariétale est que l'occlusion anévrysmale après traitement par *flow-diverter* n'est pas seulement liée à une thrombose intra-anévrysmale mais est essentiellement liée à la cicatrisation et à l'endothélialisation du dispositif¹¹⁵. La recolonisation mésenchymateuse et la ré-endothélialisation sont retardées et dérivent des cellules de l'artère porteuse adjacente¹¹⁵. Etant donné ce mécanisme, dans les cas d'apposition pariétale imparfaite, la partie mal-apposée du dispositif ne parviendra pas à s'endothélialiser en raison d'un manque de contact direct avec l'artère porteuse. Ce mécanisme a également été discuté dans la littérature dans le cadre des stents coronaires qui ne parviennent pas à s'endothélialiser en cas de mal-apposition pariétale^{290, 295}. Cette étude a également montré que l'angiographie n'était pas un outil fiable pour évaluer l'apposition pariétale. Nos résultats actuels sont conformes à l'étude clinique publiée par Saake et al.²⁹¹ qui rapporte que l'apposition pariétale était difficile à évaluer sur l'artériographie dans une étude avec 14 patients et des évaluations faites par deux neuroradiologues expérimentés. Dans cette étude comparant l'artériographie et l'angioscanner, les examinateurs ont préféré l'angioscanner pour l'évaluation de l'apposition pariétale²⁹¹. Il y a un certain nombre d'éléments pour expliquer la faiblesse de l'artériographie dans l'évaluation de l'apposition pariétale. L'artériographie 2D ne peut pas fournir d'image en coupe transversale ainsi les vues sont limitées pour examiner la relation entre le *flow-diverter* et la paroi des artères. En outre, l'acquisition d'imagerie en artériographie soustraite avec soustraction du masque rend difficile l'évaluation de toute opacification de contraste entre le dispositif lui-même soustrait et la paroi artérielle. De plus, dans notre étude, il y avait un artéfact de mouvement lié au fait que les anévrysmes expérimentaux ne sont pas situés dans le cerveau mais au niveau thoracique et

sont soumis aux mouvements respiratoires. De nouveaux outils sont actuellement évalués dans le cadre du traitement par *flow-diverter* des anévrismes intracrâniens pour mesurer l'apposition à la paroi. Les acquisitions scannographiques avec opacification artérielle ont une résolution spatiale très élevée et peuvent être réalisées directement sur la table d'artériographie sans aucune procédure invasive supplémentaire et avec une faible irradiation^{291, 292, 296-301}. Plus récemment, la tomographie par cohérence optique est en cours d'évaluation pour les procédures intracrâniennes^{293, 302-306}. En outre, d'autres techniques endovasculaires qui ne sont pas encore utilisées dans le domaine de la neuroradiologie mais qui sont principalement utilisées en cardiologie, telles que l'échographie intravasculaire³⁰³ ou l'imagerie optique endoluminale (angioscopie)³⁰⁷, semblent prometteuses dans l'évaluation de l'apposition à la paroi. Notre étude suggère que ces nouveaux outils devraient être préférés à l'artériographie pour cette évaluation.

En cas de mauvaise apposition pariétale démontrée sur l'imagerie post-déploiement, il pourrait être utile d'améliorer l'apposition par angioplastie au ballon. Une autre option est le développement de stents *flow-diverters* avec une force radiale et une conformabilité supérieures qui sont des facteurs-clé pour une meilleure apposition à la paroi³⁰⁸. Cependant, la force radiale est généralement faible dans les dispositifs tressés. Nous supposons que les nouveaux *flow-diverters* constitués de deux stents avec un stent coupé au laser et un stent à densité de mailles élevée sur leur partie externe pourraient donner une force radiale supérieure et une meilleure apposition pariétale³⁰⁹.

Conclusion

Cette étude met en évidence le fait qu'**une bonne apposition pariétale est essentielle pour obtenir une exclusion complète des anévrismes après traitement par *flow-diverter*.** Nous montrons également que l'artériographie n'est pas un outil fiable pour évaluer l'apposition pariétale du stent avec une faible corrélation. Notre étude suggère que le développement de nouveaux outils pour l'évaluation de l'apposition pariétale des stents *flow-diverters* est nécessaire pour améliorer les résultats angiographiques.

Wall Apposition Is a Key Factor for Aneurysm Occlusion after Flow Diversion: A Histologic Evaluation in 41 Rabbits

 A. Rouchaud,  C. Ramana,  W. Brinjikji,  Y.-H. Ding,  D. Dai,  T. Gunderson,  J. Cebra,  D.F. Kallmes, and  R. Kadirvel



ABSTRACT

BACKGROUND AND PURPOSE: Robust wall apposition for flow-diverter stents may be important for endothelialization. Using a large series of experimental aneurysms treated with the Pipeline Embolization Device, the objectives of this study were to 1) assess interobserver agreement for the evaluation of wall apposition on posttreatment DSA and evaluate its association with aneurysm occlusion, and 2) measure the relationship between wall apposition assessed with histology and aneurysm occlusion rate after treatment.

MATERIALS AND METHODS: Saccular aneurysms were created in 41 rabbits and treated with the Pipeline Embolization Device. DSA was performed just after the deployment of the device and at follow-up. Three investigators independently graded wall apposition on posttreatment DSA as good or poor. A histopathologist blinded to the angiographic results graded the wall apposition on histologic samples. We examined the correlation between angiographic occlusion and wall apposition with histology and angiography.

RESULTS: Wall apposition evaluated on histology was strongly associated with saccular aneurysm occlusion. Sensitivity and specificity of wall apposition to predict complete occlusion at follow-up were 76.9% and 84.0%, respectively, with an overall accuracy of 81.6%. In this experimental study, DSA was suboptimal to assess flow-diverter apposition, with moderate interobserver agreement and low accuracy.

CONCLUSIONS: Good wall apposition is strongly associated with complete occlusion after flow-diverter therapy. In this study, DSA was suboptimal for assessing wall apposition of flow-diverter stents. These findings suggest that improved tools for assessing flow diverter-stent wall apposition are highly relevant.

ABBREVIATIONS: FDS = flow-diverter stent; PED = Pipeline Embolization Device

Flow-diverter stents (FDSs) are now largely accepted as the standard of care in the treatment of select aneurysms because of their high rates of angiographic occlusion and good clinical outcomes.¹⁻³ Because the mechanism of aneurysm occlusion after FDS treatment is likely related to stent endothelialization derived

exclusively from cells in the adjacent parent artery,⁴ it appears important to have good wall apposition to promote endothelialization.⁵ However, to our knowledge, correlation between aneurysm occlusion and wall apposition has not previously been evaluated in FDSs. Despite no evidence of this correlation, several tools are currently being evaluated to assess wall apposition of flow-diverter stents.⁶⁻⁸

Using a large series of elastase-induced aneurysms in rabbits treated with the Pipeline Embolization Device (PED; Covidien, Irvine, California), the objective of this study was to assess interobserver agreement for the evaluation of wall apposition on posttreatment DSA, evaluate its association with aneurysm occlusion, and measure the relationship between wall apposition assessed with histology and aneurysm occlusion rates after implantation.

MATERIALS AND METHODS

In Vivo Experiments


The Mayo Clinic Animal Care and Use Committee approved the animal procedures. Some rabbits used in this study were originally used in other investigations.^{9,10} Elastase-induced aneurysms were created in 41 New Zealand white rabbits. Aneurysm creation


Received October 6, 2015; accepted after revision April 27, 2016.


From the Applied Neuroradiology Laboratory (A.R., C.R., W.B., Y.-H.D., D.D., D.F.K., R.K.) and Departments of Radiology (W.B., D.F.K.) and Health Sciences Research, Division of Biomedical Statistics and Informatics (T.G.), Mayo Clinic, Rochester, Minnesota; Interventional Neuroradiology NEURI Center (A.R.), Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France; and Department of Bioengineering (J.C.), George Mason University, Fairfax, Virginia.

This work was supported by research grant N50767491 from the National Institutes of Health and Medtronic. Aymeric Rouchaud was supported by research grants from the French Society of Radiology and Therese Planiol Foundation.

Please address correspondence to Aymeric Rouchaud, MD, Applied Neuroradiology Laboratory, Mayo Clinic, 200 First St SW, Rochester, MN 55905; e-mail: aymeric.rouchaud@gmail.com

 Indicates open access to non-subscribers at www.ajnr.org

 Indicates article with supplemental on-line table.

 Indicates article with supplemental on-line photos.

<http://dx.doi.org/10.3174/ajnr.A4848>

procedures were performed as previously described by our study group.¹¹ Aneurysms were treated at least 3 weeks after creation.¹² Subjects were premedicated with aspirin (10 mg/kg orally) and clopidogrel (10 mg/kg orally) 2 days before the treatment procedure; this medication regimen was continued for 1 month after embolization. The detailed procedure was previously published.^{9,10} All endovascular procedures were performed with the Advantx DLX (GE Healthcare, Milwaukee, Wisconsin) Angio Suite equipped with an image amplifier. Imaging field of view was 11 cm with a frame rate of 2 frames per second, and the x-ray dose per frame was 500 μ R. The spatial resolution was 1.5 lines pairs per millimeter.

A 5F guide catheter (Envoy; Codman & Shurtleff, Raynham, Massachusetts) was briefly placed into the aortic arch, and DSA was performed. Heparin (500 U intravenously) was administered, and then a microcatheter (Marksman; Covidien) was placed over a microguidewire (Transend; Stryker, Kalamazoo, Michigan) into the subclavian artery distal to the aneurysm cavity. The wire was removed and the PED was advanced into the distal aspect of the microcatheter. The device was deployed across the neck of the aneurysm from the subclavian artery to the brachiocephalic trunk, with no protrusion of the proximal landing zone in the aortic arch. The microcatheter was removed, and DSA was performed through the guide catheter 5 minutes after deployment. No additional angioplasty to improve wall apposition or 3D acquisition were performed.

The implanted PED was selected according to the diameter of the artery. Details regarding proximal and distal diameters of the parent artery as well as the size of the implanted PEDs are available in the On-line Table.

Rabbits were humanely killed at day 30 ($n = 18$), day 90 ($n = 11$), and day 180 ($n = 12$) after the procedure. At the time of death, the animals were deeply anesthetized. DSA of the aortic arch was performed to evaluate aneurysm occlusion. The animals then were euthanized with a lethal injection of pentobarbital. Aneurysm and parent artery tissue were immediately fixed in 10% neutral buffered formalin.

Data Analysis

Angiographic Evaluation. A single experienced reader, blinded to wall-apposition status (DSA and histologic evaluations), assessed angiographic aneurysm occlusion at follow-up according to a 2-point classification: complete (100%) or incomplete occlusion.

Selected postprocess (pixel shift) images of the posttreatment DSA were independently examined by 3 investigators, blinded to histologic wall-apposition evaluation, to grade wall-apposition status on posttreatment DSA. Wall-apposition status on DSA was evaluated according to a dichotomous outcome, noted as either good or poor apposition depending on the presence or absence of visible contrast media between the stent and the parent artery. (Illustrative images for good and poor wall apposition are presented in On-line Figs 1 and 2).

Histopathologic Processing and Wall-Apposition Evaluation. A histopathologist blinded to the angiographic results did the processing and analysis for wall apposition as previously described.⁹ After routine tissue processing, the fixed samples were embedded

in paraffin. Aneurysm samples were processed at 1000- μ m intervals in a sagittal orientation with use of an IsoMet Low Speed Saw (Buehler, Lake Bluff, Illinois). The metal stents were carefully removed under a dissecting microscope. The samples then were re-embedded in paraffin, sectioned at 5–6 μ m, and stained with hematoxylin-eosin.

Wall apposition was evaluated according to a dichotomous outcome, with either good or poor wall apposition of the stent. The evaluation was performed at the level of the aneurysm neck. A good histologic wall apposition meant that the stent was well apposed on the entire surface parent artery adjacent to the aneurysm ostium.

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed in R statistical and computing software version 3.1.1 (<http://www.r-project.org/>). κ and intraclass correlation coefficient statistics were calculated by using the irr package (version 0.84). Agreement among 3 readers for DSA assessment of posttreatment wall apposition was assessed by using the intraclass correlation coefficient method.¹³ Cohen κ was also displayed for pair-wise comparisons of raters. κ also was used to assess agreement between the reference method of histology and DSA by using a consensus score agreed to by 2 radiologists for each method.

We calculated sensitivity, specificity, and accuracy of post-treatment DSA and histologic wall-apposition evaluations in predicting the occurrence of aneurysm occlusion at follow-up. The Wilson Score 95% CI is reported for each statistic. The Fisher exact test was performed to test for association between wall apposition assessed by histology at follow-up and occlusion outcome at follow-up.

RESULTS

Population and Angiographic Follow-Up Outcome

This study included 41 consecutively treated rabbits. All aneurysms were saccular. The mean aneurysm size was 9.41 mm (95% CI, 8.41–10.41) in the complete-occlusion group and 9.47 mm (95% CI, 8.03–10.91) in the incomplete-occlusion group. There was no significant difference in aneurysm sizes across groups (t test P value = .94). The length of follow-up varied from 30 days to 180 days, with a mean length of 90 days. Rabbits were euthanized at day 30 ($n = 18$), day 90 ($n = 11$), and day 180 ($n = 12$).

Follow-up DSA was available for 40 rabbits, of which 67.5% ($n = 27$) had complete occlusion and 32.5% ($n = 13$) had incomplete occlusion. Angiographic complete-occlusion rates at 30, 90, and 180 days were not statistically different at 52.9% ($n = 9$), 72.7% ($n = 8$), and 83.3% ($n = 10$), respectively (χ^2 P value = .25).

Wall-Apposition Evaluation on Posttreatment DSA

Immediate posttreatment DSA was available for 41 rabbits. Wall-apposition status evaluated on posttreatment DSA by the 3 independent readers demonstrated a good wall-apposition rate of 61.0% ($n = 75$ of 123 readings) and a poor wall-apposition rate of 39.0% ($n = 48$). The consensus DSA evaluation yielded 63.4% ($n = 26$) good wall apposition and 36.6% ($n = 15$) poor wall apposition. All 3 readers rated similar proportions of wall appo-

Table 1: Contingency table for wall-apposition assessment on posttreatment DSA

Wall Apposition	Follow-up DSA Outcome		Total
	Complete Occlusion	Incomplete Occlusion	
Good	15	10	25
Poor	12	3	15
Total	27	13	40

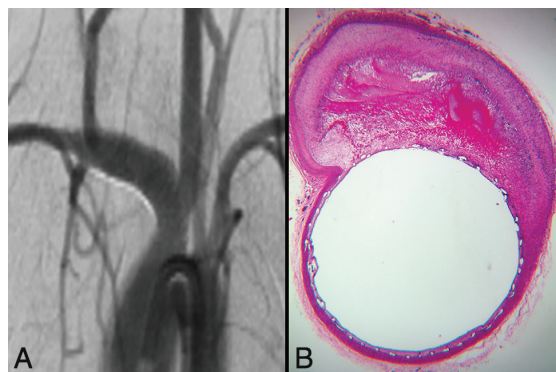


FIG 1. Histology and DSA illustrative correlation of good wall apposition associated with complete aneurysm occlusion. A, Follow-up DSA objectively shows complete occlusion of the aneurysm sac. B, Photomicrograph (hematoxylin-eosin staining, original magnification $\times 100$) at the level of the aneurysm neck shows perfect wall apposition with complete aneurysm pouch occlusion filled with conjunctive tissue when using the PED.

sition as poor ($n = 16$; 39%). Pair-wise κ between the 3 readers for DSA was $\kappa = 0.487, 0.590,$ and 0.385 . Intraclass correlation among readers was 0.488 (95% CI, $0.30-0.66$), indicating moderate interobserver agreement.

Correlation between Consensus DSA Wall Apposition and Follow-Up Occlusion

A contingency table is presented in Table 1. Sensitivity and specificity of good wall apposition evaluated on posttreatment DSA for the prediction of complete versus incomplete occlusion on follow-up DSA were 23.1% (95% CI, $8.2-50.3$) and 55.5% (95% CI, $37.3-72.4$), respectively. The overall accuracy of the wall apposition evaluated on posttreatment DSA for the prediction of complete versus incomplete occlusion at follow-up was 45.0% (95% CI, $30.7-60.2$).

Wall-Apposition Evaluation on Histology

Histologic evaluation at time of follow-up DSA was available for 38 rabbits, of which 63.2% ($n = 24$) had good wall apposition and 36.8% ($n = 14$) had poor wall apposition.

Correlation between Histologic Wall-Apposition Evaluation and Follow-Up Occlusion

Illustrative histology images for good and poor wall apposition are presented in Fig 1 and Fig 2, respectively. A contingency table is presented in Table 2. Angiographic complete occlusion rates in good wall-apposition aneurysms of 77.8% (7 of 9) at 30 days, 100.0% (6 of 6) at 90 days, and 88.9% (8 of 9) at 180 days were not statistically different ($\chi^2 P$ value = .44). Angiographic complete

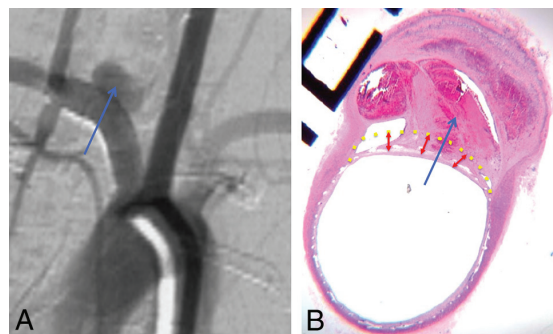


FIG 2. Histology and DSA illustrative correlation of poor wall apposition associated with incomplete aneurysm occlusion. Follow-up DSA objectively shows incomplete occlusion of the aneurysm sac (blue arrow) (A). Photomicrograph at the level of the aneurysm neck (hematoxylin-eosin staining, original magnification $\times 100$) shows poor wall apposition (yellow dotted line) and filling of the aneurysm pouch with a partial thrombosis in the aneurysm sac (B).

Table 2: Contingency table for wall-apposition assessment on histology

Wall Apposition	Follow-up DSA Outcome		Total
	Complete Occlusion	Incomplete Occlusion	
Good	21	3	24
Poor	4	10	14
Total	25	13	38

occlusion rates in poor wall-apposition aneurysms of 25.0% (2 of 8) at 30 days, 25.0% (1 of 4) at 90 days, and 50.0% (1 of 2) at 180 days were not statistically different ($\chi^2 P$ value = .77).

Sensitivity and specificity of wall apposition evaluated on histology for the prediction of complete versus incomplete occlusion on follow-up DSA were 76.9% (95% CI, $49.7-91.8$) and 84.0% (95% CI, $65.3-93.6$), respectively. The overall accuracy of the wall apposition evaluated on posttreatment DSA for the prediction of complete versus incomplete occlusion at follow-up was 81.6% (95% CI, $66.6-90.8$). Histologically assessed wall apposition was significantly associated with occlusion at follow-up DSA (Fisher exact test P value $< .001$; odds ratio, 15.7 ; 95% CI, $2.63-133.2$).

DISCUSSION

Our study of a large series of experimental aneurysms demonstrated that wall apposition is a crucial determinant for saccular aneurysm occlusion after FDS treatment. Wall apposition on histology was strongly correlated with aneurysm occlusion after treatment of intracranial aneurysms with flow diverters, suggesting that if good wall apposition is not present, adjunctive measures such as balloon inflation should be considered in some clinical settings to improve apposition and, thus, aneurysm occlusion rates.

In addition, our study demonstrated that assessment of wall apposition on posttreatment DSA suffers from low interobserver agreement and is poorly predictive of final aneurysm occlusion status. We acknowledge that the DSA system used for this experimental study in rabbits is not optimal and that the results cannot be extrapolated with DSA used in the clinical angiography suite. Indeed, these findings strongly suggest that operators should con-

sider alternative methodologies for assessing wall apposition with high-resolution contrast-enhanced conebeam CT such as VasoCT (Philips Healthcare, Best, the Netherlands),¹⁴ DynaCT (Siemens, Erlangen, Germany),¹⁵ and Innova CT (GE Healthcare) or with intravascular optical coherence tomography.⁸

This study correlates flow-diverter wall apposition with saccular aneurysm occlusion by using histologic evaluation. This is of high importance because wall apposition can be considered a key factor for the occurrence of saccular aneurysm nonocclusion. A potential biologic mechanism that could explain lower occlusion rates in cases of poor wall apposition is the fact that aneurysm occlusion after flow-diverter stent treatment is not exclusively related to intra-aneurysmal thrombosis, but is also driven by endothelialization of the device.⁴ This endothelialization is relatively delayed and, we believe, derived exclusively from cells in the adjacent parent artery.⁴ Based on this proposed mechanism, the malapposed portion of the device will fail to endothelialize because of the lack of direct contact with the parent artery in cases of poor wall apposition. This mechanism has also been discussed in the coronary intervention literature, and coronary stents that lack wall apposition fail to endothelialize.^{5,16} Though our study proves that wall apposition is highly correlated with angiographic outcome, we also found that DSA was a suboptimal tool in assessing wall apposition.

Our current results are in accordance with the clinical study published by Saake et al,⁶ who, in a study with 14 patients and evaluations made in consensus by 2 experienced neuroradiologists, reported that wall apposition was difficult to assess on intra-arterial DSA. In their study, they did not find any significant difference between DSA and intravenous angiographic CT related to the deployment of the FDS, wall apposition of the stent in the nonaneurysmal parent vessel segments, and the aneurysmal neck coverage by the stent, but the reviewers preferred intravenous angiographic CT for evaluation of wall apposition. Beyond the fact that the angiography suite used in this experimental study is not optimal and differs from clinical ones, there are some explanations for why 2D DSA might be suboptimal in assessing wall apposition. 2D DSA cannot provide cross-sectional images; thus, there are limited views examining the relationship between the FDS and the vessel wall. In addition, DSA imaging acquisition is based on mask subtraction, making assessment of any contrast opacification between the subtracted device itself and the arterial wall quite difficult. Furthermore, there was motion artifact in our study because the experimental aneurysms are not located in the brain, but in the thorax, and are subject to ventilation movements.

Newer tools are currently being evaluated in the setting of FDS treatment of intracranial aneurysms to assess wall apposition. Flat panel CT with intra-arterial or intravenous opacification has a very high spatial resolution and can be done directly on the DSA table without any additional invasive procedure and with low radiation.^{6,7,17-22} More recently, optical coherence tomography has been evaluated for intracranial procedures.^{8,23-27} In addition, other endovascular techniques that are primarily used in cardiology but not yet used in neuroradiology, such as intravascular sonography²⁴ or endoluminal optical imaging (angioscopy),²⁸ seem promising in the assessment of wall apposition. Our study

suggests that these tools could someday be preferred over DSA for the assessment of wall apposition.

In cases of poor wall apposition demonstrated on postdeployment imaging, it could be useful to improve apposition with balloon expansion. Another option is the development of flow-diverter stents with higher radial force and conformability, which are key factors, for better wall apposition.²⁹ However, radial force is usually low in braided devices. We surmise that new flow-diverter devices with a laser-cut scaffold and a high mesh attenuation construct on the outer diameter could give higher radial force and better wall apposition.³⁰

Limitations

Our study is limited by its retrospective nature and the use of only selected images for the DSA readers' assessment. In addition, it is possible that a newer-generation angiography suite could provide better DSA images; 3D runs with multiplanar reconstructions might be better than 2D DSA to assess wall apposition, but we did not perform these acquisitions. Another limitation to our study is the motion artifact associated with the respiratory and cardiac motion in these rabbit aneurysms. However, it is important to point out that all images underwent postprocessing, including pixel shifting by an experienced radiologist before assessment by the blinded readers. Another limitation of this study is that only 1 experienced reader evaluated the histologic samples. However, this reader was blinded to the DSA outcomes. Regarding the choice of the appropriate device, sizing was sometimes difficult because of discrepancies in the artery diameter between the proximal and distal parts, but the braided stents have the ability to expand beyond their labeled diameter.

We did not use a previously published classification for wall apposition assessment because we mainly focused at the level of the aneurysm neck, whereas the available classifications discussed the device deployment in the parent artery and not specifically at the neck.⁶ Another limitation of this study is that rabbits were killed at different time points, which can modify the outcomes after implantation of the PED depending on the length of follow-up. However, we did not observe any statistically significant impact of time on complete occlusion rates. Also, this study focused on wall apposition as a key factor influencing aneurysm occlusion after flow diversion, but some other criteria that have not been analyzed in this specific study are also of high importance, such as hemodynamic effects, intra-aneurysmal thrombosis, and mesh attenuation.

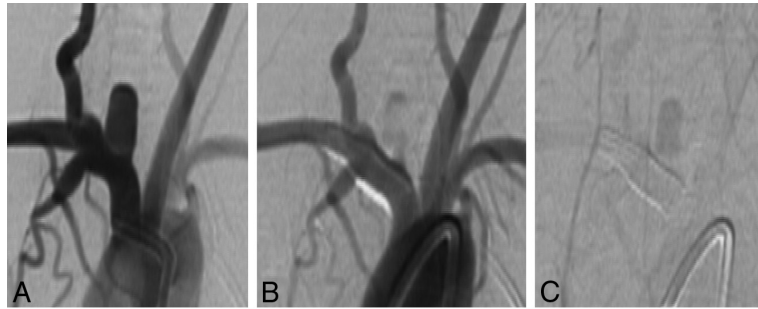
CONCLUSIONS

This study highlights that good wall apposition is key in obtaining complete occlusion of saccular aneurysms after FDS treatment. In this study, 2D DSA was found suboptimal for assessing wall apposition of FDSs, with only moderate interobserver agreement and low accuracy. Our inability to perform high-frame rate DSAs and C-arm CT acquisitions to evaluate wall apposition must be considered when assessing the significance of these results. Our study suggests that development of new tools for the assessment of wall apposition for flow-diverter stents is needed to improve angiographic outcomes in patients treated with FDSs.

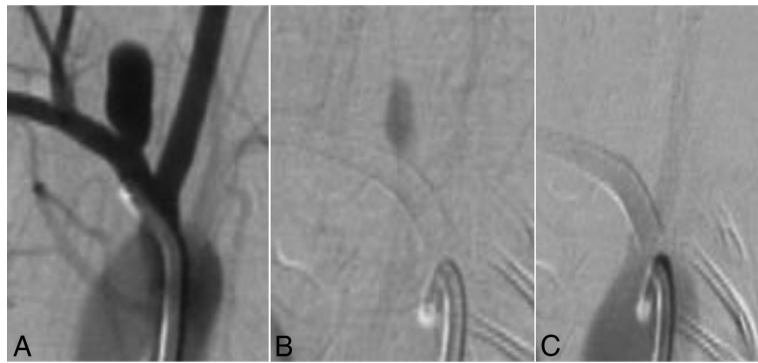
Disclosures: Juan Cebra—RELATED: Grant: National Institutes of Health, Comments: research grant*; UNRELATED: Grants/Grants Pending: National Institutes of Health,* Philips,* Comments: research grants. David F. Kallmes—UNRELATED: Board Membership: GE Healthcare,* Comments: cost-effectiveness board; Consultancy: ev3/Covidien/Medtronic,* Comments: planning and implementing clinical trials, clinical events committee, and steering committee; Grants/Grants Pending: Microvention,* Sequent,* Neurosigma,* Surmodics,* Codman,* ev3/Covidien/Medtronic,* Comments: preclinical research, clinical trials, and supply of devices; Travel/Accommodations/Meeting Expenses Unrelated to Activities Listed: ev3/Covidien/Medtronic,* Comments: presentation at FDA panel meeting. Ramanathan Kadirvel—RELATED: Grant: National Institutes of Health. *Money paid to the institution.

REFERENCES

- Arrese I, Sarabia R, Pintado R, et al. **Flow-diverter devices for intracranial aneurysms: systematic review and meta-analysis.** *Neurosurgery* 2013;73:193–99; discussion 199–200 CrossRef Medline
- Brinjikji W, Murad MH, Lanzino G, et al. **Endovascular treatment of intracranial aneurysms with flow diverters: a meta-analysis.** *Stroke* 2013;44:442–47 CrossRef Medline
- Wakhloo AK, Gounis MJ. **Revolution in aneurysm treatment: flow diversion to cure aneurysms: a paradigm shift.** *Neurosurgery* 2014;61 Suppl 1:111–20 CrossRef Medline
- Kadirvel R, Ding YH, Dai D, et al. **Cellular mechanisms of aneurysm occlusion after treatment with a flow diverter.** *Radiology* 2014;270:394–99 CrossRef Medline
- Foin N, Gutiérrez-Chico JL, Nakatani S, et al. **Incomplete stent apposition causes high shear flow disturbances and delay in neointimal coverage as a function of strut to wall detachment distance: implications for the management of incomplete stent apposition.** *Circ Cardiovasc Interv* 2014;7:180–89 CrossRef Medline
- Saake M, Struffert T, Goelitz P, et al. **Angiographic CT with intravenous contrast agent application for monitoring of intracranial flow diverting stents.** *Neuroradiology* 2012;54:727–35 CrossRef Medline
- Ding D, Starke RM, Durst CR, et al. **DynaCT imaging for intraprocedural evaluation of flow-diverting stent apposition during endovascular treatment of intracranial aneurysms.** *J Clin Neurosci* 2014; 21:1981–83 CrossRef Medline
- van der Marel K, Gounis MJ, Weaver JP, et al. **Grading of Regional Apposition after Flow-Diverter Treatment (GRAFT): a comparative evaluation of VasoCT and intravascular OCT.** *J Neurointerv Surg* 2015 Jul 28. [Epub ahead of print] CrossRef Medline
- Kallmes DF, Ding YH, Dai D, et al. **A new endoluminal, flow-disrupting device for treatment of saccular aneurysms.** *Stroke* 2007;38:2346–52 CrossRef Medline
- Kallmes DF, Ding YH, Dai D, et al. **A second-generation, endoluminal, flow-disrupting device for treatment of saccular aneurysms.** *AJNR Am J Neuroradiol* 2009;30:1153–58 CrossRef Medline
- Altes TA, Cloft HJ, Short JG, et al. **1999 ARRS Executive Council Award. Creation of saccular aneurysms in the rabbit: a model suitable for testing endovascular devices.** *American Roentgen Ray Society. AJR Am J Roentgenol* 2000;174:349–54 CrossRef Medline
- Fujiwara NH, Cloft HJ, Marx WF, et al. **Serial angiography in an elastase-induced aneurysm model in rabbits: evidence for progressive aneurysm enlargement after creation.** *AJNR Am J Neuroradiol* 2001;22:698–703 Medline
- Shrout PE, Fleiss JL. **Intraclass correlations: uses in assessing rater reliability.** *Psychol Bull* 1979;86:420–28 CrossRef Medline
- Kizilkilic O, Kocer N, Metaxas GE, et al. **Utility of VasoCT in the treatment of intracranial aneurysm with flow-diverter stents.** *J Neurosurg* 2012;117:45–49 CrossRef Medline
- Faragò G, Caldiera V, Tempa G, et al. **Advanced digital subtraction angiography and MR fusion imaging protocol applied to accurate placement of flow diverter device.** *J Neurointerv Surg* 2016;8:e5 CrossRef Medline
- Attizzani GF, Capodanno D, Ohno Y, et al. **Mechanisms, pathophysiology, and clinical aspects of incomplete stent apposition.** *J Am Coll Cardiol* 2014;63:1355–67 CrossRef Medline
- Aurboonyawat T, Schmidt PJ, Piotin M, et al. **A study of the first-generation Pipeline embolization device morphology using intraoperative angiographic computed tomography (ACT).** *Neuroradiology* 2011;53:23–30 CrossRef Medline
- Clarencon F, Piotin M, Pistocchi S, et al. **Evaluation of stent visibility by flat panel detector CT in patients treated for intracranial aneurysms.** *Neuroradiology* 2012;54:1121–25 CrossRef Medline
- Patel NV, Gounis MJ, Wakhloo AK, et al. **Contrast-enhanced angiographic cone-beam CT of cerebrovascular stents: experimental optimization and clinical application.** *AJNR Am J Neuroradiol* 2011;32:137–44 CrossRef Medline
- Jou LD, Mitchell BD, Shaltoni HM, et al. **Effect of structural remodeling (retraction and recoil) of the Pipeline embolization device on aneurysm occlusion rate.** *AJNR Am J Neuroradiol* 2014;35:1772–78 CrossRef Medline
- Caroff J, Mihalea C, Neki H, et al. **Role of C-arm VasoCT in the use of endovascular WEB flow disruption in intracranial aneurysm treatment.** *AJNR Am J Neuroradiol* 2014;35:1353–57 CrossRef Medline
- Poncyjusz W, Biliński P, Safranow K, et al. **The LVIS/LVIS Jr. stents in the treatment of wide-neck intracranial aneurysms: multicentre registry.** *J Neurointerv Surg* 2015;7:524–29 CrossRef Medline
- Hayat U, Thondapu V, Asrar UI Haq M, et al. **Optical coherence tomography to evaluate coronary stent implantation and complications.** *Coron Artery Dis* 2015;26 Suppl 1:e55–68 CrossRef Medline
- Amoroso G, van Geuns RJ, Spaulding C, et al. **Assessment of the safety and performance of the STENTYS self-expanding coronary stent in acute myocardial infarction: results from the APPOSITION I study.** *EuroIntervention* 2011;7:428–36 CrossRef Medline
- Radu M, Jorgensen E, Kelbaek H, et al. **Strut apposition after coronary stent implantation visualised with optical coherence tomography.** *EuroIntervention* 2010;6:86–93 CrossRef Medline
- Ozaki Y, Okumura M, Ismail TF, et al. **The fate of incomplete stent apposition with drug-eluting stents: an optical coherence tomography-based natural history study.** *Eur Heart J* 2010;31:1470–76 CrossRef Medline
- Sawada T, Shite J, Negi N, et al. **Factors that influence measurements and accurate evaluation of stent apposition by optical coherence tomography. Assessment using a phantom model.** *Circ J* 2009;73:1841–47 CrossRef Medline
- McVeigh PZ, Sacho R, Weersink RA, et al. **High-resolution angioscopic imaging during endovascular neurosurgery.** *Neurosurgery* 2014;75:171–80; discussion 179–80 CrossRef Medline
- Kalmár G, Hübner F, Voelker W, et al. **Radial force and wall apposition of balloon-expandable vascular stents in eccentric stenoses: an in vitro evaluation in a curved vessel model.** *J Vasc Interv Radiol* 2002;13:499–508 CrossRef Medline
- Möhlenbruch MA, Herweh C, Jestaedt L, et al. **The FRED flow-diverter stent for intracranial aneurysms: clinical study to assess safety and efficacy.** *AJNR Am J Neuroradiol* 2015;36:1155–61 CrossRef Medline



ON-LINE FIG 1. Illustrative DSA images for poor wall apposition. *A*, Pretreatment DSA. *B* and *C*, Objective bad wall apposition with contrast media between the arterial wall and the device with stagnation.



ON-LINE FIG 2. Illustrative DSA images for good wall apposition. *A*, Pretreatment DSA. *B* and *C*, Objective good wall apposition with no contrast media between the arterial wall and the device.

On-line Table: Descriptive table of aneurysms measurements, PED size, and outcomes

Animal ID	Aneurysm Measurements (mm)			Parent Artery Size (mm)			Size of the Implanted PED	Wall Apposition on Posttreatment DSA	Time of Death of Subjects (d)	Aneurysm Occlusion on FUP DSA	Wall Apposition on Histology
	Neck	Width	Height	Aneurysm Neck Level	Proximal to Aneurysm	Distal to Aneurysm					
1	3.5	3.8	9.2	2.8	2.2	3.2	3.5 × 15	Good	180	Complete	NA
2	3.2	3.9	8.2	3.4	4.8	4.2	4.0 × 20	Poor	90	Complete	NA
3	3.1	4.9	11.1	3	2.5	3.7	3.25 × 14	Poor	180	Complete	Good
4	2.7	4.3	9.9	2.5	2.3	2.1	3.25 × 17	Good	90	Complete	Good
5	2.8	3.6	9.4	2.5	2.4	3.1	3.75 × 14	Poor	90	Complete	Good
6	2.4	3.7	10.7	2.2	3	3.5	3.25 × 17	Poor	180	Complete	Good
7	3	4.2	9.3	2.4	2.7	2.3	3.25 × 17	Good	90	Complete	Good
8	4.6	5.3	12.7	3.1	3.4	3.6	3.25 × 14	Poor	90	Complete	Good
9	2.8	3.8	10.4	2.9	3	4.7	3.5 × 17	Poor	180	Complete	Good
10	2.3	3.9	6.8	4	4.1	4.2	3.5 × 17	Good	30	Complete	Good
11	4.7	5.7	14.6	3.9	2.3	4	3.5 × 14	Good	180	Complete	Good
12	3.3	6.3	11.1	2.5	3.2	3.2	4.0 × 17	Good	30	Complete	Good
13	3.8	5	14.1	2.7	2.8	4.2	3.25 × 14	Poor	180	Complete	Good
14	2.9	3.9	7.9	3.4	2.6	3.4	3.5 × 20	Poor	180	Complete	Good
15	2.5	3.6	7	2.8	3.6	3.6	3.5 × 15	Good	90	Incomplete	Poor
16	2.6	2.9	4.8	3.5	3.6	2.8	3.5 × 15	Good	30	Complete	Good
17	3.4	2.7	6.3	2.9	3	2.9	3.5 × 15	Good	180	Complete	Good
18	2.7	2.8	5.8	3	3.6	3.1	3.5 × 15	Good	90	Incomplete	Poor
19	2.4	3.7	8.6	2.5	3.2	2.4	3.5 × 20	Good	30	Incomplete	Good
20	2.3	4.1	9	2.7	3.8	4.2	3.5 × 15	Poor	180	Complete	Good
21	2.9	3.1	7.8	3.3	3	3.1	3.75 × 15	Good	30	Complete	Poor
22	1.9	3.7	8.9	4	3.2	3.6	3.75 × 20	Good	30	NC	NA
23	1.9	2.9	7.6	3.2	4	4.1	3.75 × 15	Good	30	Incomplete	Good
24	4.3	4.3	10.9	3.3	3.5	3.6	3.5 × 20	Good	180	Incomplete	Poor
25	5.7	5.1	11.9	4.5	4.6	4.1	4.0 × 20	Poor	30	Incomplete	Poor
26	4.6	4	11.2	2.1	2.6	4.6	3.5 × 15	Poor	90	Complete	Poor
27	1.7	3.8	7.3	2.5	2.7	3.3	3.5 × 15	Good	30	Complete	Good
28	2.9	4.8	9	3.3	4.6	4.1	4.0 × 15	Poor	180	Incomplete	Good
29	3.1	2.7	4.9	3.4	3.1	6.4	3.5 × 20	Poor	180	Complete	Poor
30	2.5	4.4	6.7	3.1	3.5	3.5	3.75 × 15	Poor	90	Incomplete	Poor
31	3.3	4.2	11.3	3.4	3.4	4.1	3.75 × 14	Good	30	Complete	Poor
32	2.5	4.1	8.6	2.7	3.4	3	3.5 × 14	Good	30	Complete	Good
33	2.4	3.4	6.5	3.2	4	3.4	4.5 × 14	Good	90	Complete	Good
34	5.6	4.7	9.2	2.8	3.6	3.9	4.5 × 14	Good	30	Complete	Good
35	3.6	5.4	11.8	2.9	2.9	4.1	3.75 × 17	Good	30	Incomplete	Poor
36	4.6	5.1	12.8	3.1	3.4	4.1	3.25 × 17	Poor	90	Complete	Good
37	4.7	5.5	10.6	2.8	2.4	4.3	4.0 × 15	Good	30	Incomplete	Poor
38	6.3	7.8	9	2.8	2.5	4.6	4.0 × 15	Good	30	Complete	Good
39	5.9	7.8	13.7	2.7	3.2	3.7	3.5 × 15	Good	30	Incomplete	Poor
40	2.8	4.2	11.1	2.9	3.3	3.9	3.5 × 15	Good	30	Incomplete	Poor
41	4.9	8.1	8.4	2	3.1	2.4	3.5 × 15	Good	30	Incomplete	Poor

Note:—FUP indicates follow-up; NA, no histology; NC, no control.

b. Risque de rupture retardée

➤ *Revue de la littérature*

Les complications majeures après *flow-diverter* incluent l'AVC ischémique due à l'occlusion de l'artère porteuse ou de branches couvertes par le dispositif³¹¹⁻³¹⁴ ainsi que les complications hémorragiques : la rupture post-opératoire de l'anévrisme et les hémorragies intraparenchymateuses homolatérales au dispositif (sans rupture de l'anévrisme)^{189, 204, 205, 315-317}.

Peu d'éléments sont connus sur les facteurs de risque et les mécanismes de ces complications hémorragiques^{185, 317-320}. De précédentes études ont suggéré ou démontré un risque plus élevé de rupture dans les anévrismes géants (> 25 mm)^{109, 189, 205, 320}. Certaines études ont suggéré le rôle du thrombus intra anévrysmal non complètement exclu de sa charge biologique, comme étant la cause de ces ruptures retardées^{321, 322}. Ce rôle du thrombus intra anévrysmal a été montré par analogie aux anévrismes de l'aorte abdominale dans lesquels le thrombus luminal est connu pour être le site de stockage, d'activation et de relargage de polynucléaires et de différentes protéases comme les métalloprotéinases et les sérine-protéases^{49, 243}. Il a été démontré que l'activité protéolytique du thrombus luminal est le principal moteur de dégradation des constituants structurels de la paroi artérielle avec une augmentation de l'infiltration pariétale par des polynucléaires neutrophiles au moment de la rupture^{323, 324}. Des profils similaires liés à l'importante charge biologique du thrombus sacculaire des AI après mise en place d'un *flow-diverter* pourraient être à l'origine de leur rupture secondaire. Bien que ces cas de ruptures retardées soient rares, leur gravité nécessite de prévenir au maximum ce risque. En l'attente d'études expérimentales visant à obtenir une thrombose moins génératrice de lésions inflammatoires, l'ANSM a recommandé d'associer un traitement par coils au *flow-diverter* pour le traitement des anévrismes géants de plus de 15 mm de diamètre. Cette association des coils viserait à obtenir plus rapidement un thrombus "organisé" qui serait moins pourvoyeur de ruptures retardées.

Nous avons récemment publié une revue systématique de la littérature sur les hémorragies intraparenchymateuses après traitement par *flow-diverter* et la rupture retardée des anévrismes traités par *flow-diverter*³²⁵ afin de déterminer quelles étaient les caractéristiques du patient, de la procédure ou de l'anévrisme qui constitueraient des facteurs de risque de ces complications. Selon cette revue systématique, environ 80% des ruptures anévrysmales retardées se produisent dans les 30 jours suivant la procédure. Les patients

présentant une de ces complications ont un mauvais pronostic clinique avec 70 à 80% de morbi-mortalité. Parmi les patients ayant présenté une rupture retardée, 45% avaient des anévrysmes géants (>25 mm), suggérant que ces anévrysmes présentent un risque plus élevé de rupture retardée que les petits, moyens ou grands anévrysmes. Cette étude a également analysé l'impact du coiling associé afin de déterminer sa capacité à prévenir les ruptures retardées comme précédemment suggéré. Près de 20% des anévrysmes ayant présenté une rupture retardée avaient un coiling associé préalable ou simultanément à la pose du *flow-diverter*, suggérant que le coiling des anévrysmes traités par *flow-diverter* ne protège pas systématiquement contre une rupture retardée.

Le mécanisme biologique exact aboutissant à la rupture retardée d'un anévrysme n'est pas bien établi. Des études de dynamique des fluides ont démontré que les modifications du flux après l'implantation d'un *flow-diverter* provoquent une augmentation de la pression intra-anévrysmale pouvant potentiellement conduire à une rupture, surtout pour les anévrysmes géants²⁰⁴. D'autres études suggèrent un rôle potentiel du thrombus intra-anévrysmal dans le mécanisme pathophysiologique de la rupture retardée de l'anévrysme étant donné que le thrombus intra-sacculaire est une source de diverses protéases avec une activité protéolytique élevée pouvant participer à la dégradation de la paroi artérielle et conduire à la rupture de l'anévrysme^{189, 243, 321-324, 327-329}.

Puisque les anévrysmes géants sont plus susceptibles d'avoir un important thrombus intra-sacculaire, ce mécanisme pourrait jouer un rôle dans la rupture tardive de ces anévrysmes. En raison du risque accru de rupture retardée des anévrysmes géants, certains ont recommandé que les anévrysmes géants soient traités par coiling associé au *flow-diverter* afin de protéger le dôme de l'anévrysme et éviter les ruptures tardives^{205, 316, 319, 330}. En effet, notre étude a révélé que plus de 80% des anévrysmes ayant présenté une rupture retardée après *flow-diverter* n'avaient pas eu de coiling associé. Cependant, il ressort clairement de ces résultats que le coiling n'est pas une panacée puisque 20% des anévrysmes ayant subi une rupture retardée avaient également des coils. Il n'a cependant pas été possible, dans cette étude, d'analyser l'impact de la densité du coiling associé puisque cette information n'est pas rapportée dans la plupart des études incluses. Peut-être un coiling plus dense serait plus protecteur contre la rupture retardée ?

Finalement, la rupture retardée d'un anévrysme après *flow-diverter* est un problème complexe et multifactoriel et des études précliniques sont nécessaires pour évaluer les effets protecteurs mécaniques et biologiques du coiling associé.

Nous présentons dans la partie suivante, une étude expérimentale évaluant l'expression des métallo-protéases après traitement par *flow-diverter*, seul ou en association avec des coils³²⁶.

➤ Intérêt du coiling associé pour la prévention des ruptures retardées

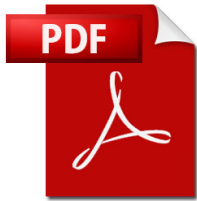
Comme nous venons de le rappeler, les *flow-diverters* peuvent avoir des complications rares mais graves, telles que la rupture retardée d'un anévrisme^{189, 204, 205, 316, 317, 325}. Il subsiste des preuves insuffisantes concernant les facteurs de risque et les mécanismes aboutissant à ces complications hémorragiques^{185, 205, 316-320} avec cependant un rôle essentiel du thrombus intra-anévrysmal dans le mécanisme physiopathologique de la rupture retardée de l'anévrisme¹⁸⁹.

Comme décrit précédemment dans les anévrismes de l'aorte abdominale, les leucocytes piégés dans le thrombus intra-luminal sont une source de stockage, de libération et d'activation de diverses protéases telles que les métalloprotéinases (MMP-9) et les sérine-protéases. Ces protéases ont une activité protéolytique élevée qui pourrait participer à la dégradation des composants structurels de la paroi artérielle et conduire à une rupture de l'anévrisme^{189, 224, 243, 321-323, 327-329, 340}. Les MMP sont sécrétées à l'état de pro-formes inactives (pro-MMP) et sont activées par clivage de protéines par d'autres protéinases en MMP actives³⁴⁰. L'expression excessive des collagénases activées (MMP-2 et MMP-9) dans les anévrismes cérébraux rompus³⁴¹ indique qu'une régulation efficace des MMP pourrait permettre une stabilisation des anévrismes cérébraux et une réduction du risque de rupture retardée.

Certaines études ont déjà décrit l'implication des MMP dans les maladies vasculaires cérébrales et les anévrismes^{44, 55, 342-347}. Des études antérieures ont démontré un risque plus élevé de rupture des anévrismes intracrâniens géants^{109, 189, 205, 320, 325} et ont recommandé que ces anévrismes géants soient traités par coiling en complément du traitement par *flow-diverter* afin de stabiliser l'anévrisme dans le but de prévenir les ruptures retardées^{205, 316, 319, 330, 348}. Cependant, le coiling associé ne permet pas d'éliminer totalement le risque de rupture retardée avec 20% de ruptures retardées dans des anévrismes traités par coiling associé³²⁵.

La cyclosporine A est un agent anti-inflammatoire³⁴⁹ largement utilisé pour prévenir le rejet de greffe après transplantation ou pour le traitement de maladies auto-immunes³⁵⁰. Cette molécule a déjà été testée dans diverses applications pour son effet sur la régulation des taux de MMP³⁴⁹⁻³⁵⁹. Dans une étude portant sur les anévrismes de l'aorte abdominale, la cyclosporine avait permis de diminuer l'expression de MMP-9 active et de stopper la croissance des anévrismes³⁵⁵. Cependant, la cyclosporine n'a pas jamais été testée dans les anévrismes intracrâniens pour réguler l'expression des MMP.

Les objectifs de notre étude étaient d'évaluer l'effet du coiling associé et de la cyclosporine pour réguler l'expression des MMP dans les anévrysmes intracrâniens traités par *flow-diverter* dans un modèle anévrysmal chez le lapin.



Article 3 : Thielen E, McClure M, **Rouchaud A**, Ding YH, Dai D, Schroeder D, Cebal J, Kallmes DF, Kadirvel R. Concomitant coiling reduces metalloproteinase levels in flow-diverter-treated aneurysms but anti-inflammatory treatment has no effect. *J Neurointerv Surg.* 2016 Mar 14. [Epub ahead of print]³²⁶

Les parties Méthodes et Résultats sont présentées dans le PDF de l'article.

Cette étude démontre que **le traitement par *flow-diverter* a un impact sur le niveau d'expression des MMP dans les anévrysmes intracrâniens.** Plus précisément, les anévrysmes traités par *flow-diverter* et coiling associé ont des niveaux significativement augmentés de pro-MMP-9. Dans cette étude réalisée sur un effectif assez peu important d'animaux, nous avons noté une importante tendance à la diminution de l'expression de MMP-9 active en cas de coiling associé par rapport aux anévrysmes traités par *flow-diverter* seul. L'approche par médication anti-inflammatoire avec la cyclosporine n'a pas eu d'impact significatif sur les taux de MMP. Ces résultats suggèrent la nécessité de plus grandes études précliniques axées sur l'expression de la MMP-9 ou après traitement par *flow-diverter*. D'autres sérine-protéases neutrophilaires telles que l'élastase n'ont pas été analysées dans cette étude mais pourraient également avoir un rôle majeur.

Par analogie avec les anévrysmes de l'aorte abdominale, des études expérimentales et cliniques antérieures ont suggéré que le thrombus intra-anévrysmal secondaire à la mise en place du *flow-diverter* pourrait être un site d'activation des MMP et une cause potentielle de rupture retardée^{189, 243, 321-323, 327-329}. En outre, des études antérieures ont suggéré ou démontré un risque plus élevé de ruptures retardées après *flow-diverter* dans les anévrysmes géants^{109, 189, 205, 320, 325}. Étant donné que les anévrysmes géants sont généralement plus susceptibles d'avoir un thrombus intraluminal plus important, il est probable que les anévrysmes plus grands traités par *flow-diverter* ont des niveaux plus élevés d'expression des MMP. Les résultats de cette étude, sont encourageants pour réaliser de nouvelles recherches concernant le rôle de la MMP-9 dans la survenue de complications liées aux *flow-diverters*.

La tendance à la diminution de l'expression de la forme active de MMP-9 dans le groupe traité par coiling concomitant par rapport aux autres groupes traités par *flow-diverter* est un élément très important. En effet, malgré des recommandations empiriques qui avaient préconisé de traiter les anévrysmes de plus de 15 mm par coiling associé^{205, 316, 319, 330, 348}, aucune étude n'avait décrit son impact sur les taux de MMP. Notre étude montre que l'effet du coiling concomitant n'est pas seulement lié à un effet mécanique des coils pour protéger le dôme des anévrysmes mais, au moins en partie, à un effet biologique sur l'expression des MMP. **Ces résultats suggèrent que le coiling concomitant peut réduire le niveau d'expression de MMP-9 active dans les anévrysmes traités par *flow-diverter*** en bloquant l'activation de la pro-MMP9 vers sa forme active avec une accumulation de sa pro-forme inactive, qui pourrait être une solution potentielle pour empêcher des ruptures d'anévrysmes retardées après *flow-diverter*. Cela signifie qu'il y a moins d'activation neutrophilaire dans le thrombus des anévrysmes traités par coiling associé au *flow-diverter* que celui des anévrysmes traités par *flow-diverter* seul. Cela est en faveur d'un thrombus en constant renouvellement dans les anévrysmes traités par *flow-diverter* seul et que les coils permettent une stabilisation de ce thrombus. Pour explorer ces mécanismes, il serait intéressant d'analyser les niveaux de MMP dans de nouveaux modèles d'anévrysmes actifs ou de thrombus bio-actifs^{48, 267}.

Des médicaments anti-inflammatoires et immunosuppresseurs comme la cyclosporine A ont démontré un effet bénéfique sur les taux de MMP dans les anévrysmes de l'aorte abdominale^{355, 360, 361}. Cependant, dans notre étude, les taux d'expression de MMP-2 et MMP-9 dans le groupe traité par *flow-diverter* et cyclosporine étaient comparables aux anévrysmes traités avec *flow-diverter* seul avec des niveaux plus élevés de MMP-9 active. Bien que l'on espérait que la cyclosporine pourrait être utilisée pour contrôler les niveaux de MMP, elle ne semble pas avoir d'effet sur l'expression de MMP-9 ou MMP-2. D'autres recherches pourraient être menées pour explorer la possibilité d'utiliser d'autres médicaments anti-inflammatoires sur l'expression des MMP. En outre, le rôle des médiateurs pro-inflammatoires dans la croissance et/ou la rupture des anévrysmes par rapport à leur cicatrisation après traitement reste à élucider.

Conclusion

L'implantation d'un *flow-diverter* augmente le niveau d'expression de pro-MMP9 dans les anévrysmes. On observe une tendance très importante pour une réduction de l'expression de MMP-9 active avec le coiling associé, nécessitant une confirmation de ces résultats sur une

étude avec un effectif plus important. Le traitement anti-inflammatoire par cyclosporine semble avoir un effet biologique minimal.

ORIGINAL RESEARCH

Concomitant coiling reduces metalloproteinase levels in flow diverter-treated aneurysms but anti-inflammatory treatment has no effect

Evan Thielen,¹ Megan McClure,¹ Aymeric Rouchaud,¹ Yong-Hong Ding,¹ Daying Dai,¹ Dana Schroeder,¹ Juan Cebral,² David F Kallmes,^{1,3} Ramanathan Kadirvel¹

¹Applied Neuroradiology Laboratory, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA
²George Mason University, Bioengineering, Fairfax, Virginia, USA
³Department of Radiology, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA

Correspondence to

Dr Aymeric Rouchaud, Neuroradiology Research Laboratory, Mayo Clinic, 200 First St SW, Rochester, MN 55905, USA; aymeric.rouchaud@gmail.com

Received 29 November 2015
 Revised 10 February 2016
 Accepted 22 February 2016

ABSTRACT

Background and purpose Flow diverters (FD) can cause rare but devastating delayed aneurysm ruptures in which matrix metalloproteinases (MMPs) have been potentially implicated. Concomitant coiling or anti-inflammatory medications have been proposed to prevent the risk of delayed ruptures. The aim of this study was to evaluate concomitant coiling and ciclosporin in regulating the expression of MMPs in FD-treated aneurysms.

Materials and methods Elastase-induced aneurysms were created in 20 rabbits. Aneurysms were treated with (1) FD alone; (2) FD with concomitant coiling; (3) FD+ciclosporin; or (4) left untreated as controls. At sacrifice, MMP levels were analyzed by zymography. Kruskal–Wallis one-way non-parametric ANOVA was performed for each enzyme. If significant results were observed for the Kruskal–Wallis test, pairwise group comparisons were performed using Dunn's test with Bonferroni multiple-testing correction.

Results Significant differences were observed among groups for pro-MMP9 ($p=0.0337$). Pairwise comparison demonstrated higher levels of pro-MMP9 with concomitant coiling compared with untreated aneurysms ($p=0.012$), with higher though not significantly different levels of pro-MMP9 in FD with concomitant coiling versus FD alone. While not statistically significant, trends were noted regarding differences in active-MMP9 across groups, with a lower level of active-MMP9 with concomitant coiling compared with the other FD groups. No significant differences were observed for pro- or active-MMP2 across groups, or for FD + ciclosporin compared with FD alone.

Conclusions FD implantation increases the level of pro-MMP9 expression in aneurysms. Provocative trends regarding modulation of active-MMP9 expression with concomitant coiling suggest the need for larger confirmatory preclinical studies. Anti-inflammatory treatment with ciclosporin appears to have a minimal biological effect.

Trial registration number R01NS076491

INTRODUCTION

Flow diverters (FD) are now largely accepted as standard treatment of selected aneurysms due to their high rates of angiographic occlusion and good clinical outcomes.^{1–3} However, these devices may have rare but severe complications such as post-operative or delayed aneurysm rupture.^{4–8} Despite the fact that numerous case series and case reports

have reported this complication, there continues to be controversy surrounding its origin with poor evidence regarding the risk factors and mechanisms of these hemorrhagic complications.^{4 6 8–12} Previous studies have suggested a potential role of intra-aneurysmal thrombus in the pathophysiologic mechanism of aneurysm rupture.⁷

As previously described in abdominal aortic aneurysms, leukocytes trapped in the intraluminal thrombus are a source of storage, release, and activation of various proteases such as matrix metalloproteinases (MMP2 and MMP9) and serine proteases. These have high proteolytic activity which could participate in the degradation of structural components of the arterial wall and lead to aneurysm rupture.^{7 13–20} MMPs are secreted as inactive pro-forms (pro-MMP) and are activated by protein cleavage by other proteinases (active-MMP).²⁰ The overexpression of activated type IV collagenases MMP9 and MMP2 in cerebral ruptured aneurysms²¹ indicates that effective regulation of MMPs may result in improving the clinical prognosis of cerebral aneurysms.

Some studies have already described the implication of MMPs in cerebral vascular diseases and aneurysms.^{22–29} Previous studies have demonstrated a higher risk of rupture in giant aneurysms^{2 6 7 12} and have recommended that giant aneurysms are treated with concomitant coiling and FD treatment in order to protect the dome of the aneurysm in an attempt to prevent delayed ruptures.^{4 6 11 30 31}

Ciclosporin A is an anti-inflammatory agent³² widely used to prevent organ transplant rejection or to treat autoimmune disorders.³³ Ciclosporin has already been tested for its effect on MMP levels in various models and disorders.^{32–42} In a study of abdominal aortic aneurysms, ciclosporin decreased MMP9 and stabilized expanding aortic arteries.³⁸ However, it has not been tested in intracranial aneurysms to regulate MMP expression.

The aims of our study were to evaluate the effect of associated coiling and ciclosporin to regulate MMP expression in FD-treated aneurysms in a rabbit model.

METHODS**Aneurysm creation and treatment**

The Institutional Animal Care and Use Committee approved all procedures before the initiation of this study. Some of the rabbits used in this study were originally employed as part of other investigations,

To cite: Thielen E, McClure M, Rouchaud A, et al. *J NeuroIntervent Surg* Published Online First: [please include Day Month Year] doi:10.1136/neurintsurg-2015-012207

Basic science

where we investigated the gene expression between aneurysms treated with microcoils and FD.⁴³ Elastase-induced saccular aneurysms were created in 20 New Zealand White rabbits as previously described.⁴⁴ Three weeks after aneurysm creation the rabbits were treated either with FD alone (n=5), FD with concomitant coiling (n=6), FD + ciclosporin (n=5), or left untreated (n=4).^{45 46} The rabbits treated with FD and ciclosporin were given 10 mg ciclosporin A/kg body weight by oral gavage once daily for 4 weeks.

The rabbits were sacrificed 4 weeks after the treatment procedure. At the time of sacrifice the animals were deeply anesthetized. The animals were then euthanized with a lethal injection of pentobarbital. Aneurysms were immediately harvested, frozen in liquid nitrogen and kept at -70°C until used.⁴³

Gelatin zymography of MMPs

Frozen samples were pulverized under liquid nitrogen and extracted in ice-cold lysis buffer (10 mmol/L sodium phosphate, pH 7.2, 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, and 0.2% sodium azide). After centrifugation at 10 000 g for 20 min at 4°C , the protein concentration of the supernatant was determined (Pierce Biotechnology). Samples were resolved by non-reducing 10% SDS-PAGE through gels containing 0.1% gelatin (Bio-Rad). Gels were washed with 2.5% Triton X-100 for 1 h, then incubated for 24 h at 37°C in developing buffer (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5, 5 mmol/L CaCl_2 and 0.5 mmol/L ZnCl_2). MMP2 and MMP9 are collagenases which act on the gelatin (a partial collagen digest) in the gel and produce gelatinolytic zones. Gelatinolytic zones, representing the activities of MMPs, were visualized after staining the gels with 0.5% Coomassie Blue R-250. The gelatinolytic zones of MMP2 and MMP9 were analyzed densitometrically using Image-J software and converted to quantifiable data in the number of pixels.^{47 48} The intensities of the gelatinolytic bands reflect the activity of the corresponding MMP.

Statistical analysis

Kruskal–Wallis one-way non-parametric ANOVA was performed for each enzyme (pro-MMP2, active-MMP2, pro-MMP9, and active-MMP9) for each of the four treatment groups. Kruskal–Wallis p values were not corrected for multiple testing. Post-hoc

pairwise group comparisons were performed using Dunn's test with Bonferroni multiple-testing correction.⁴⁹ Statistical analyses were performed in R (V3.1.1; Vienna, Austria). Dunn's test was performed using R package `dunn.test` (V1.2.4). A value of $\alpha=0.05$ was selected as the significance threshold.

RESULTS

Summary statistics are reported in [table 1](#) as medians and IQR. [Figure 1](#) shows MMP expression by aneurysm treatment with boxplots and individual data points.

In all treatment groups the levels of MMPs in treated aneurysms appeared higher than in the untreated group, with the exception of the FD with concomitant coiling group for active-MMP9; however, significant differences between groups were only found for pro-MMP9. MMP2 levels were similar throughout the three different FD treatment groups.

Compared with the untreated aneurysms, aneurysms treated with FD alone had higher levels of pro-MMP9 (2575 (IQR 697–4917) vs 428 (IQR 90–1941)), active-MMP9 (2666 (IQR 1066–5291) vs 483 (IQR 251–1897)), pro-MMP2 (4644 (IQR 2403–7693) vs 3250 (IQR 2950–6684)), and active-MMP2 (3500 (IQR 2684–4476) vs 1294 (IQR 1143–1666)), but these differences did not reach significant levels ([table 2](#)).

In the group treated with FD and concomitant coiling the level of active-MMP9 was similar to the level in the untreated group (496 (IQR 420–1734) vs 483 (IQR 251–1897)). The level of pro-MMP9 was significantly higher in the FD with concomitant coiling group than in the untreated aneurysm group (9774 (IQR 7657–13562) vs 428 (IQR 90–1941); $p=0.012$, [table 2](#)).

We did not observe any statistically significant difference or trends in difference when comparing the MMP levels in aneurysms treated with FD + ciclosporin and FD alone.

DISCUSSION

This study demonstrates that treatment with FD affects MMP levels in intracranial aneurysms. Specifically, aneurysms treated with FD and concomitant coiling have significantly increased levels of pro-MMP9. In this relatively small study we noted a trend toward decreased active-MMP9 with concomitant coiling compared with the other FD groups. Anti-inflammatory

Table 1 Descriptive statistics for pixel counts by enzyme

	Untreated aneurysm (N=4)	FD alone (N=6)	FD + coils (N=5)	FD + ciclosporin (N=5)*	p Value
Pro-MMP9					0.0337
Median	428	2575	9774	3159	
IQR	90–1941	697–4917	7657–13562	1730–4150	
Active-MMP9					0.126
Median	483	2666	496	2410	
IQR	251–1897	1066–5291	420–1734	2099–3039	
Pro-MMP2					0.779
Median	3250	4644	4553	4628	
IQR	2950–6684	2403–7693	3962–5261	4066–8065	
Active-MMP2					0.152
Median	1294	3500	3653	3822	
IQR	1143–1666	2684–4476	2186–4360	2670–4068	

Kruskal–Wallis tests.

*Flow diverter + ciclosporin pro-MMP9 (N=4).

FD, flow diverter.

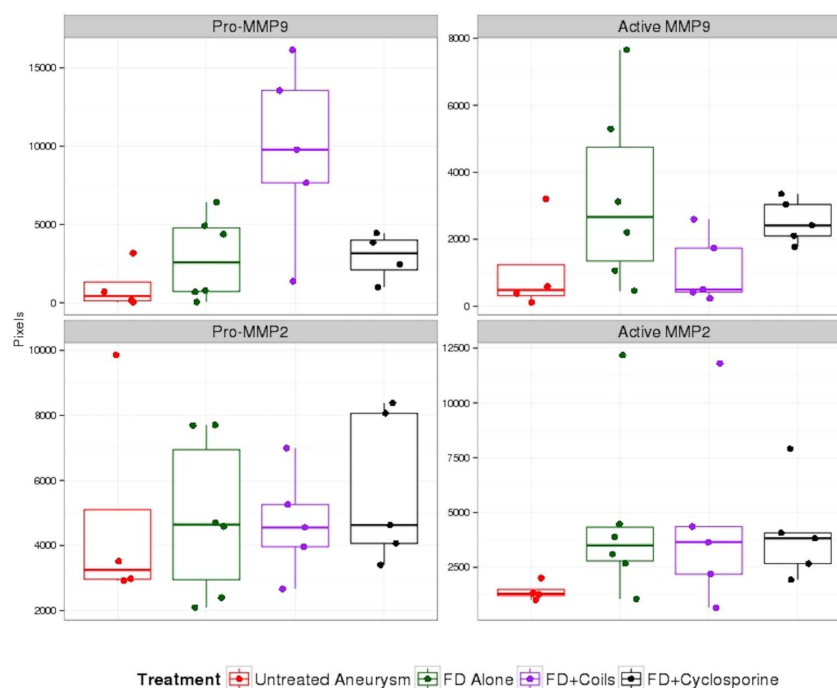


Figure 1 Boxplot of matrix metalloproteinase (MMP) expression by aneurysm treatment. The individual data points for each treatment are also shown. FD, flow diverter.

medications with ciclosporin did not significantly affect the levels of MMPs. These findings suggest the need for larger pre-clinical studies focused on MMP9 biology following treatment with FD.

By analogy with abdominal aneurysms, previous experimental and clinical studies have suggested that the intra-aneurysmal thrombus associated with FD could be a site of activation of MMPs and a potential cause of delayed ruptures.^{7 13–19} Furthermore, prior studies have suggested or demonstrated a higher risk of delayed ruptures after FD in giant aneurysms.^{2 6 7 12} Since giant aneurysms are generally more likely to have a larger intraluminal thrombus, it is probable that larger FD-treated aneurysms have higher levels of MMP expression. Based on our current findings, we believe that the ongoing focus on MMP9 may provide important insights into FD-related complications.

The trend toward decreased active-MMP9 with concomitant coiling compared with the other FD groups is very important. Indeed, despite previous recommendations for concomitant coiling in aneurysms larger than 15 mm,^{4 6 11 30 31} no study has described its effect on MMP levels. Our study shows that the effect of concomitant coiling is not only related to a mechanical effect of the coils to protect the aneurysms dome but, at least in

part, is related to a biological effect on MMP expression. It suggests that concomitant coiling may reduce the level of active-MMP9 expression in the FD-treated aneurysms by blocking the activation of pro-MMP9 in its active form with accumulation of its inactive proform, which could be a potential solution to prevent delayed aneurysm rupture after FD.

Anti-inflammatory and immunosuppressive drugs such as ciclosporin A have proved to be beneficial on MMP levels in abdominal aneurysms.^{38 50 51} However, in our study, the expression levels of MMP2 and MMP9 in the group treated with FD + ciclosporin were comparable to those in aneurysms treated with FD alone, with higher levels of active-MMP9. While it was hoped that ciclosporin could be used to control MMP levels, it does not appear to have an effect on either MMP9 or MMP2. Further research is needed to explore the effect of other anti-inflammatory medications on MMP expression. Additionally, the role of pro-inflammatory mediators in aneurysm progression and rupture versus healing after treatment remains to be elucidated. Previous studies have demonstrated that MMPs and monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 play key roles in formation and rupture, with MCP-1 promoting MMP9, but post-treatment expression also increases possibly due to aneurysm healing.^{29 52 53}

Table 2 Post-hoc pairwise group comparison p values for pro-MMP9 using Dunn's method with Bonferroni correction

	FD + coils	FD alone	FD + ciclosporin
FD alone	0.141	–	–
FD + ciclosporin	0.414	1.00	–
Untreated aneurysm	0.012	0.783	0.561

FD, flow diverter.

Study limitations

Our study has several limitations. We used the rabbit elastase model which has histological, morphological, biological, and hemodynamic similarities to humans and is stable in time with no spontaneous thrombosis.⁵⁴ However, this model is neither a model of spontaneous rupture nor a model of delayed aneurysm rupture after FD, and some biological aspects may differ when considering rupture-prone aneurysms. To explore these

Basic science

mechanisms, it would be of interest to analyze levels of MMPs in new models for active aneurysms with inflamed aneurysm wall or bioactive thrombus.^{55–56} Also, the reported cases of delayed rupture after FD occurred mostly in large or giant aneurysms but the aneurysms used in this study were less than 20 mm. Some of our results did not reach significant differences, but our ability to detect differences between groups was limited by the size of the treatment groups. Further studies should be done with larger groups. For the effect of concomitant coiling, we did not perform any analysis of the impact of the packing density. Perhaps denser coil packing would increase the effect of MMP regulation. Different anti-inflammatory drugs may have different results, but we decided to use cyclosporin because rabbits are known to be extremely sensitive to steroids.^{57–60} Furthermore, we analyzed only one dose of cyclosporin and its effect may be different with higher doses. Only one time point was studied following treatment of the aneurysm and protein expression may change over time. Finally, only two MMPs were studied and other MMP isoforms may play important roles in delayed aneurysm rupture.⁶¹ Transforming growth factor β (TGF- β) is a key factor for MMP downregulation.³⁸ However, we did not measure the level of TGF- β in this study. It is possible that other proteolytic enzymes such as cathepsin or other pathways may lead to delayed aneurysm rupture.

CONCLUSION

FD implantation increases the level of pro-MMP9 expression in aneurysms. Provocative trends regarding modulation of active-MMP9 expression with concomitant coiling suggests the need for larger confirmatory preclinical studies. Anti-inflammatory treatment with cyclosporin appears to have minimal biological effect.

Contributors All authors participated in drafting the article and revising it critically for important intellectual content. All authors made substantial contributions to conception and design, acquisition of the data, and analysis and interpretation of the data. All authors provided final approval of the version to be published.

Funding This work was supported by NIH grant R01NS076491

Competing interests None declared.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data sharing statement The authors are willing to share spreadsheets from their data extraction on request.

REFERENCES

- Arrese I, Sarabia R, Pintado R, et al. Flow-diverter devices for intracranial aneurysms: systematic review and meta-analysis. *Neurosurgery* 2013;73:193–9; discussion 199–200.
- Brinjikji W, Murad MH, Lanzino G, et al. Endovascular treatment of intracranial aneurysms with flow diverters: a meta-analysis. *Stroke* 2013;44:442–7.
- Wakhloo AK, Gounis MJ. Revolution in aneurysm treatment: flow diversion to cure aneurysms: a paradigm shift. *Neurosurgery* 2014;61(Suppl 1):111–20.
- Turovski B, Macht S, Kulcsar Z, et al. Early fatal hemorrhage after endovascular cerebral aneurysm treatment with a flow diverter (SILK-Stent): do we need to rethink our concepts? *Neuroradiology* 2011;53:37–41.
- Cebral JR, Mut F, Raschi M, et al. Aneurysm rupture following treatment with flow-diverting stents: computational hemodynamics analysis of treatment. *AJNR Am J Neuroradiol* 2011;32:27–33.
- Kulcsar Z, Szikora I. The ESMINT retrospective analysis of delayed aneurysm ruptures after flow diversion (RADAR) study. *EJMINT* 2012;2012:1244000088.
- Kulcsar Z, Houdart E, Bonafé A, et al. Intra-aneurysmal thrombosis as a possible cause of delayed aneurysm rupture after flow-diversion treatment. *AJNR Am J Neuroradiol* 2011;32:20–5.
- Cruz JP, Chow M, O’Kelly C, et al. Delayed ipsilateral parenchymal hemorrhage following flow diversion for the treatment of anterior circulation aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol* 2012;33:603–8.
- Saatci I, Yavuz K, Ozer C, et al. Treatment of intracranial aneurysms using the pipeline flow-diverter embolization device: a single-center experience with long-term follow-up results. *AJNR Am J Neuroradiol* 2012;33:1436–46.
- Becske T, Kallmes DF, Saatci I, et al. Pipeline for uncoilable or failed aneurysms: results from a multicenter clinical trial. *Radiology* 2013;267:858–68.
- Berge J, Biondi A, Machi P, et al. Flow-diverter silk stent for the treatment of intracranial aneurysms: 1-year follow-up in a multicenter study. *AJNR Am J Neuroradiol* 2012;33:1150–5.
- Kallmes DF, Hanel R, Lopes D, et al. International retrospective study of the pipeline embolization device: a multicenter aneurysm treatment study. *AJNR Am J Neuroradiol* 2015;36:108–15.
- Adolph R, Vorp DA, Steed DL, et al. Cellular content and permeability of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 1997;25:916–26.
- Rosignol P, Fontaine V, Meilhac O, et al. [Physiopathology of aortic aneurysm]. *Rev Prat* 2002;52:1061–5.
- Carrell TW, Burnand KG, Booth NA, et al. Intraluminal thrombus enhances proteolysis in abdominal aortic aneurysms. *Vascular* 2006;14:9–16.
- Fontaine V, Jacob MP, Houard X, et al. Involvement of the mural thrombus as a site of protease release and activation in human aortic aneurysms. *Am J Pathol* 2002;161:1701–10.
- Houard X, Rouzet F, Touat Z, et al. Topology of the fibrinolytic system within the mural thrombus of human abdominal aortic aneurysms. *J Pathol* 2007;212:20–8.
- Michel JB, Rouer M, Alsac JM. Regarding “A multilayer stent in the aorta may not seal the aneurysm, thereby leading to rupture.” *J Vasc Surg* 2013;57:605.
- Frosen J, Piippo A, Paetau A, et al. Remodeling of saccular cerebral artery aneurysm wall is associated with rupture: histological analysis of 24 unruptured and 42 ruptured cases. *Stroke* 2004;35:2287–93.
- Tulamo R, Frösen J, Hernesniemi J, et al. Inflammatory changes in the aneurysm wall: a review. *J Neurointerv Surg* 2010;2:120–30.
- Jin D, Sheng J, Yang X, et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases expression in human cerebral ruptured and unruptured aneurysm. *Surg Neurol* 2007;68(Suppl 2):S11–16.
- Starke RM, Komotar RJ, Hwang BY, et al. Systemic expression of matrix metalloproteinase-9 in patients with cerebral arteriovenous malformations. *Neurosurgery* 2010;66:343–8.
- Aoki T, Kataoka H, Moriwaki T, et al. Role of TIMP-1 and TIMP-2 in the progression of cerebral aneurysms. *Stroke* 2007;38:2337–45.
- Aoki T, Kataoka H, Morimoto M, et al. Macrophage-derived matrix metalloproteinase-2 and -9 promote the progression of cerebral aneurysms in rats. *Stroke* 2007;38:162–9.
- Nuki Y, Tsou TL, Kurihara C, et al. Elastase-induced intracranial aneurysms in hypertensive mice. *Hypertension* 2009;54:1337–44.
- Starke RM, Chalouhi N, Jabbour PM, et al. Critical role of TNF- α in cerebral aneurysm formation and progression to rupture. *J Neuroinflammation* 2014;11:77.
- Makino H, Tada Y, Wada K, et al. Pharmacological stabilization of intracranial aneurysms in mice: a feasibility study. *Stroke* 2012;43:2450–6.
- Kim SC, Singh M, Huang J, et al. Matrix metalloproteinase-9 in cerebral aneurysms. *Neurosurgery* 1997;41:642–66; discussion 646–7.
- Hoh BL, Hosaka K, Downes DP, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes inflammatory vascular repair of murine carotid aneurysms via a macrophage inflammatory protein-1 α and macrophage inflammatory protein-2-dependent pathway. *Circulation* 2011;124:2243–52.
- Velioglu M, Kizilkilic O, Selcuk H, et al. Early and midterm results of complex cerebral aneurysms treated with Silk stent. *Neuroradiology* 2012;54:1355–65.
- Largen E, Balt-Extrusion. Urgent Field Safety Notice Intracranial Stent “SILK.” Clarification of the Indications. https://www.swissmedic.ch/recallists_dl/03071/Vk_20100309_06-e1.pdf
- Kim YH, Jung JC, Jung SY, et al. Cyclosporine A downregulates MMP-3 and MMP-13 expression in cultured pterygium fibroblasts. *Cornea* 2015;34:1137–43.
- Gawronska-Kozak B, Kirk-Ballard H. Cyclosporin A reduces matrix metalloproteinases and collagen expression in dermal fibroblasts from regenerative FOXP1 deficient (nude) mice. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2013;6:7.
- Shetty R, Ghosh A, Lim RR, et al. Elevated expression of matrix metalloproteinase-9 and inflammatory cytokines in keratoconus patients is inhibited by cyclosporine A. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56:738–50.
- Kuo PJ, Tu HP, Chin YT, et al. Cyclosporine-A inhibits MMP-2 and -9 activities in the presence of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide: an experiment in human gingival fibroblast and U937 macrophage co-culture. *J Periodontol Res* 2012;47:431–8.
- Chiu HC, Lu YT, Chin YT, et al. Cyclosporine A inhibits the expression of membrane type-I matrix metalloproteinase in gingiva. *J Periodontol Res* 2009;44:338–47.
- Bolzani G, Della Coletta R, Martelli Junior H, et al. Cyclosporin A inhibits production and activity of matrix metalloproteinases by gingival fibroblasts. *J Periodontol Res* 2000;35:51–8.
- Dai J, Michineau S, Franck G, et al. Long term stabilization of expanding aortic aneurysms by a short course of cyclosporine A through transforming growth factor-beta induction. *PLoS ONE* 2011;6:e28903.
- Ha E, Mun KC. Effects of cyclosporin on metalloproteinase in endothelial cells. *Transplant Proc* 2012;44:991–2.
- Huang YH, Ma YL, Ma L, et al. Cyclosporin A improves adhesion and invasion of mouse preimplantation embryos via upregulating integrin beta3 and matrix metalloproteinase-9. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7:1379–88.

- 41 Zhou WH, Du MR, Dong L, *et al.* Cyclosporin A increases expression of matrix metalloproteinase 9 and 2 and invasiveness in vitro of the first-trimester human trophoblast cells via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Hum Reprod* 2007;22:2743–50.
- 42 Bianchi R, Rodella L, Rezzani R. Cyclosporine A up-regulates expression of matrix metalloproteinase 2 and vascular endothelial growth factor in rat heart. *Int Immunopharmacol* 2003;3:427–33.
- 43 Puffer C, Dai D, Ding YH, *et al.* Gene expression comparison of flow diversion and coiling in an experimental aneurysm model. *J Neurointerv Surg* 2015;7:926–30.
- 44 Altes TA, Cloft HJ, Short JG, *et al.* 1999 ARRS Executive Council Award. Creation of saccular aneurysms in the rabbit: a model suitable for testing endovascular devices. American Roentgen Ray Society. *AJR Am J Roentgenol* 2000;174:349–54.
- 45 Kallmes DF, Ding YH, Dai D, *et al.* A new endoluminal, flow-disrupting device for treatment of saccular aneurysms. *Stroke* 2007;38:2346–52.
- 46 Kallmes DF, Helm GA, Hudson SB, *et al.* Histologic evaluation of platinum coil embolization in an aneurysm model in rabbits. *Radiology* 1999;213:217–22.
- 47 Toth M, Sohail A, Fridman R. Assessment of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by gelatin zymography. *Methods Mol Biol* 2012;878:121–35.
- 48 Toth M, Fridman R. Assessment of gelatinases MMP-2 and MMP-9 by gelatin zymography. *Methods Mol Med* 2001;57:163–74.
- 49 Dunn OJ. Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics* 1964;6:241–52.
- 50 Yamaguchi T, Yokokawa M, Suzuki M, *et al.* The effect of immunosuppression on aortic dilatation in a rat aneurysm model. *Surg Today* 2000;30:1093–9.
- 51 Piechota-Polanczyk A, Demyanets S, Nykonenko O, *et al.* Decreased tissue levels of cyclophilin A, a cyclosporine A target and phospho-ERK1/2 in simvastatin patients with abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2013;45:682–8.
- 52 Aoki T, Kataoka H, Ishibashi R, *et al.* Impact of monocyte chemoattractant protein-1 deficiency on cerebral aneurysm formation. *Stroke* 2009;40:942–51.
- 53 Kanematsu Y, Kanematsu M, Kurihara C, *et al.* Critical roles of macrophages in the formation of intracranial aneurysms. *Stroke* 2011;42:173–8.
- 54 Ding YH, Dai D, Lewis DA, *et al.* Long-term patency of elastase-induced aneurysm model in rabbits. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006;27:139–41.
- 55 Gounis MJ, van der Bom IM, Wakhloo AK, *et al.* MR imaging of myeloperoxidase activity in a model of the inflamed aneurysm wall. *AJNR Am J Neuroradiol* 2015;36:146–52.
- 56 Delbosc S, Alsac JM, Journe C, *et al.* Porphyromonas gingivalis participates in pathogenesis of human abdominal aortic aneurysm by neutrophil activation. Proof of concept in rats. *PLoS ONE* 2011;6:e18679.
- 57 Rosenthal KL. Therapeutic contraindications in exotic pets. *Semin Avian Exot Pet Med* 2004;13:44–8.
- 58 Borgmann AR, Bogle D, Robb CA, *et al.* Comparative toxicity of two-dexamethasone derivatives following topical ocular instillation to rabbits. II. Systemic histopathological changes. *Toxicology* 1976;6:77–84.
- 59 Tennant BC, Balazs T, Baldwin BH, *et al.* Assessment of hepatic function in rabbits with steroid-induced cholestatic liver injury. *Fundam Appl Toxicol* 1981;1:329–33.
- 60 Sheng FC, Freischlag JA, Backstrom B, *et al.* The effect of dexamethasone in vivo on blood and peritoneal neutrophils (PMN) in rabbits with peritonitis. *J Surg Res* 1987;43:296–301.
- 61 Zhang B, Dhillon S, Geary I, *et al.* Polymorphisms in matrix metalloproteinase-1, -3, -9, and -12 genes in relation to subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 2001;32:2198–202.

c. Branches couvertes et risque d'occlusion

Les *flow-diverters* sont définis par leur porosité (proportion de surface de stent non couverte) qui est le facteur le plus important dans la réduction du flux intra-anevrismal³⁶². En fonction de la conformation du stent et de son déploiement dans un segment artériel droit ou au contraire dans une courbure, la compaction des mailles et ainsi la porosité du stent varient de manière importante ; la porosité optimale étant aux alentours de 60-70%¹¹⁶. En effet, la compaction des mailles dans la partie interne de la courbure d'un vaisseau induit une augmentation de la couverture métallique et inversement l'étirement des mailles dans la partie externe induit une diminution de cette couverture³⁶³. Contrairement à des stents couverts qui ne permettraient pas au flux de passer dans les branches artérielles couvertes par le stent, l'intérêt des *flow-diverters* est qu'ils sont censés permettre de garder perméables les artères collatérales couvertes par le dispositif^{108, 110, 112}. Cependant, une compaction et une diversion du flux trop importante et brutale dans des branches artérielles couvertes par le stent risquent de provoquer l'occlusion de ces artères et de provoquer des lésions ischémiques^{364, 365}. Les modifications de flux dans les branches couvertes par le *flow-diverter* sont fréquentes et l'incidence des modifications de flux sur les branches latérales du siphon carotidien pourrait varier de 1.4% à 45%^{195, 200-202, 366-368}.

De plus, en cas de couverture d'une branche artérielle par le *flow-diverter*, il est important de prendre en considération les suppléances artérielles mises en jeu pour compenser le territoire artériel soumis à la diversion du flux. Ainsi, en cas de suppléance importante par les collatérales, la diminution du flux dans la branche couverte par le dispositif est très importante et survient presque immédiatement après le déploiement du *flow-diverter*. Au contraire, en cas d'absence de circulation collatérale, la couverture de la branche ne provoque pas de réduction de flux significative car la vascularisation du territoire dépend uniquement de l'apport par la branche couverte. Ainsi, lorsqu'on s'intéresse à l'endothélialisation du *flow-diverter* au niveau de l'ostium d'une branche couverte, celle-ci sera quasi-totale en cas de suppléance importante alors qu'elle restera presque nulle en cas d'absence de suppléance par les collatérales^{125-127, 196, 197, 364, 369}. Il est donc capital d'analyser les flux collatéraux dans le territoire de branches couvertes afin d'anticiper les risques d'échec de traitement en cas de persistance de flux dans le territoire d'une branche artérielle portant l'anevrisme et également afin de prévenir les risques ischémiques.

La théorie du gradient de pression permet d'expliquer pourquoi les petites artères perforantes restent généralement perméables après leur couverture par un *flow-diverter*, alors que des branches collatérales, même de gros calibre telles que l'artère communicante postérieure ou l'artère ophtalmique ont plus tendance à s'occlure. L'effet aspiratif de vaisseaux terminaux sans suppléance possible permet que ceux-ci restent perméables alors que des vaisseaux avec un flux collatéral vont plus facilement s'occlure^{125, 128, 370}. Des études chez l'animal ont montré que la nécessité de la perfusion tissulaire d'un territoire alimenté par une branche couverte par un *flow-diverter* est responsable du maintien de leur perméabilité¹⁰⁸. Un flux aspiratif avec un gradient de pression suffisant à travers l'ostium d'une branche couverte permet de maintenir la perméabilité de cette artère mais avec un risque de persistance de la perméabilité de l'anévrisme, même après le placement d'un *flow-diverter*³⁷¹.

Eviter l'occlusion de branches couvertes par le *flow-diverter* est un enjeu capital pour la sécurité des patients traités par ces dispositifs mais constitue un défi biologique important étant données les contradictions biologiques entre les volontés simultanées de thrombose du sac anévrysmal et de perméabilité des branches couvertes.

Nous illustrerons ce phénomène au travers d'une étude clinique analysant les risques d'occlusion de l'artère ophtalmique couverte par un stent à diversion de flux.

➤ Risques liés à la couverture de l'artère ophtalmique

Les *flow-diverters* sont couramment utilisés pour la reconstruction endovasculaire d'une artère pour le traitement d'anévrismes à collet large, difficiles à traiter avec des coils ou par *stent-assisted coiling*^{109, 131, 213, 310, 372, 373}. Les *flow-diverters* ont pour objectifs de perturber l'écoulement du flux artériel dans le sac anévrysmal, provoquant sa thrombose et la cicatrisation du collet par une prolifération néo-intimale et une couverture endothéliale, tout en maintenant un flux sanguin normal dans le vaisseau porteur et dans les vaisseaux couverts par le dispositif^{112, 184, 213, 310, 373-377}.

Une interrogation concernant le traitement des anévrismes intracrâniens par *flow-diverter* est la perméabilité des artères perforantes et des branches collatérales couvertes par le dispositif¹⁹¹. Les *flow-diverters* sont conçus pour assurer une couverture suffisante au collet de l'anévrisme pour isoler la lésion de la circulation, mais être suffisamment poreuse pour préserver la perméabilité, au travers des mailles du dispositif, des vaisseaux collatéraux couverts par le *flow-diverter*¹⁹¹.

Le flux dans les branches couvertes est régi par des régimes de flux et de pression différents de ceux dans l'anévrisme. En effet, comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce travail, le flux intra-anévrysmal est un flux turbulent, vortexiel, avec des phénomènes d'entrées et de ré-entrées du flux^{33, 34, 192} alors que le flux dans les branches artérielles couvertes est un flux laminaire provoquant un effet aspiratif¹⁹³. Ceci a été étudié par histologie suite au déploiement de *flow-diverters* dans des aortes de lapins, démontrant des défauts d'endothélialisation du dispositif, de forme circulaire, en regard des ostia des artères lombaires couvertes par le *flow-diverter*¹¹⁰.

Ce gradient de pression, permettant aux artères couvertes de rester perméables, peut toutefois être moins important dans des vaisseaux présentant une importante collatéralité¹¹⁰. C'est notamment le cas en cas de *flow-diverter* déployé en regard d'une artère ophtalmique. En effet, l'artère ophtalmique possède un réseau de suppléance par la carotide externe qui constitue un réseau de collatéralité permettant une reprise en charge par voie rétrograde^{110, 378}. Ce flux rétrograde compétitif peut entraîner un écoulement lent ou une occlusion proximale de l'artère ophtalmique en raison de son apport rétrograde provenant de la circulation de l'artère carotide externe¹¹². Une précédente étude avait évalué par angiographie les modifications du flux dans l'artère ophtalmique immédiatement après le placement d'un *flow-diverter* en regard de l'artère ophtalmique pour le traitement de 20 anévrismes¹⁹⁵. Cette étude avait observé 21% d'occlusion complète de l'artère ophtalmique et 11% de ralentissement du

flux de l'artère ophtalmique. Dans cette petite série rétrospective, aucun symptôme visuel n'avait été observé malgré les modification du flux dans l'artère ophtalmique, mais seulement cinq patients avaient bénéficié d'un examen ophtalmologique spécialisé¹⁹⁵. Puisque les amputations du champ visuel dues à de petites lésions ischémiques sont souvent asymptomatiques, elles sont facilement sous-diagnostiquées. **Afin d'identifier même de petits déficits, il apparaît donc obligatoire d'explorer les troubles ophtalmologiques avec un examen complet systématique.**

Dans cette étude, nous avons analysé les **conséquences ophtalmiques dues à la couverture de l'artère ophtalmique par l'implantation d'un *flow-diverter*** pour le traitement d'anévrismes de la terminaison carotidienne. Cette analyse s'est intéressée à l'origine anatomique de l'artère ophtalmique par rapport à l'anévrisme cible.



Article 4 : Rouchaud A, Leclerc O, Benayoun Y, Saleme S, Camillieri Y, Boncœur MP, Robert PY, Mounayer C. Visual Outcomes With Flow-diverter Stents Covering Ophthalmic Artery for Treatment of Internal Carotid Aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2015 Feb;36(2):330-6.¹⁹⁴

Les parties Méthodes et Résultats sont présentées dans le PDF de l'article.

Ces résultats confirment les bons résultats des *flow-diverters* pour le traitement des anévrismes du siphon carotidien avec 78,6% d'occlusion complète à 6 mois de suivi et aucune complication clinique symptomatique. Cependant, les risques liés à l'utilisation des *flow-diverters* sont encore mal estimés et il semble important de les détecter afin de comprendre leurs mécanismes et les prévenir.

Nos résultats montrent que la couverture de l'artère ophtalmique n'est pas un traitement inoffensif puisque 17,9% des patients présentaient des complications ophtalmiques permanentes. Ces complications peuvent être légères ou sévères, mais certaines ne sont détectées qu'avec un examen ophtalmique complet et étendu, qui n'a pas été réalisé dans la plupart des études antérieures.

Puffer et al¹⁹⁵ avaient rapporté que la couverture de l'artère ophtalmique par un *flow-diverter* était cliniquement bien tolérée, aucun patient n'ayant présenté de déficit visuel, même si 25% des artères ophtalmiques couvertes par un *flow-diverter* avaient subi une occlusion au cours du suivi. Certains patients peuvent ne pas avoir de symptômes cliniques en raison d'une amputation asymptomatique du champ de vision, ce qui souligne l'importance des examens

ophtalmologiques poussés pour détecter l'ischémie rétinienne ou des déficits mineurs.

Le flux artériel de l'artère ophtalmique - analysé en artériographie - peut ne pas être le seul indicateur de complications ophtalmiques après la couverture de l'artère ophtalmique, d'autant que l'occlusion artérielle ophtalmique tardive asymptomatique peut être due à la mise en jeu d'un important réseau collatéral^{195, 379}. Ce mécanisme est confirmé par plusieurs études animales^{112, 380}, suggérant qu'en cas de flux laminaire et aspiratif, en raison d'un gradient de pression élevé dans la branche artérielle couverte, celle-ci reste perméable. Au contraire, si le gradient de pression est faible, comme cela se produit avec l'artère ophtalmique où un réseau collatéral important est mis en jeu, la diversion du flux peut être augmentée, provoquant une occlusion de la branche couverte. Ce phénomène aspiratif au niveau des branches couvertes, expliquant la perméabilité des artères couvertes par un *flow-diverter*, a été démontré dans un modèle de lapin avec couverture des artères lombaires, qui a rapporté une excellente perméabilité des petites artères couvertes par le dispositif¹¹⁰. Cette hypothèse a été confirmée dans la pratique clinique, avec une perméabilité maintenue des artères couvertes alors que les poches anévrysmales, sans voie de drainage possible, subissent une thrombose due à la stagnation sanguine^{112, 380}. Il est probable cependant que ce mécanisme ne soit pas exactement applicable à toutes les configurations anatomiques; Nous avons donc classé les anévrysmes en quatre groupes selon la classification OA² (*Ophthalmic Aneurysm Anatomy*) (**Figure 12**).

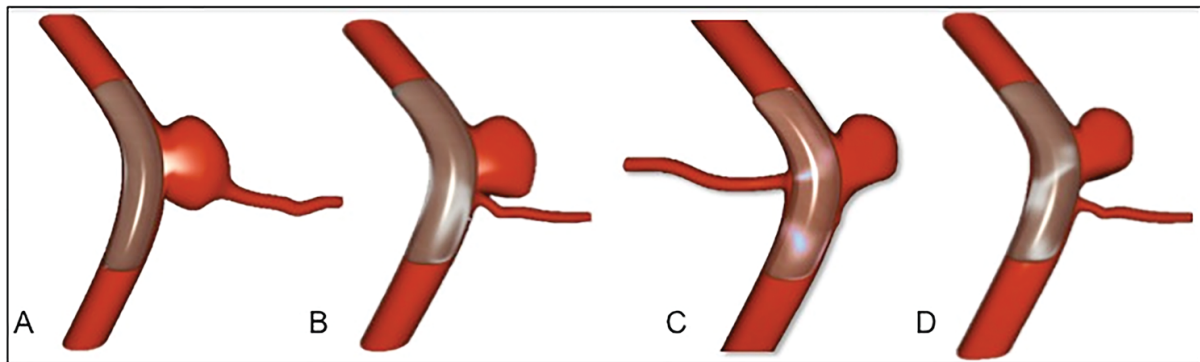


Figure 12 : Classification selon l'origine anatomique de l'artère ophtalmique couverte. A, type A: artère ophtalmique provenant du sac anévrysmal. B, type B: artère ophtalmique provenant du collet de l'anévrysme. C, type C: artère ophtalmique provenant de la courbure interne du siphon carotidien. D, type D: artère ophtalmique non impliquée dans l'anévrysme, mais recouverte par le *flow-diverter*.

Image issue de Rouchaud et al.¹⁹⁴

En cas d'anévrysme ophtalmique avec l'artère ophtalmique naissant du fond du sac anévrysmal (Type A), l'écoulement dans l'artère ophtalmique est turbulent après avoir traversé l'anévrysme plutôt qu'un flux laminaire rapide. Ainsi, après le placement d'un *flow-diverter* en

regard du collet de l'anévrysme, l'écoulement turbulent dans l'anévrysme est modifié et peut induire une thrombose partielle du sac anévrysmal. De plus, dans cette configuration, le canal d'écoulement que constitue l'artère ophtalmique peut causer un risque d'embolies rétiniens. Malgré le petit nombre de patients présentant des anévrysmes de type A dans notre étude (n = 5), nous avons observé des embolies avec des ischémies rétiniennes dans 80% de ces cas. De plus dans la configuration d'une artère naissant du dôme du sac anévrysmal, il existe un important risque d'échec du traitement car le sac anévrysmal va rester perméable afin de maintenir le flux alimentant l'artère ophtalmique (**Figure 13**). Ces observations ont depuis été confirmées par une autre étude publiée par Griessenauer et al. dans laquelle les auteurs rapportent que les patients présentant une anatomie de type A avec l'artère ophtalmique naissant du dôme de l'anévrysme, ont plus de risque d'échec du traitement avec 50 % de non-exclusion de l'anévrysme à 6 mois³⁸¹. De plus, ils ont confirmé que ces patients avaient plus de risque de complications thrombo-emboliques avec 14.3 % de symptômes visuels³⁸¹. De la même façon, en cas d'anévrysme communicant postérieur et couverture de l'artère communicante postérieure avec une anatomie de type foetal (absence de segment P1 homolatéral), il existe un important risque d'échec du traitement¹⁹⁹.

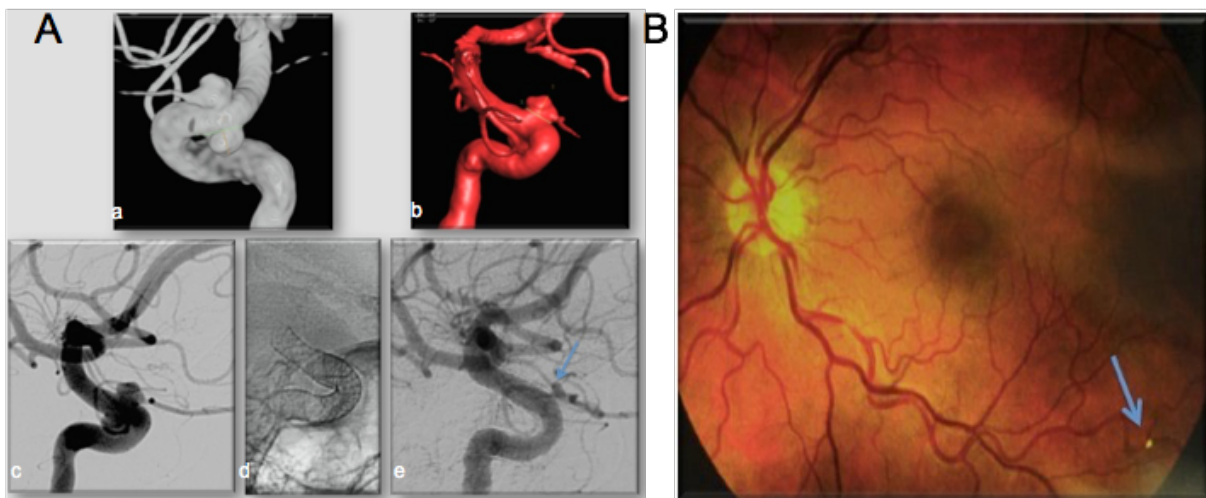


Figure 13 : Cas illustratif du traitement d'un anévrysme ophtalmique avec anatomie de type A.

A, Acquisitions angiographiques de la carotide interne gauche: **a**, **b**, Les angiographies 3D montrent 2 anévrysmes dont un anévrysme ophtalmique avec l'artère ophtalmique naissant du dôme anévrysmal (Anatomie type A); **e**, 3 mois après mise en place du *flow-diverter*, persistance d'un reliquat anévrysmal (flèche bleue) avec perméabilité de l'artère ophtalmique. **B**, Fond d'œil gauche montrant un embolie rétinien.

Figure issue de Rouchaud et al¹⁹⁴.

Un autre résultat de notre étude est que les patients avec l'artère ophtalmique naissant de la courbe interne du siphon carotidien (Type C) ont un taux élevé de complications

ophtalmologique. Cette configuration ne représentait que 14,3% des patients de notre série, mais 75% d'entre eux ont présenté des complications ophtalmologiques. Trois-quarts des patients de type C ont présenté une atrophie du nerf optique. L'hypothèse expliquant l'atrophie du nerf optique est une ischémie due à une réduction sévère et rapide du flux sanguin dans l'artère ophtalmique. Cela pourrait être expliqué par la tortuosité du siphon carotidien et la conception tressée des *flow-diverters*. Dans la partie interne d'une courbe, la densité de mailles du dispositif est plus élevée que dans la courbe externe en raison d'une compaction plus importante du *flow-diverter*^{362, 382-384}. L'espace entre les cellules du *flow-diverter* est par conséquent réduit en regard de l'origine de l'artère ophtalmique, ce qui conduit à une diminution importante et brutale du flux dans le vaisseau^{382, 383}. La persistance d'un effet aspiratif de l'artère ophtalmique peut permettre de maintenir la perméabilité de l'artère ophtalmique, mais induit brutalement un bas débit avec un défaut de perfusion. Si l'afflux antérograde par l'artère ophtalmique diminue, son territoire est pris en charge par les collatérales venant de la carotide externe qui se développent avec le temps. En cas de diminution aiguë de la perfusion, et avant toute reprise en charge par les branches collatérales du système carotidien externe, certains territoires vascularisés par de très petites branches peuvent subir une ischémie brutale par hypoperfusion. Ceci peut se produire pour la perfusion de la tête du nerf optique, qui est assurée par des artères perforantes issues des artères ciliaires courtes postérieures et constituant le cercle artériel de Zinn-Haller³⁸⁵⁻³⁸⁷. Ces territoires peuvent être lésés notamment dans des situations de bas débit après arrêt cardio-respiratoire ressuscité ou chirurgie et provoquer une ischémie de la tête du nerf optique. Ce mécanisme de bas débit aigu dans l'artère ophtalmique après le déploiement d'un *flow-diverter* avec une densité de mailles élevée en regard de l'artère ophtalmique pourrait expliquer l'ischémie du nerf optique malgré l'angiographie normale. La configuration anatomique de type C doit être une préoccupation avant l'implantation d'un *flow-diverter* et il apparaît obligatoire d'adapter strictement le diamètre du *flow-diverter* à celui de l'artère carotide et de choisir un *flow-diverter* de plus grand diamètre pour éviter une compaction excessive dans la courbe intérieure.

Conclusion

Cette étude prospective montre que la couverture de l'artère ophtalmique par un *flow-diverter* n'est pas anodine. Les complications ophtalmiques ne sont pas rares, mais sont habituellement sous-diagnostiquées. La disposition anatomique de l'artère ophtalmique doit être clairement analysée car certaines configurations particulières peuvent exposer les patients

à un risque plus élevé. Lorsqu'il n'est pas nécessaire, il convient d'éviter de recouvrir l'artère ophtalmique avec un *flow-diverter*.

Visual Outcomes with Flow-Diverter Stents Covering the Ophthalmic Artery for Treatment of Internal Carotid Artery Aneurysms

A. Rouchaud, O. Leclerc, Y. Benayoun, S. Saleme, Y. Camilleri, F. D'Argento, M.-P. Boncoeur, P.-Y. Robert, and C. Mounayer



ABSTRACT

BACKGROUND AND PURPOSE: Flow-diverting stents can be used to treat intracranial aneurysms that are not amenable to treatment with coils. We analyzed ophthalmic consequences due to coverage of the origin of the ophthalmic artery by flow-diverting stents for the treatment of internal carotid artery aneurysms.

MATERIALS AND METHODS: From April 2009 to April 2013, the clinical and angiographic outcomes of all 28 patients treated for aneurysms with flow-diverting stents covering the origin of the ophthalmic artery were prospectively collected. The origin of the ophthalmic artery in relation to the target aneurysm was classified by using a 4-type classification. A complete ophthalmic examination was performed by a single ophthalmologist 48 hours before and 1 week after covering the ophthalmic artery.

RESULTS: Ophthalmic artery patency was normal at the end of endovascular treatment in 24/28 cases (85.7%). With extensive ophthalmic examinations, 11 patients (39.3%) showed new ophthalmic complications. Patients with the ophthalmic artery originating from the aneurysm sac were at high risk for retinal emboli (4/5, 80%). Patients with the ophthalmic artery originating from the inner curve of the carotid siphon were at high risk for optic nerve ischemic atrophy (3/4, 75%).

CONCLUSIONS: This prospective study shows that covering the ophthalmic artery with a flow-diverting stent is not without potential complications. Ophthalmic complications can occur but are often not diagnosed. The anatomic disposition of the ophthalmic artery in relation to the carotid siphon and aneurysm should be clearly understood because some configurations have a higher risk. When not required, covering of the ophthalmic artery by flow-diverting stents should be avoided.

ABBREVIATIONS: FDS = flow-diverting stent; OA² = ophthalmic artery aneurysm; PED = Pipeline Embolization Device

Flow-diverting stents (FDSs) are commonly used for the endovascular reconstruction of a segmentally diseased parent vessel and treatment of large-neck intracranial aneurysms, which can be difficult to reconstruct with coils, even when used with large-cell stents.¹⁻⁶ FDSs aim to maintain normal blood flow through parent and branch vessels while disrupting flow into the aneurysm, causing thrombosis, and eventually sealing the aneurysm ostium through neointimal proliferation across the device struts.⁶⁻⁸ Good angiographic and clinical results have been achieved in small series.^{4-6,9-12}

One issue concerning intracranial aneurysm treatment by an FDS is the patency of the perforating arteries and side branches

covered by the device.¹³ FDSs are designed to provide sufficient coverage across the aneurysm neck to exclude the lesion from circulation but to be porous enough to preserve the patency of any branch vessels covered by the construct through the interstices between the device strands.¹³ The flow into the regional perforators and branch arteries is governed by different factors from those that drive flow into an aneurysm, and the patency of the perforators is maintained by a suction effect due to lower pressure in those branches.¹⁴ This has been studied with histologic evaluation of the Pipeline Embolization Device (PED; Covidien, Irvine, California) in rabbit aorta, demonstrating rounded funnel-like defects into the homogeneous sheet of neoendothelium on the FDS in regard to the orifices of the regional branches.¹⁵

This pressure gradient may, however, be less important in vessels that have robust competitive collateral flow.¹⁵ This is most frequently seen when constructs are built over the ophthalmic artery, which occasionally becomes occluded when covered by multiple devices.⁸ In these situations, competitive collateral flow from the external carotid artery may create a “flow equalization

Received April 14, 2014; accepted after revision August 14.

From the Departments of Interventional Neuroradiology (A.R., S.S., Y.C., M.-P.B., C.M.) and Ophthalmology (O.L., Y.B., P.-Y.R.), Centre Hospitalier et Universitaire Dupuytren, Limoges, France; and Institute of Radiology (F.D.), Policlinico Agostino Gemelli, Catholic University, Rome, Italy.

Please address correspondence to Aymeric Rouchaud, MD, Department of Interventional Neuroradiology, CHU Dupuytren, 2 Ave Martin Luther King, Limoges, France; e-mail: aymeric.rouchaud@gmail.com

<http://dx.doi.org/10.3174/ajnr.A4129>

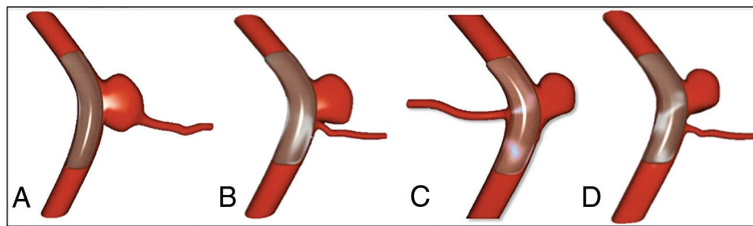


FIG 1. Classification according to the anatomy of the origin of the covered ophthalmic artery: the ophthalmic artery aneurysm classification. A, Type A: ophthalmic artery originating from the aneurysm sac. B, Type B: ophthalmic artery originating from the neck of the aneurysm. C, Type C: ophthalmic artery originating in the inner curve of the carotid siphon. D, Type D: ophthalmic artery not involved in the aneurysm but covered by the Pipeline Embolization Device.

point,” resulting in slow flow or proximal occlusion of the ophthalmic artery because of its retrograde supply from the external carotid artery circulation.^{15,16} Recently, a study evaluated the patency rate of the ophthalmic artery with standard digital subtraction angiography and any change in angiographic flow in the artery immediately after FDS placement across the arterial inlet for the treatment of 20 proximal ICA aneurysms.¹⁷ This study assessed 21% of ophthalmic artery occlusions and 11% of ophthalmic arteries with slow antegrade flow. In this small, retrospective series, no visual worsening was observed in case of flow change in the ophthalmic artery, but only 5 patients had a detailed ophthalmic examination.¹⁷ Because small visual field amputations due to ischemic lesions can be easily underdiagnosed and they are often asymptomatic, it appears mandatory to explore ophthalmic disorders with a complete examination to identify even small deficits.

In this study, we analyzed ophthalmic consequences due to coverage of the ophthalmic artery by the implantation of an FDS covering the origin of the ophthalmic artery for the treatment of terminal ICA aneurysms. This analysis focuses on the anatomy of the origin of the ophthalmic artery in relation to the target aneurysm.

MATERIALS AND METHODS

Patients

From April 2009 to April 2013, the clinical and angiographic outcomes of all patients treated at our institution for aneurysms with PEDs covering the origin of the ophthalmic artery were collected prospectively. Our institutional ethics committee approved the study. Written informed consent was obtained from each patient.

Procedures

All procedures were performed by an experienced neuroradiologist with the patient under general anesthesia, by using a triaxial approach. Accurate measurement of the parent artery was performed on 3D images, acquired with rotational angiography, with a dedicated workstation (XtraVision; Philips Healthcare, Best, the Netherlands) for vessel analysis before each procedure. The PEDs (Covidien) were deployed in the desired position to have a perfect wall apposition. Angiographic images were acquired in anteroposterior, lateral, and working projections before and immediately after treatment. To assess the wall positioning of the device, we performed a vaso-CT acquisition (Allura Xper FD20; Philips Healthcare) just after the deployment.¹⁸ In case of malpositioning, balloon remodeling was performed inside the device or a second overlaid PED was implanted.

The number of PEDs to be deployed was decided on the basis of flow reduction observed during the procedure or of anatomic circumstances. Additional coiling was performed in large aneurysms with a maximum diameter of >12 mm, by using the jailed microcatheter technique.

Periprocedural Medication

All patients were given dual antiplatelet therapy for 7 days before to 3 months after the intervention (clopidogrel, 75 mg; aspirin, 160 mg daily). Adequate platelet inhibition was verified the day

before treatment with the VerifyNow P2Y12 assay (Accumetrics, San Diego, California).

If there was resistance, the doses were increased.

During catheterization and PED placement, anticoagulation with heparin kept the activated clotting time at 2–3 times the normal value. In addition, 250 mg of aspirin was given intravenously just before PED deployment.

Imaging

MR imaging was performed to assess optic nerve compression and cerebral ischemic complications with a 3T system before and 1 day and 3 months after the procedure.

Data Collection and Image Analysis

Patient age, sex, aneurysm location and type (saccular or fusiform), the presence of previous treatment, size, rupture status at presentation, and compressive symptoms were collected. Procedural details (eg, number and size of implanted PEDs and associated coiling) were noted.

A single reader evaluated all angiograms. Aneurysm occlusion was assessed by using the O’Kelly-Marotta grading scale. The patency of the ophthalmic artery was reported as normal or slowed antegrade flow, occlusion, or retrograde filling.

Classification according to Anatomy of the Origin of the Covered Ophthalmic Artery

The origin of the ophthalmic artery correlated to the location of the aneurysm was assessed by using a 4-type ophthalmic artery aneurysm (OA²) classification as detailed in Fig 1.

Ophthalmologic Examination

A complete standardized ophthalmologic examination was performed by a single ophthalmologist 48 hours before and 1 week after covering the ophthalmic artery. At every visit, possible visual side effects of treatment (decrease of visual acuity, loss of visual field, diplopia, and ocular pain) were investigated.

A routine logarithm of the minimum angle of resolution best spectacle-corrected visual acuity assessment was performed, followed by a slit-lamp examination of the anterior segment, fluorescein staining, a dilated fundus examination, and applanation tonometry. The oculocephalic reflex and a Lancaster test searched the limitation of the extrinsic ocular motility.

Each patient underwent retinal photography and, in case of any abnormality, retinal fluorescein angiography to study retinal

Table 1: Demographics and aneurysm/procedure characteristics^a

	Overall (n = 28)	Type			
		A (n = 5)	B (n = 6)	C (n = 4)	D (n = 13)
Demographics					
Age (yr)	52 (19–81)	45 (25–73)	54 (36–79)	46 (38–66)	52 (19–81)
Men	9 (32.1)	3 (60.0)	1 (16.7)	2 (50.0)	3 (23.1)
Aneurysm					
Size (mm)	8 (3–17)	6 (3–14)	7 (6–10)	11 (5–15)	8 (4–17)
Fortuitous presentation ^b	19 (67.9)	4 (80.0)	6 (100.0)	0	9 (69.2)
Procedure					
FDS and coils	7 (25.0)	0	1 (16.7)	1 (25.0)	5 (38.5)
>1 FDS	12 (42.9)	1 (20.0)	2 (33.3)	2 (50.0)	7 (53.9)

^a Values reported are median (range) or count (percentage).^b Other cases were recanalization or oculomotor palsy.**Table 2: Outcomes^a**

	Overall (n = 28)	Type			
		A (n = 5)	B (n = 6)	C (n = 4)	D (n = 13)
Normal patency of ophthalmic artery ^b					
Immediately after procedure	24 (85.7)	5 (100)	5 (83.3)	2 (50.0)	12 (92.3)
At 3 mo	27 (96.4)	5 (100)	6 (100)	4 (100)	12 (92.3)
At 12 mo	27 (96.4)	5 (100)	6 (100)	4 (100)	12 (92.3)
Ophthalmic complications					
Retinal emboli	5 (17.9)	4 (80.0)	0	0	1 (7.7)
Optic atrophy	3 (10.7)	0	0	3 (75.0)	0
New clinical symptoms	11 (39.3)	4 (80.0)	1 (16.7)	3 (75.0)	3 (23.1)
Transient	6 (21.4)	1 (20.0)	1 (16.7)	1 (25.0)	3 (23.1)
Permanent	5 (17.9)	3 (60.0)	0	2 (50.0)	0

^a Values reported are count (percentage).^b Other cases had occlusion or slowed blood flow.

side effects. A Topcon 50 IA camera (Topcon, Tokyo, Japan) coupled with the IMAGEnet Lite (Topcon) digital imaging system was used to acquire the images. Mean retinal thickness in the central foveal area was measured by using optical coherence tomography (Stratus OCT, Version 4.0.1; Carl Zeiss Meditec, Dublin, California). To study the retinal nerve fiber layer, we scanned the optical discs of each patient by optical coherence tomography. For visual field assessment, the 24–2 central field SITA Fast program of the Humphrey 750 (Carl Zeiss Meditec) was performed.

Clinical Events

Any clinical events appearing in the postoperative course were noted. A neurologic assessment was performed before the treatment, at discharge, and at follow-up.

Angiographic Follow-Up

Angiographic images obtained immediately after endovascular treatment were compared with those obtained at each follow-up examination. Our standard angiographic follow-up protocol consisted of angiography 3–6 months after endovascular treatment and then 1 year later, by using standard projections and the working projection for PED placement.

Data Analysis

Continuous variables are expressed as median (range), and qualitative variables, as count (percentage). Baseline characteristics and outcomes are described according to the OA² classification without statistical comparisons regarding the study sample size. Data were analyzed with SAS, Version 9.3 (SAS Institute, Cary, North Carolina).

RESULTS

Patients

Twenty-eight internal carotid artery aneurysms in 28 patients (median age, 52 years; 32.1% men) were selected for treatment with the FDS covering the origin of the ophthalmic artery (Table 1). Median aneurysm size was 8 mm (range, 3–17 mm). Presentations were fortuitous in 67.9%, angiographic recurrence of previously endovascularly treated aneurysms in 17.9%, and acute oculomotor nerve palsy due to nerve compression by the aneurysm in 14.2%.

Aneurysms were treated with an FDS alone in 75% and with an FDS and coils in 25% (Table 1). In most cases (57.1%), only 1 FDS was implanted, 35.7% had 2, and 7.1% with giant aneurysms had 3 FDSs.

Anatomic configuration according to the origin of the covered ophthalmic artery was type A in 17.9%, B in 21.4%, C in 14.3%, and D in 46.4%, with no important differences among the 4 groups in terms of demographics, aneurysm characteristics, or adjunctive use of coils.

Outcomes

During endovascular treatment, 1 parenchymal embolism occurred in the territory of the right middle cerebral artery, which was treated with intra-arterial abciximab without any clinical symptoms at patient wake-up, as previously reported.¹⁹

Follow-up MR imaging, performed in all patients, showed 1 case of territorial parenchymal ischemia in the right frontal area without clinical symptoms and no case of hemorrhagic complications. There were no cases of oculomotor nerve compression due to aneurysm thrombosis, and no patients had optic nerve compression or enlargement of the aneurysm after FDS implantation.

At follow-up, there was a global aneurysm complete occlusion rate of 78.6% at 6 months, with no difference according to the OA² classification. No cases of stent thrombosis were observed, and there was no intrastent intimal hyperplasia on DSA. No patients were lost to follow-up.

Ophthalmic artery patency was normal at the end of endovascular treatment in 85.7% of patients (Table 2). We observed 1 case of ophthalmic artery occlusion in a type B anatomy just after implantation of 2 FDSs with no ophthalmic symptoms despite an exhaustive examination and with a normal antegrade flow at 3-month and 1-year follow-ups. We observed 3 cases of ophthalmic artery flow slowing just after FDS implantation. At 3-month and 1-year follow-ups, all except 1 case had a normal antegrade flow in the covered ophthalmic artery. The only case that was not angiographically normal was a stenosis at the origin of a type D ophthalmic artery.

With an extensive ophthalmic examination, 11 patients

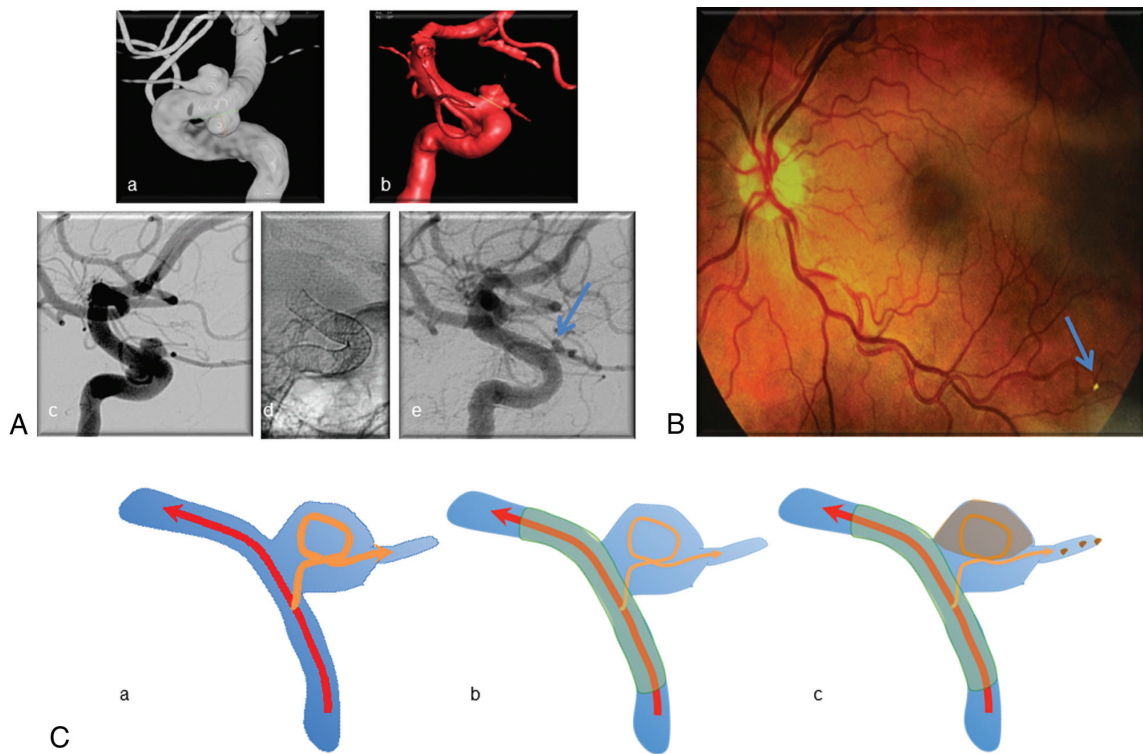


FIG 2. Illustrative case for type A. A, Left internal carotid artery angiograms: *a* and *b*, 3D angiograms with 2 carotid ophthalmic aneurysms with the ophthalmic artery originating from the aneurysm. *c*–*e*, Angiogram 3 months after flow-diverting stent implantation showing patency of the ophthalmic artery with a remnant of the upper aneurysm (arrow in *e*). B, Left eye fundusoscopic examination showing hyperattenuated embolic material in a retinal artery of the inferior retina (arrow). C, Explicative schema: *a*, The flow in the ophthalmic artery is turbulent due to the aneurysm. *b*, After placement of an FDS across the aneurysm neck, the turbulent flow is modified and may induce partial thrombosis of the aneurysm. *c*, The outflow channel that constitutes the ophthalmic artery may be the route for ophthalmic thromboemboli and subsequent retinal infarcts.

(39.3%) showed new ophthalmic complications: Six had visual blurring, 4 had visual field defects, and 1 had oculomotor palsy. New clinical complications were transient or asymptomatic in 6 (2 cases of visual field amputations were asymptomatic but were observed on visual field examinations). We observed 5 (17.9%) retinal emboli, all but 1 in type A anatomy, and 3 optic nerve atrophies in a type C anatomy (Table 2).

DISCUSSION

FDSs offer new opportunities for the treatment of aneurysms, extending the field of aneurysms eligible for endovascular approach and increasing long-term occlusion rates.^{1,4,15,20} They are considered effective and safe, especially before the level of the circle of Willis. Our findings support this finding because we observed only 1 case of parenchymal ischemic complication, no clinical symptoms, and 78.6% achieving complete occlusion at 6-month follow-up. However, the complications of FDSs are not well-known, and it seems important to detect them to understand their mechanisms and prevent them.

Our results show that coverage of the ophthalmic artery is not a harmless treatment because 17.9% of patients had permanent ophthalmic complications. These complications can be mild or severe, but some are only detected with a complete and extensive

ophthalmic examination, which was not performed in most previous studies.

Puffer et al¹⁷ reported that FDSs over the ophthalmic artery were clinically well-tolerated, because no patient experienced visual loss, even though 25% of the ophthalmic arteries covered with an FDS underwent ophthalmic artery occlusion with time. Some patients may have no clinical symptoms because of asymptomatic loss of the FOV, which highlights the importance of extensive ophthalmic examinations to detect retinal ischemia or subtle deficits.

The arterial flow of the ophthalmic artery, analyzed with DSA, may not be the only predictor of ophthalmic complications after coverage of the ophthalmic artery, especially because asymptomatic delayed ophthalmic artery thrombosis may be due to the development of an important collateral network.^{17,21} This mechanism is supported by several animal studies,^{8,22} suggesting that in cases of laminar flow with aspiration effect, due to a high pressure gradient in the covered side branch, the ophthalmic artery remains patent, but if the pressure gradient is low, as happens with the ophthalmic artery where an important collateral network develops, flow diversion may be increased and can result in side branch thrombosis. The aspirative flow mechanism to explain the patency of covered arteries has been described in a rabbit model

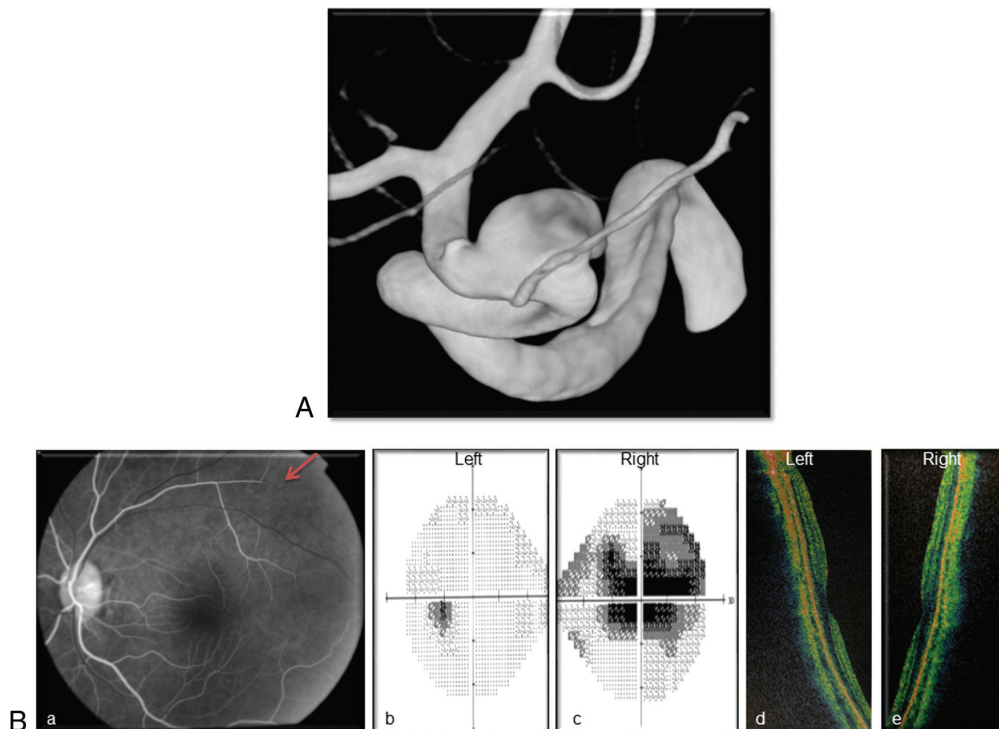


FIG 3. Illustrative case of type C. A, Right internal carotid artery 3D angiogram showing a carotid ophthalmic aneurysm with the ophthalmic artery originating from the inner curve of the ICA. B, Three-month ophthalmic examination: a, Right eye fluorescein retinal angiography showing an arterial flow defect in the upper part of the retina (arrow). b and c, Visual field assessment showing a large central scotoma in the right eye. d and e, Mean retinal thickness in the central foveal area, measured by using optical coherence tomography, proved right optic nerve atrophy (right eye, 55.03 μm ; left eye, 100.65 μm).

with coverage of the lumbar arteries; the authors reported excellent patency of small branch arteries covered by the device.¹⁵ This hypothesis, which has been confirmed in clinical practice, is that continued flow in these arteries permits ongoing patency, whereas aneurysm cavities, which lack an outflow channel, undergo thrombosis due to blood stagnation.^{8,22} It may be that this mechanism is not exactly applicable to all anatomic configurations; we therefore classified aneurysms into 4 groups according to the OA² classification (Fig 1).

In the case of an aneurysm at the origin of the covered side branches with the ophthalmic artery originating from the aneurysm sac (Fig 1A), the ophthalmic artery has turbulent flow after crossing the aneurysm rather than a rapid laminar flow. Thus, after placement of an FDS across the aneurysm neck, the turbulent flow in the aneurysm is modified and may induce partial thrombosis. Furthermore, the outflow channel that constitutes the ophthalmic artery may be the route for ophthalmic thromboemboli and subsequent retinal infarcts. Despite the small number of patients with type A aneurysms in our study ($n = 5$), we observed small retinal emboli in 80.0% of these cases. The hypothetical mechanism for this is illustrated in Fig 2. It may be that for these particular cases of a branched artery originating from the aneurysm sac, it would be necessary to restore a laminar flow in the branch with coiling before implantation of the FDS, but this strategy should be tested in animal models or with fluid computational analysis.

Another observation of this study is that patients with an ophthalmic artery originating in the inner curve of the carotid siphon (Fig 1C) have high rates of complications. This configuration only accounted for 14.3% of patients in our series, but 75.0% of them had new ophthalmic complications. Three of the 4 patients with type C anatomy presented with optic nerve atrophy, as described in Fig 3. The hypothesis to explain optic nerve atrophy is ischemia due to a drastic and rapid reduction of the blood flow in the ophthalmic artery. This could be explained by the tortuosity of the carotid siphon and the braided design of the FDS. In the inner part of a curve, the mesh attenuation of the device is higher than that in the outer curve because of tighter packing of the FDS.^{23,24} The free-cell space is consequently reduced across the origin of the ophthalmic artery, which leads to a rapid decrease of the inflow of the vessel.^{23,24} The persistency of an aspirative effect may allow patency of the ophthalmic artery, but it induces a defect of perfusion. If antegrade inflow by the ophthalmic artery decreases, its territory is taken over by the collaterals from the external carotid artery with a competitive flow through anastomosis, but this network develops with time.

In case of acute low perfusion and before any supply by collateral branches from the external carotid system, some territories vascularized by very tiny branches can be hypoperfused. This hypoperfusion might occur for the optic nerve head perfusion, which is ensured by perforators from short posterior ciliary arteries constituting the Zinn-Haller arterial ring.²⁵⁻²⁷ These territo-

ries can be injured in case of low flow after resuscitation or surgery and can cause optic nerve ischemia.^{28,29} This mechanism of acute low flow in the ophthalmic artery after implantation of an FDS with high mesh attenuation over the ophthalmic artery might explain optic nerve ischemia despite normal angiography findings. A type C aneurysm must be a concern before FDS implantation, and it appears mandatory to strictly adapt the FDS diameter to that of the carotid artery and choose an FDS of larger diameter to avoid excessive packing and reduce mesh attenuation in the inner curve.

Our study is limited by the small number of patients with each OA² classification, which lowers its power to identify differences among each type, and the study sample size is not large enough to exclude the possibility of confounding factors. However, the data of this series identify a large tendency for more ophthalmic complications (permanent or definitive) in groups A and C compared with other anatomy configurations. We did not observe an increased risk of ophthalmic complications related to the number of overlaid PEDs or in cases of associated coiling (data not shown), suggesting a real relationship between ophthalmic artery anatomy and ophthalmologic outcome, which should be confirmed in a larger population.

Furthermore, this observational study had no control group, and we did not perform detailed ophthalmic investigations in carotid-ophthalmic aneurysms treated with other devices or in the absence of coverage of the ophthalmic artery with the FDS. Nevertheless, the series of D'Urso et al³⁰ reported only 1 case of visual impairment in 126 unruptured paraclinoid aneurysms treated with coiling, suggesting that coiling (with or without associated stent) does not carry a high risk of ophthalmic complications and that the observations reported in our series could be related to coverage of the ophthalmic artery by the FDS.

Finally, the patency and flow velocity in the ophthalmic artery were estimated with angiography, which is not the most suitable tool. Further studies should analyze this flow by using Doppler sonography, before and after FDS placement, to correlate ophthalmic complications with subtle ophthalmic artery flow variations.

CONCLUSIONS

This prospective study shows that covering the ophthalmic artery with an FDS is not without potential complications. Ophthalmic complications are not rare but are usually underdiagnosed. The anatomic disposition of the ophthalmic artery regarding the carotid siphon and aneurysms should be clearly understood because some particular configurations may expose patients to a higher risk. When not required, covering the ophthalmic artery with an FDS should be avoided.

REFERENCES

1. Brinjikji W, Murad MH, Lanzino G, et al. **Endovascular treatment of intracranial aneurysms with flow diverters: a meta-analysis.** *Stroke* 2013;44:442–47
2. Fiorella D, Woo HH, Albuquerque FC, et al. **Definitive reconstruction of circumferential, fusiform intracranial aneurysms with the Pipeline embolization device.** *Neurosurgery* 2008;62:1115–20; discussion 1120–21
3. Pistocchi S, Blanc R, Bartolini B, et al. **Flow diverters at and beyond**

the level of the circle of Willis for the treatment of intracranial aneurysms. *Stroke* 2012;43:1032–38

4. Lylyk P, Miranda C, Ceratto R, et al. **Curative endovascular reconstruction of cerebral aneurysms with the Pipeline embolization device: the Buenos Aires experience.** *Neurosurgery* 2009;64:632–42; discussion 642–43
5. D'Urso PI, Lanzino G, Cloft HJ, et al. **Flow diversion for intracranial aneurysms: a review.** *Stroke* 2011;42:2363–68
6. Pierot L. **Flow diverter stents in the treatment of intracranial aneurysms: where are we?** *J Neuroradiol* 2011;38:40–46
7. Çınar C, Bozkaya H, Oran I. **Endovascular treatment of cranial aneurysms with the Pipeline flow-diverting stent: preliminary mid-term results.** *Diagn Interv Radiol* 2013;19:154–64
8. Dai D, Ding YH, Kadirvel R, et al. **Patency of branches after coverage with multiple telescoping flow-diverter devices: an in vivo study in rabbits.** *AJNR Am J Neuroradiol* 2012;33:171–74
9. Byrne JV, Beltechi R, Yarnold JA, et al. **Early experience in the treatment of intra-cranial aneurysms by endovascular flow diversion: a multicentre prospective study.** *PLoS One* 2010;5:e12492
10. Lubicz B, Collignon L, Raphaeli G, et al. **Flow-diverter stent for the endovascular treatment of intracranial aneurysms: a prospective study in 29 patients with 34 aneurysms.** *Stroke* 2010;41:2247–53
11. Leonardi M, Cirillo L, Toni F, et al. **Treatment of intracranial aneurysms using flow-diverting Silk stents (BALT): a single centre experience.** *Interv Neuroradiol* 2011;17:306–15
12. Lubicz B, Collignon L, Raphaeli G, et al. **Pipeline flow-diverter stent for endovascular treatment of intracranial aneurysms: preliminary experience in 20 patients with 27 aneurysms.** *World Neurosurg* 2011;76:114–19
13. Sadasivan C, Cesar L, Seong J, et al. **An original flow diversion device for the treatment of intracranial aneurysms: evaluation in the rabbit elastase-induced model.** *Stroke* 2009;40:952–58
14. Kulcsár Z, Ernemann U, Wetzel SG, et al. **High-profile flow diverter (Silk) implantation in the basilar artery: efficacy in the treatment of aneurysms and the role of the perforators.** *Stroke* 2010;41:1690–96
15. Fiorella D, Lylyk P, Szikora I, et al. **Curative cerebrovascular reconstruction with the Pipeline embolization device: the emergence of definitive endovascular therapy for intracranial aneurysms.** *J Neurointerv Surg* 2009;1:56–65
16. Albuquerque FC. **Visual impairment after endovascular treatment: does stent placement increase the incidence?** *World Neurosurg* 2012;78:222
17. Puffer RC, Kallmes DF, Cloft HJ, et al. **Patency of the ophthalmic artery after flow diversion treatment of paraclinoid aneurysms.** *J Neurosurg* 2012;116:892–96
18. Clarençon F, Piotin M, Pistocchi S, et al. **Evaluation of stent visibility by flat panel detector CT in patients treated for intracranial aneurysms.** *Neuroradiology* 2012;54:1121–25
19. Mounayer C, Piotin M, Baldi S, et al. **Intraarterial administration of abciximab for thromboembolic events occurring during aneurysm coil placement.** *AJNR Am J Neuroradiol* 2003;24:2039–43
20. Becske T, Kallmes DF, Saatci I, et al. **Pipeline for uncoilable or failed aneurysms: results from a multicenter clinical trial.** *Radiology* 2013;267:858–68
21. Szikora I, Berentei Z, Kulcsar Z, et al. **Treatment of intracranial aneurysms by functional reconstruction of the parent artery: the Budapest experience with the Pipeline embolization device.** *AJNR Am J Neuroradiol* 2010;31:1139–47
22. Kallmes DF, Ding YH, Dai D, et al. **A second-generation, endoluminal, flow-disrupting device for treatment of saccular aneurysms.** *AJNR Am J Neuroradiol* 2009;30:1153–58
23. Makoyeva A, Bing F, Darsaut TE, et al. **The varying porosity of braided self-expanding stents and flow diverters: an experimental study.** *AJNR Am J Neuroradiol* 2013;34:596–602
24. Maimon S, Gonen L, Nossek E, et al. **Treatment of intra-cranial aneurysms with the Silk flow diverter: 2 years' experience with 28 patients at a single center.** *Acta Neurochir (Wien)* 2012;154:979–87

25. Hayreh SS. **The 1994 Von Sallman Lecture: the optic nerve head circulation in health and disease.** *Exp Eye Res* 1995;61:259–72
26. Ohno-Matsui K, Futagami S, Yamashita S, et al. **Zinn-Haller arterial ring observed by ICG angiography in high myopia.** *Br J Ophthalmol* 1998;82:1357–62
27. Jonas JB, Holbach L, Panda-Jonas S. **Peripapillary arterial circle of Zinn-Haller: location and spatial relationships with myopia.** *PLoS One* 2013;8:e78867
28. Wirth CD, Leitner C, Perrig M. **Bilateral posterior ischaemic optic neuropathy after severe diabetic ketoacidosis, cardiopulmonary resuscitation and respiratory failure.** *BMJ Case Rep* 2013;2013:pii: bcr2012008291
29. Kudo D, Yamamura H, Nishiuchi T, et al. **Anterior and posterior ischemic optic neuropathy related to massive fluid resuscitation after blunt trauma.** *J Trauma* 2010;68:E67–70
30. D'Urso PI, Karadeli HH, Kallmes DF, et al. **Coiling for paraclinoid aneurysms: time to make way for flow diverters?** *AJNR Am J Neuroradiol* 2012;33:1470–74

3. Perspectives : Revêtement biomimétique pour l'optimisation des *flow-diverters*

Comme nous l'avons précédemment revu, les *flow-diverters* sont une approche prometteuse pour le traitement des anévrysmes intracrâniens à collet large mais présentent plusieurs limites. En effet, leur caractère pro-thrombotique inhérent à leur composition métallique³⁸⁸⁻³⁹⁰, expose le patient à des complications thrombo-emboliques et implique l'administration d'un traitement anti-plaquettaire³⁹¹⁻³⁹⁵ présentant un risque hémorragique. De plus, nous avons rappelé le risque faible mais non négligeable de rupture retardée de l'anévrysme après mise en place d'un *flow-diverter*³²⁵, lié à une forte activité protéasique du thrombus intra-anévrysmal. Enfin, il existe certains cas d'inefficacité du traitement par *flow-diverter*, en rapport avec un défaut de cicatrisation et d'endothélialisation du stent au collet de l'anévrysme^{115, 294}. Ces limites sont liées à l'absence de cicatrisation complète et au recouvrement endothélial incomplet du dispositif métallique et de la paroi artérielle ce qui favorise l'activation et l'accumulation de leucocytes et de plaquettes dans le segment artériel traité.

L'ensemble de ces phénomènes est lié au fait que les *flow-diverters* actuellement utilisés en pratique clinique sont des dispositifs inertes qui ont été **conçus comme une barrière mécanique pour exclure le sac anévrysmal de l'hémodynamique du vaisseau porteur plutôt que comme support d'une reconstruction biologique de l'artère**. Il existe donc de nombreuses possibilités pour l'optimisation biologique des *flow-diverters*. Ainsi, le développement d'un *flow-diverter* idéal, aurait pour objectifs d'empêcher la thrombose et l'inflammation locale tout en promouvant le recouvrement endothélial pour une intégration pérenne du dispositif à l'interface sang/vaisseau. Ceci permettrait de surseoir à l'administration d'anti-aggrégants plaquettaires, de diminuer le risque de rupture retardée et d'augmenter l'efficacité du traitement par la cicatrisation du segment artériel pathologique.

Dans cette optique, nous avons récemment débuté un **travail pré-clinique évaluant un revêtement biomimétique innovant pour les *flow-diverters***. Le revêtement biomimétique que nous avons choisi utilise le CD31 comme cible biologique. Le CD31 est un récepteur homophile de dialogue intercellulaire, fortement exprimé par les cellules endothéliales et est indispensable pour empêcher l'activation des leucocytes et des plaquettes. Cette glycoprotéine possède un effet attractif sur les cellules endothéliales, et un effet inhibiteur d'activation des plaquettes et des leucocytes à son contact^{396, 397}. Le but de notre projet est d'évaluer si le revêtement direct des stents avec le P8RI, un peptide biomimétique du CD31 breveté par l'unité INSERM U1148³⁹⁸, permet d'améliorer les performances des *flow-diverters*. Un

revêtement des stents par ce peptide permettrait 1) de diminuer l'adhésion des plaquettes à leur contact et ainsi de diminuer le risque de thrombose du stent; 2) Ce revêtement étant répulsif des polynucléaires, il permettrait d'en diminuer la quantité piégée à l'intérieur de l'anévrisme et ainsi de diminuer l'activité protéolytique du thrombus intra anévrysmal et le risque de rupture secondaire. 3) la cicatrisation de l'anévrisme nécessitant l'endothélialisation du *flow diverter*, la promotion des cellules endothéliales à leur surface permettrait de recréer une barrière biologique naturelle entre le sang circulant et le thrombus sacculaire, accélérant le processus cicatriciel.

Ce projet mené grâce à l'obtention d'un financement par l'Agence Nationale de la Recherche (Projet IMPLANTS, [ANR 14CE170014](#)) est réalisé au sein de l'Unité INSERM U1148 (Hôpital Bichat, Paris) par l'équipe du Dr Giuseppina CALIGIURI, en collaboration avec le Service de Neuroradiologie interventionnelle de l'Hôpital Bicêtre (Le Kremlin Bicêtre, France, Pr Laurent SPELLE, Dr Jildaz CAROFF), le laboratoire Balt Extrusion (Montmorency, France) et l'Institut de Recherche de Chimie de Paris (UMR8247 Chimie ParisTech-CNRS).

Les travaux préliminaires ont permis d'optimiser le greffage du peptide P8RI sur le *flow-diverter* Silk (Balt Extrusion, Montmorency, France), constitué de Nitinol. Le greffage direct du peptide sur le stent n'étant pas possible, celui-ci a été réalisé grâce au coating du stent par trempage dans un bain de polydopamine³⁹⁹⁻⁴⁰². Cette molécule constituée de noyaux catécholamines permet aux moules de s'accrocher sur n'importe quelle surface et est utilisée dans diverses applications bio-médicales ou agro-alimentaires (**Figure 14**). Le résidu amine (NH₂ libre) de la dopamine permet ensuite de greffer le peptide P8RI à la surface du stent via la catécholamine. Les tests *in vitro* ont montré qu'il était facilement possible de greffer le peptide sur les *flow-diverters*, tout en préservant la fonctionnalité du peptide et les propriétés biomécaniques du stent. De plus, les tests biologiques *in vitro* ont montré que le greffage de P8RI à la surface de *flow-diverters* permet d'améliorer la survie et la croissance des cellules endothéliales tout en inhibant l'activation leucocytaire et plaquettaire.

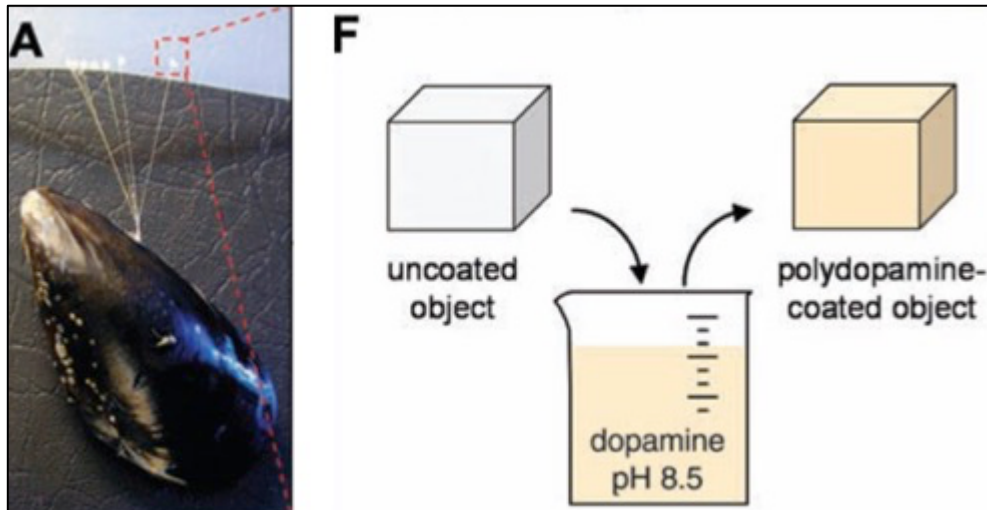


Figure 14 : Utilisation de la polydopamine pour le greffage du peptide sur la surface des *flow-diverters*.

A: Photographie des filaments (byssus) permettant l'attache des moules. F: Schéma illustrant le coating de polydopamine par trempage d'un objet dans une solution de dopamine.

Image modifiée issue de Lee *et al.*³⁹⁹

Les tests *in vivo* en cours sur le modèle d'anévrisme chez le lapin, ont pour but d'évaluer si les *flow-diverters* Silk avec le peptide P8RI permettent d'accélérer l'endothélialisation du dispositif, de diminuer l'agrégation plaquettaire et de dépôts de fibrine à leur surface et de diminuer l'activité protéolytique au sein du thrombus intra-anévrysmal.

La bio-fonctionnalisation des surfaces des dispositifs utilisés en neuroradiologie grâce à ce système de greffage semble une option prometteuse pour l'optimisation des résultats du traitement endovasculaire des anévrysmes intracrâniens que ce soit par *flow-diverter* ou éventuellement par coils ou *flow-diverter* intra-sacculaires.

III- Les Flow-diverters intra-sacculaires (WEB)

1. Principes et efficacité : Revue de la littérature

Les anévrysmes à collet large peuvent être traités avec de bons résultats par coiling avec assistance d'un ballon de remodeling ou d'un stent^{95-97, 100, 403-405}. Cependant, en raison de taux d'occlusion sub-optimaux avec des taux de recanalisation élevés, de nouvelles options prennent une place de plus en plus importante grâce au récent développement des *flow-diverters* intra-artériels ou plus récemment encore intra-sacculaires.

Le dispositif WEB (Woven Endo Bridge) (Sequent Medical, Aliso Viejo, Californie) est un dispositif intrasacculaire constitué de fils tressés, conçu pour interrompre le flux sanguin au niveau du collet de l'anévrysme. Ce dispositif est conçu pour être utilisé dans le traitement d'un large éventail d'anévrysmes incluant les anévrysmes de bifurcation à collet large^{132, 133}. Plusieurs séries ont démontré que le dispositif WEB est à la fois sûr et efficace dans le traitement des anévrysmes de bifurcation à collet large non rompus ou rompus^{143-146, 406, 407}.

Nous avons récemment publié une revue systématique et une méta-analyse de la littérature portant sur les résultats du traitement des anévrysmes à collet large avec le dispositif WEB⁴⁰⁸. Cette méta-analyse comptant 543 patients avec 557 anévrysmes traités par le dispositif WEB a démontré que le traitement des anévrysmes de bifurcation à collet large peut être réalisé avec des taux de succès technique élevés et de faibles taux de complications. Le taux d'occlusion initiale était d'environ 60%, tandis que les taux d'occlusion adéquate lors du suivi étaient de 80%⁴⁰⁸. Cette étude n'avait pas mis en évidence de différence substantielle dans les résultats en fonction de la taille de l'anévrysme, de la localisation ou du statut rompu ou non rompu de l'anévrysme. Ces résultats sont importants car ils montrent que le dispositif WEB est un outil efficace et sûr pour le traitement des anévrysmes de bifurcation à collet large. Dans la littérature, les taux d'exclusion à long terme de l'anévrysme avec le dispositif WEB sont légèrement plus élevés que ceux rapportés pour le traitement par coils des anévrysmes intracrâniens à collet large. En effet, dans les séries évaluant le traitement par coils des anévrysmes de bifurcation à collet large, les taux d'occlusion à long terme, avec occlusion complète ou presque complète, sont généralement de l'ordre de 70%⁴⁰⁹⁻⁴¹¹. Dans cette même indication, les anévrysmes traités avec un dispositif ont environ 80% d'occlusion adéquate à long terme⁴⁰⁸.

Cette revue a également démontré que les taux de complications associées au dispositif WEB étaient relativement faibles avec moins de 3% de morbidité péri-opératoire

pour le traitement des anévrismes non rompus⁴⁰⁸. Les taux de morbidité et de mortalité péri-opératoires pour le traitement par *stent-assisted coiling* des anévrismes non rompus sont similaires, variant de 3 à 5% selon les études^{412, 413}. Cependant, ces techniques sont associées à des résultats angiographiques plus médiocres^{414, 415}. La morbi-mortalité rapportée avec les *flow-diverters* dans les anévrismes de bifurcation est plus élevée avec des taux variant de 8 à 10%⁴¹⁶.

2. Corrélation histologique avec l'occlusion angiographique

Comme nous venons de le voir, le dispositif WEB (Sequent Medical, Inc., Aliso Viejo, CA) est une nouvelle option endovasculaire pour le traitement des anévrysmes intracrâniens de bifurcation à collet large¹³⁴⁻¹³⁷. Il s'agit d'un implant endosacculaire auto-expansible, qui se conforme à la paroi de l'anévrysme et couvre le collet de l'anévrysme pour fonctionner essentiellement comme un *flow-diverter* à l'interface entre le sac anévrysmal et l'artère porteuse. De façon similaire au traitement par *flow-diverter*, le processus de cicatrisation par la mise en place du *flow-diverter* intrasacculaire nécessite un processus complexe de dépôt de tissu conjonctif suivi d'une endothélialisation de la surface du dispositif au collet de l'anévrysme.

Les premières études expérimentales et cliniques avaient démontré que le WEB est à la fois sûr et efficace dans le traitement des anévrysmes intracrâniens^{137, 408 134-136, 138-142}.

Comme le mécanisme d'action du dispositif WEB est différent de celui des coils et des *flow-diverters*, plusieurs équipes ont développé de nouveaux outils pour évaluer l'occlusion angiographique et plusieurs échelles de classification ont été proposées^{137, 140-142, 417}. La classification la plus couramment utilisée est l'échelle WOS, *Web Occlusion Scale* (**Figure 15**)¹⁴⁰.

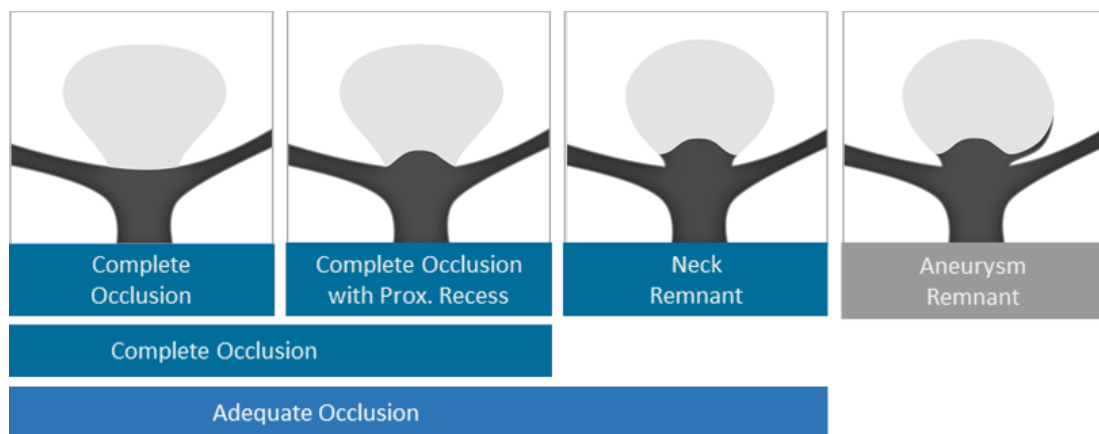


Figure 15 : Echelle WOS, *Web Occlusion Scale*. Occlusion complète correspond à l'occlusion totale du sac anévrysmal, avec ou sans opacification du récessus proximal¹⁴⁰. *Neck remnant*, correspond à une opacification résiduelle au collet de l'anévrysme s'étendant après le marqueur du récessus proximal. L'occlusion complète, l'occlusion complète avec opacification du récessus proximal et l'opacification résiduelle du collet sont considérées comme occlusion adéquate^{141, 418}. Le reliquat anévrysmal avec opacification de l'anévrysme au-delà du collet et s'étendant dans le dôme anévrysmal ou s'étendant en dehors du dispositif WEB est considéré comme une occlusion inadéquate.

Cependant, aucune de ces échelles, y compris l'échelle WOS, n'a été validée par des confrontations à l'histologie. **En utilisant une grande série d'anévrysmes induits à**

l'élastase chez des lapins traités avec le dispositif WEB, les objectifs de cette étude étaient de: 1) comparer les résultats angiographiques mesurés avec l'échelle WOS aux résultats histologiques et 2) évaluer l'accord interobservateur et intraobservateur de l'échelle WOS évaluée en angiographie.



Article 5 : Rouchaud A, Brinjikji W, Ding YH, Dai D, Zhu YQ, Cloft HJ, Kallmes DF, Kadirvel R. Evaluation of the Angiographic Grading Scale in Aneurysms Treated with the WEB Device in 80 Rabbits: Correlation with Histologic Evaluation. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2016 Feb;37(2):324-9.⁴¹⁹

Les parties Méthodes et Résultats sont présentées dans le PDF de l'article.

En utilisant l'analyse histologique comme référence, notre étude réalisée sur une série de 80 anévrysmes expérimentaux chez le lapin démontre que **l'échelle angiographique WOS est sensible, précise et fiable pour l'évaluation de l'occlusion d'un anévrysme traité avec le dispositif WEB.** De plus, nous avons trouvé des niveaux d'accord inter et intraobservateur forts pour l'échelle WOS. Ces résultats suggèrent que l'échelle WOS est un outil facilement reproductible et précis pour l'évaluation de l'occlusion des anévrysmes traités avec le dispositif WEB.

Ces résultats sont en accord avec l'étude clinique publiée par Fiorella et al.¹⁴⁰ qui avait rapporté un Kappa à 0,779. Notre étude est la première à comparer l'évaluation angiographique de l'occlusion des anévrysmes après traitement par le dispositif WEB aux contrôles histologiques. L'évaluation de l'occlusion est difficile après traitement avec le WEB car l'aspect angiographique diffère de celui des anévrysmes traités par coils ou *flow-diverter*¹⁴⁰. Afin d'éviter toute protrusion du dispositif dans l'artère porteuse, la surface proximale du WEB est légèrement incurvée en dedans du sac anévrysmal formant ainsi un récessus concave au niveau de l'interface entre l'artère porteuse et l'anévrysme. Cette opacification du récessus pourrait être confondue avec une opacification résiduelle au collet de l'anévrysme. L'échelle WOS⁴¹⁸, basée sur l'échelle de Raymond modifiée, prend en compte cette distinction entre l'opacification du récessus proximal et une opacification résiduelle de l'anévrysme. Dans cette échelle, l'occlusion complète de l'anévrysme avec ou sans opacification du récessus proximal est considérée comme une occlusion complète¹⁴⁰; L'occlusion complète ou une opacification résiduelle au collet sont considérées comme des résultats angiographiques adéquats conformément aux études précédentes^{418, 420, 421}. Cette

échelle a été utilisée dans plusieurs études antérieures et est également utilisée dans des essais cliniques WEBCAST⁴⁰⁷ (NCT 01778322) et WEB-IT (NCT 02191618) . Aucune autre étude à grande échelle n'a été publiée comparant les résultats histologiques aux résultats angiographiques même dans des anévrysmes traités par coils ou *flow-diverter*. Cependant, plusieurs études ont rapporté que les taux d'accord inter- et intraobservateur pour l'évaluation de l'occlusion des anévrysmes traités par coils ou *flow-diverter* sont modérés à forts⁴²⁰⁻⁴²⁴. Le degré d'accord observé dans notre étude pour l'échelle WOS est semblable à celui rapporté dans les études antérieures avec les coils ou les *flow-diverters*.

Ces résultats sont importants étant donnée la nécessité d'échelles reproductibles et validées histologiquement pour la standardisation des résultats angiographiques après traitement endovasculaire^{425, 426}.

Conclusion

Cette étude confirme la fiabilité de l'échelle WOS pour l'évaluation en angiographie des anévrysmes traités par WEB avec un accord inter- et intraobservateur satisfaisant. De plus, l'échelle WOS apparaît exacte par rapport à l'analyse histologique, ce qui est d'une grande importance pour justifier son utilisation dans les études cliniques évaluant le dispositif WEB.

Evaluation of the Angiographic Grading Scale in Aneurysms Treated with the WEB Device in 80 Rabbits: Correlation with Histologic Evaluation

A. Rouchaud, W. Brinjikji, Y.-H. Ding, D. Dai, Y.Q. Zhu, H.J. Cloft, D.F. Kallmes, and R. Kadirvel



ABSTRACT

BACKGROUND AND PURPOSE: The WEB Occlusion Score has been proposed to assess angiographic outcomes for intracranial aneurysms treated with the Woven EndoBridge (WEB) device. Using a large series of experimental aneurysms treated with the WEB, we had the following objectives: 1) to compare angiographic outcomes as measured by the WEB Occlusion Scale with histologic results, and 2) to assess interobserver and intraobserver agreement of the WEB Occlusion Scale.

MATERIALS AND METHODS: Intracranial aneurysms were created in 80 rabbits and treated with WEB devices. Animals were sacrificed at last follow-up for histologic evaluation. DSA was performed just after the deployment of the device and at follow-up. Four investigators independently and retrospectively graded the DSA twice according to the WEB Occlusion Scale. One histopathologist blinded to the angiographic results graded the occlusion according to a 4-point scale patterned on the WEB Occlusion Scale. Intra- and interobserver agreement were evaluated for DSA. Follow-up angiographic grading and histologic reference were compared to determine the WEB Occlusion Scale accuracy for complete (with or without recess filling) versus incomplete occlusion and adequate (complete occlusion or neck remnant) versus inadequate occlusion.

RESULTS: Inter- and intraobserver weighted κ for the angiographic WEB Occlusion Scale were, respectively, 0.76 and 0.76, indicating substantial agreement. The sensitivity and specificity of the WEB Occlusion Scale for complete occlusion at follow-up compared with the histologic reference standard were, respectively, 75% and 83.3%, with an overall accuracy of 80%. Similarly, for adequate occlusion at follow-up, sensitivity was 97.7%, specificity was 64.9%, and overall accuracy was 82.5%.

CONCLUSIONS: The WEB Occlusion Scale appears to be consistent, reliable, and accurate compared with a histologic reference standard.

ABBREVIATIONS: WEB = Woven EndoBridge; WOS = WEB Occlusion Scale

The Woven EndoBridge (WEB) device (Sequent Medical, Aliso Viejo, California) is a new and promising tool in the treatment of wide-neck and bifurcation intracranial aneurysms.¹⁻⁴ The endosaccular implant conforms to the aneurysm wall and spans the aneurysm neck to essentially function as a flow diverter at the aneurysm neck–parent artery interface. Initial experimental and clinical studies have demonstrated that the WEB is both safe and effective in the treatment of intracranial aneurysms.¹⁻⁹

Because the mechanism of action of the device differs from that in flow diverters and endosaccular coils, developing tools to assess angiographic occlusion has become a recent priority among many neurointerventionists, and several grading scales have been proposed.^{4,7-10} Perhaps the most commonly used scale is the WEB Occlusion Scale (WOS).⁷ However, none of these scales, including the WOS, has previously been validated with histologic studies, to our knowledge. In a large series of elastase-induced aneurysms in rabbits treated with the WEB device, the objectives of this study were the following: 1) to compare angiographic outcomes as measured by the WOS with histologic results, and 2) to assess interobserver and intraobserver agreement of the WOS.

MATERIALS AND METHODS

In Vivo Experiments

The Institutional Animal Care and Use Committee at our Institution approved the animal procedures. Elastase-induced aneu-

Received May 26, 2015; accepted after revision July 14.

From the Neuroradiology Research Laboratory (A.R., Y.-H.D., D.D., Y.Q.Z., D.F.K., R.K.), Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, Minnesota; and the Department of Radiology (A.R., W.B., H.J.C., D.F.K.), Mayo Clinic, Rochester, Minnesota.

Please address correspondence to Aymeric Rouchaud, MD, Neuroradiology Research Laboratory, Mayo Clinic, 200 First St SW, Rochester, MN 55905; e-mail: Rouchaud.Aymeric@mayo.edu; aymeric.rouchaud@gmail.com

Indicates article with supplemental on-line tables.

<http://dx.doi.org/10.3174/ajnr.A4527>

rysms were created in 80 New Zealand white rabbits. Aneurysm creation procedures were performed as previously described by our study group.¹¹ Aneurysms were treated at least 3 weeks after aneurysm creation.¹² No antiplatelet therapy was used before or after treatment. During the device-deployment procedure, animals were anesthetized, the right femoral artery was exposed, and a 5F sheath was inserted, followed by injection of 500 U of heparin through the sheath. A 5F guide catheter (Envoy; Codman & Shurtleff, Raynham, Massachusetts) was advanced into the aortic arch. Digital subtraction angiography was performed with contrast injection through the guide catheter. A microcatheter (Renegade Hi-Flo; Boston Scientific, Natick, Massachusetts) was advanced into the aneurysm lumen over a microguidewire (Transend EX; Stryker, Kalamazoo, Michigan) through the guide catheter. The WEB size was selected according to the aneurysm size. After deployment of the device, the microcatheter was removed and DSA was performed through the guide catheter at the brachiocephalic trunk immediately and 5 minutes following device implantation. Follow-up angiographic evaluation was performed at the sacrifice end point according to the WEB Occlusion Scale as described by Fiorella et al.⁷ Animals were sacrificed with a lethal injection of pentobarbital. Aneurysm and parent artery tissue were immediately fixed in 10% neutral buffered formalin.

Angiographic Evaluations

Four investigators independently and retrospectively examined selected images of the posttreatment and follow-up DSA to grade the occlusion status according to the WEB Occlusion Scale. These readings were performed twice by each of the investigators at 2-month intervals to analyze the intraobserver correlation in the readings. The WEB Occlusion Scale is a 4-point scale using the following grades: complete aneurysm occlusion, complete occlusion with recess filling, aneurysm neck remnants, and aneurysm remnants. The investigators also evaluated the modification of the aneurysm occlusion status between posttreatment and follow-up DSA as follows: improvement, stable, or recurrence. To compare follow-up DSA readings and histologic findings, we dichotomized DSA results as complete occlusion (with or without proximal recess filling) or incomplete occlusion (neck remnant or aneurysm remnant); similarly, we dichotomized DSA results as adequate occlusion (complete occlusion or neck remnant) or inadequate occlusion (aneurysm remnant), according to previous studies.^{8,13} In case of disagreement among readers, a fifth reader adjudicated between adequate or inadequate occlusion.

Histopathologic Processing and Analysis

One histopathologist blinded to the angiographic results did the processing and analysis for healing evaluation. Aneurysm samples were processed at 1000- μm intervals in a coronal orientation, permitting long-axis sectioning of the aneurysm neck, with use of an IsoMet Low Speed Saw (Buehler, Lake Bluff, Illinois). After the device segments were carefully removed under a dissecting microscope, the samples were then re-embedded in paraffin, sectioned at 5–6 μm , and stained with hematoxylin-eosin. The sections

were evaluated by using our previously reported evaluation criteria.¹⁴

The histologic results for each aneurysm were evaluated according to a 4-point histologic scale, patterned on the angiographic WEB Occlusion Scale with the same items: complete aneurysm occlusion, complete occlusion with recess filling, aneurysm neck remnants, and aneurysm remnants.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed by using the statistical software package SAS 9.0 (SAS Institute, Cary, North Carolina). Interobserver and intraobserver agreement was assessed by using the quadratic weighted κ statistic. κ statistics for interobserver agreement were calculated between each observer. Mean κ values were calculated as well. The ANOVA intraclass correlation between readers was calculated. The sensitivity, specificity, and accuracy of DSA evaluations at last angiographic follow-up were calculated by using the histologic findings as a reference standard. These were calculated on a per-reading basis.

RESULTS

Population

Eighty consecutively treated rabbits were included in this study. The length of follow-up varied from 30 to 365 days, with a mean length of follow-up of 101.4 days. Rabbits were sacrificed at day 30 ($n = 27$), day 50 ($n = 5$), day 90 ($n = 30$), day 180 ($n = 12$), or day 365 ($n = 6$). A Single-Layer WEB was used in 55% of cases ($n = 44$), and a Dual-Layer WEB was used in 45% of cases ($n = 36$).

Angiographic Results

Eight readings were performed for each of the 80 posttreatment and 80 follow-up DSAs (4 readers doing the same reading twice at 2-month intervals). Immediate posttreatment DSA showed 8.3% complete occlusion ($n = 53/640$ readings), 3.8% ($n = 24$) complete occlusion with recess filling, 12.7% ($n = 81$) neck remnants, and 75.3% ($n = 482$) aneurysm remnants. At last follow-up DSA, we observed 24.6% complete occlusion ($n = 157/639$ readings), 21.6% ($n = 138$) complete occlusion with recess filling, 30.8% ($n = 197$) neck remnants, and 23.0% ($n = 147$) aneurysm remnants.

The interobserver weighted κ coefficient for agreement of the occlusion grade according to the angiographic WEB occlusion scale was 0.76 (95% CI, 0.76–0.82), indicating substantial agreement among readers (range, 0.68–0.81). The intraobserver κ for the 2 sequential readings of the angiographic results was also substantial at 0.76 (95% CI, 0.72–0.81), ranging from 0.58 to 0.85. The ANOVA intraclass correlation among readers was 0.86 (95% CI, 0.81–0.90) for the first reading and 0.82 (95% CI, 0.76–0.87) for the second reading. The overall intraclass correlation score for both readings was 0.84 (95% CI, 0.79–0.88). Inter- and intraobserver agreement is presented in On-line Tables 1 and 2.

Variation of the aneurysm occlusion status between posttreatment and follow-up DSA showed 73.3% ($n = 469/640$) improvement, 16.6% ($n = 106$) stable occlusion, and 10.1% ($n = 65$) increase of opacification of the aneurysms compared with posttreatment DSA. The intra- and interreader κ was 0.73 (95% CI, 0.70–0.77) and 0.78 (95% CI, 0.71–0.84), respectively. These data are summarized in Table 1.

Table 1: Inter- and intraobserver κ agreement for follow-up DSA readings

	R1	R2	R3	R4
R1	0.748 (0.599–0.897) ^a	0.755 (0.690–0.819)	0.723 (0.656–0.790)	0.658 (0.587–0.730)
R2		0.847 (0.772–0.923) ^a	0.745 (0.680–0.811)	0.700 (0.632–0.767)
R3			0.823 (0.744–0.903) ^a	0.711 (0.644–0.778)
R4				0.582 (0.474–0.691) ^a

Note:—R indicates reader.

^a Intraobserver κ results.

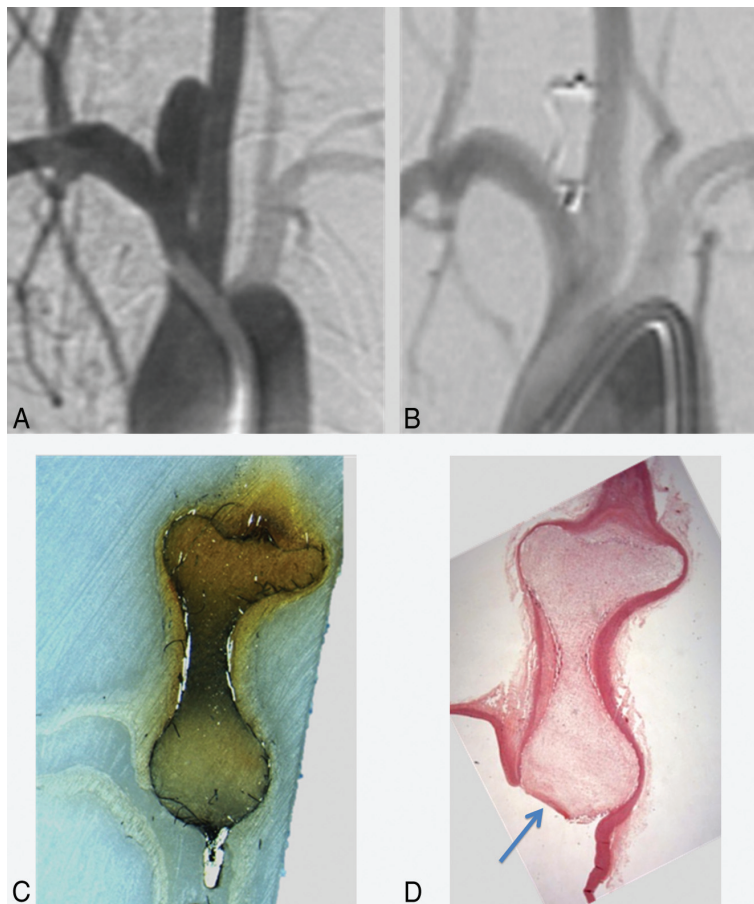


FIG 1. Complete aneurysm occlusion. Angiographic-histologic correlation. Pretreatment DSA shows an aneurysm on the right subclavian artery at the origin of the right common carotid artery (A). Follow-up DSA shows complete occlusion of the aneurysm (B). An all-mount histologic sample shows complete occlusion of the aneurysm, filled with conjunctive tissue and with any lack of organized tissue in to the aneurysm cavity or at the level of the neck (C). Photomicrograph (hematoxylin-eosin, original magnification $\times 100$) shows complete coverage of the neck with endothelial tissue with complete healing (D) and organized connective tissue within the aneurysm lumen.

Complete versus Incomplete Occlusion

We dichotomized follow-up DSA results as complete versus incomplete occlusion. The interobserver κ at follow-up was 0.63 (95% CI, 0.56–0.70), ranging from 0.42 to 0.76; the intraobserver κ was 0.71 (95% CI, 0.55–0.88), ranging from 0.47 to 0.85.

To compare with histologic findings, a fifth reader was needed in 31.2% cases (25/80) to adjudicate between complete or incomplete occlusion. The adjudicated dichotomized DSA evaluation yielded 40% (32/80) complete occlusion and 60% (48/80) incomplete occlusion.

Adequate versus Inadequate Occlusion

We dichotomized DSA results as adequate occlusion (complete healing or proximal recess persistence) versus inadequate occlusion (neck or aneurysm remnants). The interobserver κ at follow-up was 0.69 (95% CI, 0.64–0.73), ranging from 0.50 to 0.79; the intraobserver κ was 0.75 (95% CI, 0.62–0.89), ranging from 0.55 to 0.85.

To compare the DSA results with histologic findings, we determined a consensus value to allocate in the adequate versus inadequate occlusion group, according to the most present value without need for a fifth reader to adjudicate. The consensus dichotomized DSA evaluation yielded 68.8% (55/80) adequate occlusion and 31.2% (25/80) inadequate occlusion.

Histologic Results

Histologic evaluation at the time of follow-up DSA depicted 18.8% complete healing ($n = 15/80$ aneurysms) and 21.2% ($n = 17$) proximal recess persistence; 13.8% of cases ($n = 11$) had aneurysm neck remnants, and 46.2% ($n = 37$) had aneurysm remnants. We observed, respectively, 40% (32/80) complete occlusions, 60% (48/80) incomplete occlusions, 53.8% (43/80) adequate, and 46.2% (37/80) inadequate occlusions.

Correlation between Angiographic and Histologic Results

Illustrative correlations between follow-up DSA and histology are presented in Figs 1 and 2.

Correlation for the Diagnosis of Complete Occlusion

We observed 24 (30%) cases for which DSA and histologic evaluations agreed for complete occlusion (complete occlusion with or without recess filling) and 40 (50%) cases for which DSA and his-

tology agreed for incomplete occlusion. In 8 (10%) cases, DSA suggested a complete occlusion but histology identified incomplete, and similarly, 8 (10%) cases that had been misassessed as incomplete by DSA were found to have complete occlusion on histology (Table 2). Sensitivity and specificity of the DSA for the diagnosis of complete versus incomplete occlusion at follow-up compared with the histologic results as the reference standard were respectively 75% (95% CI, 56%–88%) and 83.3% (95% CI, 69%–92%). The overall accuracy of the DSA evaluation com-

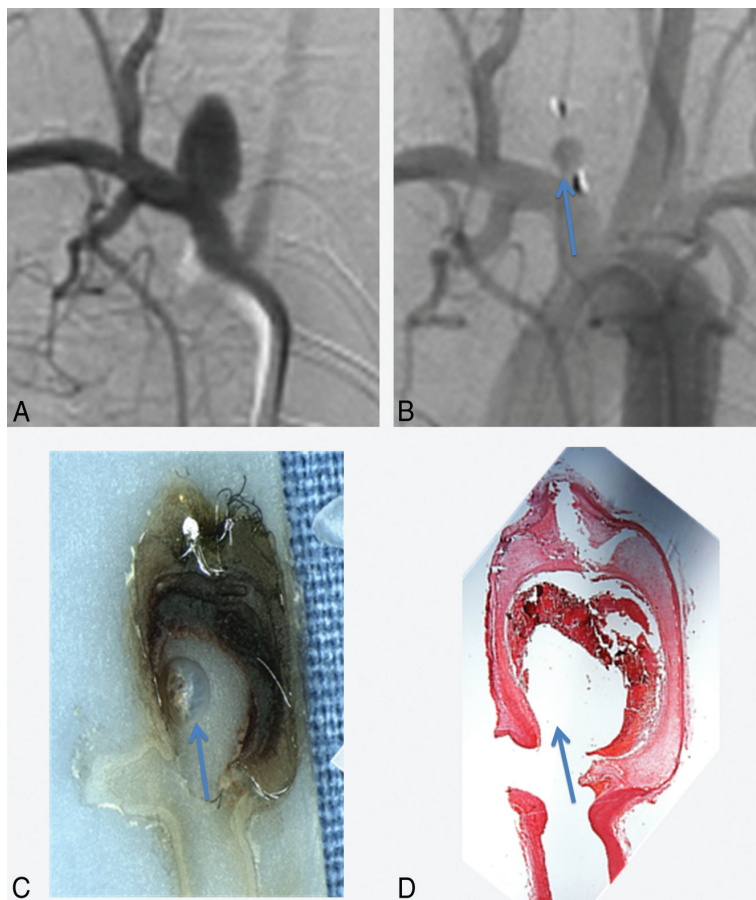


FIG 2. Aneurysm remnant. Angiographic-histologic correlation. Pretreatment DSA shows an aneurysm on the right subclavian artery at the origin of the right common carotid artery (A). Follow-up DSA shows partial filling of the aneurysm sac (blue arrow, B). An all-mount histologic sample shows a lack of filling of the aneurysm by the conjunctive tissue (blue arrow, C). Photomicrograph (hematoxylin-eosin, original magnification $\times 100$) shows a lack of coverage of the neck by endothelial tissue and filling of the aneurysm pouch with a partial thrombosis in the aneurysm sac (D).

Table 2: Correlations between the histologic reference standard and the follow-up DSA WOS evaluation: contingency table for complete versus incomplete occlusion

Histology Grading	Follow-Up DSA Grading		
	Complete Occlusion or Recess Filling	Residual Neck or Residual Aneurysm	Total
Complete occlusion or recess filling	24	8	32
Residual neck or residual aneurysm	8	40	48
Total	32	48	80

pared with the reference standard histology was 80% (95% CI, 65%–90%).

Correlation for the Diagnosis of Adequate Occlusion

We observed 42 (52.5%) cases for which DSA and histologic evaluations agreed for adequate occlusion (complete occlusion or neck remnant) and 24 (30%) cases for which DSA and histology agreed for inadequate occlusion. In 13 (16.2%) cases, DSA suggested an adequate occlusion but histology identified inadequate occlusion, and similarly 1 (1.3%) case was misassessed as inadequate

by DSA but was found to have adequate occlusion on histology (Table 3). Sensitivity and specificity of the DSA for the diagnosis of adequate versus inadequate occlusion at follow-up compared with the histologic results as the reference standard were respectively 97.7% (95% CI, 86.2%–99.9%) and 64.9% (95% CI, 47.4%–79.3%). The overall accuracy of the DSA evaluation compared with the reference standard histology was 82.5% (95% CI, 73.8%–91.9%).

DISCUSSION

Using a histologic reference standard, our study performed on a large series of experimental aneurysms demonstrates that the angiographic WOS is sensitive, specific, and accurate in assessing aneurysm occlusion following treatment of intracranial aneurysms with the WEB device. In addition, we found a substantial level of inter- and intraobserver agreement for the WEB Occlusion Scale. These findings suggest that the WEB Occlusion Scale is an easily reproducible and accurate tool in assessing aneurysm occlusion following treatment with the WEB device.

Our current results are in accordance with the clinical study published by Fiorella et al,⁷ which reported a κ value statistic at 0.779 (95% CI, 0.70–0.86). Our study is the first to compare angiographic assessment of aneurysm occlusion after treatment with the intrasaccular WEB device with histologic controls. Assessment of occlusion is challenging following treatment with the WEB because the angiographic appearance differs from that of coiled or intraluminal flow-diverter-treated aneurysms.⁷ The proximal surface of the WEB is slightly recessed into the body of the device, thus forming a concave “marker recess” at the parent artery–aneurysm interface, to avoid any protrusion of the device in the parent artery. This marker recess opacification can be mistaken for residual filling of the aneurysm neck.

The WEB Occlusion Scale (WOS),¹⁵ based on the modified Raymond Scale, has been developed for the standardized reporting of angiographic occlusion assessment achieved with intrasaccular mesh implants, taking into account the distinction between recess opacification and aneurysm neck remnant. In this scale, complete aneurysm occlusion with or without opacification of the proximal recess is considered complete occlusion⁷; complete occlusion and neck remnant are considered adequate angiographic outcomes according to previous studies.^{13,15,16} This scale has

Table 3: Correlations between the histologic reference standard and the follow-up DSA WOS evaluation: contingency table for adequate versus inadequate occlusion

Histology Grading	Follow-Up DSA Grading		Total
	Adequate Occlusion	Inadequate Occlusion	
Adequate occlusion	42	1	43
Inadequate occlusion	13	24	37
Total	55	25	80

been used in several previous studies and is also used in currently ongoing clinical trials: WEB Clinical Assessment of IntraSaccular Aneurysm Therapy (www.clinicaltrials.gov, NCT 01778322) and Wide Neck Bifurcation Intracranial Aneurysms; Intracranial Aneurysms (NCT 02191618). No other large-scale study has been published comparing histologic findings with DSA in the setting of the evaluation of aneurysm occlusion either for coiled or flow-diverter-treated aneurysms. However, several studies have reported that interobserver and intraobserver agreement rates for the assessment of aneurysm occlusion following both coiling and flow-diverter treatment are moderate to substantial.^{13,16-19} The degree of agreement seen in our study for the WOS is similar to that reported in prior studies of coiling and flow-diverter-treated aneurysms. At a time when consensus definitions for reporting angiographic outcomes following endovascular treatment of intracranial aneurysms are required, scales that are both easily reproducible and histologically validated are of the utmost importance.^{20,21}

Limitations

Our study is limited by its retrospective nature and the use of only selected images for the DSA readers' assessment. Readers did not have access to the complete angiographic run when assessing angiographic occlusion. Furthermore, only 1 experienced reader evaluated the histologic samples. However, this reader was blinded to the DSA outcomes. Another limitation of this study is that rabbits were sacrificed at different time points, which can modify the outcomes after WEB implantation, depending on the length of follow-up.

CONCLUSIONS

This study confirms the consistency and reliability of the WEB Occlusion Scale for DSA evaluation of WEB-treated aneurysms with substantial interobserver and intraobserver agreement. Furthermore, the WEB Occlusion Scale appears to be accurate compared with a histologic reference standard, which is of great importance to justify its use in clinical studies for the evaluation of the WEB device.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ravi Lingineni, BST, from the Department of Health Sciences Research of Mayo Clinic, for his contribution to statistical analysis.

Disclosures: Waleed Brinjikji—UNRELATED: Grants/Grants Pending: Brain Aneurysm Foundation.* David F. Kallmes—RELATED: Grant: Sequent Medical.* Comments: preclinical research studies; UNRELATED: Board Membership: GE Healthcare (Cost-Effectiveness Board membership); Consultancy: ev3/Covidien/Medtronic.* Comments: planning and implementing clinical trials, Steering Committee membership;

Grants/Grants Pending: MicroVention,* Codman,* Surmodics,* NeuroSigma,* ev3/Covidien/Medtronic.* Comments: preclinical research and clinical trials; Royalties: University of Virginia Patent Foundation, Comments: Spinal Fusion; Travel/Accommodations/Meeting Expenses Unrelated to Activities Listed: ev3/Covidien/Medtronic.* Comments: FDA panel presentation, open comments section. Ramanathan Kadirvel—UNRELATED: Grants/Grants Pending: National Institutes of Health.* *Money paid to the Institution.

REFERENCES

- Pierot L, Klisch J, Cognard C, et al. Endovascular WEB flow disruption in middle cerebral artery aneurysms: preliminary feasibility, clinical, and anatomical results in a multicenter study. *Neurosurgery* 2013;73:27-34; discussion 34-25 CrossRef Medline
- Lubicz B, Mine B, Collignon L, et al. WEB device for endovascular treatment of wide-neck bifurcation aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol* 2013;34:1209-14 CrossRef Medline
- Klisch J, Sychra V, Strasilla C, et al. The Woven EndoBridge cerebral aneurysm embolization device (WEB II): initial clinical experience. *Neuroradiology* 2011;53:599-607 CrossRef Medline
- Ding YH, Lewis DA, Kadirvel R, et al. The Woven EndoBridge: a new aneurysm occlusion device. *AJNR Am J Neuroradiol* 2011;32:607-11 CrossRef Medline
- Pierot L, Moret J, Turjman F, et al. WEB treatment of intracranial aneurysms: feasibility, complications, and 1-month safety results with the WEB DL and WEB SL/SLS in the French Observatory. *AJNR Am J Neuroradiol* 2015;36:922-27 CrossRef Medline
- Papagiannaki C, Spelle L, Januel AC, et al. WEB intrasaccular flow disruptor—prospective, multicenter experience in 83 patients with 85 aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol* 2014;35:2106-11 CrossRef Medline
- Fiorella D, Arthur A, Byrne J, et al. Interobserver variability in the assessment of aneurysm occlusion with the WEB aneurysm embolization system. *J Neurointerv Surg* 2015;7:591-95 CrossRef Medline
- Caroff J, Mihalea C, Dargento F, et al. Woven Endobridge (WEB) device for endovascular treatment of ruptured intracranial wide-neck aneurysms: a single-center experience. *Neuroradiology* 2014; 56:755-61 CrossRef Medline
- Pierot L, Liebig T, Sychra V, et al. Intrasaccular flow-disruption treatment of intracranial aneurysms: preliminary results of a multicenter clinical study. *AJNR Am J Neuroradiol* 2012;33:1232-38 CrossRef Medline
- Pierot L, Klisch J, Gauvrit J, et al. P-009 WEB endovascular treatment of wide-neck bifurcation aneurysms: short- and midterm results in a European study. *J Neurointerv Surg* 2014;6(suppl 1):A25 CrossRef
- Altes TA, Cloft HJ, Short JG, et al. 1999 ARRS Executive Council Award. Creation of saccular aneurysms in the rabbit: a model suitable for testing endovascular devices—American Roentgen Ray Society. *AJR Am J Roentgenol* 2000;174:349-54 CrossRef Medline
- Fujiwara NH, Cloft HJ, Marx WF, et al. Serial angiography in an elastase-induced aneurysm model in rabbits: evidence for progressive aneurysm enlargement after creation. *AJNR Am J Neuroradiol* 2001;22:698-703 Medline
- Gherasim DN, Gory B, Sivan-Hoffmann R, et al. Endovascular treatment of wide-neck anterior communicating artery aneurysms using WEB-DL and WEB-SL: short-term results in a multicenter study. *AJNR Am J Neuroradiol* 2015;36:1150-54 CrossRef Medline
- Dai D, Ding YH, Danielson MA, et al. Histopathologic and immunohistochemical comparison of human, rabbit, and swine aneurysms embolized with platinum coils. *AJNR Am J Neuroradiol* 2005; 26:2560-68 Medline
- Lubicz B, Klisch J, Gauvrit JY, et al. WEB-DL endovascular treatment of wide-neck bifurcation aneurysms: short- and midterm results in a European study. *AJNR Am J Neuroradiol* 2014;35:432-38 CrossRef Medline
- Cloft HJ, Kaufmann T, Kallmes DF. Observer agreement in the assessment of endovascular aneurysm therapy and aneurysm recurrence. *AJNR Am J Neuroradiol* 2007;28:497-500 Medline

17. McDonald JS, Carter RE, Layton KF, et al. **Interobserver variability in retreatment decisions of recurrent and residual aneurysms.** *AJNR Am J Neuroradiol* 2013;34:1035–39 CrossRef Medline
18. Suh SH, Cloft HJ, Lanzino G, et al. **Interobserver agreement after Pipeline embolization device implantation.** *AJNR Am J Neuroradiol* 2013;34:1215–18 CrossRef Medline
19. Tollard É, Darsaut TE, Bing F, et al. **Outcomes of endovascular treatments of aneurysms: observer variability and implications for interpreting case series and planning randomized trials.** *AJNR Am J Neuroradiol* 2012;33:626–31 CrossRef Medline
20. Meyers PM, Schumacher HC, Higashida RT, et al. **Reporting standards for endovascular repair of saccular intracranial cerebral aneurysms.** *AJNR Am J Neuroradiol* 2010;31:E12–24 Medline
21. Raymond J, White PM, Molyneux AJ. **Scales, agreement, outcome measures, and progress in aneurysm therapy.** *AJNR Am J Neuroradiol* 2007;28:501–02 Medline

On-line Table 1: Detailed κ results between DSA readers at posttreatment and follow-up end points

	Reading 1 κ , (CI 95%)	Reading 2 κ , (CI 95%)	Overall, (CI 95%)
Posttreatment DSA, reader 1 vs reader 3	0.694 (0.556–0.832)	0.789 (0.650–0.928)	0.741 (0.644–0.839)
Posttreatment DSA, reader 1 vs reader 4	0.776 (0.613–0.939)	0.682 (0.552–0.812)	0.719 (0.617–0.821)
Posttreatment DSA, reader 3 vs reader 4	0.718 (0.570–0.866)	0.750 (0.627–0.874)	0.737 (0.643–0.832)
Follow-up DSA, reader 1 vs reader 2	0.733 (0.640–0.826)	0.774 (0.685–0.864)	0.755 (0.690–0.819)
Follow-up DSA, reader 1 vs reader 3	0.636 (0.531–0.741)	0.782 (0.695–0.869)	0.723 (0.656–0.790)
Follow-up DSA, reader 1 vs reader 4	0.719 (0.623–0.815)	0.580 (0.472–0.688)	0.658 (0.587–0.730)
Follow-up DSA, reader 2 vs reader 3	0.721 (0.621–0.821)	0.763 (0.676–0.849)	0.745 (0.680–0.811)
Follow-up DSA, reader 2 vs reader 4	0.777 (0.692–0.863)	0.568 (0.456–0.679)	0.700 (0.632–0.767)
Follow-up DSA, reader 3 vs reader 4	0.781 (0.693–0.869)	0.612 (0.508–0.717)	0.711 (0.644–0.778)
Comparative score, reader 1 vs reader 2	0.622 (0.445–0.799)	0.730 (0.566–0.894)	0.681 (0.560–0.801)
Comparative score, reader 1 vs reader 3	0.760 (0.615–0.904)	0.754 (0.606–0.902)	0.757 (0.654–0.861)
Comparative score, reader 1 vs reader 4	0.839 (0.708–0.969)	0.755 (0.601–0.909)	0.804 (0.705–0.904)
Comparative score, reader 2 vs reader 3	0.611 (0.424–0.798)	0.700 (0.542–0.858)	0.663 (0.543–0.784)
Comparative score, reader 2 vs reader 4	0.721 (0.559–0.883)	0.704 (0.550–0.858)	0.713 (0.601–0.824)
Comparative score, reader 3 vs reader 4	0.780 (0.640–0.920)	0.826 (0.720–0.932)	0.810 (0.725–0.894)

On-line Table 2: Intraobserver κ results between the first and second readings at posttreatment and follow-up end points

	κ , (CI 95%)
Posttreatment DSA, reader 1	0.780 (0.628–0.933)
Posttreatment DSA, reader 2	0.919 (0.824–1.000)
Posttreatment DSA, reader 3	0.761 (0.644–0.878)
Posttreatment DSA, reader 4	0.648 (0.511–0.786)
Follow-up DSA, reader 1	0.795 (0.705–0.886)
Follow-up DSA, reader 2	0.847 (0.772–0.923)
Follow-up DSA, reader 3	0.823 (0.744–0.903)
Follow-up DSA, reader 4	0.582 (0.474–0.691)
Comparative score, reader 1	0.748 (0.599–0.897)
Comparative score, reader 2	0.718 (0.537–0.899)
Comparative score, reader 3	0.764 (0.634–0.893)
Comparative score, reader 4	0.877 (0.768–0.986)

IV- Thérapie cellulaire

1. Rationnel pour la thérapie cellulaire dans les anévrysmes intracrâniens

Une autre approche pour améliorer la cicatrisation et prévenir les récurrences anévrysmales en reconstruisant le segment artériel est la thérapie cellulaire. La thérapie cellulaire consiste en l'administration de cellules thérapeutiques dans le sac anévrysmal. La thérapie cellulaire a montré des résultats prometteurs dans les études cliniques pour d'autres indications cardiovasculaires, comme l'infarctus du myocarde^{427, 428} et l'accident vasculaire cérébral ischémique^{429, 430}.

Comme nous l'avons précédemment décrit, le développement ou les récurrences après traitement sont en partie liées à un défaut de cicatrisation et d'endothélialisation au collet de l'anévrysme⁴³¹ (**Figure 16**). Par conséquent, la cicatrisation et la ré-endothélialisation du collet de l'anévrysme, sont des processus qui pourraient être améliorés par thérapie cellulaire avec des cellules endothéliales afin de limiter les récurrences d'un anévrysme traité. Les cellules musculaires lisses (CML) pourraient également être une autre cible pour la thérapie cellulaire. Elles sont la composante cellulaire constitutive des vaisseaux sanguins qui fournissent l'intégrité structurale et régulent le flux sanguin local en se contractant et en provoquant une constriction ou une relaxation des vaisseaux et en provoquant une dilatation vasculaire⁴³². Au cours du développement d'un anévrysme, la dégénérescence de la lame élastique impose une augmentation du stress sur les fibres de collagène de la paroi du vaisseau et, par conséquent, sur les CML responsables de la synthèse et du renouvellement de ces fibres de collagène. De plus, les macrophages infiltrés induisent l'apoptose des CML par la sécrétion d'interleukine-1b, réduisent la synthèse du collagène par la sécrétion de facteur nucléaire kB (NFkB) et accélèrent la décomposition des fibres de collagène existantes par la sécrétion de MMP-2 et MMP-9^{37, 44, 225}. La destruction du collagène existant, associée à la diminution de la production de collagène contribue à la croissance des anévrysmes. Une approche thérapeutique possible pourrait être de reconstituer le stock de CML perdues avec des CML exogènes pour rétablir l'équilibre dans la production de collagène et arrêter la formation ou la récurrence de l'anévrysme. De ce fait, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) représentent un grand potentiel thérapeutique car elles inhibent la production de MMP-2, de MMP-9 et d'interleukine-1b. De plus, les CSM ont la capacité de se différencier en CML et en cellules endothéliales⁴³³⁻⁴³⁶. Les CSM ont également la faculté d'inhiber la production de TNF α , une cytokine pro-inflammatoire qui est sur-exprimée dans les vaisseaux cérébraux lésés et joue un rôle clé dans la formation des anévrysmes⁴³⁷⁻⁴⁴⁰.

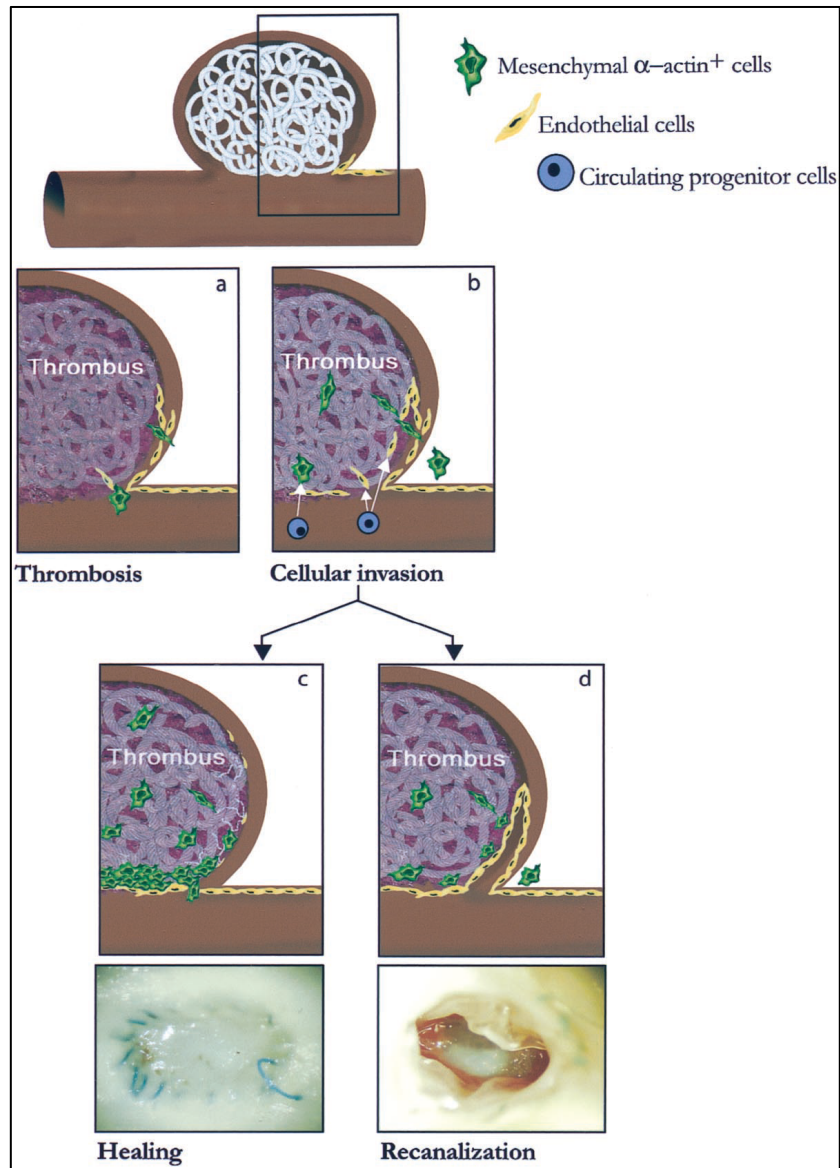


Figure 16 : Mécanismes impliqués dans la récurrence (d) ou la cicatrisation (c) après traitement par coils. L'apport de cellules actine positives (Cellules mésenchymateuses actives de type myofibroblaste), de cellules endothéliales ou de progéniteurs endothéliaux circulants, pourrait permettre d'améliorer la cicatrisation des anévrysmes traités par coils.

Image extraite de Ribourtout et al.⁴³¹

2. Thérapie cellulaire dans les anévrismes intracrâniens : revue de la littérature

Comme nous l'avons vu, plusieurs processus cellulaires impliqués dans le développement ou la récurrence des anévrismes peuvent être ciblés à des fins thérapeutiques. Plusieurs tentatives de thérapie cellulaire ont été réalisées dans le cadre d'études précliniques utilisant des cellules musculaires lisses (CML)^{149, 150}, des fibroblastes^{153, 155, 156}, des cellules progénitrices endothéliales (CPE)^{154, 212, 441, 442}, ou des cellules souches mésenchymateuses (CSM)¹⁵⁸. Adibi et al. ont récemment publié une revue de la littérature sur ces différents essais précliniques¹⁴⁸. Du fait que l'allogénicité entre individus de la même espèce est portée par toutes les cellules de l'organisme (système HLA propre à chaque individu non homozygote), la thérapie cellulaire nécessite l'utilisation de cellules autologues sinon les cellules greffées disparaissent rapidement par rejet de greffe. Cette nécessité limite les sources cellulaires autologues accessibles chez un individu donné.

a. Cellules musculaires lisses (CML)

Au cours de la formation et de la récurrence des anévrismes, la perte de CML et la destruction de la matrice extra-cellulaire contribuent à la croissance de l'anévrisme. Des études *in vitro* sur des CML isolées à partir de tissu anévrysmal intracrânien⁴⁴³ ont montré que les CML anévrysmales ont un rôle important dans la production du collagène et jouent un rôle dans la réparation du vaisseau affecté. En 1999, Raymond et al.⁷³ ont étudié la cicatrisation d'anévrismes expérimentaux chez le porc, en utilisant des CML¹⁶⁷. Les résultats ont montré une augmentation importante de la couche néo-intimale composée principalement de CML, responsable de la guérison des anévrismes⁷³. Plus tard, le même groupe¹⁵⁰ a étudié les avantages possibles de l'implantation de CML sur la cicatrisation et l'exclusion des anévrismes dans un modèle canin¹⁶⁷. Les anévrismes expérimentaux ont été occlus en utilisant un mélange de Gelfoam (Pfizer, New York, New York, USA) et de fibrinogène avec ou sans CML. Trois semaines après le traitement, le groupe CML présentait une augmentation significative de l'épaisseur de la néo-intima mais une amélioration non significative des scores angiographiques. Les auteurs ont conclu que les greffes de CML peuvent améliorer le résultat du traitement par embolisation¹⁵⁰. En 2014, Marbacher et al. ont montré que la diminution du nombre de CML du tissu anévrysmal aggravait la dégénérescence de la paroi, même dans des anévrismes traités. Ils ont en outre montré que l'implantation de CML dans les anévrismes coilés réduit la récurrence angiographique dans les anévrismes décellularisés et donne de meilleurs résultats histologiques¹⁴⁹.

Les études sur le rôle thérapeutique des CML dans le traitement des anévrismes de l'aorte abdominale peuvent également constituer une source importante de connaissances pour le traitement des anévrismes intracrâniens. Quelques études sur les modèles d'anévrisme de l'aorte abdominale^{147, 444, 445} ont démontré que les CML exercent un effet paracrine qui protège les artères contre l'inflammation et la protéolyse. Dans leurs études, Allaire et al.^{147, 444} ont montré que l'ensemencement de CML peut stimuler les capacités de cicatrisation et arrêter la croissance des anévrismes. L'ensemencement de CML réduit l'expression des MMP même dans des zones éloignées du site initial d'implantation cellulaire, suggérant un effet paracrine^{147, 444}.

Les résultats de ces études précliniques utilisant les CML montrent leur rôle important dans la pathologie et la guérison des anévrismes. Cependant, les protocoles d'isolement de CML actuellement utilisés sont invasifs et requièrent des explants d'artères obtenus chirurgicalement, ce qui représente une limite très importante pour le transfert à l'homme en clinique^{149, 432}. Ces limitations pratiques font que les CML n'ont pour l'instant jamais été utilisées dans des essais cliniques.

b. Fibroblastes

Les fibroblastes jouent également un rôle important dans la cicatrisation des anévrismes. Ils pénètrent sur le site lésionnel en réponse à l'inflammation, produisent du collagène, puis se différencient en myofibroblastes, ce qui favorise la cicatrisation^{70, 446}. La thérapie cellulaire par l'apport de fibroblastes pourrait améliorer l'activité myofibroblastique et stimuler la réponse thérapeutique⁷⁰. En 2001, Marx et al.¹⁵⁵ ont rapporté une étude comparant l'efficacité de coils portant des fibroblastes à des coils nus. Ils ont montré que le groupe thérapie cellulaire avait un pourcentage de fibrose allant jusqu'à 100%, alors que le groupe témoin ne présentait aucune fibrose organisée. Une autre étude rapportée en 2005 par Kawakami et al.¹⁵⁶ sur un modèle d'anévrisme veineux chez le lapin a montré que les coils portant des fibroblastes permettaient d'augmenter significativement les résultats de l'embolisation comparativement aux coils nus. En 2007, Dai et al.¹⁵³ ont publié des résultats sur des coils portant des fibroblastes avec des résultats de suivi à 6 mois après l'implantation. A 2 semaines, le groupe thérapie cellulaire présentait une amélioration histologique significative par rapport au groupe témoin mais sans résultat significatif à plus long terme suggérant que l'amélioration à court terme peut ne pas être indicative d'un résultat à long terme. Ainsi, la délivrance de fibroblastes peut augmenter seulement la vitesse mais pas nécessairement l'étendue de la guérison.

c. Cellules Progénitrices Endothéliales (CPE)

Les CPE sont une population hétérogène de cellules trouvées dans le sang circulant⁴⁴⁷. Un nombre plus faible de CPE dans le sang périphérique a été associé à diverses pathologies cardiovasculaires incluant les anévrismes intracrâniens^{448, 449}. Plusieurs études cliniques ont confirmé les effets thérapeutiques de la perfusion de CPE chez les patients atteints d'infarctus du myocarde⁴⁵⁰⁻⁴⁵² ainsi que chez les patients souffrant d'accident vasculaire cérébral⁴⁵³. Actuellement plus de 215 essais cliniques sont en cours utilisant des CPE dans diverses indications selon clinicaltrials.gov.

Les CPE jouent un rôle important dans la ré-endothélialisation des vaisseaux sanguins lésés. Une étude réalisée en 2003 par Shirota et al.⁴⁵⁴ a démontré la capacité des CPE à former une couche endothéliale sur une structure de type vaisseau sanguin *in vitro*. Ceci a été suivi d'une étude *in vivo* par He et al. en 2004⁴⁵⁵, qui ont étudié l'intérêt de la transfusion autologue de CPE après dénudation du revêtement d'une artère carotide de lapin. La transfusion de CPE a permis une augmentation significative de la réendothélialisation. Cependant, seulement quelques cellules dans le nouvel endothélium provenaient des CPE transplantées. Les auteurs en ont conclu que la ré-endothélialisation était déclenchée principalement par les effets paracrines des CPE transplantées⁴⁵⁵. Dans plusieurs études précliniques avec un petit nombre d'animaux, des CPE ont été implantées *in vivo* pour améliorer le traitement des anévrismes cérébraux^{154, 212, 441}. En 2012, Aronson et al.¹⁵⁴ ont montré une amélioration de l'occlusion angiographique et de la cicatrisation histologique dans des anévrismes traités avec de la colle de fibrine contenant des CPE comparativement à des anévrismes traités avec de la colle de fibrine seule, avec une ré-endothélialisation complète du collet des anévrismes traités par CPE, 16 semaines après le traitement¹⁵⁴. Une étude de Li et al.²¹² en 2013 a rapporté une meilleure endothélialisation de *flow-diverters* après l'administration de CPE injectées par voie intraveineuse. Une autre étude par Zhang et al.⁴⁴² en 2014, a montré que lorsqu'on les injectait par voie intra-artérielle, les CPE migraient au site de l'anévrisme et amélioraient la cicatrisation histologique par rapport à une injection de cellules endothéliales de cordon ombilical humain. La voie d'administration intra-artérielle utilisée dans cette étude présente l'avantage de contourner les organes filtrants (c'est-à-dire les poumons, le rein, la rate). Cependant, il s'agit d'une procédure invasive, limitant les administrations répétées, et elle présente également le risque d'occlusion de micro-vaisseaux distaux et d'ischémie⁴⁵⁶.

L'utilisation de CPE pour le traitement des anévrismes intracrâniens n'en est qu'à ses balbutiements. Les quelques études qui ont été rapportées ont montré des résultats

prometteurs, mais leur mécanisme d'action n'est pas encore clair. D'autres études sur les animaux permettront de mieux comprendre le rôle de ces cellules dans la guérison du tissu anévrysmal.

d. Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM)

Les CSM sont une population hétérogène de cellules adultes multipotentes qui peuvent être isolées de la moelle osseuse ou de la graisse⁴⁵⁷⁻⁴⁶¹. Ces deux sources sont accessibles chez l'homme. Les CSM sont particulièrement connues pour le rôle remarquable qu'elles jouent dans la régénération tissulaire⁴⁶². Leur intérêt vient du fait qu'elles sont multipotentes et donc capables de s'auto-renouveler et de se différencier en une grande variété de types cellulaires, notamment en cellules endothéliales^{463, 464} lorsque le microenvironnement y est favorable⁴⁶⁵. De plus, les CSM ont la capacité de migrer vers les tissus lésés et notamment le cerveau, après ischémie^{430, 457, 466, 467}, en raison de l'expression à leur surface de molécules d'adhésion et de récepteurs aux chémokines. Ces caractéristiques des CSM en font une source thérapeutique de choix dans les pathologies qui donnent lieu à une réaction inflammatoire importante. Les CSM favorisent la régénération en inhibant l'inflammation, en sécrétant des facteurs trophiques (effet paracrine) et en recrutant des progéniteurs locaux pour différencier et remplacer les cellules perdues⁴⁶². Les CSM sont intéressantes en vue d'applications cliniques car elles peuvent être prélevées chez un patient, autorisant une greffe autologue et permettant donc de s'affranchir des problèmes d'histocompatibilité classiquement observés dans un contexte de greffe allogénique. Elles sont facilement obtenues par aspiration au niveau de la crête iliaque sous anesthésie locale. Elles sont isolées de la moelle osseuse par adhérence au plastique et peuvent être amplifiées par culture *ex vivo*. Elles ont également l'avantage d'être ni tumorigènes ni immunogènes^{468, 469}, et de ne pas soulever de questions éthiques liées à l'utilisation des cellules souches embryonnaires. Enfin, les CSM sont peu immunogènes car elles expriment des molécules HLA de classe I mais n'expriment pas de molécule HLA de classe II⁴⁶⁵. Pour ces raisons, les CSM sont les cellules de choix dans les essais cliniques pour de nombreuses applications. Plus de 600 essais cliniques impliquant des CSM sont actuellement en cours selon clinicaltrials.gov. Plusieurs études ont montré que les CSM régulent négativement l'expression de protéines pro-inflammatoires dans des modèles animaux d'anévrysmes aortiques¹⁶³. Jusqu'en 2013, aucune étude pré-clinique n'avait étudié le potentiel des CSM pour le traitement des anévrysmes intracrâniens. Depuis notre étude présentée au *chapitre IV.3.a*¹⁵⁸, plusieurs équipes ont utilisé des CSM dans cette application notamment dans l'essai publié en 2016 dans un modèle de souris par Liu et al.⁴⁷⁰ qui ont

montré une diminution statistiquement significative de 54% du taux de rupture d'anévrisme dans le groupe avec administration intraveineuse de CSM. Cependant, même si l'administration intraveineuse de cellules est l'option la moins invasive, la plupart des cellules administrées par voie intraveineuse seront piégées dans les capillaires pulmonaires et autres organes filtrants^{471, 472}. En 2016, Adibi et al.¹⁶⁴ ont également utilisé des CSM pour le traitement des anévrismes dans le modèle à l'élastase chez le lapin. Ils ont utilisé pour cette étude des CSM allogéniques (non autologues) qu'ils ont administrées via un microcathéter dans l'anévrisme juste après la mise en place du premier coil. Cette étude a inclus 9 lapins mais avec seulement 3 dans le groupe ayant reçu la thérapie cellulaire. Malgré le faible nombre d'animaux, ils ont mis en évidence une amélioration significative de la cicatrisation en cas de traitement adjuvant par les CSM. Ils n'ont pas observé de réaction de rejet malgré l'utilisation de cellules allogéniques mais le transfert à l'homme semble plus délicat étant donné le système immunitaire humain plus complexe que chez le lapin.

3. Trois options avec des cellules souches mésenchymateuses autologues

Nous avons choisi dans les trois options présentées d'utiliser des CSM autologues car le caractère pluripotent des CSM leur permet de reconstituer aussi bien le stock de CML que celui des cellules endothéliales. De plus, les CSM possèdent un effet paracrine important notamment pour la régulation de l'expression des métallo-protéases, ce qui constitue un intérêt majeur pour la stabilisation du thrombus intra-anévrismal. Enfin, les CSM sont facilement accessibles à un prélèvement pour le transfert à l'homme. Enfin, malgré leur faible immunogénicité, nous avons choisi d'utiliser des CSM autologues afin de diminuer les risques de rejet de la greffe. Nous avons utilisé deux sources différentes de CSM dans ces études avec soit des CSM autologues prélevées à partir de la moelle osseuse, soit des CSM issues de tissu adipeux chez le lapin. Nous n'avons pas réalisé de test spécifique pour la comparaison de ces deux sources de CSM autologues mais les données de la littérature sont en faveur d'un profil similaire⁴⁷³⁻⁴⁷⁵.

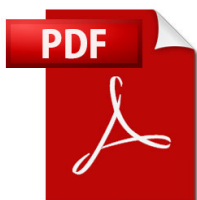
Dans le modèle anévrysmal expérimental à l'élastase chez le lapin, nous avons utilisé trois options différentes par voie artérielle pour optimiser la délivrance des CSM au site de l'anévrysme. En effet, une des limites pour la greffe des cellules au site de l'anévrysme est le fait que le flux a tendance à éliminer les cellules délivrées avant qu'elles n'aient le temps d'adhérer à la paroi de l'anévrysme. Enfin, nous avons utilisé les CSM seules, ou en association avec le traitement par coils afin d'analyser l'intérêt de la thérapie cellulaire comme option adjuvante au traitement mécanique de référence.

a. Cellules souches mésenchymateuses autologues seules, sans support

La recanalisation des anévrysmes intracrâniens traités par coils est une limite importante et est associée à un risque potentiel de rupture^{75, 476-478}. La recanalisation est due à la compaction des coils et est particulièrement observée dans les anévrysmes de grand diamètre ou à collet large^{86, 479}. Plusieurs approches "mécaniques" ont été tentées pour réduire les taux de recanalisation telles que l'utilisation de coils de calibre plus importants ou coatés avec des hydrogels, mais avec un succès limité dans les séries cliniques⁴⁸⁰⁻⁴⁸². Le mécanisme de cicatrisation des anévrysmes traités par coils met en jeu une thrombose du sac anévrysmal qui sert de substrat à la recolonisation par des cellules mésenchymateuses^{72, 162}. Au contraire, comme dans les cas de rupture retardée après *flow-diverter*, la formation de thrombus peut compromettre l'intégrité structurelle et la stabilité de la paroi artérielle en libérant une grande quantité de protéases^{49, 483}. En effet, dans les anévrysmes de l'aorte abdominale⁴⁸⁴⁻⁴⁸⁸ comme

dans les anévrysmes intracrâniens^{323, 489}, le risque de rupture est corrélé avec les changements morphologiques et l'activité biologique du thrombus intraluminal. Il a été montré que l'activité biologique du thrombus participe à l'évolution des anévrysmes de l'aorte abdominale, avec une paroi anévrysmale plus fine en présence d'un thrombus, ainsi que des signes plus fréquents d'inflammation, de mort cellulaire touchant particulièrement les cellules musculaires lisses, et de matrice extracellulaire dégradée, comparativement à la paroi artérielle normale^{484, 490}.

Etant donné la raréfaction cellulaire dans la paroi des anévrysmes, la thérapie cellulaire est une approche séduisante car elle permettrait de recoloniser le segment artériel pathologique. Peu de tentatives de thérapie cellulaire ont été tentées dans les anévrysmes cérébraux mais des résultats positifs ont été rapportés notamment avec l'administration *in situ* de cellules musculaires lisses matures d'origine vasculaire^{73, 147, 150, 491}. Différentes stratégies expérimentales pour promouvoir la cicatrisation des anévrysmes ont été proposées, notamment la thérapie cellulaire avec apport à l'anévrysme de cellules musculaires lisses matures. Cependant, plusieurs types de cellules sont déficitaires dans les anévrysmes cérébraux et l'apport d'un seul type de cellules matures ne permet pas une cicatrisation optimale des anévrysmes. Au contraire, les CSM de la moelle osseuse sont une source séduisante pour la thérapie cellulaire, car ces cellules permettent une thérapie cellulaire autologue (pas de risque de rejet), sont faciles à obtenir par culture primaire, ont la capacité de se différencier en différents types cellulaires et possèdent un puissant potentiel de cicatrisation⁴⁹². Nous avons émis l'hypothèse que l'administration *in situ* de CSM pourrait permettre une réduction de la taille des anévrysmes et favoriser la cicatrisation du thrombus intra-anévrysmal. **Dans cette étude, nous avons développé une procédure d'isolement des CSM de la moelle osseuse du lapin, et testé *in vivo* l'impact de l'administration *in situ* de CSM autologues dans un modèle d'anévrysme induit à l'élastase chez le lapin.**



Article 6 : Rouchaud A, Journé C, Louedec L, Ollivier V, Derkaoui M, Michel JB, Mazighi M. Autologous mesenchymal stem cell endografting in experimental cerebrovascular aneurysms. *Neuroradiology*. 2013 Jun;55(6):741-9.¹⁵⁸

Les parties Méthodes et Résultats sont présentées dans le PDF de l'article.

Cette étude démontre la faisabilité d'une administration endovasculaire *in situ* en localisation intra-anévrismale de CSM autologues extraites de la moelle osseuse dans un modèle d'anévrisme. Cette étude montre aussi un effet biologique direct de la greffe endovasculaire des cellules souches mésenchymateuse, illustré par la colonisation du thrombus intra-anévrismal par les cellules greffées.

Certaines équipes ont utilisé des CML d'origine vasculaire ou des fibroblastes pour la thérapie cellulaire des anévrismes, mais notre étude est la première à utiliser des cellules souches pluripotentes^{150, 156}. Il a été montré que l'utilisation de cellules musculaires lisses (génétiquement modifiées ou non) permettait de diminuer le risque de rupture d'anévrisme^{147, 493}. Cependant, dans ces études, les cellules utilisées étaient des cellules syngéniques provenant de différentes souches pures d'animaux ayant le même patrimoine génétique, sans risque de rejet. L'utilisation de cellules syngéniques n'étant pas possible chez l'homme, cette méthode n'est pas possible en clinique. De plus, les cellules musculaires lisses d'origine vasculaire autologues ne sont pas facilement accessibles chez l'homme. Elles nécessitent de nombreux échantillons chirurgicaux d'artères pour ensuite isoler les CML. De plus, la croissance *in vitro* des cellules musculaires lisses est lente par rapport aux cellules souches de moelle osseuse, limitant leur utilisation clinique.

Nous avons choisi d'utiliser les CSM de moelle osseuse car elles sont facilement accessibles à un prélèvement en grandes quantités, même chez l'homme, en utilisant un procédé peu invasif d'aspiration de moelle osseuse. Dans cette étude, il a été possible de réaliser une administration de cellules autologues avec les spécificités requises pour la thérapie cellulaire régénérative puisque les cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse ont le potentiel d'adhérer et de se différencier en cellules mésenchymateuses avec des facultés de propagation et d'invasion⁴⁹⁴ après adhésion et se différencient en cellules musculaires lisses à phénomène synthétique puisqu'elles expriment l'actine et synthétisent des protéines de la matrice extracellulaire, principalement le collagène⁴⁹⁵. L'expression de l'intégrine bêta1 sur les CSM de moelle osseuse témoigne de leur aptitude à adhérer à la matrice extracellulaire. Les CSM de moelle osseuse ont également le potentiel de se différencier en cellules vasculaires telles que les myofibroblastes et peuvent participer au renforcement des parois artérielles. Enfin, les CSM de moelle osseuse pénètrent dans le thrombus intraluminal comme illustré dans l'article par la présence de cellules souches marquées présentes au sein du thrombus intra-anévrismal. Contrairement aux fibroblastes, les CSM de moelle osseuse expriment peu le *Tissue Factor* et sont donc dépourvues d'activité procoagulante importante, limitant la formation de thrombus et le risque de thrombose de

l'artère porteuse. Cette caractéristique des CSM de moelle osseuse est primordiale pour réduire le risque d'anévrisme en diminuant l'effet pathogène du thrombus intraluminal exercé par l'activation plaquettaire, la formation de fibrine et la liaison du plasminogène et de ses activateurs. En effet, le thrombus intra-anévrysmal peut être responsable du piégeage des globules rouges et des neutrophiles, conduisant à une lésion oxydante et protéolytique de la paroi artérielle comme décrit dans les anévrysmes de l'aorte abdominale^{323, 483}. Par conséquent, l'ensemencement de CSM de moelle osseuse et la colonisation du thrombus luminal peut potentiellement diminuer l'effet pathogène du thrombus intra-anévrysmal et favoriser la guérison des anévrysmes⁴⁸⁹.

Enfin, le greffage de CSM de moelle osseuse dans ce modèle d'anévrisme a permis une réduction de la taille des anévrysmes, montrant son efficacité pour le traitement des anévrysmes. La présence d'une hyperplasie cellulaire intimale suggère un mécanisme de cicatrisation de la paroi artérielle. L'hyperplasie intimale avait déjà été associée à la cicatrisation des anévrysmes dans une étude utilisant des cellules musculaires lisses d'origine vasculaire implantées dans un modèle d'anévrisme veineux chez le chien¹⁵⁰ ou encore avec des fibroblastes dans un modèle d'anévrisme veineux chez des lapins¹⁵⁶. Dans l'anévrisme de l'aorte abdominale, les anévrysmes recevant des cellules musculaires lisses d'origine vasculaire sont plus riches en collagène avec une diminution du thrombus intra-anévrysmal et une ré-endothélialisation de la paroi¹⁴⁷. Des résultats similaires ont été observés dans notre étude après la greffe de CSM autologues.

Dans cette étude, nous n'avons pas évalué la proportion de cellules qui avaient effectivement été greffées dans l'anévrisme ni le risque d'embolisation dans d'autres territoires après la déflation du ballon de protection. L'un des risques possibles de l'administration endovasculaire de cellules pour le traitement des anévrysmes intracrâniens est le risque infarctus cérébral dû à la migration de cellules après la déflation du ballon. Dans ces expérimentations réalisées dans le modèle anévrysmal chez le lapin, les anévrysmes sont situés au niveau de l'artère sous-clavière droite, avec un risque ischémique pour le membre antérieur droit en cas de migration cellulaire. Nous n'avons pas effectué d'analyse systématique du membre antérieur droit chez les lapins traités pour détecter la présence de cellules souches marquées par fluorescence, mais nous n'avons pas observé de lésions ischémiques cliniquement détectables.

Conclusion

Cette étude montre que la thérapie cellulaire avec des cellules souches mésenchymateuses autologues est réalisable et efficace pour le traitement des anévrismes intracrâniens aboutissant à une réduction de la taille des anévrismes et une cicatrisation du thrombus intra-anévrysmal. Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer l'intérêt de l'administration de cellules souches pour le traitement des anévrismes intracrâniens en combinaison ou non avec des coils ou d'autres dispositifs.

Autologous mesenchymal stem cell endografting in experimental cerebrovascular aneurysms

Aymeric Rouchaud · Clément Journé · Liliane Louedec ·
Véronique Ollivier · Mohammed Derkaoui ·
Jean-Baptiste Michel · Mikael Mazighi

Received: 26 October 2012 / Accepted: 4 March 2013 / Published online: 21 March 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract

Introduction Coiling is the gold standard for the treatment of intracranial aneurysms. However, some issues associated with endovascular treatment limit its long-term efficiency. Recanalization with coil compaction is certainly the most important. New approaches may be considered to promote thrombus colonization by mesenchymal cells and aneurysm healing. In the present study, we have percutaneously delivered autologous bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) to an elastase-induced rabbit carotid aneurysm model in vivo.

Methods Autologous mesenchymatous stem cells were obtained after femoral puncture and bone marrow aspiration. After 2 weeks of in vitro cell culture, five million BMSCs were grafted in the carotid aneurysm using an endovascular approach.

Results We demonstrated the feasibility of in vivo percutaneous seeding of autologous BMSCs in the aneurysm by positive Hoechst fluorostaining. Two weeks later, conventional angiography showed an increase in median aneurysmal surface in the sham group, whereas this surface was decreased in

the group treated with BMSCs, +28.4 versus -26.4 %, respectively ($p=0.01$). BMSC seeding resulted in intimal hyperplasia with cell colonization and disappearance of the thrombus. **Conclusion** In conclusion, percutaneous seeding of BMSCs may colonize and heal the arterial wall thus limiting aneurysm expansion.

Keywords Rabbit · Carotid aneurysm · Mesenchymal stem cells · Cell therapy · Elastase-induced aneurysms

Abbreviations

BMSC Bone marrow mesenchymal stem cells
CFA Common femoral artery
PCA Procoagulant activity
RCCA Right common carotid artery
TF Tissue factor

Introduction

Endovascular therapy of intracranial aneurysms is now the gold standard [26] and has supplanted the surgical approach in numerous centers [26]. However, recurrences after coiling of intracranial aneurysms remain the main issue, and are associated with a potential risk of late rebleeding [7, 27, 34, 35]. The recanalization phenomenon attributable to coil compaction is particularly observed in wide-necked or large aneurysms [17, 33]. Several “mechanical” approaches have been attempted to reduce recanalization of aneurysms such as increasing the volume occupied by coils, using for example platinum coils coated with hydrogel, but with limited success in clinical series [9, 21, 28]. The healing mechanism within coiled aneurysms is not fully understood, but the thrombus may play an important role as the substrate of mesenchymal cell

A. Rouchaud · C. Journé · L. Louedec · V. Ollivier ·
M. Derkaoui · J.-B. Michel · M. Mazighi
INSERM Research Unit 698, Inserm-Paris 7 Denis Diderot
University, Paris, France

A. Rouchaud · M. Mazighi
Department of Neurology and Stroke Centre,
Paris 7-Denis Diderot Sorbonne University, 46 rue Henri Huchard,
75018 Paris, France

A. Rouchaud (✉)
INSERM U-698, Department of Neurology and Stroke Centre,
Bichat University Hospital, 46 rue Henri Huchard, 75018
Paris, France
e-mail: aymeric.rouchaud@gmail.com

recolonization and healing. In contrast, thrombus formation may compromise the structural integrity and stability of the arterial wall by releasing large amount of different proteases [25]. Indeed, in human aneurysms of the abdominal aorta (AAA) [22, 24, 37, 40, 42] as in cerebrovascular aneurysms [14, 15], the risk of rupture is correlated with the morphological changes and biological activity of the intraluminal thrombus. Previous studies supported that biological activities of the thrombus participate in AAA evolution as illustrated by a thinner aneurysmal wall in presence of a thrombus, as well as more frequent signs of inflammation, vascular smooth muscle cells (VSMC) death, and degraded extracellular matrix as compared with adjacent blood flow-lined wall [20, 42].

Different strategies to experimentally promote aneurysm healing have been proposed, including adherent cell therapy [2, 36, 41]. The elastase-induced model of carotid artery aneurysm in the rabbit offers the possibility to perform an endovascular approach, and is easy to handle and not too expensive [8]. Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) are an attractive source for adherent cell therapy, since they represent an autologous therapy (no grafted cell rejection), are easy to expand by primary culture and possess powerful tissue healing potential [38]. Cell therapy has been rarely attempted in cerebral aneurysms but positive results were reported using VSMC seeding in a carotid aneurysm model [32]. We hypothesized that mesenchymal cell delivery might induce aneurysm shrinkage and cure through thrombus enhanced cellular healing. In the present study, we developed a procedure of rabbit autologous BMSC isolation and *in vitro* expansion and tested *in vivo* the impact of endovascular seeding of these BMSCs in a carotid elastase-induced aneurysm in rabbits.

Methods

Aneurysm induction

The animal protocols were approved by the Bichat University Institutional Animal Care and Use Committee. Elastase-induced saccular aneurysms were induced in 13 New Zealand White rabbits (males; body weight, 3–4 kg). Procedures for producing aneurysms have been previously described, initially in rat abdominal aorta [5] and extended to rabbits to produce carotid saccular aneurysms [3]. In brief, rabbits were anesthetized with an intramuscular injection of acepromazine and intravenous pentobarbital. The right common carotid artery (RCCA) was exposed and ligated distally. A 1–2 mm arteriotomy was performed and a 5F vascular sheath was advanced retrogradely in the RCCA to a point approximately 3 cm cranial to the origin of the RCCA. A 3F Fogarty balloon inflated with iodinated

contrast medium was advanced through the sheath to the level of the origin of the RCCA under fluoroscopic guidance. Porcine elastase (45 U.I., E1250-50 MG, lot 115K7682, Sigma, France) was incubated within the lumen of the RCCA above the inflated balloon for 20 min, after which the catheter, balloon, and sheath were removed. The RCCA was then ligated below the arteriotomy.

BMSC isolation and proliferation

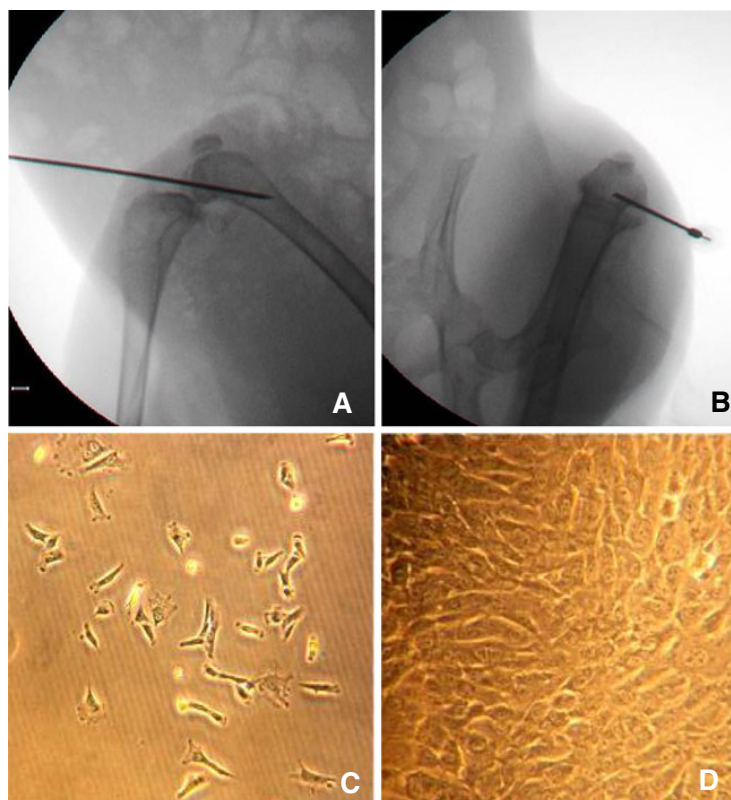
Rabbit autologous BMSCs were obtained by femoral marrow puncture. One week before aneurysm induction, 2 mL of bone marrow were aspirated via a lumbar puncture needle from the femur diaphysis through a transknee joint approach of the individual rabbits, using fluoroscopic guidance under general anesthesia (Fig. 1a and b). The bone marrow aspirate was passed through a 100 μ m filter and centrifuged for 5 min at 1,500 rpm. The cell pellet was then resuspended in 5 ml of Dulbecco's Modified Eagle Medium (BioMedia) supplemented with 20 % fetal bovine serum and 1 % penicillin–streptomycin, seeded in a T25 plastic dish and incubated at 37 °C, with 90 % humidity and 5 % CO₂. Only adherent cells were conserved (Fig. 1c). The medium was changed every 3 days. Dense BMSC clones were trypsinized and the cells were plated in 75 cm² flasks until 60–70 % confluence (Fig. 1d). Cells from the second or third passage were used, with about five million BMSCs obtained in 2–3 weeks. BMSC proliferation after aneurysm grafting was assessed using Hoechst 33342 (Sigma B2261).

BMSC characterization

Immunostaining

Rabbit BMSCs in primary culture, were fixed in 3.7 % paraformaldehyde. For detection of cell surface proteins, immunostaining was performed on intact cells with anti-CD45 (10 μ g/ml, ABD Serotec), anti-CD29 (10 μ g/ml, ABD Serotec), and anti-CD90 (10 μ g/ml, ABD Serotec). Immunohistofluorescence was performed on methanol-permeabilized cells for intracellular staining of cytoskeletal proteins with primary antibodies: antialpha smooth muscle actin (10 μ g/ml, Dako), anticalponin (dilution 1:100, Abcam), antismooth muscle myosin heavy chain (10 μ g/ml, Millipore), and anti-SM22 α (transgelin, 10 μ g/ml, Abcam). A goat antimouse AlexaFluor-488 (10 μ g/ml, Invitrogen) was used as secondary antibody for detection. Control irrelevant antibodies (Dako) were applied at the same concentration in order to assess nonspecific staining. Cells were counterstained by Hoechst to visualize cell nuclei.

Fig. 1 BMSC sampling and proliferation. Bone marrow aspiration using a lumbar puncture needle under fluoroscopic guidance (lateral view (a) and frontal view (b)). Seeding and primary culture of BMSCs at passages P0 (c) and P3 (d) after 2 weeks of culture



Procoagulant activity assay

Procoagulant activity (PCA) was quantified with a one-step plasma recalcification time assay [29]. Briefly, for total activity, BMSCs or primary cultures of rabbit dermal fibroblasts [23] were lysed with 15 mM octyl-*b*-D-glycopyranoside at 37 °C for 15 min and diluted threefold before PCA assay. Clotting times were analyzed in comparison with serial dilutions of a recombinant lipidated human tissue factor (TF) protein (Diagnostica Stago). PCA was expressed as picogram per microgram of protein. The observed PCA was confirmed as being due to TF by using human Phe-Phe-Arg chloromethylketone-inactivated factor VIIa (American Diagnostica).

In vivo BMSC endovascular seeding in experimental aneurysms

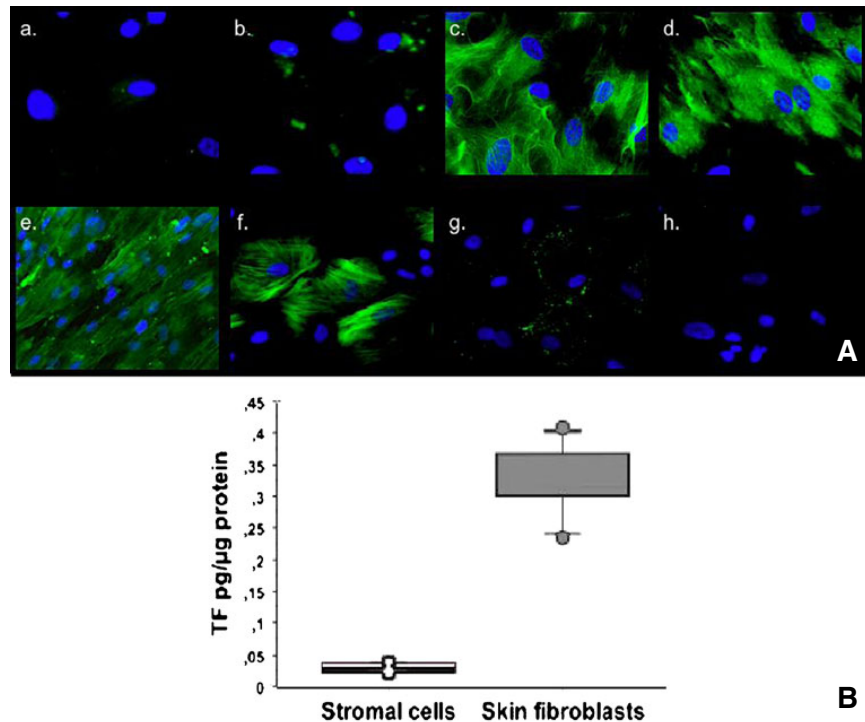
Two weeks after carotid intraluminal elastase incubation, aneurysmal occurrence was established under fluoroscopy with an intra-arterial injection of iodinated contrast medium in the left auricularis rostralis artery. The rabbits were randomly assigned to one of two groups: (1) six rabbits in the sham

group (aneurysm with culture medium injection instead of BMSCs), (2) and seven with autologous BMSCs seeding in the aneurysmal sac. For each group, rabbits were anesthetized as for the aneurysm induction. Both of the two common femoral arteries (CFA) were exposed and ligated distally. On each side, a 1- to 2-mm arteriotomy was made and a 5F vascular sheath was introduced retrogradely. Culture medium alone or BMSCs ($5 \cdot 10^6$ BMSCs in 3 mL culture medium) were infused into the aneurysm by the Excelsior SL-10 micro-catheter while the balloon was inflated during 20 min.

Tissue harvest

Aneurysm samples were harvested at 2 weeks after cell endografting. Under general anesthesia, an intra-arterial injection of iodinated contrast medium via the left auricularis rostralis artery, and digital subtraction angiography (DSA) was performed. The angiographic occlusion scores were calculated on the basis of the percentage of iodinated contrast medium inside the aneurysm cavity, as previously described [30]. All sacrifice angiograms were compared with pregraft angiograms and assessed for changes in aneurysm filling. Aneurysms were assigned to one of the three result groups: stable, progressive

Fig. 2 BMSC characterization. **a** BMSC immunostaining. Cells are stained for different functional markers ($\times 40$ magnification). *a* Controls, *b* common leukocyte antigen (CD45), *c* integrin $\beta 1$ (CD29), *d* Thy-1 (CD90) mesenchymal marker, *e* α -actin (cytoskeleton of adherent cells), *f* calponin (associated with α -actin), *g* VSMC high molecular chain myosin, *h* transgelin (SM22- α). **b** PCA assay of BMSCs compared to skin fibroblasts. Clotting times were analyzed in comparison with serial dilutions of a recombinant lipid human TF protein (Diagnostica Stago) and PCA is expressed as picogram per microgram of protein



hematoxylin-eosin staining (Fig. 6b). Mesenchymal cell synthesized extracellular matrix, including both collagen (Fig. 6c) and small amounts of elastin (Fig. 6d). The majority of these cells were α -actin-positive (Fig. 6e).

Discussion

In the present study, we demonstrated the feasibility of in vivo percutaneous seeding of autologous BMSCs in a model of elastase-induced carotid saccular aneurysm. We documented a biological effect illustrated by endoluminal thrombus cell colonization after BMSC endovascular grafting.

The model used in this study (i.e., elastase-induced carotid aneurysm) has been widely applied as a preclinical model for evaluation of endovascular devices. This aneurysm model is similar to human aneurysms histologically, morphologically, and hemodynamically [10, 39] and is a simple and accessible model to use in the laboratory.

Vascular smooth muscle cells and fibroblasts have already been used in cell therapy for aneurysms, but to the best of our knowledge seeding of BMSCs has not been reported [19, 32]. Both normal and genetically-modified VSMCs have been shown to prevent aneurysm rupture [2, 16]. However, in these studies, syngenic cell seeding was used, allowing for use of large numbers of VSMCs pooled from different animals, a technique which is likely to mount

an immune response against transplanted cells [31] in non-syngenic animals or in humans. Autologous VSMCs are not easy to harvest in humans and require numerous surgical samples of arteries or veins, to subsequently extract cells. Moreover, in vitro growth of mature VSMC is low as compared to BMSCs, limiting their clinical use.

We chose to use BMSCs since they are easily harvested in large quantities, even in humans, using the minimally invasive procedure of bone marrow aspiration. It was possible to conduct autologous cell seeding with specificities required for regenerative cell therapy. BMSCs have the potential to adhere and to differentiate into mesenchymal cells with the faculty for tensegrity [18] after adhesion, since they express actin, and to synthesize extracellular matrix proteins, mainly collagens [13]. Expression of integrin $\beta 1$ on BMSCs provides evidence of their ability to adhere to the extracellular matrix. BMSCs have also the potential to differentiate into vascular cells such as myofibroblasts and may participate in arterial wall consolidation. Finally, BMSCs do not penetrate into the intraluminal thrombus as illustrated by positive Hoechst fluorostaining. As opposed to fibroblasts, BMSCs poorly express TF and are devoid of important procoagulant activity, limiting thrombus formation and embolic risk. This feature of BMSCs may be critical to reduce aneurysm risk through limited pathogenic effect of the intraluminal thrombus exerted via platelet activation, fibrin formation, and binding of plasminogen and its activators. The

Fig. 3 Reduction of aneurysm size after BMSC endovascular grafting. Digital angiograms of the carotid elastase-induced aneurysm before (a) and 2 weeks after (b) endovascular autologous BMSC grafting. c *Box-plot* showing luminal area reduction 2 weeks after BMSCs grafting as compared to aneurysms incubated with DMEM alone, $p < 0.05$. Results represent the means of six controls and seven BMSC-treated aneurysms

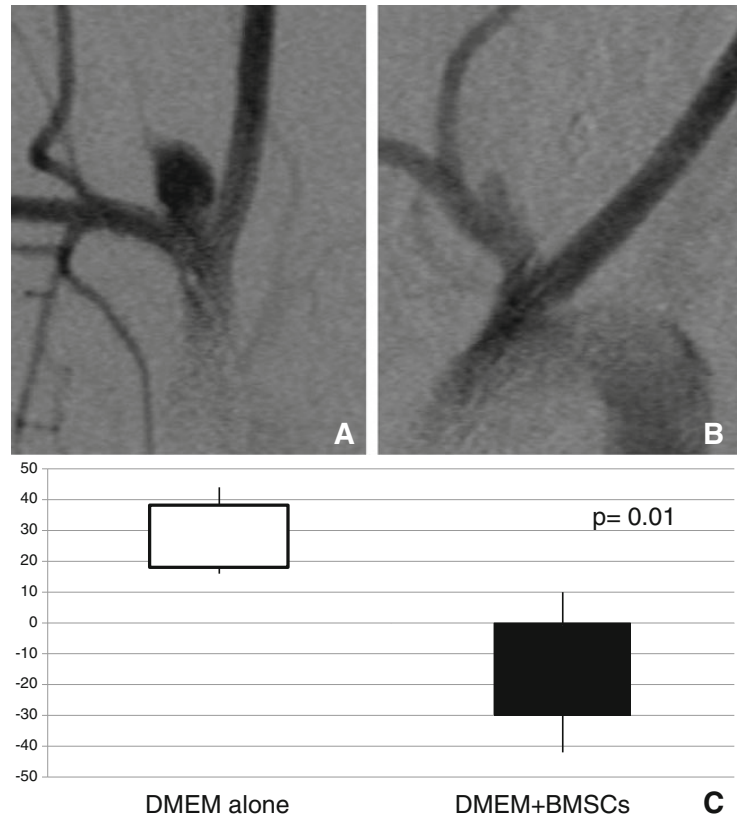


Fig. 4 Representative aspects of untreated elastase-induced aneurysms. a Global aspect with intraluminal thrombus (indicated by asterisk: Picro-Orcein staining, Hamamatsu nanozoomer), b Fragmentation of elastic laminae indicated by arrows ($\times 20$), c absence of α -actin staining of the thrombus (RBC red blood cells)

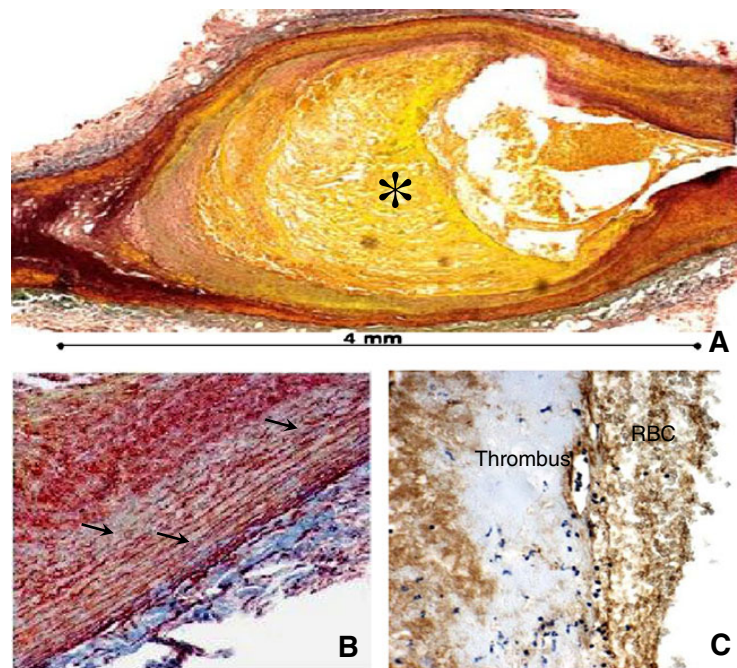


Fig. 5 Representative aspect of stabilized aneurysms after BMSC grafting. **a** Global cross-sectional view (Picro-Orcein staining, Hamamatsu nanozoomer). **b** Intimal proliferation of α -actin-positive mesenchymal cells. **c** Producing elastin matrix (orcein), **d** collagen (Sirius red), and **e** Hoechst positive

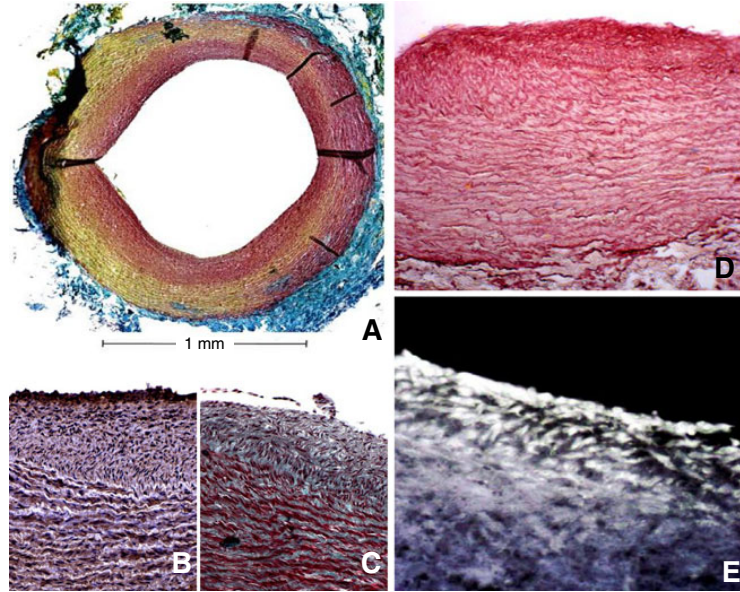
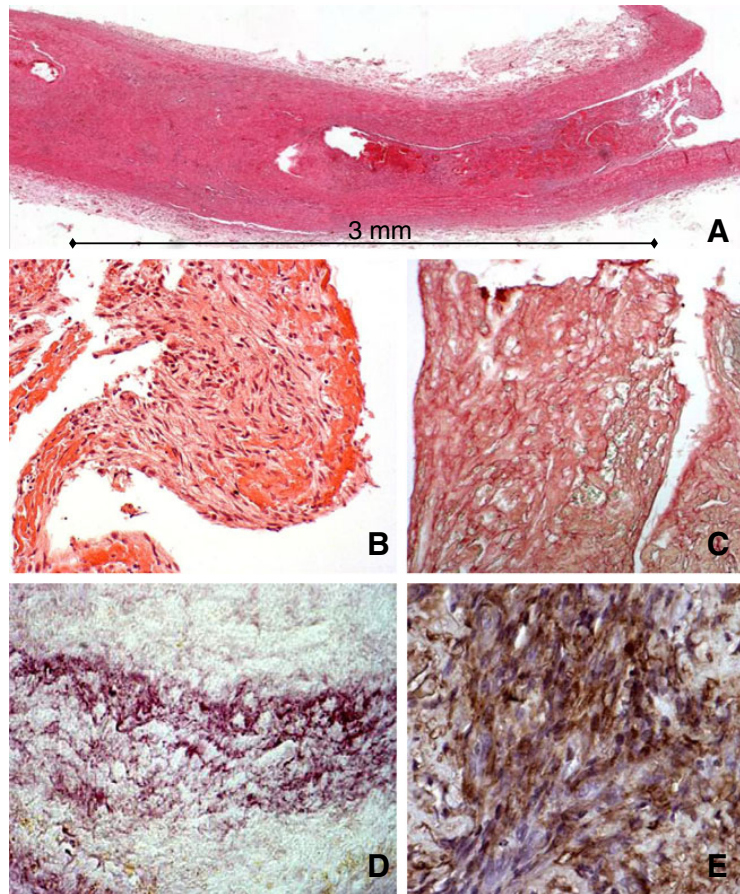


Fig. 6 Representative aspect of an intraluminal occlusive thrombus colonized by BMSCs. **a** Global aspect (H&E), **b** proliferation of mesenchymal cells in the thrombus (H&E), **c** presence of newly synthesized collagen (Sirius red) (**c**), and elastin (orcein) (**d**), and **e** α -actin-positive cells



latter may be responsible for the trapping of erythrocytes and neutrophils, leading to oxidative and proteolytic injury of the arterial wall as described in AAA [14, 25]. Therefore BMSC seeding and colonization of the luminal thrombus may potentially decrease its pathogenic effect and promote aneurysm healing [15].

Finally, BMSC grafting in elastase-induced carotid aneurysms was associated with aneurysmal size reduction, in favor of efficacy for the treatment of aneurysms. The presence of intimal cell hyperplasia suggests a mechanism of arterial wall healing. Intimal hyperplasia was reported to be associated with aneurysm repair in the setting of VSMC seeding in a venous canine aneurysm model [32] or with fibroblasts in a venous pouch aneurysm model in rabbits [19]. In aortic aneurysm, VSMC-seeded aneurysms are richer in collagen and lined with an endothelium without thrombus [2]. Similar findings were observed in this study after autologous mesenchymal stem cell grafting, but without any further thrombus formation, inflammation, and loose connective tissue formation, as commonly observed in rabbit elastase-induced aneurysm models after platinum coil [11].

Limitations of the study The elastase-induced aneurysm model used in this study is only a model for aneurysm growth but not for rupture and we cannot assure that BMSC endovascular grafting prevents rupture, even if aneurysm shrinkage and thrombus colonization represent favorable prognostic factors [26, 14]. As in rats, the elastase model of aneurysm conserves its ability to spontaneously evolve toward healing by mesenchymal cell recolonization, therefore explaining the absence of secondary rupture. It is why we developed a model of weak bacterial pathogen contamination of the thrombus, in which the healing process did not take place [12]. Concerns also include the risk of harming cells by trafficking through the catheter lumen, but previous studies have shown that efficient transmicrocatheter delivery of cells can be achieved [1, 23]. Furthermore, in this study, we did not evaluate the proportion of cells that had effectively been grafted into the aneurysm or the risk of embolization in other territories after balloon deflation. One of the possible risks of endovascular delivery of cells for the treatment of intracranial is the risk of ischemic stroke due to cells trafficking after balloon deflation. In our experiments in aneurysms located on the right subclavian arteries in rabbits, the ischemic risk could have been in the vessels of the right anterior arms. One of the limits of our study is that we did not perform a systemic analyze of the right anterior arm of the treated rabbits to detect fluorescent BMSCs but we did not observed clinically detectable patent ischemic lesions. On the contrary, we observed biological and morphological effects with cell colonization of the thrombus and decreased aneurysm size. BMSCs are poorly

procoagulant, a property, which could be an advantage in case of cell mobilization.

In conclusion, findings of this study support that autologous mesenchymal stem cells are good candidates for cell therapy in cerebral aneurysms. Further studies are required to fully appreciate the utility of BMSC seeding in aneurysms in combination or not with coiling or other devices.

Acknowledgments This study was supported by the European project: Fighting Aneurysmal Diseases (FAD) (Health-F2-2008-200647; <http://www.fighting-aneurysm.org/>).

Conflict of interest We declare that we have no conflict of interest.

References

1. Abruzzo T, Tun T, Sambanis A (2007) Efficient transmicrocatheter delivery of functional fibroblasts with a bioengineered collagen gel-platinum microcoil complex: toward the development of endovascular cell therapy for cerebral aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol* 28:1586–1593
2. Allaire E, Muscatelli-Groux B, Guinault AM et al (2004) Vascular smooth muscle cell endovascular therapy stabilizes already developed aneurysms in a model of aortic injury elicited by inflammation and proteolysis. *Ann Surg* 239:417–427
3. Altes TA, Cloft HJ, Short JG et al (2000) 1999 ARRS Executive Council Award. Creation of saccular aneurysms in the rabbit: a model suitable for testing endovascular devices. *American Roentgen Ray Society. AJR Am J Roentgenol* 174:349–354
4. Anidjar S, Dobrin PB, Chejfec G et al (1994) Experimental study of determinants of aneurysmal expansion of the abdominal aorta. *Ann Vasc Surg* 8:127–136
5. Anidjar S, Salzman JL, Gentric D et al (1990) Elastase-induced experimental aneurysms in rats. *Circulation* 82:973–981
6. Augello A, De Bari C (2010) The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells. *Hum Gene Ther* 21:1226–1238
7. Ausman JI (1997) The future of neurovascular surgery. Part I: Intracranial aneurysms. *Surg Neurol* 48:98–100
8. Bouzeghrane F, Naggara O, Kallmes DF et al (2010) In vivo experimental intracranial aneurysm models: a systematic review. *AJNR Am J Neuroradiol* 31:418–423
9. Cloft HJ (2007) HydroCoil for Endovascular Aneurysm Occlusion (HEAL) study: 3–6 month angiographic follow-up results. *AJNR Am J Neuroradiol* 28:152–154
10. Dai D, Ding YH, Danielson MA et al (2005) Histopathologic and immunohistochemical comparison of human, rabbit, and swine aneurysms embolized with platinum coils. *AJNR Am J Neuroradiol* 26:2560–2568
11. Dai D, Ding YH, Lewis DA et al (2006) A proposed ordinal scale for grading histology in elastase-induced, saccular aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol* 27:132–138
12. Delbosc S, Alsac JM, Journe C et al (2011) *Porphyromonas gingivalis* participates in pathogenesis of human abdominal aortic aneurysm by neutrophil activation. Proof of concept in rats. *PLoS One* 6:e18679
13. Dunsmore SE, Shapiro SD (2004) The bone marrow leaves its scar: new concepts in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 113:180–182
14. Frosen J, Piippo A, Paetau A et al (2004) Remodeling of saccular cerebral artery aneurysm wall is associated with rupture:

- histological analysis of 24 unruptured and 42 ruptured cases. *Stroke* 35:2287–2293
15. Frosen J, Tulamo R, Paetau A et al (2012) Saccular intracranial aneurysm: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol* 123(6):773–786
 16. Gomes D, Louedec L, Plissonnier D et al (2001) Endoluminal smooth muscle cell seeding limits intimal hyperplasia. *J Vasc Surg* 34:707–715
 17. Hayakawa M, Murayama Y, Duckwiler GR et al (2000) Natural history of the neck remnant of a cerebral aneurysm treated with the Guglielmi detachable coil system. *J Neurosurg* 93:561–568
 18. Ingber DE (2008) Tensegrity-based mechanosensing from macro to micro. *Prog Biophys Mol Biol* 97:163–179
 19. Kawakami O, Miyamoto S, Hatano T et al (2005) Accelerated embolization healing of aneurysms by polyethylene terephthalate coils seeded with autologous fibroblasts. *Neurosurgery* 56:1075–1081, discussion 1075–1081
 20. Kazi M, Thyberg J, Religa P et al (2003) Influence of intraluminal thrombus on structural and cellular composition of abdominal aortic aneurysm wall. *J Vasc Surg* 38:1283–1292
 21. Kimchi TJ, Willinsky RA, Spears J et al (2007) Endovascular treatment of intracranial aneurysms with matrix coils: immediate posttreatment results, clinical outcome and follow-up. *Neuroradiology* 49:223–229
 22. King PS, Cooperberg PL, Madigan SM (1986) The anechoic crescent in abdominal aortic aneurysms: not a sign of dissection. *AJR Am J Roentgenol* 146:345–348
 23. Mazighi M, Tchetché D, Goueffic Y et al (2006) Percutaneous transplantation of genetically-modified autologous fibroblasts in the rabbit femoral artery: a novel approach for cardiovascular gene therapy. *J Vasc Surg* 44:1067–1075
 24. Mehard WB, Heiken JP, Sicard GA (1994) High-attenuating crescent in abdominal aortic aneurysm wall at CT: a sign of acute or impending rupture. *Radiology* 192:359–362
 25. Michel JB, Martin-Ventura JL, Egado J et al (2011) Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans. *Cardiovasc Res* 90:18–27
 26. Molyneux A, Kerr R, Stratton I et al (2002) International Subarachnoid Aneurysm Trial (ISAT) of neurosurgical clipping versus endovascular coiling in 2143 patients with ruptured intracranial aneurysms: a randomised trial. *Lancet* 360:1267–1274
 27. Murayama Y, Vinuela F, Suzuki Y et al (1997) Ion implantation and protein coating of detachable coils for endovascular treatment of cerebral aneurysms: concepts and preliminary results in swine models. *Neurosurgery* 40:1233–1243, discussion 1243–1234
 28. Niimi Y, Song J, Madrid M et al (2006) Endosaccular treatment of intracranial aneurysms using matrix coils: early experience and midterm follow-up. *Stroke* 37:1028–1032
 29. Ollivier V, Faure S, Tarantino N et al (2003) Fractalkine/CX3CL1 production by human aortic smooth muscle cells impairs monocyte procoagulant and inflammatory responses. *Cytokine* 21:303–311
 30. Onizuka M, Miskolczi L, Gounis MJ et al (2006) Elastase-induced aneurysms in rabbits: effect of postconstruction geometry on final size. *AJNR Am J Neuroradiol* 27:1129–1131
 31. Plissonnier D, Henaff M, Poncet P et al (2000) Involvement of antibody-dependent apoptosis in graft rejection. *Transplantation* 69:2601–2608
 32. Raymond J, Desfaits AC, Roy D (1999) Fibrinogen and vascular smooth muscle cell grafts promote healing of experimental aneurysms treated by embolization. *Stroke* 30:1657–1664
 33. Raymond J, Guilbert F, Weill A et al (2003) Long-term angiographic recurrences after selective endovascular treatment of aneurysms with detachable coils. *Stroke* 34:1398–1403
 34. Raymond J, Roy D (1997) Safety and efficacy of endovascular treatment of acutely ruptured aneurysms. *Neurosurgery* 41:1235–1245, discussion 1245–1236
 35. Raymond J, Roy D, Bojanowski M et al (1997) Endovascular treatment of acutely ruptured and unruptured aneurysms of the basilar bifurcation. *J Neurosurg* 86:211–219
 36. Raymond J, Venne D, Allas S et al (1999) Healing mechanisms in experimental aneurysms. I. Vascular smooth muscle cells and neointima formation. *J Neuroradiol* 26:7–20
 37. Satta J, Laara E, Juvonen T (1996) Intraluminal thrombus predicts rupture of an abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 23:737–739
 38. Sherman LS, Munoz J, Patel SA et al (2011) Moving from the laboratory bench to patients' bedside: considerations for effective therapy with stem cells. *Clin Transl Sci* 4:380–386
 39. Short JG, Fujiwara NH, Marx WF et al (2001) Elastase-induced saccular aneurysms in rabbits: comparison of geometric features with those of human aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol* 22:1833–1837
 40. Siegel CL, Cohan RH, Korobkin M et al (1994) Abdominal aortic aneurysm morphology: CT features in patients with ruptured and nonruptured aneurysms. *AJR Am J Roentgenol* 163:1123–1129
 41. Venne D, Raymond J, Allas S et al (1999) Healing of experimental aneurysms. II: Platelet extracts can increase the thickness of the neointima at the neck of treated aneurysms. *J Neuroradiol* 26:92–100
 42. Wolf YG, Thomas WS, Brennan FJ et al (1994) Computed tomography scanning findings associated with rapid expansion of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 20:529–535, discussion 535–528

b. Cellules souches mésenchymateuses autologues dans des microbilles

Ces travaux ont été réalisés au cours de mon Master 2 (Année universitaire 2010-2011, Institut Galilée - Université Paris 13 - Chimie, Ingénierie de la santé, Biomatériaux) dans l'Unité INSERM U1148 (Hôpital Bichat) sous la direction des Professeurs Mikael MAZIGHI et Didier LETOURNEUR.

Nous avons vu l'intérêt de l'administration de CSM dans le sac anévrysmal pour favoriser sa cicatrisation. Cependant, malgré l'administration des cellules sous protection de l'inflation d'un ballonnet au collet de l'anévrysme pendant 20 minutes, une des limites principales de l'approche est le faible taux de cellules greffées à la paroi anévrysmale étant donné qu'elles sont éliminées par le flux sanguin intra-anévrysmal^{158, 496}. Le but de ce travail était de développer des vecteurs biocompatibles capables de transporter des cellules, administrables par voie endovasculaire, et avec une affinité importante pour le thrombus intra-anévrysmal afin de favoriser leur ancrage au niveau du site pathologique. **Afin d'optimiser la thérapie cellulaire par voie endovasculaire nous avons utilisé une approche d'ingénierie tissulaire avec des microbilles comme vecteurs de la thérapie cellulaire.**

Afin d'optimiser la greffe cellulaire dans le sac anévrysmal, nous avons envisagé d'utiliser l'ingénierie tissulaire en incorporant les cellules dans des vecteurs, capables de transporter les cellules en grande quantité et également d'adhérer aux parois de l'anévrysme. Nous avons pour cela développé des vecteurs de cellules. Nous avons utilisé les compétences du laboratoire pour la confection de matrices poreuses en polysaccharides développées sous forme de plaques^{497, 498}, et avons décliné ces protocoles pour la confection de microbilles poreuses. Nous avons également renforcé l'adhérence de ces vecteurs dans l'anévrysme par l'expression à leur surface de fucoïdane, un polysaccharide présentant une forte affinité pour la P-sélectine plaquettaire^{499, 500}. Ainsi, nous avons développé un outil d'ingénierie tissulaire, administrable par voie intra-artérielle, sous forme de microbilles poreuses capables de vectoriser des cellules et de s'ancrer dans un anévrysme par son interaction avec le thrombus intra-anévrysmal.

Le protocole de fabrication de matrices poreuses biodégradables précédemment développé et breveté au sein du laboratoire⁴⁹⁸ a été modifié afin d'obtenir des microbilles adaptées à l'indication du traitement endovasculaire des anévrysmes par ingénierie tissulaire. Brièvement, ces microbilles étaient constituées de polysaccharides, polymères glucidiques

d'origine végétale. De nombreux polysaccharides sont utilisés dans le domaine médical et alimentaire. Nous avons utilisé un mélange de Dextrane (Sigma, 500 000 g/mol) et Pullulane (Hayashibara, M=200 000 g/mol). Afin de potentialiser l'adhésion de ces vecteurs dans l'anévrisme nous avons ajouté au mélange Pullulane-Dextrane, un troisième polysaccharide, le Fucoïdane (Sigma, Fucoïdan from *Fucus vesiculosus*, M= 57 000 g/mol), qui présente une forte affinité pour la P-sélectine plaquettaire^{499, 500}, et permet donc aux billes de se lier fortement au thrombus intra-anévrysmal. Le fucoïdane est un polysaccharide provenant principalement des algues brunes^{501, 502}, avec lequel notre groupe a une longue expérience^{500, 503, 504} (plus de 15 publications internationales, et plusieurs brevets). Afin de réticuler ces différents polysaccharides entre eux, nous avons utilisé le trisodium trimétaphosphate (STMP) pour créer des ponts entre les unités hydroxyles des chaînes polysaccharidiques. Les microbilles ont été marquées au FITC (vert) afin de pouvoir les visualiser au microscope à fluorescence. Enfin, dans le but d'obtenir des biomatériaux poreux, nous avons ajouté du NaCl comme agent porogène lors de la préparation de l'hydrogel. Le protocole de préparation des microbilles a fait l'objet d'une demande d'extension de protection par dépôt de brevets à l'international. Une fois lavées et calibrées, les microbilles obtenues ont été lyophilisées (Lyophilisateur PILPA V3.0, Cryotec®). Au cours de ces travaux, nous avons développé différents types de billes pour la vectorisation de CSM en fonction de leur taille, de leur porosité, du pourcentage de fucoïdane présent dans les billes et de l'ajout ou non de protéines utilisées dans leur fabrication. Les billes que nous avons sélectionnées pour l'ensemencement des cellules avaient un diamètre compris entre 300 à 500 µm.

Dans cette étude nous avons utilisé des CSM autologues chez le lapin comme précédemment décrit¹⁵⁸. Après marquage à la PKH-26 (rouge), les CSM de lapin ont été insérées dans les microbilles poreuses lyophilisées par absorption. Deux à trois millions de cellules (soit 3 flacons de culture de 75 cm²) ont été incorporées dans 4 mg de microbilles (**Figure 17**).

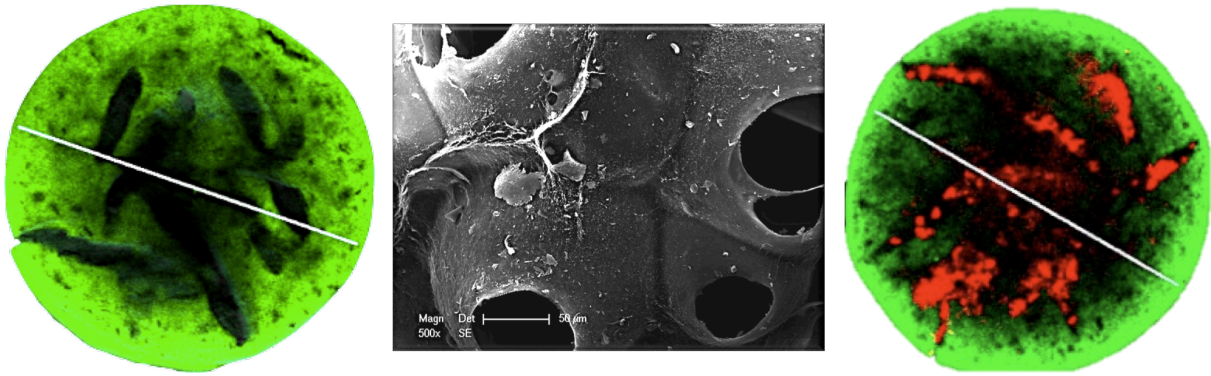


Figure 17 : Images au microscope confocal de microbilles de 500 µm de pullulane-dextrane avant et après ensemencement de CSM. Les billes sont visualisées en vert par le dextrane-FITC, les cellules sont visualisées en rouge grâce à leur marquage par la PKH-26.

Les microbilles poreuses de polysaccharides chargées en CSM autologues marquées à la PKH-26 ont ensuite été délivrées par un microcathéter dans l'anévrisme sous protection d'un ballon gonflé pendant 5 minutes dans l'artère sous-clavière en regard du collet de l'anévrisme comme pour la technique du remodeling.

Vingt-quatre heures après l'ensemencement des microbilles marquées au FITC (vert) et contenant les CSM autologues marquées à la PKH-26 (rouge), le segment anévrysmal a été prélevé et congelé. Les coupes histologiques transversales d'artère congelée (9 µm d'épaisseur) ont été observées au microscope à fluorescence (Nikon) afin d'observer et de compter les billes visibles en vert ainsi que les cellules contenues à l'intérieur de ces dernières et visibles en rouge.

L'objectif était d'obtenir des microbilles poreuses de la plus petite taille possible à cause du risque ischémique en cas d'embolie distale et également à cause de leur administration par des cathéters de diamètre interne de 800 µm. En effet, l'administration endovasculaire de microbilles est soumise au risque que les billes ne restent pas en totalité accrochées au site où elles ont été administrées et soient responsables d'une ischémie cérébrale distale par occlusion d'artères de petit calibre. Il fallait cependant que ces billes soient de taille suffisamment importante pour être capables d'être chargées en cellules donc de taille supérieure à 300 µm. C'est pourquoi nous avons décidé de sélectionner les billes ayant un diamètre compris entre 300 et 500 µm.

Les résultats observés sur 6 lapins avaient mis en évidence la possibilité de réaliser des microbilles poreuses capables de vectoriser des cellules dans la lésion anévrysmale et administrables par voie endovasculaire à l'aide de matériel utilisé en pratique clinique. Cependant, malgré une sélection sur leur taille jusqu'à 500 µm, le risque ischémique en cas de

migration des billes dans la circulation d'aval est une limite qui doit être évaluée. Une option envisageable pour maîtriser le risque de migration des microbilles dans le sac anévrysmal serait le déploiement d'un stent à mailles serrées en regard du collet de l'anévrysme.

Les travaux réalisés n'ont pas évalué l'effet thérapeutique, mais il s'agit de travaux préliminaires dont l'efficacité thérapeutique doit être confirmée par des analyses histologiques à des temps précoces pour évaluer la greffe cellulaire et par des analyses à des temps tardifs, en histologie pour évaluer la re-cellularisation de la média et la réparation de la lame limitante élastique ainsi qu'une évaluation morphologique par imagerie pour mesurer la régression de l'anévrysme.

Conclusion

Nous avons développé et validé *in vivo* des vecteurs d'ingénierie tissulaire sous forme de microbilles capables de transporter des cellules et administrables par voie endovasculaire avec une affinité spécifique pour le thrombus intra-anévrysmal. Malgré une optimisation nécessaire pour contrôler le risque de migration de ces vecteurs, ces travaux mettent en évidence, dans des modèles d'anévrysmes intracrâniens chez le lapin, la possibilité de réaliser un traitement par ingénierie tissulaire dont l'efficacité thérapeutique doit désormais être évaluée.

c. Cellules souches mésenchymateuses autologues sur des coils

Le traitement endovasculaire des anévrysmes intracrâniens présente des limites avec jusqu'à 30% de recanalisation à un an après traitement par coiling^{505, 506}, conduisant non seulement à des re-traitements fréquents avec les risques opératoires associés, mais aussi au risque de rupture si la récurrence n'est pas traitée⁴⁷⁶⁻⁴⁷⁸. Ainsi, il existe une nécessité d'optimiser le traitement par coils afin de permettre une occlusion complète et durable des anévrysmes traités par coils. Le phénomène de recanalisation par compaction des coils est particulièrement observé dans les anévrysmes de grande taille ou à collet large^{1, 70, 86, 479, 507-509}. Le fort taux de récurrence des anévrysmes traités par coils est probablement dû à la nature inerte des coils de platine^{431, 510}, qui ne parviennent pas à provoquer l'attraction et la prolifération des cellules circulantes ou locales qui pourraient reconstruire le segment artériel pathologique. La récurrence de l'anévrysme après traitement endovasculaire est en effet due à la compaction des coils mais également à un défaut de prolifération des cellules au collet de l'anévrysme et à un déficit des protéines de la matrice extracellulaire dans la cavité de l'anévrysme^{1, 43, 70, 511, 512}. Ainsi, la cavité de l'anévrysme est incapable de résister à la contrainte mécanique continue due aux pulsations artérielles, conduisant à une récurrence de l'anévrysme et à une possible rupture de l'anévrysme.

De nombreuses stratégies ont été proposées pour améliorer les taux d'occlusion des anévrysmes, notamment la modification des coils avec addition de polymères, de facteurs de croissance, ou de cellules^{162, 431, 513-521}. À ce jour, les essais cliniques ont été décevants en ce qui concerne l'efficacité des coils modifiés^{480-482, 505, 522-530}. D'autres études ont utilisé la thérapie cellulaire avec des cellules matures et différenciées pour favoriser la guérison des anévrysmes^{73, 147-157}. Cependant, la thérapie cellulaire avec des cellules matures déjà différenciées ne permet pas que les cellules se différencient dans les autres types cellulaires normalement présents dans la paroi des vaisseaux sanguins. Idéalement, les cellules qui recouvrent les coils implantés devraient posséder la capacité de se différencier en cellules endothéliales capables de former une couche confluyente de cellules endothéliales au collet de l'anévrysme et les cellules qui se trouvent à l'intérieur du sac anévrysmal devraient posséder la capacité de se différencier en cellules mésenchymateuses permettant la synthèse de collagène^{70, 158, 159}. Du point de vue biologique, les cellules souches mésenchymateuses représentent un type cellulaire idéal pour recoloniser les anévrysmes intracrâniens car elles possèdent l'ensemble de ces propriétés^{148, 158, 160-164}.

Afin d'étudier l'effet de l'ensemencement de CSM autologues sur la cicatrisation des anévrysmes, nous avons réalisé une étude cas-témoin comparant la cicatrisation d'anévrysmes

traités avec des coils recouverts de CSM autologues à des anévrysmes traités avec des coils nus dans le modèle d'anévrysme induit à l'élastase chez le lapin. **Le but de cette étude était de déterminer si des cellules souches autologues pourraient améliorer la réponse de cicatrisation d'anévrysmes expérimentaux traités par coils.**

Nous avons pour cela utilisé dans le modèle d'anévrysme chez le lapin des CSM autologues issues de tissu adipeux prélevé au niveau du cou du lapin au moment de la chirurgie pour la création de l'anévrysme. Le tissu adipeux contient des adipocytes, cellules différenciées qui accumulent au sein de leur cytoplasme une énorme gouttelette lipidique, des cellules d'aspect fibroblastique (parmi lesquelles se trouvent les CSM), des capillaires sanguins, des terminaisons nerveuses, du tissu conjonctif et des macrophages. La séparation des cellules du tissu adipeux par digestion enzymatique à la collagénase permet d'isoler facilement les adipocytes (fraction cellulaire qui flotte en milieu liquide) du reste des cellules appelé fraction stroma-vasculaire (SVF). La SVF représente la population cellulaire très hétérogène entourant les adipocytes dans le tissu gras. Placées en milieu de culture, certaines cellules de la SVF vont adhérer au support de culture, proliférer et donner lieu en quelques jours en une population cellulaire plus homogène de MSC adipocytaires (**Figure 18**).

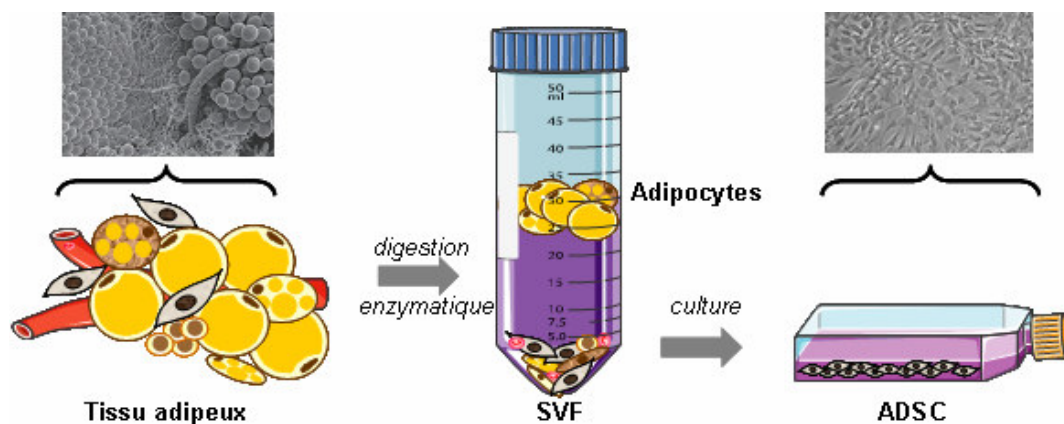


Figure 18 : Extraction des CSM adipocytaires (ADSC) à partir de tissu adipeux.

Image extraite de la thèse de B. Léobon⁴⁶⁰



Article 7 : Rouchaud A, Brinjikji W, Dai D, Ding YH, Gunderson T, Spelle L, Kallmes DF, Kadirvel R. Autologous Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Improve Healing Of Coiled Experimental Saccular Aneurysms: An Angiographic And Histopathological Study. *J Neurointerv Surg.* 2017 Jan 11. [Epub ahead of print]

Les parties Méthodes et Résultats sont présentées dans le PDF de l'article.

Cette étude démontre que l'apport de CSM autologues attachées à des coils de platine améliore l'endothélialisation au collet de l'anévrisme et augmente la cicatrisation du sac anévrysmal. Ainsi, l'ensemencement *ex vivo* de cellules souches sur des coils standards peut améliorer la cicatrisation biologique des anévrysmes.

Cependant, les résultats angiographiques étaient meilleurs chez les témoins (traités par coils standards) que dans les anévrysmes traités avec les coils portant les CSM autologues. Il est possible que la fibrose induite par les cellules implantées puisse provoquer une rétraction importante des coils, favorisant leur compaction.

De précédentes études avaient utilisé la thérapie cellulaire avec des cellules matures différenciées pour promouvoir la guérison des anévrysmes^{73, 147-157}. Cependant, contrairement aux résultats de notre étude, aucune de ces études n'avait permis de montrer à la fois un bénéfice sur la cicatrisation endothéliale au collet de l'anévrisme et en même temps sur la cicatrisation du sac anévrysmal lui-même. Certains auteurs ont démontré que les fibroblastes améliorent la fibrose intra-sacculaire mais n'ont aucun impact sur l'endothélialisation ni sur la formation de néo-intima au collet^{152, 153, 155, 156}. De plus, les fibroblastes ont une activité procoagulante importante en raison de l'expression intense du facteur tissulaire¹⁵⁸. Contrairement aux fibroblastes, les cellules souches mésenchymateuses, extraites à partir du tissu adipeux comme dans cette étude ou de la moelle osseuse, expriment peu le facteur tissulaire et sont donc dépourvues d'activité procoagulante, limitant ainsi la formation de thrombus¹⁵⁸. D'autres équipes ont utilisé des cellules musculaires lisses délivrées directement dans l'anévrisme. Raymond et al.¹⁵⁰ et Marbacher et al.¹⁴⁹ ont observé une néo-intima plus épaisse après implantation de cellules musculaires lisses, mais n'ont observé aucune différence sur la fibrose ou l'endothélialisation avec cette technique. De même, les études ayant utilisé des cellules progénitrices ont montré leur capacité de former des monocouches confluentes de cellules endothéliales avec une sous-couche de neointima, mais sans aucun effet sur la guérison du sac anévrysmal lui-même^{149, 154}.

Ces études précédentes confirment que l'implantation de cellules différenciées ne permet pas leur différenciation en d'autres types cellulaires normalement présents dans la paroi des vaisseaux sanguins. Idéalement, les cellules qui recouvrent les coils et qui se retrouvent positionnées au collet se différencieront en cellules endothéliales artérielles et celles qui se retrouvent localisées plus profondément dans le sac anévrysmal deviendraient des cellules musculaires lisses^{70, 158, 159}. Du point de vue biologique, les CSM représentent un type cellulaire idéal pour recoloniser les anévrysmes cérébraux grâce à leur potentiel de

différenciation en différents types cellulaires en fonction de leur environnement spécifique^{148, 158, 160-163}. Bien que la méthodologie utilisée dans notre étude ne permette pas de différencier histologiquement les cellules implantées par rapport aux cellules recrutées, des études antérieures ont démontré que des CSM transplantées pouvaient se différencier *in vivo* dans les phénotypes spécifiques de cellules endommagées sous l'influence de facteurs locaux exprimés dans le site hôte⁵³¹⁻⁵³³. Dans des conditions de flux laminaire, la contrainte de cisaillement induit la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en cellules endothéliales, de sorte que les cellules qui bordent le collet de l'anévrisme vont se différencier préférentiellement en cellules endothéliales^{534, 535}. C'est ce qui a été observé dans notre étude avec la présence d'un endothélium continu et d'une néo-intima plus épaisse au niveau du collet des anévrysmes ayant reçu les coils portant les cellules souches, comparativement aux anévrysmes traités par coils nus. De plus, le sac intra-anévrysmal étant riche en plaquettes, cela stimule la différenciation des cellules souches mésenchymateuse en cellules musculaires lisses⁵³⁶. Ceci a également été observé dans notre étude avec une plus grande quantité de cellules musculaires lisses dans les anévrysmes ayant reçu les coils recouverts de CSM autologues. Les cellules musculaires lisses de phénotype synthétique présentes à l'intérieur de la cavité anévrysmale sont ensuite responsables de la production de collagène aboutissant à la fibrose et à la cicatrisation de la lésion.

D'autres études avaient utilisé des CSM démontrant leur intérêt dans la promotion de la cicatrisation des anévrysmes intracrâniens^{158, 164, 442}. Comme décrit précédemment, nous avons dans une autre étude utilisé des cellules souches mésenchymateuses provenant de la moelle osseuse, directement administrées dans l'anévrisme par voie endovasculaire mais sans support permettant de les maintenir en position intra-anévrysmale. Des résultats satisfaisants avaient été obtenus concernant la réduction de la taille des anévrysmes et la cicatrisation histologique, cependant avec cette approche nous avons eu un faible rendement des cellules effectivement fixées dans le sac anévrysmal en raison de l'absence de support pour les maintenir à l'intérieur de l'anévrisme¹⁵⁸. Récemment, Adibi et al. ont publié une série de 3 lapins traités par coiling combiné à l'administration intra-anévrysmale de cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse allogéniques administrées juste après l'implantation du premier coil¹⁶⁴. Ils ont observé une amélioration significative des scores histologiques¹⁶⁴. Cependant, ils ont utilisé des cellules allogéniques, sans impact délétère rapporté chez les lapins, mais cette greffe de cellules allogéniques est très fortement susceptible de provoquer un rejet immunitaire contre les cellules transplantées chez d'autres animaux et notamment chez l'homme⁵³⁷.

Dans notre étude nous n'avons étudié qu'un seul délai (1 mois) et qu'une seule dose de cellules (5.10^6) et il est possible que les observations seraient différentes à un délai ou avec une dose de cellules différentes.

A notre connaissance, cette étude est la plus grande utilisant des cellules souches autologues pour le traitement des anévrysmes intracrâniens dans une étude expérimentale. En outre, en dépit de la petite taille de l'échantillon, l'effet était statistiquement significatif en faveur des cellules souches pour la guérison histologique et incite à la réalisation de nouvelles études sur un effectif plus important pour évaluer la sécurité et les résultats à long terme. D'autres études évaluant les résultats à différents moments seraient obligatoires pour évaluer l'effet des CSM au fil du temps et évaluer la stabilité ou la progression des reliquats anévrysmaux. Une des principales limites de cette approche avec des cellules souches autologues est qu'elle n'est pas appropriée pour le traitement aigu des anévrysmes rompus car cela nécessite du temps pour obtenir une quantité suffisante de cellules pour chaque patient.

Conclusion

Les cellules souches mésenchymateuses autologues attachées à des coils de platine améliorent significativement la cicatrisation histologique des anévrysmes par rapport aux coils standard avec une meilleure endothélialisation au collet et une augmentation de la fibrose et de la matrice de collagène dans le sac anévrysmal.

ORIGINAL RESEARCH

Autologous adipose-derived mesenchymal stem cells improve healing of coiled experimental saccular aneurysms: an angiographic and histopathological study

Aymeric Rouchaud,^{1,2} Waleed Brinjikji,³ Daying Dai,¹ Yong-Hong Ding,¹ Tina Gunderson,⁴ Dana Schroeder,¹ Laurent Spelle,² David F Kallmes,¹ Ramanathan Kadirvel¹

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/neurintsurg-2016-012867>).

¹Applied Neuroradiology Laboratory, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA
²Department of Interventional Neuroradiology, NEURI Center, Le Kremlin-Bicetre, France
³Department of Radiology, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA
⁴Health Sciences Research, Division of Biomedical Statistics and Informatics, Mayo Clinic, Rochester, USA

Correspondence to
 Dr Aymeric Rouchaud, Applied Neuroradiology Laboratory, Mayo Clinic, 200 First St SW, Rochester, MN 55905, USA; aymeric.rouchaud@gmail.com

Received 8 November 2016
 Revised 14 December 2016
 Accepted 15 December 2016

ABSTRACT

Purpose Long-term occlusion of coiled aneurysms frequently fails, probably because of poor intrasaccular healing and inadequate endothelialization across the aneurysm neck. The purpose of this study was to determine if attachment of autologous mesenchymal stem cells (MSCs) to platinum coils would improve the healing response in an elastase-induced aneurysm model in rabbits.

Materials and methods With approval from the institutional animal care and use committee, aneurysms were created in rabbits and embolized with control platinum coils (Axiom; Medtronic) (n=6) or coils seeded *ex vivo* with autologous adipose-tissue MSCs (n=7). Aneurysmal occlusion after embolization was evaluated at 1 month with angiography. Histological samples were analyzed by gross imaging and graded on the basis of neck and dome healing on H&E staining. Fibrosis was evaluated using a ratio of the total area presenting collagen. Endothelialization of the neck was quantitatively analyzed using CD31 immunohistochemistry. χ^2 and Student's t-test were used to compare groups.

Results Healing score (11.5 vs 8.0, p=0.019), fibrosis ratio (10.3 vs 0.13, p=0.006) and endothelialization (902 262 μm^2 vs 31 810 μm^2 , p=0.041) were significantly greater in the MSC group. The MSC group showed marked cellular proliferation and thrombus organization, with a continuous membrane bridging the neck of the aneurysm. Angiographic stable or progressive occlusion rate was significantly lower in the MSC group (0.00, 95% CI 0.00 to 0.41) compared with controls (0.67, 95% CI 0.22 to 0.96) (p=0.02).

Conclusions Autologous MSCs attached to platinum coils significantly improve histological healing, as they result in improved neck endothelialization and collagen matrix formation within the aneurysm sac.

INTRODUCTION

Endovascular therapy of intracranial aneurysms is the gold standard and has supplanted the surgical approach for many types of aneurysms.¹ However, numerous clinical studies indicate that up to 30% of aneurysms recur within 1 year after coiling,^{2,3} leading to frequent retreatment and associated perioperative risks and risk of hemorrhage if untreated.⁴⁻⁶ Thus, complete and durable aneurysm occlusion following coiling remains an important unmet clinical

need. The recanalization phenomenon attributable to coil compaction is particularly observed in wide-necked or large aneurysms.⁷⁻¹³ The recurrence rate of coiled aneurysms is most likely due to the inert nature of platinum coils,^{14,15} which fail to induce attraction and proliferation of either circulating or resident cells that might reconstruct the deficient segment of the vessel wall. Aneurysm recurrence after endovascular treatment is due to coil compaction, lack of endothelial cell growth across the neck of the aneurysm, and deficient deposition of extracellular matrix proteins in the aneurysm cavity.^{9,13,16-18} Thus, the aneurysm cavity remains unable to withstand the ongoing mechanical stress from continued arterial pulsation, leading to aneurysm recurrence and possible rupture.

Many different strategies have been proposed to improve aneurysm occlusion rates, including modification of coils by adding polymers, growth factors, β emitters or cells.^{14,19-28} To date, clinical trials have been disappointing regarding the efficacy of these second-generation, modified-coil technologies.^{2,29-40} Other studies have used cell therapy with mature and differentiated cells to promote aneurysm healing.⁴¹⁻⁵² However, terminally differentiated, implanted cells do not differentiate into the other cell types normally present in the blood vessel wall. Ideally, the cells lining the implanted coils would differentiate into arterial endothelial cells, forming a confluent layer of endothelial cells across the neck of the aneurysm, and those residing deep in the endothelial lining would become medial smooth muscle cells with the formation of collagen.^{13,53,54} From a biological perspective, mesenchymal stem cells (MSCs) represent an ideal cell type with which to populate saccular aneurysms.^{26,41,53,55-58}

To study the effect of autologous MSCs on aneurysm healing, we conducted a case-control study comparing the healing effects of MSCs on coils with bare platinum coils in the treatment of an elastase-induced aneurysm model in rabbits. The purpose of this study was to determine if attaching autologous MSCs to platinum coils would improve the healing response of experimental aneurysms.

MATERIALS AND METHODS

The animal care and use committee at our institution approved the animal procedures.

To cite: Rouchaud A, Brinjikji W, Dai D, et al. *J NeuroInterv Surg*. Published Online First: [please include Day Month Year] doi:10.1136/neurintsurg-2016-012867

Aneurysm creation

Elastase-induced saccular aneurysms were created in 13 rabbits as previously described.^{59 60} Briefly, under general anesthesia, the right common carotid artery (RCCA) was exposed and ligated distally. A 5 F vascular sheath was advanced retrogradely into the RCCA, and a 3 F Fogarty balloon inflated with iodinated contrast medium was advanced through the sheath to the level of the origin of the RCCA under fluoroscopic guidance. Porcine elastase was incubated within the lumen of the RCCA above the inflated balloon for 20 min, after which the catheter, balloon and sheath were removed. The RCCA was then ligated below the arteriotomy. No morbidity or mortality was observed with aneurysm creation.

Autologous MSC isolation and culture

Adipose tissue was harvested during the aneurysm creation procedure from the neck of the rabbit. Autologous MSCs were isolated from adipose tissue extracted from the fat of the rabbit neck. Briefly, adipose tissue was digested with collagenase, then passed through a 70 µm cell strainer (BD Biosciences, San Diego, California, USA) and incubated in red blood cell lysis buffer (Sigma-Aldrich). Harvested cells were cultured in a medium consisting of Dulbecco's Modified Eagle Medium with 10% fetal bovine serum and 2 mM l-glutamine. Adherent MSCs were cultured until 5×10^6 cells had been obtained from each rabbit with about four cell passages for each rabbit. MSC membranes were labeled with fluorescent Dil (Sigma/Aldrich Chemical Co).

Coil preparation

Axium detachable coils (Medtronic, Irvine, California, USA) were placed in 15 mL Falcon tubes. An MSC suspension (1×10^6 cells/mL) was poured into the Falcon tubes containing the coils. The tubes were agitated at 300 rpm for 1 hour in an orbital shaker, and then the coils were cultured in the same culture medium as previously described and stored in the cell incubator for 24 hours at 37°C. Cell-seeded coils were then thoroughly washed with phosphate-buffered saline to exclude non-adherent cells, and resheathed in the delivery sheath. Axium coils incubated with culture medium without MSCs served as controls. Figure 1 illustrates MSCs growing on the coil 24 hours after seeding viewed by scanning electronic microscopy (figure 1A) and by fluorescence microscopy after nuclear staining (Syto16; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) (figure 1B).

To confirm that the resheathing and delivery of the coil through the microcatheter had not stripped a large proportion of cells off the coils, we pushed a cell-seeded coil through an Excel (Target Therapeutics) delivery microcatheter *ex vivo* and then flushed the catheter with saline. We measured the number of non-adherent cells afterwards, which was less than 5% of the initial number of cells seeded on the coil. The non-adherent cells were cultured in the culture medium to confirm that the cells were alive after the resheathing and delivery steps.

Coiling of the experimental aneurysms

Aneurysms were treated 3 weeks after their creation.⁶¹ Under general anesthesia, a 5 F catheter was advanced from the right common femoral artery into the brachiocephalic artery. Using the coaxial technique, an Excel microcatheter was advanced into the aneurysm. Aneurysms were embolized with Axium coils without MSCs (control group, n=6) or Axium coils carrying autologous MSCs (test group, n=7). After embolization, a final

control DSA was performed. A blinded reader with 20 years of experience estimated aneurysm occlusion and packing density with the Angiocalc tool (<http://www.angiocalc.com>).

Follow-up

Control DSA was performed 4 weeks after coiling via the left auricularis rostralis artery under general anesthesia. All angiograms at death were compared with immediate post-treatment angiograms and assessed for any increase or decrease in contrast filling of the aneurysms. Aneurysms were assigned to one of three result groups: stable occlusion (no modification between immediate post-treatment and 4-week angiograms), progressive occlusion (decrease in aneurysm opacification between immediate post-treatment and 4-week angiograms), or coil compaction (increase in aneurysm opacification between immediate post-treatment and 4-week angiograms). Angiography results are expressed as the proportion of aneurysms demonstrating stable or progressive occlusion comparing immediate post-coiling and follow-up results. For this evaluation, the reader was blinded to the treatment group.

Tissue harvest and processing

After follow-up DSA, animals were killed by lethal injection of pentobarbital. Median sternotomy and pericardiotomy were performed. The animals were then perfusion-fixed with 10% buffered formalin for 10 min followed by flushing with heparinized saline for 5 min. The coiled aneurysm was then harvested and immersed in Tris-buffered saline (TBS). Under a dissection microscope (Leica MZ 125), the parent artery was cut longitudinally to expose the neck orifice for gross inspection to evaluate tissue growth at the neck; the sample was then photographed using the MicroPublisher 5.0 RTV camera attached to the dissection microscope. After photography, the sample was fixed in 10% formalin for 2 hours for further whole tissue mount staining.

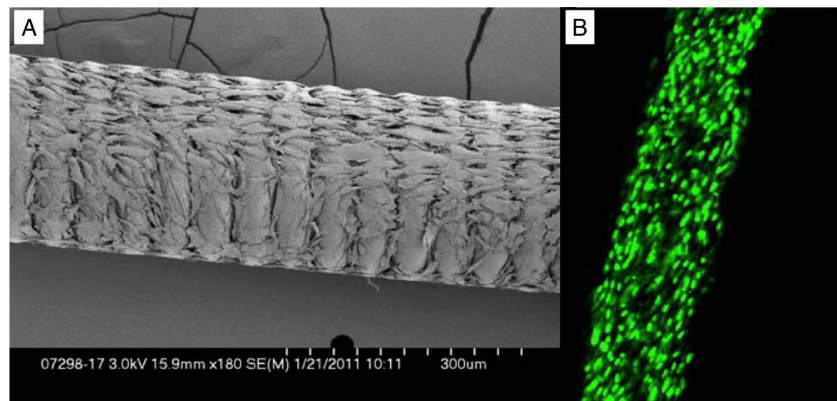
Whole-mount en face immunostaining

Details of the procedure are described in a previous study.⁶² Briefly, after the macrophotographs were taken, the aneurysms were fixed in 10% neutral buffered formalin and then washed with TBS; they were then incubated with 5% normal donkey serum in 0.3% Tween in TBS. The samples were then incubated with primary antibodies against CD31 (1:30; Dako, Carpinteria, California, USA) or smooth muscle actin (1:200; Dako) at 4°C. Specific binding was visualized using a secondary antibody Cy3 or fluorescein isothiocyanate-conjugated IgG (1:200; Jackson Immuno Research, West Grove, Pennsylvania, USA). Sytox green (1:1000; Life Technologies, Grand Island, New York, New York, USA) served as a nuclear counterstain to identify inflammatory cells.

Histological analysis

Tissues were embedded in paraffin and then sectioned at 1000 µm. Metallic coil fragments were gently removed with dissection forceps under a dissecting microscope. Paraffin sections were then re-embedded in paraffin blocks and sectioned at 4 µm intervals. Mounted sections were stained with either H&E for conventional histopathological evaluation or Masson Trichrome stain for collagen deposition. Sections were viewed by two blinded and independent reviewers paying particular attention to the thickness of the cell layer across the neck of the aneurysms and the cellularity within the aneurysm dome. To evaluate histological healing, we used an ordinal grading classification, described in a previous report.⁶³ Briefly, neck healing score was

Figure 1 Platinum coils seeded with adipose-derived autologous mesenchymal stem cells (MSCs). (A) Scanning electron microscopic image showing coil seeded with MSCs. (B) Confocal microscopic image of MSCs seeded on the coil surface, stained with nuclear stain Syto16 (green).



calculated on the basis of tissue coverage, the score for coil microcompaction at the neck was based on the shape of the coil holes across the neck, and the healing characteristic score in the dome was categorized on the basis of the density of cellular infiltration and area of organized tissue, by using an image analysis technique based on Photoshop software (Adobe Systems, San Jose, California, USA). These scores used for the ordinal grading classification (neck average, microcompaction and healing) were combined to obtain a total score representative of the aneurysm's healing. The degree of inflammation was defined and scored as: 0, no inflammatory cell infiltration; 1, mild, scant, scattered inflammatory cell infiltration; 2, moderate, patchy inflammatory cell infiltration; 3, marked, attenuated, diffuse inflammatory cell infiltration.⁴⁷

Neck endothelialization at the level of the aneurysm

For endothelialization analysis, we used whole-mount en face immunostaining with primary antibodies against CD31. We quantitatively analyzed the endothelialization of the neck area with measurement of the CD31-positive field viewed from the neck orifice.

Analysis of collagen deposition

We quantitatively analyzed collagen deposition or fibrosis identified with Masson Trichrome staining using an image analysis technique based on Photoshop software.⁴⁷ A fibrosis ratio—the total area of fibrosis within the aneurysmal cavity and neck divided by the total area of the aneurysmal cavity and neck—was calculated for each aneurysm.

Immunohistochemistry

Sections were stained immunohistochemically⁶⁴ for immunostained RAM-11 (1:50, for rabbit; Dako, Carpinteria, California, USA). RAM-11 is a macrophage-specific monoclonal antibody⁶⁵ used to detect inflammation in the aneurysm dome.

Statistical analysis

Wilcoxon rank-sum tests were performed to compare geometries and packing density between groups. Differences in histological findings between groups were assessed using the between-group Wilcoxon rank-sum test. Results are expressed as median and interquartiles (25th and 75th). For DSA outcomes, groups were compared using Fisher's exact test and reported with exact Klopfer-Pearson 95% CIs. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Seeding of autologous MSCs on Axium coils

Diffuse, confluent cell growth on the coil's surface and between coil loops was obtained after 24 hours of seeding, which was confirmed by scanning electron microscopy and fluorescence microscopy (figure 1).

Angiographic findings

There were no significant differences in aneurysm neck size ($p=0.69$), aneurysm width ($p=0.37$), and aneurysm height ($p=0.64$) between groups. Packing density was significantly different between groups, with median (IQR) of 22.5% (18.8–24.8%) for the control group and 30.0% (25.0–34.0%) for the MSC group ($p=0.01$).

All the aneurysms in the MSC group had coil compaction at follow-up with neck recurrences, whereas there were two cases of coil compaction, three stable total occlusions and one progressive total occlusion in the control group. The stable or progressive occlusion rate was significantly lower in the MSC group (0.00, 95% CI 0.00 to 0.41) than in the control group (0.67, 95% CI 0.22 to 0.96) ($p=0.02$).

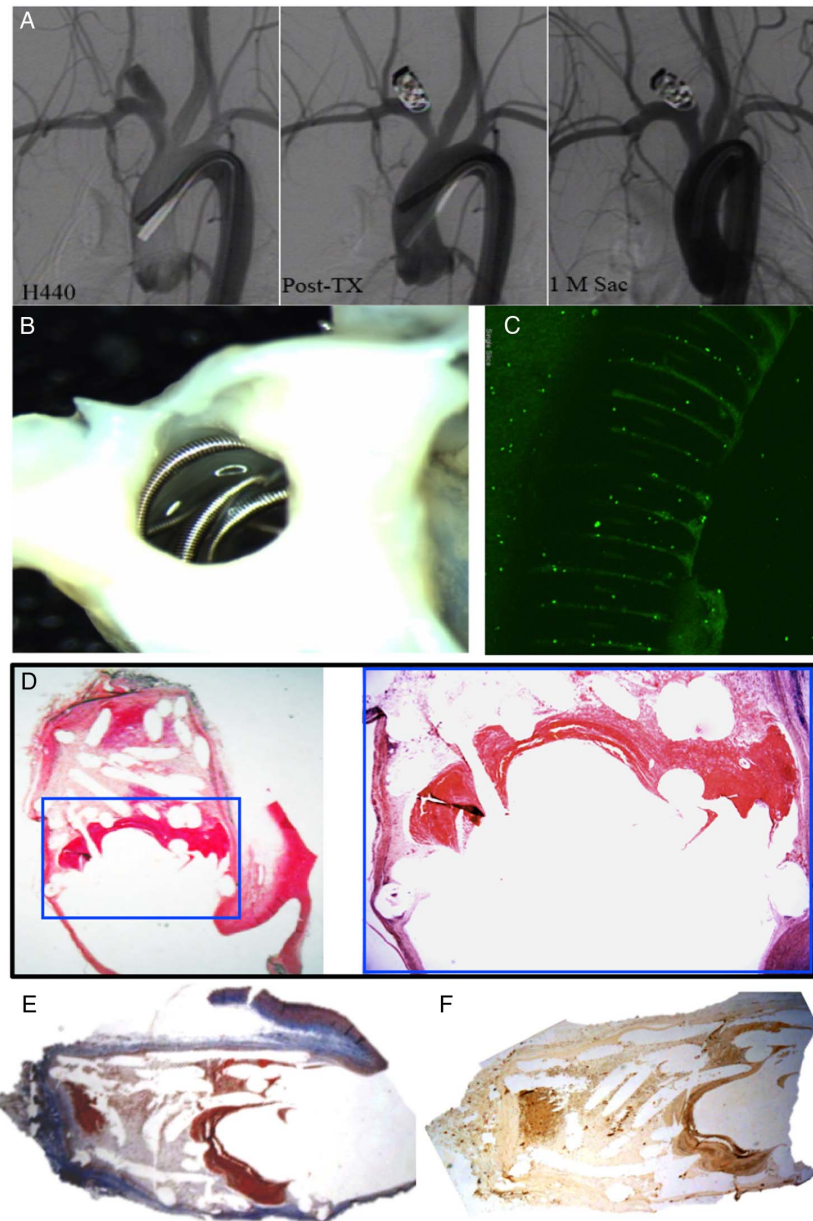
Qualitative histology

Gross microscopy showed the coil loops at the neck orifice were bare with no membranous tissue covering (figure 2B) in the control group; no endothelialization on the coil surface was observed with CD31 immunostaining (figure 2C). In the MSC group, the coil loops that crossed the neck orifice were covered with transparent and translucent membranous tissue (figure 3B); this membranous tissue was lined with a layer of CD31-positive cells (figure 3C), indicating endothelialization on the coil surface.

Microscopy showed six of six aneurysms in the control group with a large neck remnant and poorly organized thrombus crossing the neck interface (figure 2D), loose connective tissue associated with scattered macrophages and thin extracellular matrix filling the aneurysm dome, and a small amount of collagen deposition (figure 2D–F). In contrast, in the MSC group, microscopy showed endothelium-lined, thin and thick neointima completely covering the neck interface (figure 3D). Denser connective tissue associated with diffuse macrophage infiltration, thick extracellular matrix and collagen deposit in the aneurysmal cavity was also observed in the MSC group (figure 3D–F).

Hemorrhagic stroke

Figure 2 A set of representative images of a single aneurysm packed with Axium coils without mesenchymal stem cells (MSCs) (control group). (A) Angiograms show stability of the aneurysm occlusion between the immediate post-treatment and 1-month follow-up angiograms. (B) Macrophotograph of the neck orifice shows that the coil loops crossing the neck orifice are bare (original magnification 3.2×). (C) Whole tissue mount staining (antibody for CD31) shows there are no CD31+ cells on the coil surface at the neck orifice (water lens, original magnification 20×). (D) Microphotograph shows poorly organized thrombus at the neck interface; loose connective tissue with thin extracellular matrix in the dome (H&E, original magnification 12.5×). Higher magnification (40×) is provided for the blue square area. (E) Masson Trichrome staining shows that the aneurysm barely has any collagen deposit within the cavity (Masson Trichrome, original magnification, 12.5×) (F) RAM-11 immunostaining shows a few scattered macrophages within the dome tissue (immunohistochemistry, original magnification 25×).



Histological scoring

The MSC group had a significantly higher inflammation score than the control group (mean (range) 3.0 (3.0–3.0) vs 2.0 (2.0–2.0), $p < 0.01$) indicating a larger number of multinuclear giant cells and macrophages. Overall, the total histological healing score was significantly higher in the MSC group (11.5 (11.0 to 12.0)) than the control group (8.0 (6.25 to 9.0)) ($p = 0.019$).

Quantitative analysis of aneurysm fibrosis

Quantitative analysis of aneurysm fibrosis based on evaluation of collagen⁶⁶ in the aneurysm cavity demonstrated a significantly higher fibrosis ratio in the MSC group (10.3 (IQR 7.98–28.3)) than in the control group (0.13 (IQR 0.055–0.272)) ($p = 0.006$).

Quantitative analysis of coil endothelialization at the level of the aneurysm neck

There was significantly greater endothelialization of the aneurysm neck in the MSC group (902 262 μm^2 (IQR 608 991–1 799 849)) than in the controls (31 810 μm^2 (IQR 14 106–397 315)) ($p = 0.041$).

DISCUSSION

This study demonstrated that autologous MSCs attached to platinum coils improved endothelial cell growth across the neck of the aneurysm and increased fibrosis within the aneurysm sac. Thus, ex vivo loading of standard coils can achieve improved biological healing of aneurysm cavities.

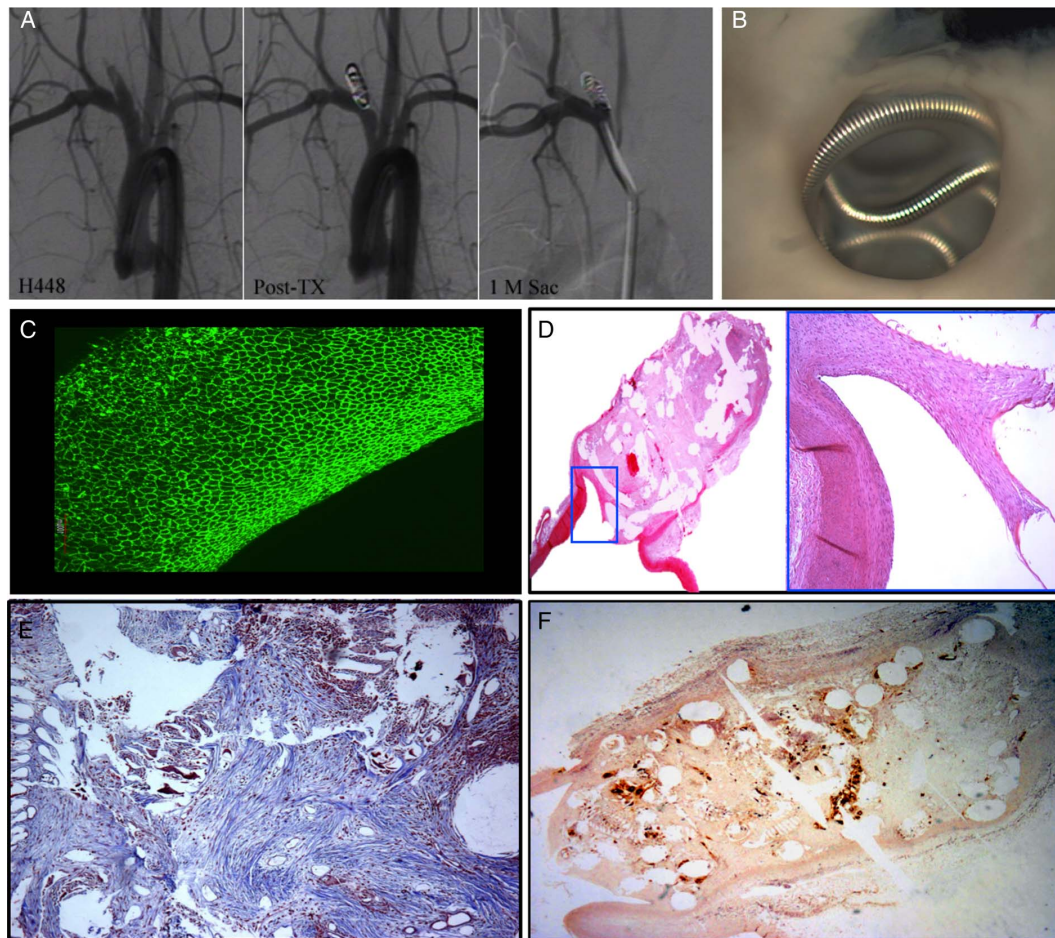


Figure 3 A set of representative images of a single aneurysm packed with Axium coils with seeded autologous mesenchymal stem cells (MSCs) (MSC group). (A) Angiograms show stability of the aneurysm occlusion between the immediate post-treatment and 1-month follow-up angiograms. (B) Macro photograph of the neck orifice shows that the coil loops at the neck orifice are almost completely covered with white, translucent and transparent membranous tissue (original magnification 6.3 \times). (C) Whole tissue mount staining (antibody for CD31) shows a single layer of confluent CD31+ cells on the coil loop at the neck orifice (water lens, original magnification 20 \times). (D) Microphotograph shows that the dome is completely filled with dense connective tissue; endothelium lined thin and thick neointima completely transverses the entire neck interface. Local, dense inflammation is also shown at the top of the dome (H&E, original magnification 12.5 \times). Higher magnification (40 \times) is provided for the blue square area. (E) Masson Trichrome staining shows dense packing of collagen deposition in an organized fashion in the aneurysm sac (Masson Trichrome, original magnification 100 \times). (F) RAM-11 immunostaining shows local and diffuse dense macrophages within the dome surrounding the coil struts (immunohistochemistry, original magnification 25 \times).

Notably, however, angiographic outcomes were better in controls than in the MSC group. It is possible that the induced fibrosis from the implanted cells caused retraction of the coils, favoring coil compaction. Prior to clinical translation therefore substantial additional preclinical evaluation of ex vivo autologous MSC implantation is warranted.

Prior studies used therapy with differentiated cells to promote aneurysm healing.^{41–52} However, none of these studies demonstrated the improvements in healing responses in both aneurysm neck and aneurysm sac seen in our study. Some authors demonstrated that fibroblasts improve intrasaccular fibrosis but have no impact on endothelialization and neointima formation.^{47 48 50 51} Furthermore, fibroblasts have important procoagulant activity due to intense expression of tissue factor (TF).⁵³ Unlike fibroblasts, MSCs, whether from adipose tissue or bone marrow,

express TF poorly and are devoid of procoagulant activity, limiting thrombus formation.⁵³ Other groups used smooth muscle cells delivered into the aneurysm. Raymond *et al*⁴⁵ and Marbacher *et al*⁴² observed thicker neointima with smooth muscle cell implantation, but observed no difference in fibrosis and endothelialization with this technique. Meanwhile, studies reporting the use of endothelial progenitor cells in preclinical aneurysm models demonstrated confluent monolayers of endothelial cells with underlying neointima but without effect on intrasaccular healing.^{42 49}

These previous studies confirm that differentiated implanted cells do not differentiate into the other cell types normally present in the blood vessel wall. Ideally, the cells lining the implanted coils at the neck interface would differentiate into arterial endothelial cells, and those residing deeper in the

aneurysm sac would become medial smooth muscle cells.^{13 53 54} From a biological perspective, MSCs represent an ideal cell type with which to populate saccular aneurysms because of their potential to differentiate into various cell types based on their specific environment.^{26 41 53 55–57} While our current methodology did not allow specific histopathological identification of implanted versus recruited cells, previous studies have demonstrated that transplanted MSCs can differentiate into specific phenotypes of damaged cells in vivo under the influence of local host factors.^{67–69} Under conditions of laminar flow, shear stress induces MSCs to differentiate into endothelial cells, so the implanted MSCs lining the neck of the aneurysm preferentially differentiate into cells lining the arterial wall.^{70 71} This was also observed in the present study using autologous stem cells with continuous endothelium at the aneurysm necks and thick neointima, assumed to originate from the implanted autologous MSCs. Furthermore, the embolized aneurysm cavity is rich in platelets stimulating MSCs to differentiate into smooth muscle cell phenotypes;⁷² this was observed in our study with smooth muscle cells assumed to originate from the implanted autologous MSCs. The smooth muscle cells present in the aneurysm sacs are then responsible for production of the collagen, which is responsible for fibrosis and wound healing.

Recently published studies demonstrate the benefits of MSCs in promoting intracranial aneurysm healing.^{53 58 73} In the same elastase model in rabbits, Rouchaud *et al*⁵³ used autologous MSCs from bone marrow injected directly into the aneurysm by an endovascular route through a catheter placed in the aneurysm with no scaffold. Satisfactory results regarding reduction in aneurysm size and histological healing were obtained in this study, but the number of cells that effectively attached themselves to the aneurysm sac was low because of the absence of a scaffold to hold them inside the aneurysm. This diminished the beneficial effect of the MSC therapy and also increased the risk of cells migrating into the intracranial circulation and causing an ischemic stroke. Recently, Adibi *et al*⁵⁸ published a study of three rabbits treated with combined endovascular coiling and intra-aneurysmal allogeneic bone-marrow MSC injection into the aneurysm immediately after placement of the framing coil. They observed a significant improvement in histological scores.⁵⁸ The authors used allogeneic MSCs with no deleterious impact in rabbits, but this technique is likely to induce an immune response against transplanted cells in other animals and humans.⁷⁴ Another limitation of this study is the fact that the authors relied on the framing coil to promote intra-aneurysmal stasis, thus containing the implanted cells in the aneurysm sac and avoiding cell migration. Further analysis of this technique is needed to assess the risk of cell migration and to evaluate the risk of ischemic stroke.

Limitations

Our study is limited by its small sample size. Another limitation is that the rabbits were killed at only one time point, making it impossible to evaluate if the effects were permanent; also it is possible that the beneficial effects on histological healing observed with MSCs could appear earlier than 1 month. Furthermore, only a dose of 5×10^6 cells was evaluated, which might not be the appropriate dose. Also, MSCs were not labeled for in vivo tracking, therefore we cannot determine if the implanted cells were viable at the time of death or whether the cells were responsible for the tissue changes noted. Furthermore, the packing density was significantly different between the groups, being higher in the MSC group, which may have biased some of the histological results.

To the best of our knowledge, this study is the largest to use autologous stem cells for the treatment of intracranial aneurysms in an experimental study. Furthermore, despite the small sample size, the effect was statistically significant in favor of MSCs for histological healing, encouraging larger experiments to evaluate safety and long-term outcomes. Further studies are required to evaluate outcomes at different time points to determine the effect of MSCs over time and evaluate the stability or progression of neck remnants. Also, an autologous approach with MSCs does not seem to be appropriate for acute treatment of ruptured aneurysms, since time is needed to produce sufficient cells for each patient. We used a cell dose of 5×10^6 cells, which was used in the previous studies by Adibi *et al*⁵⁸ and Rouchaud *et al*,⁵³ but further studies with different amounts of cells are needed to determine the appropriate dose–response efficiency.

CONCLUSION

Autologous MSCs attached to platinum coils significantly improve histological healing compared with standard coils, with more endothelial cells across the neck of the aneurysm and collagen matrix within the aneurysm sac. However, these findings did not correlate with the angiographic findings.

Acknowledgements We thank Medtronic (Irvine, California, USA) for generously providing the Axiom coils used for this study.

Contributors AR, DFK, and RK participated in the conception and design of the study. AR, DD and WB participated in drafting the article. AR, WB, LS, DFK, and RK participated in revising it critically for important intellectual content. AR, WB, DD, YHD, TG, LS, DFK, and RK made substantial contributions to conception and design, acquisition of the data, and analysis and interpretation of the data. All authors provided final approval of the version to be published.

Funding This work was supported by research grant NS0767491 from the National Institute of Health and Medtronic. This work was partially funded by the SNIS Foundation Fellow Research Grant. AR was supported by research grants from the French Society of Radiology and Therese Planiol Foundation.

Competing interests None declared.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data sharing statement The data discussed in this article are taken from our institution. Unpublished data may be available on request to the corresponding author.

REFERENCES

- Molyneux A, Kerr R, Stratton I, *et al*. International Subarachnoid Aneurysm Trial (ISAT) of neurosurgical clipping versus endovascular coiling in 2143 patients with ruptured intracranial aneurysms: a randomised trial. *Lancet* 2002;360:1267–74.
- White PM, Lewis SC, Gholkar A, *et al*. Hydrogel-coated coils versus bare platinum coils for the endovascular treatment of intracranial aneurysms (HELPS): a randomised controlled trial. *Lancet* 2011;377:1655–62.
- Ogilvy CS, Chua MH, Fusco MR, *et al*. Validation of a system to predict recanalization after endovascular treatment of intracranial aneurysms. *Neurosurgery* 2015;77:168–73; discussion 73–4.
- Ausman JI. The future of neurovascular surgery. Part I: Intracranial aneurysms. *Surg Neurol* 1997;48:98–100.
- Murayama Y, Viñuela F, Suzuki Y, *et al*. Ion implantation and protein coating of detachable coils for endovascular treatment of cerebral aneurysms: concepts and preliminary results in swine models. *Neurosurgery* 1997;40:1233–43. discussion 43–4.
- Raymond J, Roy D, Bojanowski M, *et al*. Endovascular treatment of acutely ruptured and unruptured aneurysms of the basilar bifurcation. *J Neurosurg* 1997;86:211–19.
- Raymond J, Guilbert F, Weill A, *et al*. Long-term angiographic recurrences after selective endovascular treatment of aneurysms with detachable coils. *Stroke* 2003;34:1398–403.
- Hayakawa M, Murayama Y, Duckwiler GR, *et al*. Natural history of the neck remnant of a cerebral aneurysm treated with the Guglielmi detachable coil system. *J Neurosurg* 2000;93:561–8.
- Brisman JL, Song JK, Newell DW. Cerebral aneurysms. *N Engl J Med* 2006;355:928–39.
- Li H, Pan R, Wang H, *et al*. Clipping versus coiling for ruptured intracranial aneurysms: a systematic review and meta-analysis. *Stroke* 2013;44:29–37.

- 11 Kaufmann TJ, Huston J III, Cloft HJ, *et al.* A prospective trial of 3T and 1.5T time-of-flight and contrast-enhanced MR angiography in the follow-up of coiled intracranial aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol* 2010;31:912–18.
- 12 Brinjikji W, Yong Hong D, Dai D, *et al.* Statins are not associated with short-term improved aneurysm healing in a rabbit model of unruptured aneurysms. *J Neurointerv Surg* 2016. doi: 10.1136/neurintsurg-2016-012265. [Epub ahead of print 3 Mar 2016].
- 13 Brinjikji W, Kallmes DF, Kadirvel R. Mechanisms of healing in coiled intracranial aneurysms: a review of the literature. *AJNR Am J Neuroradiol* 2015;36:1216–22.
- 14 Ribourtout E, Raymond J. Gene therapy and endovascular treatment of intracranial aneurysms. *Stroke* 2004;35:786–93.
- 15 Murayama Y, Viñuela F, Tateshima S, *et al.* Cellular responses of bioabsorbable polymeric material and Guglielmi detachable coil in experimental aneurysms. *Stroke* 2002;33:1120–8.
- 16 Khan SH, Nichols C, Depowell JJ, *et al.* Comparison of coil types in aneurysm recurrence. *Clin Neurol Neurosurg* 2012;114:12–16.
- 17 Hoppe AL, Raghavan ML, Hasan DM. Comparison of the association of sac growth and coil compaction with recurrence in coil embolized cerebral aneurysms. *PLoS ONE* 2015;10:e0123017.
- 18 Chalouhi N, Ali MS, Jabbour PM, *et al.* Biology of intracranial aneurysms: role of inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012;32:1659–76.
- 19 Raymond J, Leblanc P, Morel F, *et al.* Beta radiation and inhibition of recanalization after coil embolization of canine arteries and experimental aneurysms: how should radiation be delivered? *Stroke* 2003;34:1262–8.
- 20 Raymond J, Metcalfe A, Desfaits AC, *et al.* Alginate for endovascular treatment of aneurysms and local growth factor delivery. *AJNR Am J Neuroradiol* 2003;24:1214–21.
- 21 Matsumoto H, Terada T, Tsuura M, *et al.* Basic fibroblast growth factor released from a platinum coil with a polyvinyl alcohol core enhances cellular proliferation and vascular wall thickness: an in vitro and in vivo study. *Neurosurgery* 2003;53:402–7. discussion 07–8.
- 22 Reinges MH, Krings T, Drexler AY, *et al.* Bare, bio-active and hydrogel-coated coils for endovascular treatment of experimentally induced aneurysms. Long-term histological and scanning electron microscopy results. *Interv Neuroradiol* 2010;16:139–50.
- 23 Toma N, Imanaka-Yoshida K, Takeuchi T, *et al.* Tenascin-C-coated platinum coils for acceleration of organization of cavities and reduction of lumen size in a rat aneurysm model. *J Neurosurg* 2005;103:681–6.
- 24 Tsumoto T, Matsumoto H, Terada T, *et al.* A polyvinyl alcohol core coil containing basic fibroblast growth factor evaluated in rabbits with aneurysms induced by elastase. *Neurosurgery* 2007;61:160–6; discussion 66.
- 25 Kallmes DF, Fujiwara NH, Yuen D, *et al.* A collagen-based coil for embolization of saccular aneurysms in a New Zealand White rabbit model. *AJNR Am J Neuroradiol* 2003;24:591–6.
- 26 Gao Y, Lu Z, Chen C, *et al.* Mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells accelerate intra-aneurysmal tissue organization after treatment with SDF-1 α -coated coils. *Neural Res* 2016;38:333–41.
- 27 Gao Y, Wang Q, Cui X, *et al.* Controlled release of stromal cell-derived factor-1 α from silk fibroin-coated coils accelerates intra-aneurysmal organization and occlusion of neck remnant by recruiting endothelial progenitor cells. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7:8366–80.
- 28 Raymond J, Mounayer C, Salazkin I, *et al.* Safety and effectiveness of radioactive coil embolization of aneurysms: effects of radiation on recanalization, clot organization, neointima formation, and surrounding nerves in experimental models. *Stroke* 2006;37:2147–52.
- 29 Smith MJ, Mascitelli J, Santillan A, *et al.* Bare platinum vs matrix detachable coils for the endovascular treatment of intracranial aneurysms: a multivariate logistic regression analysis and review of the literature. *Neurosurgery* 2011;69:557–64; discussion 65.
- 30 Rivet DJ, Moran CJ, Mazumdar A, *et al.* Single-institution experience with matrix coils in the treatment of intracranial aneurysms: comparison with same-center outcomes with the use of platinum coils. *AJNR Am J Neuroradiol* 2007;28:1736–42.
- 31 Plotin M, Spelle L, Mounayer C, *et al.* Intracranial aneurysms coiling with matrix: immediate results in 152 patients and midterm anatomic follow-up from 115 patients. *Stroke* 2009;40:321–3.
- 32 O'Hare AM, Fanning NF, Ti JP, *et al.* HydroCoils, occlusion rates, and outcomes: a large single-center study. *AJNR Am J Neuroradiol* 2010;31:1917–22.
- 33 Linfante I, DeLeo MJ III, Gounis MJ, *et al.* Cerecyte versus platinum coils in the treatment of intracranial aneurysms: packing attenuation and clinical and angiographic midterm results. *AJNR Am J Neuroradiol* 2009;30:1496–501.
- 34 Ishii A, Murayama Y, Nien YL, *et al.* Immediate and midterm outcomes of patients with cerebral aneurysms treated with Matrix1 and Matrix2 coils: a comparative analysis based on a single-center experience in 250 consecutive cases. *Neurosurgery* 2008;63:1071–7; discussion 77–9.
- 35 Gunnarsson T, Tong FC, Klurfan P, *et al.* Angiographic and clinical outcomes in 200 consecutive patients with cerebral aneurysm treated with hydrogel-coated coils. *AJNR Am J Neuroradiol* 2009;30:1657–64.
- 36 Gaba RC, Ansari SA, Roy SS, *et al.* Embolization of intracranial aneurysms with hydrogel-coated coils versus inert platinum coils: effects on packing density, coil length and quantity, procedure performance, cost, length of hospital stay, and durability of therapy. *Stroke* 2006;37:1443–50.
- 37 Fiorella D, Albuquerque FC, McDougall CG. Durability of aneurysm embolization with matrix detachable coils. *Neurosurgery* 2006;58:51–9. discussion 51–9.
- 38 Cloft HJ. HydroCoil for Endovascular Aneurysm Occlusion (HEAL) study: 3–6 month angiographic follow-up results. *AJNR Am J Neuroradiol* 2007;28:152–4.
- 39 Kimchi TJ, Willinsky RA, Spears J, *et al.* Endovascular treatment of intracranial aneurysms with matrix coils: immediate posttreatment results, clinical outcome and follow-up. *Neuroradiology* 2007;49:223–9.
- 40 Niimi Y, Song J, Madrid M, *et al.* Endosaccular treatment of intracranial aneurysms using matrix coils: early experience and midterm follow-up. *Stroke* 2006;37:1028–32.
- 41 Adibi A, Sen A, Mitha AP. Cell therapy for intracranial aneurysms: a review. *World Neurosurg* 2016;86:390–8.
- 42 Marbacher S, Frösén J, Marjamaa J, *et al.* Intraluminal cell transplantation prevents growth and rupture in a model of rupture-prone saccular aneurysms. *Stroke* 2014;45:3684–90.
- 43 Allaire E, Muscatelli-Groux B, Guinault AM, *et al.* Vascular smooth muscle cell endovascular therapy stabilizes already developed aneurysms in a model of aortic injury elicited by inflammation and proteolysis. *Ann Surg* 2004;239:417–27.
- 44 Raymond J, Venne D, Allas S, *et al.* Healing mechanisms in experimental aneurysms. I. Vascular smooth muscle cells and neointima formation. *J Neurosurg* 1999;26:7–20.
- 45 Raymond J, Desfaits AC, Roy D. Fibrinogen and vascular smooth muscle cell grafts promote healing of experimental aneurysms treated by embolization. *Stroke* 1999;30:1657–64.
- 46 Kwon OK, Han MH, Oh CW, *et al.* Embolization with autologous fibroblast-attached platinum coils in canine carotid artery aneurysms: histopathological differences from plain coil embolization. *Invest Radiol* 2003;38:281–7.
- 47 Dai D, Ding YH, Danielson MA, *et al.* Endovascular treatment of experimental aneurysms with use of fibroblast transfected with replication-deficient adenovirus containing bone morphogenetic protein-13 gene. *AJNR Am J Neuroradiol* 2008;29:739–44.
- 48 Dai D, Ding YH, Danielson MA, *et al.* Endovascular treatment of experimental aneurysms by use of fibroblast-coated platinum coils: an angiographic and histopathologic study. *Stroke* 2007;38:170–6.
- 49 Aronson JP, Mitha AP, Hoh BL, *et al.* A novel tissue engineering approach using an endothelial progenitor cell-seeded biopolymer to treat intracranial saccular aneurysms. *J Neurosurg* 2012;117:546–54.
- 50 Marx WE, Cloft HJ, Helm GA, *et al.* Endovascular treatment of experimental aneurysms by use of biologically modified embolic devices: coil-mediated intraaneurysmal delivery of fibroblast tissue allografts. *AJNR Am J Neuroradiol* 2001;22:323–33.
- 51 Kawakami O, Miyamoto S, Hatano T, *et al.* Accelerated embolization healing of aneurysms by polyethylene terephthalate coils seeded with autologous fibroblasts. *Neurosurgery* 2005;56:1075–81. discussion 75–81.
- 52 Li S, Tian Y, Huang X, *et al.* Intravenous transfusion of endothelial colony-forming cells attenuates vascular degeneration after cerebral aneurysm induction. *Brain Res* 2014;1593:65–75.
- 53 Rouchaud A, Journé C, Louedec L, *et al.* Autologous mesenchymal stem cell endografting in experimental cerebrovascular aneurysms. *Neuroradiology* 2013;55:741–9.
- 54 Bianco P, Cao X, Frenette PS, *et al.* The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med* 2013;19:35–42.
- 55 Aoki T, Nozaki K. Preemptive medicine for cerebral aneurysms. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2016;56:552–68.
- 56 Esfahani DR, Viswanathan V, Alaraj A. Nanoparticles and stem cells—has targeted therapy for aneurysms finally arrived? *Neural Res* 2015;37:269–77.
- 57 Yamawaki-Ogata A, Hashizume R, Fu XM, *et al.* Mesenchymal stem cells for treatment of aortic aneurysms. *World J Stem Cells* 2014;6:278–87.
- 58 Adibi A, Eesa M, Wong JH, *et al.* Combined endovascular coiling and intra-aneurysmal allogeneic mesenchymal stromal cell therapy for intracranial aneurysms in a rabbit model: a proof-of-concept study. *J Neurointerv Surg* 2016. doi: 10.1136/neurintsurg-2016-012520 [Epub ahead of print 7 Jul 2016].
- 59 Brinjikji W, Ding YH, Kallmes DF, *et al.* From bench to bedside: utility of the rabbit elastase aneurysm model in preclinical studies of intracranial aneurysm treatment. *J Neurointerv Surg* 2016;8:521–5.
- 60 Altes TA, Cloft HJ, Short JG, *et al.* 1999 ARRS Executive Council Award. Creation of saccular aneurysms in the rabbit: a model suitable for testing endovascular devices. American Roentgen Ray Society. *AJR Am J Roentgenol* 2000;174:349–54.
- 61 Fujiwara NH, Cloft HJ, Marx WF, *et al.* Serial angiography in an elastase-induced aneurysm model in rabbits: evidence for progressive aneurysm enlargement after creation. *AJNR Am J Neuroradiol* 2001;22:698–703.

Hemorrhagic stroke

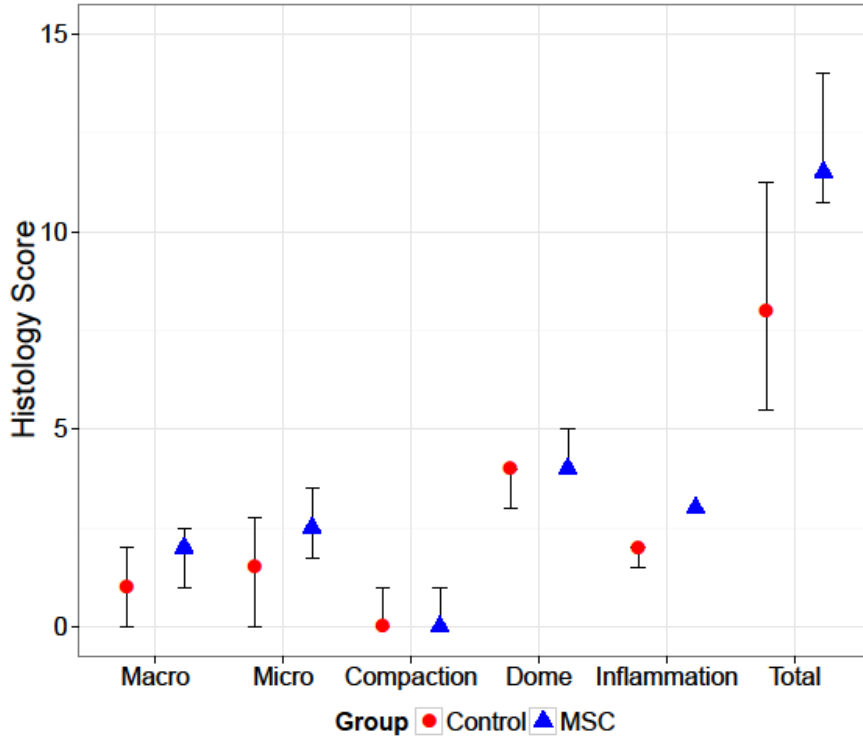
- 62 Dai D, Ding YH, Rezek I, *et al.* Characterizing patterns of endothelialization following coil embolization: a whole-mount, dual immunostaining approach. *J Neurointerv Surg* 2016;8:402–6.
- 63 Dai D, Ding YH, Lewis DA, *et al.* A proposed ordinal scale for grading histology in elastase-induced, saccular aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006;27:132–8.
- 64 Dai D, Ding YH, Kadirvel R, *et al.* A longitudinal immunohistochemical study of the healing of experimental aneurysms after embolization with platinum coils. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006;27:736–41.
- 65 Tsukada T, Rosenfeld M, Ross R, *et al.* Immunocytochemical analysis of cellular components in atherosclerotic lesions. Use of monoclonal antibodies with the Watanabe and fat-fed rabbit. *Arteriosclerosis* 1986;6:601–13.
- 66 Dai D, Ding YH, Danielson MA, *et al.* Histopathologic and immunohistochemical comparison of human, rabbit, and swine aneurysms embolized with platinum coils. *AJNR Am J Neuroradiol* 2005;26:2560–8.
- 67 Quintavalla J, Uziel-Fusi S, Yin J, *et al.* Fluorescently labeled mesenchymal stem cells (MSCs) maintain multilineage potential and can be detected following implantation into articular cartilage defects. *Biomaterials* 2002;23:109–19.
- 68 Fang D, Seo BM, Liu Y, *et al.* Transplantation of mesenchymal stem cells is an optimal approach for plastic surgery. *Stem Cells* 2007;25:1021–8.
- 69 Zhao Q, Gong P, Tan Z, *et al.* Differentiation control of transplanted mesenchymal stem cells (MSCs): a new possible strategy to promote periodontal regeneration. *Med Hypotheses* 2008;70:944–7.
- 70 Dong JD, Gu YQ, Li CM, *et al.* Response of mesenchymal stem cells to shear stress in tissue-engineered vascular grafts. *Acta Pharmacol Sin* 2009;30:530–6.
- 71 O’Cearbhaill ED, Punched MA, Murphy M, *et al.* Response of mesenchymal stem cells to the biomechanical environment of the endothelium on a flexible tubular silicone substrate. *Biomaterials* 2008;29:1610–19.
- 72 Ball SG, Shuttleworth CA, Kielty CM. Platelet-derived growth factor receptors regulate mesenchymal stem cell fate: implications for neovascularization. *Expert Opin Biol Ther* 2010;10:57–71.
- 73 Zhang S, An Q, Li Q, *et al.* Therapeutic benefit of bone marrow-derived endothelial progenitor cell transplantation after experimental aneurysm embolization with coil in rats. *PLoS ONE* 2014;9:e90069.
- 74 Plissonnier D, Henaff M, Poncet P, *et al.* Involvement of antibody-dependent apoptosis in graft rejection. *Transplantation* 2000;69:2601–8.

Supplemental files

Supplemental Table 1. Descriptive statistics for aneurysms geometries and packing density.

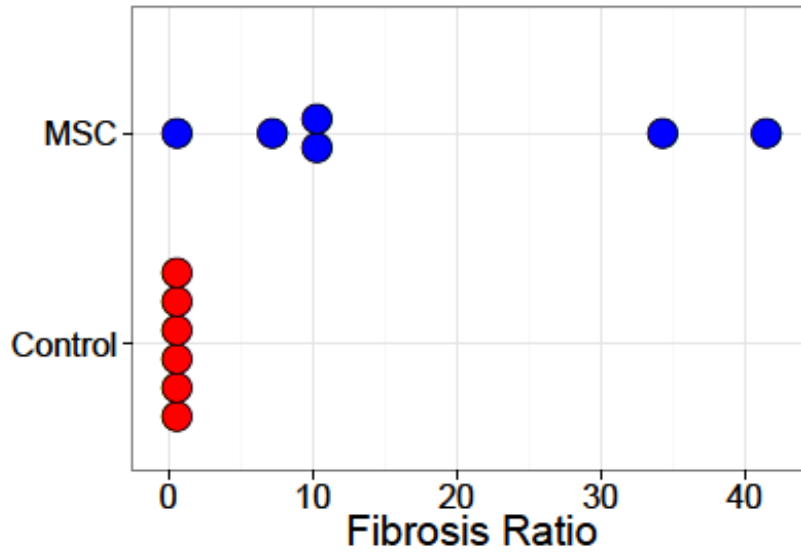
	Control (N=6)	Test (N=7)	p value
Width (mm)			0.373
median	2.8	3	
Q1, Q3	2.62, 3.13	2.1, 3	
Height (mm)			0.637
median	8.35	8.3	
Q1, Q3	7.53, 9.32	7.9, 10.4	
Neck (mm)			0.690
median	2.9	2.7	
Q1, Q3	2.45, 3.57	2.45, 3	
Packing Density (%)			0.010
median	22.5	30	
Q1, Q3	18.8, 24.8	25, 34	

Supplemental Figure 1. Median histology scores for each scoring category and total score. Error bars represent a bootstrapped (10,000 replicate) 95% confidence interval for the median.



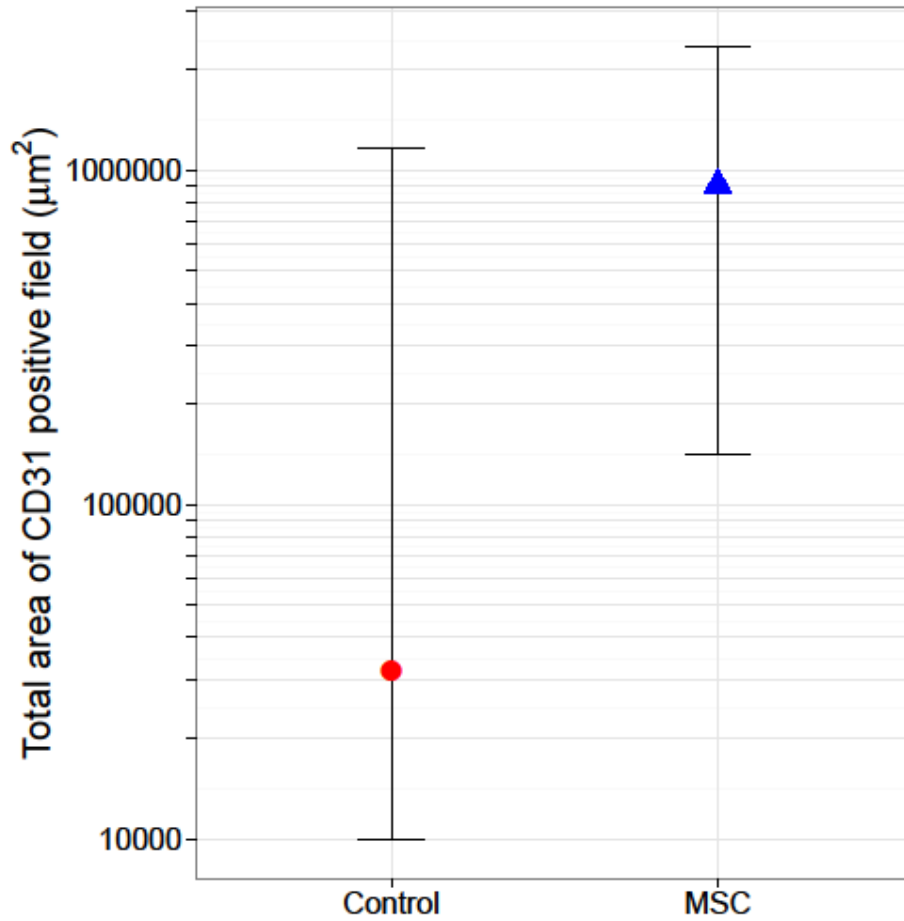
	Control (N=6)	MSC (N=7)	p value
Macro			0.147
Median	1	2	
Q1, Q3	0.25, 1.75	1, 2	
Micro			0.097
Median	1.5	2.5	
Q1, Q3	0.25, 2	2, 3	
Compaction			0.915
Median	0	0	
Q1, Q3	0, 0	0, 0	
Dome			0.068
Median	4	4	
Q1, Q3	4, 4	4, 5	
Inflammation			<0.001
Median	2	3	
Q1, Q3	2, 2	3, 3	
Total			0.019
Median	8	11.5	
Q1, Q3	6.25, 9	11, 12	

Supplemental Figure 2. Dotplot of fibrosis ratio. Each dot represents one subject.



	Control (N=6)	MSC (N=6)	p value
Fibrosis Ratio			0.006
Median	0.13	10.3	
Q1, Q3	0.055, 0.272	7.98, 28.3	

Supplemental Figure 3. Median total area (μm^2) of CD31 positive field viewed from neck orifice. Error bars represent a bootstrapped (10,000 replicate) 95% confidence interval for the median.



	Control (N=6)	MSC (N=7)	p value
Total Area			0.04113
Median	31810	902262	
Q1, Q3	14106, 397315	608991, 1799849	

4. Perspectives pour la thérapie cellulaire dans les anévrismes intracrâniens

Comme nous l'avons rappelé, plusieurs modalités de thérapie cellulaire avec des fibroblastes, des CML, des CPE ou des CSM ont été démontrées comme étant réalisables dans des études pré-cliniques pour le traitement des anévrismes intracrâniens. Il ressort clairement des études qui ont été rapportées jusqu'à présent que tous ces types de cellules peuvent jouer un rôle dans la guérison des anévrismes intracrâniens. Cependant certaines études ont montré un bénéfice supérieur des CSM par rapport aux CML pour la thérapie cellulaire des anévrismes de l'aorte abdominale⁵³⁸.

Nous avons choisi dans les trois options présentées d'utiliser des CSM autologues car le caractère pluripotent des CSM leur permet de reconstituer aussi bien le stock de CML que celui des cellules endothéliales. De plus, les CSM possèdent un effet paracrine important notamment pour la régulation de l'expression des métallo-protéases, ce qui constitue un intérêt majeur pour la stabilisation du thrombus intra-anévrysmal et pourrait faire de la thérapie cellulaire une thérapie adjuvante très intéressante pour diminuer le risque de rupture retardée après traitement par *flow-diverter*. Enfin, les CSM sont facilement accessibles à un prélèvement pour le transfert à l'homme. Tous ces éléments font que les traitements à base de CSM ont un fort potentiel de transfert clinique d'autant plus qu'elles sont déjà largement utilisées dans d'autres indications. D'importants investissements de l'industrie ont permis de mettre au point une vaste gamme d'infrastructures spécialisées, et des outils tels que des banques de cellules spécialisées, et des technologies spécialisées de vulgarisation pour les CSM⁵³⁹. Ces produits ne sont pas disponibles pour les autres types de cellules notamment les CML, les fibroblastes ou les CPE.

Afin d'optimiser la thérapie cellulaire, il est désormais nécessaire de réaliser de nouveaux essais contrôlés randomisés sur de plus grands effectifs. Aussi, il est nécessaire de réaliser des essais avec différentes doses de cellules afin de déterminer la quantité optimale de cellules. Les études précliniques sur la thérapie cellulaire dans les anévrismes n'ont pas soulevé de problème de sécurité jusqu'à présent. Le profil d'innocuité de toute thérapie cellulaire est affecté par de multiples facteurs, y compris le type de cellule, leur source (autologue, allogénique ou xénogénique), la dose et la méthode d'administration. Parmi les 4 types de cellules qui ont été utilisés dans les études liées aux anévrismes, les fibroblastes, les CPE et les CSM ont fait l'objet d'évaluations de sécurité clinique pour d'autres indications, montrant des résultats positifs. De multiples essais de phase II avec des CPE autologues⁵⁴⁰⁻⁵⁴²

n'ont montré aucun événement indésirable majeur. De même, une méta-analyse sur plus de 1000 patients⁵⁴³ n'a montré aucun effet indésirable pour les thérapies intravasculaires utilisant des CSM autologues ou allogéniques, à l'exception d'une fièvre passagère. Enfin, la thérapie cellulaire utilisant des fibroblastes autologues ou allogéniques, avec des protocoles d'administration locale sont déjà approuvés par la Food and Drug Administration des États-Unis qui a conclu à leur innocuité et à leur efficacité.

Le transfert de cette technologie en pratique clinique nécessitera aussi de définir clairement les objectifs du traitement. Le scénario qui semblerait le plus facile à intégrer aux pratiques cliniques est l'ajout de la thérapie cellulaire concomitante à une procédure clinique existante et approuvée (*coiling*, *flow-diverter*, dispositif intra-sacculaire) pour améliorer son résultat et réduire l'incidence de récurrence. Cependant, la thérapie cellulaire pourrait également être considérée à l'avenir comme un traitement préventif pour prévenir la formation d'anévrismes chez certains patients à risques, ou comme un traitement alternatif aux traitements endovasculaires actuellement disponibles. La rentabilité économique de ces stratégies doit également être une préoccupation importante et l'analyse du rapport coût-efficacité des thérapies cellulaires avec un ajustement minimal des pratiques cliniques actuelles pourrait ouvrir la voie vers les premiers essais cliniques de thérapie cellulaire pour les anévrismes intracrâniens.

Nous avons présenté trois options utilisant des cellules autologues afin de réduire le risque de rejet des cellules. Cependant certains considèrent que l'administration de CSM allogéniques est possible chez l'homme⁵⁴⁴. L'option d'une thérapie cellulaire allogénique pour les anévrismes intracrâniens serait très utile car elle pourrait être utilisée en phase aiguë pour les patients qui présentent des anévrismes rompus, étant donné qu'il n'y a pas de temps possible pour le prélèvement et la culture de cellules autologues pour ces patients. Les thérapies cellulaires allogéniques sont également moins coûteuses et plus attrayantes pour les entreprises préparant des cellules à visée thérapeutique.

L'intérêt croissant pour le développement de thérapies individualisées, les résultats très prometteurs obtenus dans les études pré-cliniques ainsi que les motivations financières permettent de réellement penser que la thérapie cellulaire aura une place importante dans un avenir proche pour le traitement de anévrismes intracrâniens^{545, 546}.

V- Conclusion et perspectives

Nous avons vu au cours de ces travaux que la genèse d'un anévrisme intracrânien n'est pas uniquement due à un effet mécanique direct du flux artériel sur les bifurcations, mais plus à ses interactions biologiques entre les éléments figurés du sang (collision) ou du transport transpariétal des protéines plasmatiques (convection). Même si les conditions hémodynamiques jouent un rôle initiateur, elles ne sont qu'un élément parmi d'autres aboutissant à la formation ou à la rupture d'un anévrisme. En plus de ce phénomène mécanique, plusieurs éléments d'ordres biologiques contribuent au développement des lésions anévrysmales et nous avons vu le rôle majeur joué par le thrombus (caillot) intra-anévrysmal. En effet, le caillot intra-anévrysmal est le responsable de la progression des anévrysmes vers la croissance ou la rupture, en étant le site d'activation de nombreuses métalloprotéinases et serine-protéases capables de dégrader la paroi artérielle en provoquant la perte des cellules musculaires lisses et la lyse de la matrice extracellulaire. Il est également un site important d'oxydation en rapport avec le rôle catalyseur du Fe^{++} de l'hème des globules rouges et/ou de la myéloperoxydase des neutrophiles. Cependant, nous avons également vu que le thrombus du sac anévrysmal est un substrat indispensable à la cicatrisation des anévrysmes après traitement endovasculaire. En effet, quelque soit le traitement endovasculaire entrepris, par coils, *flow-diverter* ou dispositif intra-sacculaire, le thrombus intrasacculaire est indispensable pour obtenir une stabilité de l'exclusion anévrysmale. Le thrombus sert dans ce cas de support à la recolonisation de l'anévrysmes par des cellules mésenchymateuses, en particulier au collet, qui permettront la cicatrisation de l'anévrysmes. Cependant, comme nous l'avons vu dans certaines situations, le rôle thrombus intra-anévrysmal peut être ambigu, et être la cause de l'échec du traitement ou de complications graves telles que les ruptures retardées après *flow-diverter*.

Dans les différents travaux présentés dans cette thèse, nous avons pu analyser une partie des phénomènes biologiques impliqués dans le succès ou l'échec des traitements que nous entreprenons. Nous avons au cours de ce travail de thèse réalisé plusieurs expérimentations dans le modèle d'anévrysmes à l'élastase chez le lapin afin de mieux comprendre les mécanismes biologiques mis en jeu par les traitements endovasculaires. L'analyse de ces phénomènes est indispensable pour comprendre les causes d'échec, mais aussi afin de développer de nouveaux outils biologiquement actifs pour le traitement des anévrysmes intracrâniens. Nous avons ainsi proposé le développement de stents *flow-*

diverters **biologiquement actifs** grâce à leur revêtement par un peptide biomimétique permettant d'accélérer la recolonisation endothéliale et de diminuer l'activation des polynucléaires.

Parmi les différentes stratégies possibles, nous avons également proposé dans ce travail trois approches différentes pour une thérapie cellulaire par voie endovasculaire dans le traitement des anévrysmes intracrâniens, utilisant des cellules souches mésenchymateuses autologues. Dans nos travaux, cette thérapie cellulaire a montré des résultats très encourageants en permettant une recolonisation mésenchymateuse du thrombus intra-anévrysmal et permettant une cicatrisation accélérée de l'anévrysme. La thérapie cellulaire avec des cellules souches mésenchymateuses autologues est déjà utilisée en pratique clinique dans certaines indications chez l'homme. Les résultats que nous rapportons permettent d'envisager la thérapie cellulaire dans un futur proche pour le traitement des anévrysmes intracrâniens, soit seule, soit plus probablement en association aux dispositifs métalliques endovasculaires actuellement disponibles.

L'une des clés pour la stabilité du traitement endovasculaire est d'obtenir un thrombus intra-anévrysmal qui soit le support d'une recolonisation mésenchymateuse satisfaisante. Une autre approche serait de favoriser la thrombose du sac anévrysmal tout en diminuant son activité protéolytique pour la paroi et son activité fibinolytique responsable des phénomènes de recanalisation secondaire. Dans cet objectif, la vectorisation locale de traitements anti-fibrinolytiques par les dispositifs endovasculaires eux-mêmes, tels que l'acide tranéxamique (Exacyl) pourrait permettre d'obtenir un thrombus intra-anévrysmal moins fibrinolytique et servant de support à la cicatrisation.

Au total, le traitement des anévrysmes intracrâniens ne peut plus être basé uniquement sur des considérations mécaniques. Le développement des futurs dispositifs endovasculaires devra inclure une dimension biologique pour permettre le développement de thérapies individualisées et optimiser la cicatrisation complète des anévrysmes intracrâniens. Cependant, ce changement de stratégie ne peut se faire sans une implication importante de l'industrie biomédicale et il semble capital que l'ensemble des acteurs soient orientés dans cette voie.

REFERENCES

1. Brisman JL, Song JK, Newell DW. Cerebral aneurysms. *The New England journal of medicine*. 2006;355:928-939
2. Vega C, Kwoon JV, Lavine SD. Intracranial aneurysms: Current evidence and clinical practice. *Am Fam Physician*. 2002;66:601-608
3. Nakatomi H, Segawa H, Kurata A, Shiokawa Y, Nagata K, Kamiyama H, et al. Clinicopathological study of intracranial fusiform and dolichoectatic aneurysms : Insight on the mechanism of growth. *Stroke*. 2000;31:896-900
4. Massoud TF, Turjman F, Ji C, Vinuela F, Guglielmi G, Gobin YP, et al. Endovascular treatment of fusiform aneurysms with stents and coils: Technical feasibility in a swine model. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1995;16:1953-1963
5. Rouchaud A, Brandt MD, Rydberg AM, Kadirvel R, Flemming K, Kallmes DF, et al. Prevalence of intracranial aneurysms in patients with aortic aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2016;37:1664-1668
6. Vlak MH, Algra A, Brandenburg R, Rinkel GJ. Prevalence of unruptured intracranial aneurysms, with emphasis on sex, age, comorbidity, country, and time period: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2011;10:626-636
7. Ingall T, Asplund K, Mahonen M, Bonita R. A multinational comparison of subarachnoid hemorrhage epidemiology in the who monica stroke study. *Stroke*. 2000;31:1054-1061
8. Labovitz DL, Halim AX, Brent B, Boden-Albala B, Hauser WA, Sacco RL. Subarachnoid hemorrhage incidence among whites, blacks and caribbean hispanics: The northern manhattan study. *Neuroepidemiology*. 2006;26:147-150
9. Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Barker-Collo SL, Parag V. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: A systematic review. *Lancet Neurol*. 2009;8:355-369
10. Wiebers DO, Whisnant JP, Huston J, 3rd, Meissner I, Brown RD, Jr., Piegras DG, et al. Unruptured intracranial aneurysms: Natural history, clinical outcome, and risks of surgical and endovascular treatment. *Lancet*. 2003;362:103-110
11. van Crevel H, Habbema JD, Braakman R. Decision analysis of the management of incidental intracranial saccular aneurysms. *Neurology*. 1986;36:1335-1339
12. Juvela S, Porras M, Poussa K. Natural history of unruptured intracranial aneurysms: Probability of and risk factors for aneurysm rupture. *J Neurosurg*. 2000;93:379-387
13. Asari S, Ohmoto T. Natural history and risk factors of unruptured cerebral aneurysms. *Clin Neurol Neurosurg*. 1993;95:205-214
14. Weir B, Disney L, Karrison T. Sizes of ruptured and unruptured aneurysms in relation to their sites and the ages of patients. *J Neurosurg*. 2002;96:64-70
15. Brennan JW, Schwartz ML. Unruptured intracranial aneurysms: Appraisal of the literature and suggested recommendations for surgery, using evidence-based medicine criteria. *Neurosurgery*. 2000;47:1359-1371; discussion 1371-1352
16. Graf CJ. Prognosis for patients with nonsurgically-treated aneurysms. Analysis of the cooperative study of intracranial aneurysms and subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 1971;35:438-443
17. Tsutsumi K, Ueki K, Morita A, Kirino T. Risk of rupture from incidental cerebral aneurysms. *J Neurosurg*. 2000;93:550-553
18. Wermer MJ, van der Schaaf IC, Algra A, Rinkel GJ. Risk of rupture of unruptured intracranial aneurysms in relation to patient and aneurysm characteristics: An updated meta-analysis. *Stroke*. 2007;38:1404-1410
19. Backes D, Vergouwen MD, Tiel Groenestege AT, Bor AS, Velthuis BK, Greving JP, et al. Phases score for prediction of intracranial aneurysm growth. *Stroke*. 2015;46:1221-1226
20. Greving JP, Wermer MJ, Brown RD, Jr., Morita A, Juvela S, Yonekura M, et al. Development of the phases score for prediction of risk of rupture of intracranial aneurysms: A pooled analysis of six prospective cohort studies. *Lancet Neurol*. 2014;13:59-66

21. Bourcier R, Redon R, Desal H. Genetic investigations on intracranial aneurysm: Update and perspectives. *J Neuroradiol.* 2015;42:67-71
22. Alfano JM, Kolega J, Natarajan SK, Xiang J, Paluch RA, Levy EI, et al. Intracranial aneurysms occur more frequently at bifurcation sites that typically experience higher hemodynamic stresses. *Neurosurgery.* 2013;73:497-505
23. Geers AJ, Morales HG, Larrabide I, Butakoff C, Bijlenga P, Frangi AF. Wall shear stress at the initiation site of cerebral aneurysms. *Biomech Model Mechanobiol.* 2016
24. Can A, Du R. Association of hemodynamic factors with intracranial aneurysm formation and rupture: Systematic review and meta-analysis. *Neurosurgery.* 2016;78:510-520
25. Kadirvel R, Ding YH, Dai D, Zakaria H, Robertson AM, Danielson MA, et al. The influence of hemodynamic forces on biomarkers in the walls of elastase-induced aneurysms in rabbits. *Neuroradiology.* 2007;49:1041-1053
26. Sanchez M, Ecker O, Ambard D, Jourdan F, Nicoud F, Mendez S, et al. Intracranial aneurysmal pulsatility as a new individual criterion for rupture risk evaluation: Biomechanical and numeric approach (irras project). *AJNR Am J Neuroradiol.* 2014;35:1765-1771
27. Cebra JR, Duan X, Chung BJ, Putman C, Aziz K, Robertson AM. Wall mechanical properties and hemodynamics of unruptured intracranial aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2015;36:1695-1703
28. Fontaine V, Jacob MP, Houard X, Rossignol P, Plissonnier D, Angles-Cano E, et al. Involvement of the mural thrombus as a site of protease release and activation in human aortic aneurysms. *Am J Pathol.* 2002;161:1701-1710
29. Fontaine V, Touat Z, Mtairag el M, Vranckx R, Louedec L, Houard X, et al. Role of leukocyte elastase in preventing cellular re-colonization of the mural thrombus. *Am J Pathol.* 2004;164:2077-2087
30. Frosen J, Marjamaa J, Myllarniemi M, Abo-Ramadan U, Tulamo R, Niemela M, et al. Contribution of mural and bone marrow-derived neointimal cells to thrombus organization and wall remodeling in a microsurgical murine saccular aneurysm model. *Neurosurgery.* 2006;58:936-944; discussion 936-944
31. Frosen J, Piippo A, Paetau A, Kangasniemi M, Niemela M, Hernesniemi J, et al. Growth factor receptor expression and remodeling of saccular cerebral artery aneurysm walls: Implications for biological therapy preventing rupture. *Neurosurgery.* 2006;58:534-541; discussion 534-541
32. Cebra J, Ollikainen E, Chung BJ, Mut F, Sippola V, Jahromi BR, et al. Flow conditions in the intracranial aneurysm lumen are associated with inflammation and degenerative changes of the aneurysm wall. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2016
33. Frolov SV, Sindeev SV, Liepsch D, Balasso A. Experimental and cfd flow studies in an intracranial aneurysm model with newtonian and non-newtonian fluids. *Technol Health Care.* 2016;24:317-333
34. Le TB, Troolin DR, Amatya D, Longmire EK, Sotiropoulos F. Vortex phenomena in sidewall aneurysm hemodynamics: Experiment and numerical simulation. *Ann Biomed Eng.* 2013;41:2157-2170
35. Biasetti J, Spazzini PG, Swedenborg J, Gasser TC. An integrated fluid-chemical model toward modeling the formation of intra-luminal thrombus in abdominal aortic aneurysms. *Front Physiol.* 2012;3:266
36. Michel J-B. Biology of vascular wall dilation and rupture. . In: Press OU, ed. Oxford, UK; 2016.
37. Aoki T, Kataoka H, Ishibashi R, Nozaki K, Morishita R, Hashimoto N. Reduced collagen biosynthesis is the hallmark of cerebral aneurysm: Contribution of interleukin-1beta and nuclear factor-kappaB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:1080-1086
38. Aoki T, Nishimura M, Kataoka H, Ishibashi R, Nozaki K, Hashimoto N. Reactive oxygen species modulate growth of cerebral aneurysms: A study using the free radical scavenger edaravone and p47phox(-/-) mice. *Lab Invest.* 2009;89:730-741
39. Aoki T, Kataoka H, Shimamura M, Nakagami H, Wakayama K, Moriwaki T, et al. Nf-kappaB is a key mediator of cerebral aneurysm formation. *Circulation.* 2007;116:2830-2840

40. Kurki MI, Hakkinen SK, Frosen J, Tulamo R, von und zu Fraunberg M, Wong G, et al. Upregulated signaling pathways in ruptured human saccular intracranial aneurysm wall: An emerging regulative role of toll-like receptor signaling and nuclear factor-kappaB, hypoxia-inducible factor-1a, and ets transcription factors. *Neurosurgery*. 2011;68:1667-1675; discussion 1675-1666
41. Frosen J, Tulamo R, Paetau A, Laaksamo E, Korja M, Laakso A, et al. Saccular intracranial aneurysm: Pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol*. 2012;123:773-786
42. Tulamo R, Frosen J, Hernesniemi J, Niemela M. Inflammatory changes in the aneurysm wall: A review. *J Neurointerv Surg*. 2010;2:120-130
43. Chalouhi N, Ali MS, Jabbour PM, Tjoumakaris SI, Gonzalez LF, Rosenwasser RH, et al. Biology of intracranial aneurysms: Role of inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012;32:1659-1676
44. Aoki T, Kataoka H, Morimoto M, Nozaki K, Hashimoto N. Macrophage-derived matrix metalloproteinase-2 and -9 promote the progression of cerebral aneurysms in rats. *Stroke*. 2007;38:162-169
45. Newby AC. Matrix metalloproteinase inhibition therapy for vascular diseases. *Vascul Pharmacol*. 2012;56:232-244
46. DeLeo MJ, 3rd, Gounis MJ, Hong B, Ford JC, Wakhloo AK, Bogdanov AA, Jr. Carotid artery brain aneurysm model: In vivo molecular enzyme-specific mr imaging of active inflammation in a pilot study. *Radiology*. 2009;252:696-703
47. Gounis MJ, Vedantham S, Weaver JP, Puri AS, Brooks CS, Wakhloo AK, et al. Myeloperoxidase in human intracranial aneurysms: Preliminary evidence. *Stroke*. 2014;45:1474-1477
48. Gounis MJ, van der Bom IM, Wakhloo AK, Zheng S, Chueh JY, Kuhn AL, et al. Mr imaging of myeloperoxidase activity in a model of the inflamed aneurysm wall. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2015;36:146-152
49. Coutard M, Touat Z, Houard X, Leclercq A, Michel JB. Thrombus versus wall biological activities in experimental aortic aneurysms. *J Vasc Res*. 2010;47:355-366
50. Fontaine V, Touat Z, Mtairag el M, Vranckx R, Louedec L, Houard X, et al. Role of leukocyte elastase in preventing cellular re-colonization of the mural thrombus. *Am J Pathol*. 2004;164:2077-2087
51. Aoki T, Kataoka H, Ishibashi R, Nozaki K, Egashira K, Hashimoto N. Impact of monocyte chemoattractant protein-1 deficiency on cerebral aneurysm formation. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2009;40:942-951
52. Aoki T, Kataoka H, Morimoto M, Nozaki K, Hashimoto N. Macrophage-derived matrix metalloproteinase-2 and -9 promote the progression of cerebral aneurysms in rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2007;38:162-169
53. Aoki T, Kataoka H, Moriwaki T, Nozaki K, Hashimoto N. Role of timp-1 and timp-2 in the progression of cerebral aneurysms. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2007;38:2337-2345
54. Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2008;75:346-359
55. Aoki T, Kataoka H, Moriwaki T, Nozaki K, Hashimoto N. Role of timp-1 and timp-2 in the progression of cerebral aneurysms. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2007;38:2337-2345
56. Van Nes MC, Herrmann FR, Gold G, Michel JP, Rizzoli R. Does the mini nutritional assessment predict hospitalization outcomes in older people? *Age Ageing*. 2001;30:221-226
57. Tulamo R, Frosen J, Junnikkala S, Paetau A, Kangasniemi M, Pelaez J, et al. Complement system becomes activated by the classical pathway in intracranial aneurysm walls. *Lab Invest*. 2010;90:168-179
58. Tulamo R, Frosen J, Junnikkala S, Paetau A, Pitkaniemi J, Kangasniemi M, et al. Complement activation associates with saccular cerebral artery aneurysm wall degeneration and rupture. *Neurosurgery*. 2006;59:1069-1076; discussion 1076-1067
59. Tulamo R, Frosen J, Laaksamo E, Niemela M, Laakso A, Hernesniemi J. [why does the cerebral artery aneurysm rupture?]. *Duodecim*. 2011;127:244-252

60. Passero SG, Calchetti B, Bartalini S. Intracranial bleeding in patients with vertebrobasilar dolichoectasia. *Stroke*. 2005;36:1421-1425
61. Bouzeghrane F, Darsaut T, Salazkin I, Ogoudikpe C, Gevry G, Raymond J. Matrix metalloproteinase-9 may play a role in recanalization and recurrence after therapeutic embolization of aneurysms or arteries. *J Vasc Interv Radiol*. 2007;18:1271-1279
62. Pyysalo MJ, Pyysalo LM, Pessi T, Karhunen PJ, Lehtimäki T, Oksala N, et al. Bacterial DNA findings in ruptured and unruptured intracranial aneurysms. *Acta Odontol Scand*. 2016;74:315-320
63. Pyysalo MJ, Pyysalo LM, Pessi T, Karhunen PJ, Ohman JE. The connection between ruptured cerebral aneurysms and odontogenic bacteria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84:1214-1218
64. Turjman AS, Turjman F, Edelman ER. Role of fluid dynamics and inflammation in intracranial aneurysm formation. *Circulation*. 2014;129:373-382
65. Guglielmi G, Vinuela F, Duckwiler G, Dion J, Lylyk P, Berenstein A, et al. Endovascular treatment of posterior circulation aneurysms by electrothrombosis using electrically detachable coils. *J Neurosurg*. 1992;77:515-524
66. Molyneux A, Kerr R, Stratton I, Sandercock P, Clarke M, Shrimpton J, et al. International subarachnoid aneurysm trial (isat) of neurosurgical clipping versus endovascular coiling in 2143 patients with ruptured intracranial aneurysms: A randomised trial. *Lancet*. 2002;360:1267-1274
67. Brinjikji W, Rabinstein AA, Nasr DM, Lanzino G, Kallmes DF, Cloft HJ. Better outcomes with treatment by coiling relative to clipping of unruptured intracranial aneurysms in the united states, 2001-2008. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2011;32:1071-1075
68. Krings T, Hans FJ, Moller-Hartmann W, Brunn A, Thiex R, Schmitz-Rode T, et al. Treatment of experimentally induced aneurysms with stents. *Neurosurgery*. 2005;56:1347-1359; discussion 1360
69. Fujiwara NH, Kallmes DF. Healing response in elastase-induced rabbit aneurysms after embolization with a new platinum coil system. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2002;23:1137-1144
70. Brinjikji W, Kallmes DF, Kadirvel R. Mechanisms of healing in coiled intracranial aneurysms: A review of the literature. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2015;36:1216-1222
71. Pandey AS, San Antonio JD, Addya S, Surrey S, Fortina P, Van Bockstaele EJ, et al. Mechanisms of endothelial cell attachment, proliferation, and differentiation on 4 types of platinum-based endovascular coils. *World Neurosurg*. 2014;82:684-695
72. Brinjikji W, Kallmes DF, Kadirvel R. Mechanisms of healing in coiled intracranial aneurysms: A review of the literature. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2014
73. Raymond J, Venne D, Allas S, Roy D, Oliva VL, Denbow N, et al. Healing mechanisms in experimental aneurysms. I. Vascular smooth muscle cells and neointima formation. *J Neuroradiol*. 1999;26:7-20
74. Hino K, Konishi Y, Shimada A, Kurita H, Sato E, Hara M, et al. Morphologic changes in neointimal proliferation in an experimental aneurysm after coil embolization: Effect of factor xiii administration. *Neuroradiology*. 2004;46:996-1005
75. Raymond J, Roy D. Safety and efficacy of endovascular treatment of acutely ruptured aneurysms. *Neurosurgery*. 1997;41:1235-1245; discussion 1245-1236
76. Molyneux A, Kerr R. International subarachnoid aneurysm trial. *J Neurosurg*. 1999;91:352-353
77. Molyneux AJ, Kerr RS, Yu LM, Clarke M, Sneade M, Yarnold JA, et al. International subarachnoid aneurysm trial (isat) of neurosurgical clipping versus endovascular coiling in 2143 patients with ruptured intracranial aneurysms: A randomised comparison of effects on survival, dependency, seizures, rebleeding, subgroups, and aneurysm occlusion. *Lancet*. 2005;366:809-817
78. Molyneux AJ, Birks J, Clarke A, Sneade M, Kerr RS. The durability of endovascular coiling versus neurosurgical clipping of ruptured cerebral aneurysms: 18 year follow-up of the uk cohort of the international subarachnoid aneurysm trial (isat). *Lancet*. 2015;385:691-697

79. Brinjikji W, Rabinstein AA, Lanzino G, Kallmes DF, Cloft HJ. Effect of age on outcomes of treatment of unruptured cerebral aneurysms: A study of the national inpatient sample 2001-2008. *Stroke*. 2011;42:1320-1324
80. Johnston SC, Mendis S, Mathers CD. Global variation in stroke burden and mortality: Estimates from monitoring, surveillance, and modelling. *Lancet Neurol*. 2009;8:345-354
81. Ferns SP, Sprengers ME, van Rooij WJ, Rinkel GJ, van Rijn JC, Bipat S, et al. Coiling of intracranial aneurysms: A systematic review on initial occlusion and reopening and retreatment rates. *Stroke*. 2009;40:e523-529
82. Raymond J, Darsaut T, Salazkin I, Gevry G, Bouzeghrane F. Mechanisms of occlusion and recanalization in canine carotid bifurcation aneurysms embolized with platinum coils: An alternative concept. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2008;29:745-752
83. Abdihalim M, Watanabe M, Chaudhry SA, Jagadeesan B, Suri MF, Qureshi AI. Are coil compaction and aneurysmal growth two distinct etiologies leading to recurrence following endovascular treatment of intracranial aneurysm? *J Neuroimaging*. 2014;24:171-175
84. Dorfer C, Gruber A, Standhardt H, Bavinzski G, Knosp E. Management of residual and recurrent aneurysms after initial endovascular treatment. *Neurosurgery*. 2012;70:537-553; discussion 553-534
85. Naggara ON, White PM, Guilbert F, Roy D, Weill A, Raymond J. Endovascular treatment of intracranial unruptured aneurysms: Systematic review and meta-analysis of the literature on safety and efficacy. *Radiology*. 2010;256:887-897
86. Raymond J, Guilbert F, Weill A, Georganos SA, Juravsky L, Lambert A, et al. Long-term angiographic recurrences after selective endovascular treatment of aneurysms with detachable coils. *Stroke*. 2003;34:1398-1403
87. Lecler A, Raymond J, Rodriguez-Regent C, Al Shareef F, Trystram D, Godon-Hardy S, et al. Intracranial aneurysms: Recurrences more than 10 years after endovascular treatment-a prospective cohort study, systematic review, and meta-analysis. *Radiology*. 2015;277:173-180
88. Hodgson TJ, Carroll T, Jellinek DA. Subarachnoid hemorrhage due to late recurrence of a previously unruptured aneurysm after complete endovascular occlusion. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1998;19:1939-1941
89. Murayama Y, Vinuela F, Duckwiler GR, Gobin YP, Guglielmi G. Embolization of incidental cerebral aneurysms by using the Guglielmi detachable coil system. *J Neurosurg*. 1999;90:207-214
90. Soize S, Gawlitza M, Raoult H, Pierot L. Imaging follow-up of intracranial aneurysms treated by endovascular means: Why, when, and how? *Stroke*. 2016
91. Gallas S, Pasco A, Cottier JP, Gabrillargues J, Drouineau J, Cognard C, et al. A multicenter study of 705 ruptured intracranial aneurysms treated with Guglielmi detachable coils. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2005;26:1723-1731
92. Johnston SC, Dowd CF, Higashida RT, Lawton MT, Duckwiler GR, Gress DR, et al. Predictors of rehemorrhage after treatment of ruptured intracranial aneurysms: The cerebral aneurysm rerupture after treatment (carat) study. *Stroke*. 2008;39:120-125
93. Pierot L, Cognard C, Anxionnat R, Ricolfi F, Investigators C. Remodeling technique for endovascular treatment of ruptured intracranial aneurysms had a higher rate of adequate postoperative occlusion than did conventional coil embolization with comparable safety. *Radiology*. 2011;258:546-553
94. Pierot L, Cognard C, Spelle L, Moret J. Safety and efficacy of balloon remodeling technique during endovascular treatment of intracranial aneurysms: Critical review of the literature. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2012;33:12-15
95. Moret J, Cognard C, Weill A, Castaings L, Rey A. The 'remodelling technique' in the treatment of wide neck intracranial aneurysms: Angiographic results and clinical follow-up in 56 cases. *Interventional Neuroradiology*. 1997;3:21-35
96. Nakahara T, Hidaka T, Kutsuna M, Yamanaka M, Sakoda K. Intraaneurysmal embolization for wide-necked aneurysms - remodeling technique, combined neck-clipping and coiling therapy, scaffolding technique. *Interventional Neuroradiology*. 2000;6:95-101

97. Mu SQ, Yang XJ, Li YX, Zhang YP, Lü M, Wu ZX. Endovascular treatment of wide-necked intracranial aneurysms using of "remodeling technique" with the hyperform balloon. *Chin. Med. J.* 2008;121:725-729
98. Gentric JC, Biondi A, Piotin M, Mounayer C, Lobotesis K, Bonafe A, et al. Balloon remodeling may improve angiographic results of stent-assisted coiling of unruptured intracranial aneurysms. *Neurosurgery.* 2015;76:441-445; discussion 445
99. Piotin M, Blanc R, Spelle L, Mounayer C, Piantino R, Schmidt PJ, et al. Stent-assisted coiling of intracranial aneurysms: Clinical and angiographic results in 216 consecutive aneurysms. *Stroke.* 2010;41:110-115
100. Biondi A, Janardhan V, Katz JM, Salvaggio K, Riina HA, Gobin YP. Neuroform stent-assisted coil embolization of wide-neck intracranial aneurysms: Strategies in stent deployment and midterm follow-up. *Neurosurgery.* 2007;61:460-468; discussion 468-469
101. Gentric JC, Biondi A, Piotin M, Mounayer C, Lobotesis K, Bonafe A, et al. Safety and efficacy of neuroform for treatment of intracranial aneurysms: A prospective, consecutive, french multicentric study. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2013;34:1203-1208
102. Pierot L, Rajpal G, Kadziolka K, Barbe C. The place for remodeling technique and stenting in the endovascular management of intracranial aneurysms: A single-center analysis from 2008 to 2010. *Neuroradiology.* 2012;54:973-979
103. Lubicz B, Bandeira A, Bruneau M, Dewindt A, Baleriaux D, De Witte O. Stenting is improving and stabilizing anatomical results of coiled intracranial aneurysms. *Neuroradiology.* 2009;51:419-425
104. Palacio S, Hart RG, Pearce LA, Anderson DC, Sharma M, Birnbaum LA, et al. Effect of addition of clopidogrel to aspirin on stroke incidence: Meta-analysis of randomized trials. *Int J Stroke.* 2015;10:686-691
105. Piotin M, Mandai S, Murphy KJ, Sugiu K, Gailloud P, Martin JB, et al. Dense packing of cerebral aneurysms: An in vitro study with detachable platinum coils. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2000;21:757-760
106. Abrahams JM, Diamond SL, Hurst RW, Zager EL, Grady MS. Topic review: Surface modifications enhancing biological activity of guglielmi detachable coils in treating intracranial aneurysms. *Surg Neurol.* 2000;54:34-40; discussion 40-31
107. Crobeddu E, Lanzino G, Kallmes DF, Cloft HJ. Review of 2 decades of aneurysm-recurrence literature, part 1: Reducing recurrence after endovascular coiling. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2013;34:266-270
108. Kallmes DF, Ding YH, Dai D, Kadirvel R, Lewis DA, Cloft HJ. A new endoluminal, flow-disrupting device for treatment of saccular aneurysms. *Stroke.* 2007;38:2346-2352
109. Brinjikji W, Murad MH, Lanzino G, Cloft HJ, Kallmes DF. Endovascular treatment of intracranial aneurysms with flow diverters: A meta-analysis. *Stroke.* 2013;44:442-447
110. Fiorella D, Lylyk P, Szikora I, Kelly ME, Albuquerque FC, McDougall CG, et al. Curative cerebrovascular reconstruction with the pipeline embolization device: The emergence of definitive endovascular therapy for intracranial aneurysms. *J Neurointerv Surg.* 2009;1:56-65
111. Martin AR, Cruz JP, Matouk CC, Spears J, Marotta TR. The pipeline flow-diverting stent for exclusion of ruptured intracranial aneurysms with difficult morphologies. *Neurosurgery.* 2012;70:21-28; discussion 28
112. Dai D, Ding YH, Kadirvel R, Rad AE, Lewis DA, Kallmes DF. Patency of branches after coverage with multiple telescoping flow-diverter devices: An in vivo study in rabbits. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2012;33:171-174
113. Szikora I, Berentei Z, Kulcsar Z, Marosfoi M, Vajda ZS, Lee W, et al. Treatment of intracranial aneurysms by functional reconstruction of the parent artery: The budapest experience with the pipeline embolization device. *Am J Neuroradiol.* 2010;31:1139-1147
114. Eker OF, Boudjeltia KZ, Jerez RA, Le Bars E, Sanchez M, Bonafe A, et al. Mr derived volumetric flow rate waveforms of internal carotid artery in patients treated for unruptured intracranial aneurysms by flow diversion technique. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2015;35:2070-2079
115. Kadirvel R, Ding YH, Dai D, Rezek I, Lewis DA, Kallmes DF. Cellular mechanisms of aneurysm occlusion after treatment with a flow diverter. *Radiology.* 2014;270:394-399

116. Augsburger L, Farhat M, Reymond P, Fonck E, Kulcsar Z, Stergiopoulos N, et al. Effect of flow diverter porosity on intraaneurysmal blood flow. *Klinische Neuroradiologie*. 2009;19:204-214
117. Bartolini B, Blanc R, Pistocchi S, Redjem H, Piotin M. "Y" and "x" stent-assisted coiling of complex and wide-neck intracranial bifurcation aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2014;35:2153-2158
118. Spiotta AM, Lena J, Chaudry MI, Turner RD, Turk AS. Y-stenting for bifurcation aneurysm coil embolization: What is the risk? *Stroke Res Treat*. 2014;2014:762389
119. Raymond J, Darsaut TE, Bing F, Makoyeva A, Kotowski M, Gevry G, et al. Stent-assisted coiling of bifurcation aneurysms may improve endovascular treatment: A critical evaluation in an experimental model. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2013;34:570-576
120. de Paula Lucas C, Piotin M, Spelle L, Moret J. Stent-jack technique in stent-assisted coiling of wide-neck aneurysms. *Neurosurgery*. 2008;62:ONS414-416; discussion ONS416-417
121. Cohen JE, Moscovici S, El Hassan HA, Doron O, Itshayek E. T-microstent-assisted coiling in the management of ruptured wide-necked anterior communicating artery aneurysms: Choosing between y, x and t. *J Clin Neurosci*. 2016
122. Pierot L, Biondi A. Endovascular techniques for the management of wide-neck intracranial bifurcation aneurysms: A critical review of the literature. *J Neuroradiol*. 2016;43:167-175
123. Bang JS, Kim CH, Kwon BJ, Park SC, Kim Y. The difficulties and risks of y-stent-assisted coiling: A comparison of first and second stenting procedures. *World Neurosurg*. 2016;88:146-153
124. Iosif C, Mounayer C. Flow-diverter stents for the treatment of saccular middle cerebral artery bifurcation aneurysms: Is "unsuitable" the right conclusion? *AJNR Am J Neuroradiol*. 2016;37:E13
125. Saleme S, Iosif C, Ponomarjova S, Mendes G, Camilleri Y, Caire F, et al. Flow-diverting stents for intracranial bifurcation aneurysm treatment. *Neurosurgery*. 2014;75:623-631; quiz 631
126. Iosif C, Ponsonnard S, Roussie A, Saleme S, Carles P, Ponomarjova S, et al. Jailed artery ostia modifications after flow-diverting stent deployment at arterial bifurcations: A scanning electron microscopy translational study. *Neurosurgery*. 2016;79:473-480
127. Iosif C, Saleme S, Ponsonnard S, Carles P, Silveira EP, Waihrich E, et al. Intravascular optical coherence tomography for the evaluation of arterial bifurcations covered by flow diverters. *J Neurointerv Surg*. 2016
128. Caroff J, Neki H, Mihalea C, D'Argento F, Abdel Khalek H, Ikka L, et al. Flow-diverter stents for the treatment of saccular middle cerebral artery bifurcation aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2016;37:279-284
129. Gawlitza M, Januel AC, Tall P, Bonneville F, Cognard C. Flow diversion treatment of complex bifurcation aneurysms beyond the circle of willis: A single-center series with special emphasis on covered cortical branches and perforating arteries. *J Neurointerv Surg*. 2016;8:481-487
130. Fahed R, Gentric JC, Salazkin I, Gevry G, Raymond J, Darsaut TE. Flow diversion of bifurcation aneurysms is more effective when the jailed branch is occluded: An experimental study in a novel canine model. *J Neurointerv Surg*. 2016
131. Pistocchi S, Blanc R, Bartolini B, Piotin M. Flow diverters at and beyond the level of the circle of willis for the treatment of intracranial aneurysms. *Stroke*. 2012;43:1032-1038
132. Ding YH, Lewis DA, Kadirvel R, Dai D, Kallmes DF. The woven endobridge: A new aneurysm occlusion device. *AJNR. American journal of neuroradiology*. 2011;32:607-611
133. Pierot L, Liebig T, Sychra V, Kadziolka K, Dorn F, Strasilla C, et al. Intrasaccular flow-disruption treatment of intracranial aneurysms: Preliminary results of a multicenter clinical study. *AJNR. American journal of neuroradiology*. 2012;33:1232-1238
134. Pierot L, Klisch J, Cognard C, Szikora I, Mine B, Kadziolka K, et al. Endovascular web flow disruption in middle cerebral artery aneurysms: Preliminary feasibility, clinical, and anatomical results in a multicenter study. *Neurosurgery*. 2013;73:27-34; discussion 34-25

135. Lubicz B, Mine B, Collignon L, Brisbois D, Duckwiler G, Strother C. Web device for endovascular treatment of wide-neck bifurcation aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2013;34:1209-1214
136. Klisch J, Sychra V, Strasilla C, Liebig T, Fiorella D. The woven endobridge cerebral aneurysm embolization device (web ii): Initial clinical experience. *Neuroradiology.* 2011;53:599-607
137. Ding YH, Lewis DA, Kadirvel R, Dai D, Kallmes DF. The woven endobridge: A new aneurysm occlusion device. *AJNR. American journal of neuroradiology.* 2011;32:607-611
138. Pierot L, Moret J, Turjman F, Herbreteau D, Raoult H, Barreau X, et al. Web treatment of intracranial aneurysms: Feasibility, complications, and 1-month safety results with the web dl and web sl/sls in the french observatory. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2015
139. Papagiannaki C, Spelle L, Januel AC, Benaissa A, Gauvrit JY, Costalat V, et al. Web intrasaccular flow disruptor-prospective, multicenter experience in 83 patients with 85 aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2014;35:2106-2111
140. Fiorella D, Arthur A, Byrne J, Pierot L, Molyneux A, Duckwiler G, et al. Interobserver variability in the assessment of aneurysm occlusion with the web aneurysm embolization system. *J Neurointerv Surg.* 2014
141. Caroff J, Mihalea C, Dargento F, Neki H, Ikka L, Benachour N, et al. Woven endobridge (web) device for endovascular treatment of ruptured intracranial wide-neck aneurysms: A single-center experience. *Neuroradiology.* 2014;56:755-761
142. Pierot L, Liebig T, Sychra V, Kadziolka K, Dorn F, Strasilla C, et al. Intrasaccular flow-disruption treatment of intracranial aneurysms: Preliminary results of a multicenter clinical study. *AJNR. American journal of neuroradiology.* 2012;33:1232-1238
143. Liebig T, Kabbasch C, Strasilla C, Berlis A, Weber W, Pierot L, et al. Intrasaccular flow disruption in acutely ruptured aneurysms: A multicenter retrospective review of the use of the web. *AJNR. American journal of neuroradiology.* 2015;36:1721-1727
144. Lubicz B, Klisch J, Gauvrit JY, Szikora I, Leonardi M, Liebig T, et al. Web-dl endovascular treatment of wide-neck bifurcation aneurysms: Short- and midterm results in a european study. *AJNR. American journal of neuroradiology.* 2014;35:432-438
145. Papagiannaki C, Spelle L, Januel AC, Benaissa A, Gauvrit JY, Costalat V, et al. Web intrasaccular flow disruptor-prospective, multicenter experience in 83 patients with 85 aneurysms. *AJNR. American journal of neuroradiology.* 2014;35:2106-2111
146. Pierot L, Moret J, Turjman F, Herbreteau D, Raoult H, Barreau X, et al. Web treatment of intracranial aneurysms: Clinical and anatomic results in the french observatory. *AJNR. American journal of neuroradiology.* 2015
147. Allaire E, Muscatelli-Groux B, Guinault AM, Pages C, Goussard A, Mandet C, et al. Vascular smooth muscle cell endovascular therapy stabilizes already developed aneurysms in a model of aortic injury elicited by inflammation and proteolysis. *Annals of surgery.* 2004;239:417-427
148. Adibi A, Sen A, Mitha AP. Cell therapy for intracranial aneurysms: A review. *World Neurosurg.* 2016;86:390-398
149. Marbacher S, Frosen J, Marjamaa J, Anisimov A, Honkanen P, von Gunten M, et al. Intraluminal cell transplantation prevents growth and rupture in a model of rupture-prone saccular aneurysms. *Stroke.* 2014;45:3684-3690
150. Raymond J, Desfaits AC, Roy D. Fibrinogen and vascular smooth muscle cell grafts promote healing of experimental aneurysms treated by embolization. *Stroke.* 1999;30:1657-1664
151. Kwon OK, Han MH, Oh CW, Park IA, Choe G, Lee KH, et al. Embolization with autologous fibroblast-attached platinum coils in canine carotid artery aneurysms: Histopathological differences from plain coil embolization. *Invest Radiol.* 2003;38:281-287
152. Dai D, Ding YH, Danielson MA, Kadirvel R, Helm GA, Lewis DA, et al. Endovascular treatment of experimental aneurysms with use of fibroblast transfected with replication-deficient adenovirus containing bone morphogenetic protein-13 gene. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2008;29:739-744
153. Dai D, Ding YH, Danielson MA, Kadirvel R, Hunter LW, Zhan WZ, et al. Endovascular treatment of experimental aneurysms by use of fibroblast-coated platinum coils: An angiographic and histopathologic study. *Stroke.* 2007;38:170-176

154. Aronson JP, Mitha AP, Hoh BL, Auluck PK, Pomerantseva I, Vacanti JP, et al. A novel tissue engineering approach using an endothelial progenitor cell-seeded biopolymer to treat intracranial saccular aneurysms. *J Neurosurg.* 2012;117:546-554
155. Marx WE, Cloft HJ, Helm GA, Short JG, Do HM, Jensen ME, et al. Endovascular treatment of experimental aneurysms by use of biologically modified embolic devices: Coil-mediated intraaneurysmal delivery of fibroblast tissue allografts. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2001;22:323-333
156. Kawakami O, Miyamoto S, Hatano T, Yamada K, Hashimoto N, Tabata Y. Accelerated embolization healing of aneurysms by polyethylene terephthalate coils seeded with autologous fibroblasts. *Neurosurgery.* 2005;56:1075-1081; discussion 1075-1081
157. Li S, Tian Y, Huang X, Zhang Y, Wang D, Wei H, et al. Intravenous transfusion of endothelial colony-forming cells attenuates vascular degeneration after cerebral aneurysm induction. *Brain Res.* 2014;1593:65-75
158. Rouchaud A, Journe C, Louedec L, Ollivier V, Derkaoui M, Michel JB, et al. Autologous mesenchymal stem cell endografting in experimental cerebrovascular aneurysms. *Neuroradiology.* 2013;55:741-749
159. Bianco P, Cao X, Frenette PS, Mao JJ, Robey PG, Simmons PJ, et al. The meaning, the sense and the significance: Translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med.* 2013;19:35-42
160. Aoki T, Nozaki K. Preemptive medicine for cerebral aneurysms. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2016
161. Esfahani DR, Viswanathan V, Alaraj A. Nanoparticles and stem cells - has targeted therapy for aneurysms finally arrived? *Neurol Res.* 2015;37:269-277
162. Gao Y, Lu Z, Chen C, Cui X, Liu Y, Zheng T, et al. Mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells accelerate intra-aneurysmal tissue organization after treatment with sdf-1alpha-coated coils. *Neurol Res.* 2016;38:333-341
163. Yamawaki-Ogata A, Hashizume R, Fu XM, Usui A, Narita Y. Mesenchymal stem cells for treatment of aortic aneurysms. *World J Stem Cells.* 2014;6:278-287
164. Adibi A, Eesa M, Wong JH, Sen A, Mitha AP. Combined endovascular coiling and intra-aneurysmal allogeneic mesenchymal stromal cell therapy for intracranial aneurysms in a rabbit model: A proof-of-concept study. *J Neurointerv Surg.* 2016
165. Osborne-Pellegrin MJ, Coutard M, Poitevin P, Michel JB, Levy BI. Induction of aneurysms in the rat by a stenosing cotton ligature around the inter-renal aorta. *Int J Exp Pathol.* 1994;75:179-190
166. Brinjikji W, Ding YH, Kallmes DF, Kadirvel R. From bench to bedside: Utility of the rabbit elastase aneurysm model in preclinical studies of intracranial aneurysm treatment. *J Neurointerv Surg.* 2016;8:521-525
167. Bouzegrane F, Naggara O, Kallmes DF, Berenstein A, Raymond J, International Consortium of Neuroendovascular C. In vivo experimental intracranial aneurysm models: A systematic review. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2010;31:418-423
168. Nagata I, Handa H, Hashimoto N, Hazama F. Experimentally induced cerebral aneurysms in rats: Part vi. Hypertension. *Surg Neurol.* 1980;14:477-479
169. Hashimoto N, Handa H, Nagata I, Hazama F. Animal model of cerebral aneurysms: Pathology and pathogenesis of induced cerebral aneurysms in rats. *Neurol Res.* 1984;6:33-40
170. Morimoto M, Miyamoto S, Mizoguchi A, Kume N, Kita T, Hashimoto N. Mouse model of cerebral aneurysm: Experimental induction by renal hypertension and local hemodynamic changes. *Stroke.* 2002;33:1911-1915
171. Zhu YQ, Dai DY, Xing HX, Ding YH, Kadirvel R, Kallmes DF. Concomitant aneurysm detection in an intracranial dolichoectasia mouse model using a microfil polymer perfusion technique. *J Neurointerv Surg.* 2016
172. Chu Y, Wilson K, Gu H, Wegman-Points L, Dooley SA, Pierce GL, et al. Myeloperoxidase is increased in human cerebral aneurysms and increases formation and rupture of cerebral aneurysms in mice. *Stroke.* 2015;46:1651-1656

173. Altes TA, Cloft HJ, Short JG, DeGast A, Do HM, Helm GA, et al. 1999 arrs executive council award. Creation of saccular aneurysms in the rabbit: A model suitable for testing endovascular devices. American roentgen ray society. *AJR Am J Roentgenol.* 2000;174:349-354
174. Krings T, Moller-Hartmann W, Hans FJ, Thiex R, Brunn A, Scherer K, et al. A refined method for creating saccular aneurysms in the rabbit. *Neuroradiology.* 2003;45:423-429
175. Anidjar S, Salzmann JL, Gentric D, Lagneau P, Camilleri JP, Michel JB. Elastase-induced experimental aneurysms in rats. *Circulation.* 1990;82:973-981
176. Sarda-Mantel L, Coutard M, Rouzet F, Raguin O, Vrigneaud JM, Hervatin F, et al. 99mTc-annexin-v functional imaging of luminal thrombus activity in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:2153-2159
177. Abruzzo T, Shengelaia GG, Dawson RC, 3rd, Owens DS, Cawley CM, Gravanis MB. Histologic and morphologic comparison of experimental aneurysms with human intracranial aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1998;19:1309-1314
178. Saleme S, Iosif C, Ponomarjova S, Mendes G, Camilleri Y, Caire F, et al. Flow-diverting stents for intracranial bifurcation aneurysm treatment. *Neurosurgery.* 2014;75:623-631
179. Nerva JD, Morton RP, Levitt MR, Osburn JW, Ferreira MJ, Ghodke BV, et al. Pipeline embolization device as primary treatment for blister aneurysms and iatrogenic pseudoaneurysms of the internal carotid artery. *J Neurointerv Surg.* 2014
180. Rouchaud A, Saleme S, Gory B, Ayoub D, Mounayer C. Endovascular exclusion of the anterior communicating artery with flow-diverter stents as an emergency treatment for blister-like intracranial aneurysms. A case report. *Interventional neuroradiology : journal of peritherapeutic neuroradiology, surgical procedures and related neurosciences.* 2013;19:471-478
181. Kallmes DF, Hanel R, Lopes D, Boccardi E, Bonafe A, Cekirge S, et al. International retrospective study of the pipeline embolization device: A multicenter aneurysm treatment study. *AJNR. American journal of neuroradiology.* 2014
182. Byrne JV, Beltechi R, Yarnold JA, Birks J, Kamran M. Early experience in the treatment of intra-cranial aneurysms by endovascular flow diversion: A multicentre prospective study. *PloS one.* 2010;5
183. Lylyk P, Miranda C, Ceratto R, Ferrario A, Scrivano E, Luna HR, et al. Curative endovascular reconstruction of cerebral aneurysms with the pipeline embolization device: The buenos aires experience. *Neurosurgery.* 2009;64:632-642
184. Lubicz B, Collignon L, Raphaeli G, Pruvo JP, Bruneau M, De Witte O, et al. Flow-diverter stent for the endovascular treatment of intracranial aneurysms: A prospective study in 29 patients with 34 aneurysms. *Stroke.* 2010;41:2247-2253
185. Becske T, Kallmes DF, Saatci I, McDougall CG, Szikora I, Lanzino G, et al. Pipeline for uncoilable or failed aneurysms: Results from a multicenter clinical trial. *Radiology.* 2013;267:858-868
186. Arrese I, Sarabia R, Pintado R, Delgado-Rodriguez M. Flow-diverter devices for intracranial aneurysms: Systematic review and meta-analysis. *Neurosurgery.* 2013;73:193-199; discussion 199-200
187. Rouchaud A. Les flow diverters pour la prise en charge des anévrismes intracrâniens. *Sang Thrombose Vaisseaux.* 2015;27:129-136
188. Rangel-Castilla L, Munich SA, Jaleel N, Cress MC, Krishna C, Sonig A, et al. Patency of anterior circulation branch vessels after pipeline embolization: Longer-term results from 82 aneurysm cases. *J Neurosurg.* 2016:1-6
189. Kulcsar Z, Houdart E, Bonafè A, Parker G, Millar J, Goddard AJ, et al. Intra-aneurysmal thrombosis as a possible cause of delayed aneurysm rupture after flow-diversion treatment. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2011;32:20-25
190. Gentric J-C. La diversion de flux dans le traitement des anévrismes cérébraux ; des études pré-cliniques aux études cliniques. *Université de Bretagne Occidentale.* 2016;PhD Thesis:243
191. Sadasivan C, Cesar L, Seong J, Rakian A, Hao Q, Tio FO, et al. An original flow diversion device for the treatment of intracranial aneurysms: Evaluation in the rabbit elastase-induced model. *Stroke.* 2009;40:952-958

192. Cezbral JR, Mut F, Raschi M, Ding YH, Kadirvel R, Kallmes D. Strategy for analysis of flow diverting devices based on multi-modality image-based modeling. *Int J Numer Method Biomed Eng.* 2014;30:951-968
193. Kulcsar Z, Ernemann U, Wetzel SG, Bock A, Goericke S, Panagiotopoulos V, et al. High-profile flow diverter (silk) implantation in the basilar artery: Efficacy in the treatment of aneurysms and the role of the perforators. *Stroke.* 2010;41:1690-1696
194. Rouchaud A, Leclerc O, Benayoun Y, Saleme S, Camilleri Y, D'Argento F, et al. Visual outcomes with flow-diverter stents covering the ophthalmic artery for treatment of internal carotid artery aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2015;36:330-336
195. Puffer RC, Kallmes DF, Cloft HJ, Lanzino G. Patency of the ophthalmic artery after flow diversion treatment of paraclinoid aneurysms. *J Neurosurg.* 2012;116:892-896
196. Iosif C, Berg P, Ponsonnard S, Carles P, Saleme S, Pedrolo-Silveira E, et al. Role of terminal and anastomotic circulation in the patency of arteries jailed by flow-diverting stents: Animal flow model evaluation and preliminary results. *J Neurosurg.* 2016;125:898-908
197. Iosif C, Berg P, Ponsonnard S, Carles P, Saleme S, Ponomarjova S, et al. Role of terminal and anastomotic circulation in the patency of arteries jailed by flow-diverting stents: From hemodynamic changes to ostia surface modifications. *J Neurosurg.* 2016:1-12
198. Iosif C, Mounayer C, Yavuz K, Saleme S, Geyik S, Cekirge HS, et al. Middle cerebral artery bifurcation aneurysms treated by extrasaccular flow diverters: Midterm angiographic evolution and clinical outcome. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2016
199. de Carvalho FM, Caroff J, Pereira Dos Santos Neto E, Chalumeau V, Abdel Khalek H, Neki H, et al. Flow changes in the posterior communicating artery related to flow-diverter stents in carotid siphon aneurysms. *J Neurointerv Surg.* 2016
200. Neki H, Caroff J, Jittapiromsak P, Benachour N, Mihalea C, Ikka L, et al. Patency of the anterior choroidal artery covered with a flow-diverter stent. *J Neurosurg.* 2015;123:1540-1545
201. Brinjikji W, Kallmes DF, Cloft HJ, Lanzino G. Patency of the anterior choroidal artery after flow-diversion treatment of internal carotid artery aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2015;36:537-541
202. Brinjikji W, Lanzino G, Cloft HJ, Kallmes DF. Patency of the posterior communicating artery after flow diversion treatment of internal carotid artery aneurysms. *Clin Neurol Neurosurg.* 2014;120:84-88
203. Morales-Valero SF, Brinjikji W, Wald JT, Lanzino G. Low frequency of delayed ischemic events on mri after flow diversion for intracranial aneurysms. *J Neurosurg Sci.* 2015
204. Cezbral JR, Mut F, Raschi M, Scrivano E, Ceratto R, Lylyk P, et al. Aneurysm rupture following treatment with flow-diverting stents: Computational hemodynamics analysis of treatment. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2011;32:27-33
205. Kulcsár Z SI. The esmint retrospective analysis of delayed aneurysm ruptures after flow diversion (radar) study. *The eJournal of the European Society of Minimally Invasive Neurological Therapy.* 2012
206. Kadirvel R, Ding YH, Dai D, Lewis DA, Cloft HJ, Kallmes DF. Molecular indices of apoptosis activation in elastase-induced aneurysms after embolization with platinum coils. *Stroke.* 2007;38:2787-2794
207. Kadirvel R, Ding YH, Dai D, Lewis DA, Kallmes DF. Proteomic analysis of aneurysm healing mechanism after coil embolization: Comparison of dense packing with loose packing. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2012;33:1177-1181
208. Ding YH, Dai D, Lewis DA, Cloft HJ, Kallmes DF. Angiographic and histologic analysis of experimental aneurysms embolized with platinum coils, matrix, and hydrocoil. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2005;26:1757-1763
209. Dai D, Yong-Hong D, Rezek I, Lewis DA, Kallmes DF, Kadirvel R. Healing of saccular aneurysms following platinum coil embolization: Lack of improved efficacy with vitamin c supplementation. *J Neurointerv Surg.* 2013;5:591-596
210. Kallmes DF, Helm GA, Hudson SB, Altes TA, Do HM, Mandell JW, et al. Histologic evaluation of platinum coil embolization in an aneurysm model in rabbits. *Radiology.* 1999;213:217-222

211. Mitome-Mishima Y, Yamamoto M, Yatomi K, Nonaka S, Miyamoto N, Urabe T, et al. Endothelial cell proliferation in swine experimental aneurysm after coil embolization. *PLoS One*. 2014;9:e89047
212. Li ZF, Fang XG, Yang PF, Huang QH, Zhao WY, Liang C, et al. Endothelial progenitor cells contribute to neointima formation in rabbit elastase-induced aneurysm after flow diverter treatment. *CNS Neurosci Ther*. 2013;19:352-357
213. D'Urso PI, Lanzino G, Cloft HJ, Kallmes DF. Flow diversion for intracranial aneurysms: A review. *Stroke*. 2011;42:2363-2368
214. Kadirvel R, Ding YH, Dai D, Lewis DA, Kallmes DF. Differential gene expression in well-healed and poorly healed experimental aneurysms after coil treatment. *Radiology*. 2010;257:418-426
215. Mangrum WI, Farassati F, Kadirvel R, Kolbert CP, Raghavakaimal S, Dai D, et al. Mrna expression in rabbit experimental aneurysms: A study using gene chip microarrays. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2007;28:864-869
216. Kadirvel R, Ding YH, Dai D, Lewis DA, Raghavakaimal S, Cloft HJ, et al. Gene expression profiling of experimental saccular aneurysms using deoxyribonucleic acid microarrays. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2008;29:1566-1569
217. Kadirvel R, Ding YH, Dai D, Lewis DA, Kallmes DF. Gene expression changes: Five years after creation of elastase-induced aneurysms. *J Vasc Interv Radiol*. 2011;22:1447-1451 e1442
218. Yan J, Hitomi T, Takenaka K, Kato M, Kobayashi H, Okuda H, et al. Genetic study of intracranial aneurysms. *Stroke*. 2015;46:620-626
219. Akiyama K, Narita A, Nakaoka H, Cui T, Takahashi T, Yasuno K, et al. Genome-wide association study to identify genetic variants present in japanese patients harboring intracranial aneurysms. *J Hum Genet*. 2010;55:656-661
220. Puffer C, Dai D, Ding YH, Cebral J, Kallmes D, Kadirvel R. Gene expression comparison of flow diversion and coiling in an experimental aneurysm model. *J Neurointerv Surg*. 2014
221. Holcomb M, Ding YH, Dai D, McDonald RJ, McDonald JS, Kallmes DF, et al. Rna-sequencing analysis of messenger rna/microna in a rabbit aneurysm model identifies pathways and genes of interest. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2015
222. Nakaoka H, Tajima A, Yoneyama T, Hosomichi K, Kasuya H, Mizutani T, et al. Gene expression profiling reveals distinct molecular signatures associated with the rupture of intracranial aneurysm. *Stroke*. 2014;45:2239-2245
223. Roder C, Kasuya H, Harati A, Tatagiba M, Inoue I, Krischek B. Meta-analysis of microarray gene expression studies on intracranial aneurysms. *Neuroscience*. 2012;201:105-113
224. Rouchaud A, Johnson C, Thielen E, Schroeder D, Ding YH, Dai D, et al. Differential gene expression in coiled versus flow-diverter-treated aneurysms: Rna sequencing analysis in a rabbit aneurysm model. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2016;37:1114-1121
225. Frosen J. Smooth muscle cells and the formation, degeneration, and rupture of saccular intracranial aneurysm wall--a review of current pathophysiological knowledge. *Transl Stroke Res*. 2014;5:347-356
226. Kadirvel R, Dai D, Ding YH, Danielson MA, Lewis DA, Cloft HJ, et al. Endovascular treatment of aneurysms: Healing mechanisms in a swine model are associated with increased expression of matrix metalloproteinases, vascular cell adhesion molecule-1, and vascular endothelial growth factor, and decreased expression of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2007;28:849-856
227. Courtois A, Nusgens BV, Hustinx R, Namur G, Gomez P, Somja J, et al. 18f-fdg uptake assessed by pet/ct in abdominal aortic aneurysms is associated with cellular and molecular alterations prefacing wall deterioration and rupture. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2013;54:1740-1747
228. Morris DR, Biros E, Cronin O, Kuivaniemi H, Golledge J. The association of genetic variants of matrix metalloproteinases with abdominal aortic aneurysm: A systematic review and meta-analysis. *Heart*. 2014;100:295-302
229. Saracini C, Bolli P, Sticchi E, Pratesi G, Pulli R, Sofi F, et al. Polymorphisms of genes involved in extracellular matrix remodeling and abdominal aortic aneurysm. *Journal of vascular surgery*. 2012;55:171-179 e172

230. Wilson WR, Anderton M, Choke EC, Dawson J, Loftus IM, Thompson MM. Elevated plasma mmp1 and mmp9 are associated with abdominal aortic aneurysm rupture. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2008;35:580-584
231. Chase AJ, Newby AC. Regulation of matrix metalloproteinase (matrixin) genes in blood vessels: A multi-step recruitment model for pathological remodelling. *J Vasc Res*. 2003;40:329-343
232. Xiong W, Knispel R, MacTaggart J, Greiner TC, Weiss SJ, Baxter BT. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase regulates macrophage-dependent elastolytic activity and aneurysm formation in vivo. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284:1765-1771
233. Dai X, Shen J, Annam NP, Jiang H, Levi E, Schworer CM, et al. Smad3 deficiency promotes vessel wall remodeling, collagen fiber reorganization and leukocyte infiltration in an inflammatory abdominal aortic aneurysm mouse model. *Scientific reports*. 2015;5:10180
234. Song Y, Xie Y, Liu F, Zhao C, Yu R, Ban S, et al. Expression of matrix metalloproteinase-12 in aortic dissection. *BMC cardiovascular disorders*. 2013;13:34
235. Didangelos A, Yin X, Mandal K, Saje A, Smith A, Xu Q, et al. Extracellular matrix composition and remodeling in human abdominal aortic aneurysms: A proteomics approach. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2011;10:M111 008128
236. Zhang B, Dhillon S, Geary I, Howell WM, Iannotti F, Day IN, et al. Polymorphisms in matrix metalloproteinase-1, -3, -9, and -12 genes in relation to subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2001;32:2198-2202
237. Curci JA, Liao S, Huffman MD, Shapiro SD, Thompson RW. Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. *The Journal of clinical investigation*. 1998;102:1900-1910
238. Korkmaz B, Horwitz MS, Jenne DE, Gauthier F. Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin g as therapeutic targets in human diseases. *Pharmacol Rev*. 2010;62:726-759
239. Tromp G, Gatalica Z, Skunca M, Berguer R, Siegel T, Kline RA, et al. Elevated expression of matrix metalloproteinase-13 in abdominal aortic aneurysms. *Annals of vascular surgery*. 2004;18:414-420
240. Chen XF, Wang JA, Hou J, Gui C, Tang LJ, Chen XQ, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (emmprin) is present in smooth muscle cells of human aneurysmal aorta and is induced by angiotensin ii in vitro. *Clin Sci (Lond)*. 2009;116:819-826
241. Lizarbe TR, Tarin C, Gomez M, Lavin B, Aracil E, Orte LM, et al. Nitric oxide induces the progression of abdominal aortic aneurysms through the matrix metalloproteinase inducer emmprin. *Am J Pathol*. 2009;175:1421-1430
242. Kazi M, Zhu C, Roy J, Paulsson-Berne G, Hamsten A, Swedenborg J, et al. Difference in matrix-degrading protease expression and activity between thrombus-free and thrombus-covered wall of abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1341-1346
243. Fontaine V, Jacob MP, Houard X, Rossignol P, Plissonnier D, Angles-Cano E, et al. Involvement of the mural thrombus as a site of protease release and activation in human aortic aneurysms. *Am J Pathol*. 2002;161:1701-1710
244. Obermajer N, Doljak B, Kos J. Cytokeratin 8 ectoplasmic domain binds urokinase-type plasminogen activator to breast tumor cells and modulates their adhesion, growth and invasiveness. *Mol Cancer*. 2009;8:88
245. Didiasova M, Wujak L, Wygrecka M, Zakrzewicz D. From plasminogen to plasmin: Role of plasminogen receptors in human cancer. *Int J Mol Sci*. 2014;15:21229-21252
246. Syrovets T, Lunov O, Simmet T. Plasmin as a proinflammatory cell activator. *J Leukoc Biol*. 2012;92:509-519
247. Lijnen HR. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost*. 2001;86:324-333
248. Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Baes M, Lemaître V, Tipping P, et al. Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nat Genet*. 1997;17:439-444

249. Li Q, Laumonier Y, Syrovets T, Simmet T. Plasmin triggers cytokine induction in human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1383-1389
250. Burysek L, Syrovets T, Simmet T. The serine protease plasmin triggers expression of mcp-1 and cd40 in human primary monocytes via activation of p38 mapk and janus kinase (jak)/stat signaling pathways. *The Journal of biological chemistry.* 2002;277:33509-33517
251. Reilly JM. Plasminogen activators in abdominal aortic aneurysmal disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1996;800:151-156
252. Leeper NJ, Tedesco MM, Kojima Y, Schultz GM, Kundu RK, Ashley EA, et al. Apelin prevents aortic aneurysm formation by inhibiting macrophage inflammation. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology.* 2009;296:H1329-1335
253. Chun HJ, Ali ZA, Kojima Y, Kundu RK, Sheikh AY, Agrawal R, et al. Apelin signaling antagonizes ang ii effects in mouse models of atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation.* 2008;118:3343-3354
254. Yang Y, Lv SY, Lyu SK, Wu D, Chen Q. The protective effect of apelin on ischemia/reperfusion injury. *Peptides.* 2015;63:43-46
255. Zhou Y, Wang Y, Qiao S. Apelin: A potential marker of coronary artery stenosis and atherosclerotic plaque stability in acs patients. *International heart journal.* 2014;55:204-212
256. Masri B, Morin N, Cornu M, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin (65-77) activates p70 s6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *FASEB J.* 2004;18:1909-1911
257. Du X, Kang JP, Wu JH, Lv Q, Tang CS, Ma CS. Elevated high sensitive c-reactive protein and apelin levels after percutaneous coronary intervention and drug-eluting stent implantation. *Journal of Zhejiang University. Science. B.* 2010;11:548-552
258. Killer M, Plenk H, Minnich B, Al-Schameri R, Lametschwantner A, Richling B. Histological demonstration of healing in experimental aneurysms. *Minim Invasive Neurosurg.* 2009;52:170-175
259. Daley JM, Brancato SK, Thomay AA, Reichner JS, Albina JE. The phenotype of murine wound macrophages. *J Leukoc Biol.* 2010;87:59-67
260. van den Berg LM, Zijlstra-Willems EM, Richters CD, Ulrich MM, Geijtenbeek TB. Dectin-1 activation induces proliferation and migration of human keratinocytes enhancing wound re-epithelialization. *Cell Immunol.* 2014;289:49-54
261. Roy S, Dickerson R, Khanna S, Collard E, Gnyawali U, Gordillo GM, et al. Particulate beta-glucan induces tnf-alpha production in wound macrophages via a redox-sensitive nf-kappabeta-dependent pathway. *Wound Repair Regen.* 2011;19:411-419
262. Beer HD, Bittner M, Niklaus G, Munding C, Max N, Goppelt A, et al. The fibroblast growth factor binding protein is a novel interaction partner of fgf-7, fgf-10 and fgf-22 and regulates fgf activity: Implications for epithelial repair. *Oncogene.* 2005;24:5269-5277
263. Begum S, Zhang Y, Shintani T, Toratani S, Sato JD, Okamoto T. Immunohistochemical expression of heparin-binding protein 17/fibroblast growth factor-binding protein-1 (hbp17/fgfbp-1) as an angiogenic factor in head and neck tumorigenesis. *Oncology reports.* 2007;17:591-596
264. Tassi E, McDonnell K, Gibby KA, Tilan JU, Kim SE, Kodack DP, et al. Impact of fibroblast growth factor-binding protein-1 expression on angiogenesis and wound healing. *Am J Pathol.* 2011;179:2220-2232
265. Olsen CL, Hsu PP, Glienke J, Rubanyi GM, Brooks AR. Hedgehog-interacting protein is highly expressed in endothelial cells but down-regulated during angiogenesis and in several human tumors. *BMC Cancer.* 2004;4:43
266. Wong VW, Crawford JD. Vasculogenic cytokines in wound healing. *Biomed Res Int.* 2013;2013:190486
267. Delbosc S, Alsac JM, Journe C, Louedec L, Castier Y, Bonnaure-Mallet M, et al. Porphyromonas gingivalis participates in pathogenesis of human abdominal aortic aneurysm by neutrophil activation. Proof of concept in rats. *PLoS One.* 2011;6:e18679
268. Bonita R. Cigarette smoking, hypertension and the risk of subarachnoid hemorrhage: A population-based case-control study. *Stroke.* 1986;17:831-835
269. Juvela S, Hillbom M, Numminen H, Koskinen P. Cigarette smoking and alcohol consumption as risk factors for aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 1993;24:639-646

270. Juvela S, Poussa K, Porras M. Factors affecting formation and growth of intracranial aneurysms: A long-term follow-up study. *Stroke*. 2001;32:485-491
271. Knekt P, Reunanen A, Aho K, Heliövaara M, Rissanen A, Aromaa A, et al. Risk factors for subarachnoid hemorrhage in a longitudinal population study. *Journal of clinical epidemiology*. 1991;44:933-939
272. Kang HS, Han MH, Kwon BJ, Kwon OK, Kim SH. Repeat endovascular treatment in post-embolization recurrent intracranial aneurysms. *Neurosurgery*. 2006;58:60-70; discussion 60-70
273. Petitti DB, Wingerd J. Use of oral contraceptives, cigarette smoking, and risk of subarachnoid haemorrhage. *Lancet*. 1978;2:234-235
274. Sacco RL, Wolf PA, Bharucha NE, Meeks SL, Kannel WB, Charette LJ, et al. Subarachnoid and intracerebral hemorrhage: Natural history, prognosis, and precursive factors in the framingham study. *Neurology*. 1984;34:847-854
275. Brinjikji W, Lingineni RK, Gu CN, Lanzino G, Cloft HJ, Ulsh L, et al. Smoking is not associated with recurrence and retreatment of intracranial aneurysms after endovascular coiling. *J Neurosurg*. 2015;122:95-100
276. Ortiz R, Stefanski M, Rosenwasser R, Veznedaroglu E. Cigarette smoking as a risk factor for recurrence of aneurysms treated by endosaccular occlusion. *J Neurosurg*. 2008;108:672-675
277. Wei HJ, Wang D, Chen JL, Xu Y, Lei P, Jiang RC, et al. Mobilization of circulating endothelial progenitor cells after endovascular therapy for ruptured cerebral aneurysms. *Neuroscience letters*. 2011;498:114-118
278. Soga Y, Tomoi Y, Fujihara M, Okazaki S, Yamauchi Y, Shintani Y, et al. Perioperative and long-term outcomes of endovascular treatment for subclavian artery disease from a large multicenter registry. *Journal of endovascular therapy : an official journal of the International Society of Endovascular Specialists*. 2015;22:626-633
279. Musallam KM, Rosendaal FR, Zaatari G, Soweid A, Hoballah JJ, Sfeir PM, et al. Smoking and the risk of mortality and vascular and respiratory events in patients undergoing major surgery. *JAMA surgery*. 2013;148:755-762
280. Rouchaud A, Brinjikji W, Cloft HJ, Lanzino G, Becske T, Kallmes DF. Smoking does not affect occlusion rates and morbidity-mortality after pipeline embolization for intracranial aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2016;37:1122-1126
281. Chen JX, Lai LF, Zheng K, Li GX, He XY, Li LP, et al. Influencing factors of immediate angiographic results in intracranial aneurysms patients after endovascular treatment. *Journal of neurology*. 2015
282. Anderson CS, Feigin V, Bennett D, Lin RB, Hankey G, Jamrozik K, et al. Active and passive smoking and the risk of subarachnoid hemorrhage: An international population-based case-control study. *Stroke*. 2004;35:633-637
283. Kim CK, Kim BJ, Ryu WS, Lee SH, Yoon BW. Impact of smoking cessation on the risk of subarachnoid haemorrhage: A nationwide multicentre case control study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012;83:1100-1103
284. Song J, Yeon JY, Kim JS, Hong SC, Kim KH, Jeon P. Delayed thromboembolic events more than 30 days after self expandable intracranial stent-assisted embolization of unruptured intracranial aneurysms. *Clin Neurol Neurosurg*. 2015;135:73-78
285. Zhu YQ, Li MH, Lin F, Song DL, Tan HQ, Gu BX, et al. Frequency and predictors of endoleaks and long-term patency after covered stent placement for the treatment of intracranial aneurysms: A prospective, non-randomised multicentre experience. *European radiology*. 2013;23:287-297
286. Lal BK, Beach KW, Roubin GS, Lutsep HL, Moore WS, Malas MB, et al. Restenosis after carotid artery stenting and endarterectomy: A secondary analysis of crest, a randomised controlled trial. *Lancet Neurol*. 2012;11:755-763
287. Matteau A, Yeh RW, Camenzind E, Steg PG, Wijns W, Mills J, et al. Balancing long-term risks of ischemic and bleeding complications after percutaneous coronary intervention with drug-eluting stents. *The American journal of cardiology*. 2015
288. Yeo KK, Armstrong EJ, Soni K, Waldo SW, Patel M, Reeves R, et al. Long-term outcomes of angiographically confirmed coronary stent thrombosis: Results from a multicentre california

- registry. *EuroIntervention : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology*. 2015;11:188-195
289. Wakhloo AK, Gounis MJ. Revolution in aneurysm treatment: Flow diversion to cure aneurysms: A paradigm shift. *Neurosurgery*. 2014;61 Suppl 1:111-120
 290. Foin N, Gutierrez-Chico JL, Nakatani S, Torii R, Bourantas CV, Sen S, et al. Incomplete stent apposition causes high shear flow disturbances and delay in neointimal coverage as a function of strut to wall detachment distance: Implications for the management of incomplete stent apposition. *Circ Cardiovasc Interv*. 2014;7:180-189
 291. Saake M, Struffert T, Goelitz P, Ott S, Seifert F, Ganslandt O, et al. Angiographic ct with intravenous contrast agent application for monitoring of intracranial flow diverting stents. *Neuroradiology*. 2012;54:727-735
 292. Ding D, Starke RM, Durst CR, Gaughen JR, Jr., Evans AJ, Jensen ME, et al. Dynact imaging for intraprocedural evaluation of flow-diverting stent apposition during endovascular treatment of intracranial aneurysms. *J Clin Neurosci*. 2014;21:1981-1983
 293. van der Marel K, Gounis MJ, Weaver JP, de Korte AM, King RM, Arends JM, et al. Grading of regional apposition after flow-diverter treatment (graft): A comparative evaluation of vasoct and intravascular oct. *J Neurointerv Surg*. 2015
 294. Rouchaud A, Ramana C, Brinjikji W, Ding YH, Dai D, Gunderson T, et al. Wall apposition is a key factor for aneurysm occlusion after flow diversion: A histologic evaluation in 41 rabbits. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2016
 295. Attizzani GF, Capodanno D, Ohno Y, Tamburino C. Mechanisms, pathophysiology, and clinical aspects of incomplete stent apposition. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63:1355-1367
 296. Aurboonyawat T, Schmidt PJ, Piotin M, Blanc R, Spelle L, Moret J. A study of the first-generation pipeline embolization device morphology using intraoperative angiographic computed tomography (act). *Neuroradiology*. 2011;53:23-30
 297. Clarencon F, Piotin M, Pistocchi S, Babic D, Blanc R. Evaluation of stent visibility by flat panel detector ct in patients treated for intracranial aneurysms. *Neuroradiology*. 2012;54:1121-1125
 298. Patel NV, Gounis MJ, Wakhloo AK, Noordhoek N, Blijd J, Babic D, et al. Contrast-enhanced angiographic cone-beam ct of cerebrovascular stents: Experimental optimization and clinical application. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2011;32:137-144
 299. Jou LD, Mitchell BD, Shaltoni HM, Mawad ME. Effect of structural remodeling (retraction and recoil) of the pipeline embolization device on aneurysm occlusion rate. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2014;35:1772-1778
 300. Caroff J, Mihalea C, Neki H, Ruijters D, Ikka L, Benachour N, et al. Role of c-arm vasoct in the use of endovascular web flow disruption in intracranial aneurysm treatment. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2014;35:1353-1357
 301. Poncylyusz W, Bilinski P, Saffranow K, Baron J, Zbroszczyk M, Jaworski M, et al. The Ivis/Ivis jr. Stents in the treatment of wide-neck intracranial aneurysms: Multicentre registry. *J Neurointerv Surg*. 2015;7:524-529
 302. Hayat U, Thondapu V, Asrar Ul Haq M, Foin N, Jang IK, Barlis P. Optical coherence tomography to evaluate coronary stent implantation and complications. *Coron Artery Dis*. 2015;26 Suppl 1:e55-68
 303. Amoroso G, van Geuns RJ, Spaulding C, Manzo-Silberman S, Hauptmann KE, Spaargaren R, et al. Assessment of the safety and performance of the stentys self-expanding coronary stent in acute myocardial infarction: Results from the apposition i study. *EuroIntervention : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology*. 2011;7:428-436
 304. Radu M, Jorgensen E, Kelbaek H, Helqvist S, Skovgaard L, Saunamaki K. Strut apposition after coronary stent implantation visualised with optical coherence tomography. *EuroIntervention : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology*. 2010;6:86-93
 305. Ozaki Y, Okumura M, Ismail TF, Naruse H, Hattori K, Kan S, et al. The fate of incomplete stent apposition with drug-eluting stents: An optical coherence tomography-based natural history study. *Eur Heart J*. 2010;31:1470-1476

306. Sawada T, Shite J, Negi N, Shinke T, Tanino Y, Ogasawara D, et al. Factors that influence measurements and accurate evaluation of stent apposition by optical coherence tomography. Assessment using a phantom model. *Circ J*. 2009;73:1841-1847
307. McVeigh PZ, Sacho R, Weersink RA, Pereira VM, Kucharczyk W, Seibel EJ, et al. High-resolution angioscopic imaging during endovascular neurosurgery. *Neurosurgery*. 2014;75:171-180; discussion 179-180
308. Kalmar G, Hubner F, Voelker W, Hutzenlaub J, Teubner J, Poerner T, et al. Radial force and wall apposition of balloon-expandable vascular stents in eccentric stenoses: An in vitro evaluation in a curved vessel model. *J Vasc Interv Radiol*. 2002;13:499-508
309. Mohlenbruch MA, Herweh C, Jestaedt L, Stampfl S, Schonenberger S, Ringleb PA, et al. The fred flow-diverter stent for intracranial aneurysms: Clinical study to assess safety and efficacy. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2015;36:1155-1161
310. Lylyk P, Miranda C, Ceratto R, Ferrario A, Scrivano E, Luna HR, et al. Curative endovascular reconstruction of cerebral aneurysms with the pipeline embolization device: The buenos aires experience. *Neurosurgery*. 2009;64:632-642; discussion 642-633; quiz N636
311. Klisch J, Turk A, Turner R, Woo HH, Fiorella D. Very late thrombosis of flow-diverting constructs after the treatment of large fusiform posterior circulation aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2011;32:627-632
312. Fiorella D, Hsu D, Woo HH, Tarr RW, Nelson PK. Very late thrombosis of a pipeline embolization device construct: Case report. *Neurosurgery*. 2010;67:onsE313-314; discussion onsE314
313. Cirillo L, Leonardi M, Dall'olio M, Princiotta C, Stafa A, Simonetti L, et al. Complications in the treatment of intracranial aneurysms with silk stents: An analysis of 30 consecutive patients. *Interventional neuroradiology : journal of peritherapeutic neuroradiology, surgical procedures and related neurosciences*. 2012;18:413-425
314. Phillips TJ, Wenderoth JD, Phatouros CC, Rice H, Singh TP, Devilliers L, et al. Safety of the pipeline embolization device in treatment of posterior circulation aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2012;33:1225-1231
315. Tomas C, Benaissa A, Herbreteau D, Kadziolka K, Pierot L. Delayed ipsilateral parenchymal hemorrhage following treatment of intracranial aneurysms with flow diverter. *Neuroradiology*. 2014;56:155-161
316. Turowski B, Macht S, Kulcsar Z, Hanggi D, Stummer W. Early fatal hemorrhage after endovascular cerebral aneurysm treatment with a flow diverter (silk-stent): Do we need to rethink our concepts? *Neuroradiology*. 2011;53:37-41
317. Cruz JP, Chow M, O'Kelly C, Marotta B, Spears J, Montanera W, et al. Delayed ipsilateral parenchymal hemorrhage following flow diversion for the treatment of anterior circulation aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2012;33:603-608
318. Saatci I, Yavuz K, Ozer C, Geyik S, Cekirge HS. Treatment of intracranial aneurysms using the pipeline flow-diverter embolization device: A single-center experience with long-term follow-up results. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2012;33:1436-1446
319. Berge J, Biondi A, Machi P, Brunel H, Pierot L, Gabrillargues J, et al. Flow-diverter silk stent for the treatment of intracranial aneurysms: 1-year follow-up in a multicenter study. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2012;33:1150-1155
320. Kallmes DF, Hanel R, Lopes D, Boccardi E, Bonafe A, Cekirge S, et al. International retrospective study of the pipeline embolization device: A multicenter aneurysm treatment study. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2015;36:108-115
321. Adolph R, Vorp DA, Steed DL, Webster MW, Kameneva MV, Watkins SC. Cellular content and permeability of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm. *Journal of vascular surgery*. 1997;25:916-926
322. Michel JB, Rouer M, Alsac JM. Regarding "a multilayer stent in the aorta may not seal the aneurysm, thereby leading to rupture". *Journal of vascular surgery*. 2013;57:605
323. Frosen J, Piippo A, Paetau A, Kangasniemi M, Niemela M, Hernesniemi J, et al. Remodeling of saccular cerebral artery aneurysm wall is associated with rupture: Histological analysis of 24 unruptured and 42 ruptured cases. *Stroke*. 2004;35:2287-2293

324. Tulamo R, Frosen J, Hernesniemi J, Niemela M. Inflammatory changes in the aneurysm wall: A review. *Journal of NeuroInterventional Surgery*. 2010;2:120-130
325. Rouchaud A, Brinjikji W, Lanzino G, Cloft HJ, Kadirvel R, Kallmes DF. Delayed hemorrhagic complications after flow diversion for intracranial aneurysms: A literature overview. *Neuroradiology*. 2016;58:171-177
326. Thielen E, McClure M, Rouchaud A, Ding YH, Dai D, Schroeder D, et al. Concomitant coiling reduces metalloproteinase levels in flow diverter-treated aneurysms but anti-inflammatory treatment has no effect. *J Neurointerv Surg*. 2016
327. Rossignol P, Fontaine V, Meilhac O, Angles-Cano E, Jacob MP, Michel JB. [physiopathology of aortic aneurysm]. *Rev Prat*. 2002;52:1061-1065
328. Carrell TW, Burnand KG, Booth NA, Humphries J, Smith A. Intraluminal thrombus enhances proteolysis in abdominal aortic aneurysms. *Vascular*. 2006;14:9-16
329. Houard X, Rouzet F, Touat Z, Philippe M, Dominguez M, Fontaine V, et al. Topology of the fibrinolytic system within the mural thrombus of human abdominal aortic aneurysms. *J Pathol*. 2007;212:20-28
330. Velioglu M, Kizilkilic O, Selcuk H, Kocak B, Tureci E, Islak C, et al. Early and midterm results of complex cerebral aneurysms treated with silk stent. *Neuroradiology*. 2012;54:1355-1365
331. Diener HC, Bogousslavsky J, Brass LM, Cimminiello C, Csiba L, Kaste M, et al. Aspirin and clopidogrel compared with clopidogrel alone after recent ischaemic stroke or transient ischaemic attack in high-risk patients (match): Randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2004;364:331-337
332. Shapiro M, Beckske T, Sahlein D, Babb J, Nelson PK. Stent-supported aneurysm coiling: A literature survey of treatment and follow-up. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2012;33:159-163
333. Velat GJ, Fargen KM, Lawson MF, Hoh BL, Fiorella D, Mocco J. Delayed intraparenchymal hemorrhage following pipeline embolization device treatment for a giant recanalized ophthalmic aneurysm. *J Neurointerv Surg*. 2012;4:e24
334. Mitha AP, Mynard JP, Storwick JA, Shivji ZI, Wong JH, Morrish W. Can the windkessel hypothesis explain delayed intraparenchymal haemorrhage after flow diversion? A case report and model-based analysis of possible mechanisms. *Heart, lung & circulation*. 2015
335. Iosif C, Camilleri Y, Saleme S, Caire F, Yardin C, Ponomarjova S, et al. Diffusion-weighted imaging-detected ischemic lesions associated with flow-diverting stents in intracranial aneurysms: Safety, potential mechanisms, clinical outcome, and concerns. *J Neurosurg*. 2015;122:627-636
336. Hu YC, Deshmukh VR, Albuquerque FC, Fiorella D, Nixon RR, Heck DV, et al. Histopathological assessment of fatal ipsilateral intraparenchymal hemorrhages after the treatment of supraclinoid aneurysms with the pipeline embolization device. *J Neurosurg*. 2014;120:365-374
337. Chiu AH, Wenderoth J. Cerebral hyperperfusion after flow diversion of large intracranial aneurysms. *J Neurointerv Surg*. 2013;5:e48
338. Gascou G, Lobotesis K, Brunel H, Machi P, Riquelme C, Eker O, et al. Extra-aneurysmal flow modification following pipeline embolization device implantation: Focus on regional branches, perforators, and the parent vessel. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2015;36:725-731
339. Murakami H, Inaba M, Nakamura A, Ushioda T. Ipsilateral hyperperfusion after neck clipping of a giant internal carotid artery aneurysm. Case report. *J Neurosurg*. 2002;97:1233-1236
340. Tulamo R, Frosen J, Hernesniemi J, Niemela M. Inflammatory changes in the aneurysm wall: A review. *J Neurointerv Surg*. 2010;2:120-130
341. Jin D, Sheng J, Yang X, Gao B. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases expression in human cerebral ruptured and unruptured aneurysm. *Surg Neurol*. 2007;68 Suppl 2:S11-16; discussion S16
342. Starke RM, Komotar RJ, Hwang BY, Hahn DK, Otten ML, Hickman ZL, et al. Systemic expression of matrix metalloproteinase-9 in patients with cerebral arteriovenous malformations. *Neurosurgery*. 2010;66:343-348; discussion 348
343. Nuki Y, Tsou TL, Kurihara C, Kanematsu M, Kanematsu Y, Hashimoto T. Elastase-induced intracranial aneurysms in hypertensive mice. *Hypertension*. 2009;54:1337-1344

344. Starke RM, Chalouhi N, Jabbour PM, Tjoumakaris SI, Gonzalez LF, Rosenwasser RH, et al. Critical role of tnf-alpha in cerebral aneurysm formation and progression to rupture. *J Neuroinflammation*. 2014;11:77
345. Makino H, Tada Y, Wada K, Liang EI, Chang M, Mobashery S, et al. Pharmacological stabilization of intracranial aneurysms in mice: A feasibility study. *Stroke*. 2012;43:2450-2456
346. Kim SC, Singh M, Huang J, Prestigiacomo CJ, Winfree CJ, Solomon RA, et al. Matrix metalloproteinase-9 in cerebral aneurysms. *Neurosurgery*. 1997;41:642-666; discussion 646-647
347. Hoh BL, Hosaka K, Downes DP, Nowicki KW, Fernandez CE, Batich CD, et al. Monocyte chemotactic protein-1 promotes inflammatory vascular repair of murine carotid aneurysms via a macrophage inflammatory protein-1alpha and macrophage inflammatory protein-2-dependent pathway. *Circulation*. 2011;124:2243-2252
348. Largen E, Balt-Extrusion. Urgent field safety notice intracranial stent "silk". Clarification of the indications. 2010
349. Kim YH, Jung JC, Jung SY, Kim YI, Lee KW, Park YJ. Cyclosporine a downregulates mmp-3 and mmp-13 expression in cultured pterygium fibroblasts. *Cornea*. 2015;34:1137-1143
350. Gawronska-Kozak B, Kirk-Ballard H. Cyclosporin a reduces matrix metalloproteinases and collagen expression in dermal fibroblasts from regenerative foxn1 deficient (nude) mice. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2013;6:7
351. Shetty R, Ghosh A, Lim RR, Subramani M, Mihir K, Reshma AR, et al. Elevated expression of matrix metalloproteinase-9 and inflammatory cytokines in keratoconus patients is inhibited by cyclosporine a. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56:738-750
352. Kuo PJ, Tu HP, Chin YT, Lu SH, Chiang CY, Chen RY, et al. Cyclosporine-a inhibits mmp-2 and -9 activities in the presence of porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide: An experiment in human gingival fibroblast and u937 macrophage co-culture. *J Periodontal Res*. 2012;47:431-438
353. Chiu HC, Lu YT, Chin YT, Tu HP, Chiang CY, Gau CH, et al. Cyclosporine a inhibits the expression of membrane type-i matrix metalloproteinase in gingiva. *J Periodontal Res*. 2009;44:338-347
354. Bolzani G, Della Coletta R, Martelli Junior H, Graner E. Cyclosporin a inhibits production and activity of matrix metalloproteinases by gingival fibroblasts. *J Periodontal Res*. 2000;35:51-58
355. Dai J, Michineau S, Franck G, Desgranges P, Becquemin JP, Gervais M, et al. Long term stabilization of expanding aortic aneurysms by a short course of cyclosporine a through transforming growth factor-beta induction. *PLoS One*. 2011;6:e28903
356. Ha E, Mun KC. Effects of cyclosporine on metalloproteinase in endothelial cells. *Transplant Proc*. 2012;44:991-992
357. Huang YH, Ma YL, Ma L, Mao JL, Zhang Y, Du MR, et al. Cyclosporine a improves adhesion and invasion of mouse preimplantation embryos via upregulating integrin beta3 and matrix metalloproteinase-9. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7:1379-1388
358. Zhou WH, Du MR, Dong L, Zhu XY, Yang JY, He YY, et al. Cyclosporin a increases expression of matrix metalloproteinase 9 and 2 and invasiveness in vitro of the first-trimester human trophoblast cells via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Hum Reprod*. 2007;22:2743-2750
359. Bianchi R, Rodella L, Rezzani R. Cyclosporine a up-regulates expression of matrix metalloproteinase 2 and vascular endothelial growth factor in rat heart. *Int Immunopharmacol*. 2003;3:427-433
360. Yamaguchi T, Yokokawa M, Suzuki M, Higashide S, Katoh Y, Sugiyama S, et al. The effect of immunosuppression on aortic dilatation in a rat aneurysm model. *Surg Today*. 2000;30:1093-1099
361. Piechota-Polanczyk A, Demyanets S, Nykonenko O, Huk I, Mittlboeck M, Domenig CM, et al. Decreased tissue levels of cyclophilin a, a cyclosporine a target and phospho-erk1/2 in simvastatin patients with abdominal aortic aneurysm. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2013;45:682-688

362. Gentric JC, Salazkin I, Gevry G, Raymond J, Darsaut T. Compaction of flow diverters improves occlusion of experimental wide-necked aneurysms. *J Neurointerv Surg*. 2016;8:1072-1077
363. Shapiro M, Raz E, Becske T, Nelson PK. Variable porosity of the pipeline embolization device in straight and curved vessels: A guide for optimal deployment strategy. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2014;35:727-733
364. Berg P, Iosif C, Ponnsonard S, Yardin C, Janiga G, Mounayer C. Endothelialization of over- and undersized flow-diverter stents at covered vessel side branches: An in vivo and in silico study. *Journal of biomechanics*. 2016;49:4-12
365. Wang K, Yuan S. Actual metal coverage at the neck is critical for flow-diverting stents in treating intracranial aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2013;34:E31-32
366. Yu SC, Kwok CK, Cheng PW, Chan KY, Lau SS, Lui WM, et al. Intracranial aneurysms: Midterm outcome of pipeline embolization device--a prospective study in 143 patients with 178 aneurysms. *Radiology*. 2012;265:893-901
367. Levitt MR, Park MS, Albuquerque FC, Moon K, Kalani MY, McDougall CG. Posterior inferior cerebellar artery patency after flow-diverting stent treatment. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2016;37:487-489
368. Vedantam A, Rao VY, Shaltoni HM, Mawad ME. Incidence and clinical implications of carotid branch occlusion following treatment of internal carotid artery aneurysms with the pipeline embolization device. *Neurosurgery*. 2015;76:173-178; discussion 178
369. Iosif C, Carles P, Trolliard G, Yardin C, Mounayer C. Scanning electron microscopy for flow-diverting stent research: Technical tips and tricks. *Microscopy (Oxf)*. 2015;64:219-223
370. Hong B, Wang K, Huang Q, Xu Y, Fang X, Li Z, et al. Effects of metal coverage rate of flow diversion device on neointimal growth at side branch ostium and stented artery: An animal experiment in rabbit abdominal aorta. *Neuroradiology*. 2012;54:849-855
371. Kan P, Duckworth E, Puri A, Velat G, Wakhloo A. Treatment failure of fetal posterior communicating artery aneurysms with the pipeline embolization device. *J Neurointerv Surg*. 2016;8:945-948
372. Fiorella D, Woo HH, Albuquerque FC, Nelson PK. Definitive reconstruction of circumferential, fusiform intracranial aneurysms with the pipeline embolization device. *Neurosurgery*. 2008;62:1115-1120; discussion 1120-1121
373. Pierot L. Flow diverter stents in the treatment of intracranial aneurysms: Where are we? *J Neuroradiol*. 2011;38:40-46
374. Cinar C, Bozkaya H, Oran I. Endovascular treatment of cranial aneurysms with the pipeline flow-diverting stent: Preliminary mid-term results. *Diagn Interv Radiol*. 2013;19:154-164
375. Byrne JV, Beltechi R, Yarnold JA, Birks J, Kamran M. Early experience in the treatment of intra-cranial aneurysms by endovascular flow diversion: A multicentre prospective study. *PLoS One*. 2010;5:e12492
376. Leonardi M, Cirillo L, Toni F, Dall'olio M, Princiotta C, Stafa A, et al. Treatment of intracranial aneurysms using flow-diverting silk stents (balt): A single centre experience. *Interventional neuroradiology : journal of peritherapeutic neuroradiology, surgical procedures and related neurosciences*. 2011;17:306-315
377. Lubicz B, Collignon L, Raphaeli G, De Witte O. Pipeline flow-diverter stent for endovascular treatment of intracranial aneurysms: Preliminary experience in 20 patients with 27 aneurysms. *World Neurosurg*. 2011;76:114-119
378. Albuquerque FC. Visual impairment after endovascular treatment: Does stent placement increase the incidence? *World Neurosurg*. 2012;78:222
379. Szikora I, Berentei Z, Kulcsar Z, Marosfoi M, Vajda ZS, Lee W, et al. Treatment of intracranial aneurysms by functional reconstruction of the parent artery: The budapest experience with the pipeline embolization device. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2010;31:1139-1147
380. Kallmes DF, Ding YH, Dai D, Kadirvel R, Lewis DA, Cloft HJ. A second-generation, endoluminal, flow-disrupting device for treatment of saccular aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2009;30:1153-1158

381. Griessenauer CJ, Ogilvy CS, Foreman PM, Chua MH, Harrigan MR, Stapleton CJ, et al. Pipeline embolization device for small paraophthalmic artery aneurysms with an emphasis on the anatomical relationship of ophthalmic artery origin and aneurysm. *J Neurosurg.* 2016;125:1352-1359
382. Makoyeva A, Bing F, Darsaut TE, Salazkin I, Raymond J. The varying porosity of braided self-expanding stents and flow diverters: An experimental study. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2013;34:596-602
383. Ma D, Dargush GF, Natarajan SK, Levy EI, Siddiqui AH, Meng H. Computer modeling of deployment and mechanical expansion of neurovascular flow diverter in patient-specific intracranial aneurysms. *Journal of biomechanics.* 2012;45:2256-2263
384. Bing F, Darsaut TE, Salazkin I, Makoyeva A, Gevry G, Raymond J. Stents and flow diverters in the treatment of aneurysms: Device deformation in vivo may alter porosity and impact efficacy. *Neuroradiology.* 2013;55:85-92
385. Hayreh SS. The 1994 von sallman lecture. The optic nerve head circulation in health and disease. *Experimental eye research.* 1995;61:259-272
386. Ohno-Matsui K, Futagami S, Yamashita S, Tokoro T. Zinn-haller arterial ring observed by icg angiography in high myopia. *The British journal of ophthalmology.* 1998;82:1357-1362
387. Jonas JB, Holbach L, Panda-Jonas S. Peripapillary arterial circle of zinn-haller: Location and spatial relationships with myopia. *PLoS One.* 2013;8:e78867
388. Holmes DR, Jr., Kereiakes DJ, Garg S, Serruys PW, Dehmer GJ, Ellis SG, et al. Stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56:1357-1365
389. Joner M, Finn AV, Farb A, Mont EK, Kolodgie FD, Ladich E, et al. Pathology of drug-eluting stents in humans: Delayed healing and late thrombotic risk. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:193-202
390. Brash JL, Scott CF, ten Hove P, Wojciechowski P, Colman RW. Mechanism of transient adsorption of fibrinogen from plasma to solid surfaces: Role of the contact and fibrinolytic systems. *Blood.* 1988;71:932-939
391. Brinjikji W, Lanzino G, Cloft HJ, Siddiqui AH, Hanel RA, Kallmes DF. Platelet testing is associated with worse clinical outcomes for patients treated with the pipeline embolization device. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2015;36:2090-2095
392. Skukalek SL, Winkler AM, Kang J, Dion JE, Cawley CM, Webb A, et al. Effect of antiplatelet therapy and platelet function testing on hemorrhagic and thrombotic complications in patients with cerebral aneurysms treated with the pipeline embolization device: A review and meta-analysis. *J Neurointerv Surg.* 2016;8:58-65
393. Faught RW, Satti SR, Hurst RW, Pukenas BA, Smith MJ. Heterogeneous practice patterns regarding antiplatelet medications for neuroendovascular stenting in the USA: A multicenter survey. *J Neurointerv Surg.* 2014;6:774-779
394. Hagen MW, Girdhar G, Wainwright J, Hinds MT. Thrombogenicity of flow diverters in an ex vivo shunt model: Effect of phosphorylcholine surface modification. *J Neurointerv Surg.* 2016
395. Guedon A, Clarencon F, Di Maria F, Rosso C, Biondi A, Gabrieli J, et al. Very late ischemic complications in flow-diverter stents: A retrospective analysis of a single-center series. *J Neurosurg.* 2016;125:929-935
396. Caligiuri G, Rossignol P, Julia P, Groyer E, Mouradian D, Urbain D, et al. Reduced immunoregulatory cd31+ t cells in patients with atherosclerotic abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:618-623
397. Marelli-Berg FM, Clement M, Mauro C, Caligiuri G. An immunologist's guide to cd31 function in t-cells. *J Cell Sci.* 2013;126:2343-2352
398. Caligiuri GN, A. Utilisation de peptides de cd31 dans le traitement d'affections thrombotiques et auto-immunes 2009;WO2009EP58188 20090630
399. Lee H, Dellatore SM, Miller WM, Messersmith PB. Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. *Science.* 2007;318:426-430
400. Kim S, Kim DS, Kang SM. Reversible layer-by-layer deposition on solid substrates inspired by mussel byssus cuticle. *Chem Asian J.* 2014;9:63-66
401. Waite JH. Mussel power. *Nat Mater.* 2008;7:8-9

402. Kang SM, Hwang NS, Yeom J, Park SY, Messersmith PB, Choi IS, et al. One-step multipurpose surface functionalization by adhesive catecholamine. *Adv Funct Mater.* 2012;22:2949-2955
403. Pierot L, Cognard C, Spelle L, Moret J. Safety and efficacy of balloon remodeling technique during endovascular treatment of intracranial aneurysms: Critical review of the literature. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2012;33:12-15
404. Pierot L, Wakhloo AK. Endovascular treatment of intracranial aneurysms: Current status. *Stroke; a journal of cerebral circulation.* 2013;44:2046-2054
405. Lee JY, Seo JH, Cho YD, Kang HS, Han MH. Endovascular treatment of wide-neck intracranial aneurysms using a microcatheter protective technique: Results and outcomes in 75 aneurysms. *Ajnr: American Journal of Neuroradiology.* 2011;32:917-922
406. Pierot L, Spelle L, Molyneux A, Byrne J, Webcast, French Observatory I. Clinical and anatomical follow-up in patients with aneurysms treated with the web device: 1-year follow-up report in the cumulated population of 2 prospective, multicenter series (webcast and french observatory). *Neurosurgery.* 2016;78:133-141
407. Pierot L, Costalat V, Moret J, Szikora I, Klisch J, Herbreteau D, et al. Safety and efficacy of aneurysm treatment with web: Results of the webcast study. *J Neurosurg.* 2016;124:1250-1256
408. Asnafi S, Rouchaud A, Pierot L, Brinjikji W, Murad MH, Kallmes DF. Efficacy and safety of the woven endobridge (web) device for the treatment of intracranial aneurysms: A systematic review and meta-analysis. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2016;37:2287-2292
409. Brinjikji W, Murad MH, Lanzino G, Cloft HJ, Kallmes DF. Endovascular treatment of intracranial aneurysms with flow diverters: A meta-analysis. *Stroke.* 2013;44:442-447
410. Pierot L, Spelle L, Vitry F. Immediate anatomic results after the endovascular treatment of unruptured intracranial aneurysms: Analysis of the atena series. *AJNR. American journal of neuroradiology.* 2010;31:140-144
411. Pierot L, Cognard C, Ricolfi F, Anxionnat R. Immediate anatomic results after the endovascular treatment of ruptured intracranial aneurysms: Analysis in the clarity series. *AJNR. American journal of neuroradiology.* 2010;31:907-911
412. Ryu CW, Park S, Shin HS, Koh JS. Complications in stent-assisted endovascular therapy of ruptured intracranial aneurysms and relevance to antiplatelet administration: A systematic review. *AJNR. American journal of neuroradiology.* 2015;36:1682-1688
413. Hong Y, Wang YJ, Deng Z, Wu Q, Zhang JM. Stent-assisted coiling versus coiling in treatment of intracranial aneurysm: A systematic review and meta-analysis. *PLoS one.* 2014;9:e82311
414. Pierot L, Spelle L, Vitry F. Immediate clinical outcome of patients harboring unruptured intracranial aneurysms treated by endovascular approach: Results of the atena study. *Stroke; a journal of cerebral circulation.* 2008;39:2497-2504
415. Cognard C, Pierot L, Anxionnat R, Ricolfi F. Results of embolization used as the first treatment choice in a consecutive nonselected population of ruptured aneurysms: Clinical results of the clarity gdc study. *Neurosurgery.* 2011;69:837-841; discussion 842
416. Kallmes DF, Hanel R, Lopes D, Boccardi E, Bonafe A, Cekirge S, et al. International retrospective study of the pipeline embolization device: A multicenter aneurysm treatment study. *AJNR. American journal of neuroradiology.* 2015;36:108-115
417. Pierot L, Klisch J, Gauvrit J, Szikora I, Leonardi M, Liebig T, et al. P-009 web endovascular treatment of wide-neck bifurcation aneurysms: Short- and midterm results in a european study. *J Neurointerv Surg.* 2014;6 Suppl 1:A25
418. Lubicz B, Klisch J, Gauvrit JY, Szikora I, Leonardi M, Liebig T, et al. Web-dl endovascular treatment of wide-neck bifurcation aneurysms: Short- and midterm results in a european study. *AJNR. American journal of neuroradiology.* 2014;35:432-438
419. Rouchaud A, Brinjikji W, Gunderson T, Caroff J, Gentric JC, Lanzino G, et al. Validity of the meyer scale for assessment of coiled aneurysms and aneurysm recurrence. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2016;37:844-848
420. Cloft HJ, Kaufmann T, Kallmes DF. Observer agreement in the assessment of endovascular aneurysm therapy and aneurysm recurrence. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2007;28:497-500

421. Gherasim DN, Gory B, Sivan-Hoffmann R, Pierot L, Raoult H, Gauvrit JY, et al. Endovascular treatment of wide-neck anterior communicating artery aneurysms using web-dl and web-sl: Short-term results in a multicenter study. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2015
422. McDonald JS, Carter RE, Layton KF, Mocco J, Madigan JB, Tawk RG, et al. Interobserver variability in retreatment decisions of recurrent and residual aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2013;34:1035-1039
423. Suh SH, Cloft HJ, Lanzino G, Woodward K, Kallmes DF. Interobserver agreement after pipeline embolization device implantation. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2013;34:1215-1218
424. Tollard E, Darsaut TE, Bing F, Guilbert F, Gevry G, Raymond J. Outcomes of endovascular treatments of aneurysms: Observer variability and implications for interpreting case series and planning randomized trials. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2012;33:626-631
425. Meyers PM, Schumacher HC, Higashida RT, Derdeyn CP, Nesbit GM, Sacks D, et al. Reporting standards for endovascular repair of saccular intracranial cerebral aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2010;31:E12-24
426. Raymond J, White PM, Molyneux AJ. Scales, agreement, outcome measures, and progress in aneurysm therapy. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2007;28:501-502
427. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, DiFede Velazquez DL, Zambrano JP, Suncion VY, et al. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: The poseidon randomized trial. *JAMA.* 2012;308:2369-2379
428. Bartunek J, Behfar A, Dolatabadi D, Vanderheyden M, Ostojic M, Dens J, et al. Cardiopoietic stem cell therapy in heart failure: The c-cure (cardiopoietic stem cell therapy in heart failure) multicenter randomized trial with lineage-specified biologics. *J Am Coll Cardiol.* 2013;61:2329-2338
429. Banerjee S, Bentley P, Hamady M, Marley S, Davis J, Shlebak A, et al. Intra-arterial immunoselected cd34+ stem cells for acute ischemic stroke. *Stem Cells Transl Med.* 2014;3:1322-1330
430. Detante O, Moisan A, Dimastromatteo J, Richard MJ, Riou L, Grillon E, et al. Intravenous administration of 99mtc-hmpao-labeled human mesenchymal stem cells after stroke: In vivo imaging and biodistribution. *Cell Transplant.* 2009;18:1369-1379
431. Ribourtout E, Raymond J. Gene therapy and endovascular treatment of intracranial aneurysms. *Stroke.* 2004;35:786-793
432. Metz RP, Patterson JL, Wilson E. Vascular smooth muscle cells: Isolation, culture, and characterization. *Methods Mol Biol.* 2012;843:169-176
433. Gong Z, Niklason LE. Small-diameter human vessel wall engineered from bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hmscs). *FASEB J.* 2008;22:1635-1648
434. Liu JY, Swartz DD, Peng HF, Gugino SF, Russell JA, Andreadis ST. Functional tissue-engineered blood vessels from bone marrow progenitor cells. *Cardiovasc Res.* 2007;75:618-628
435. Lozito TP, Tuan RS. Mesenchymal stem cells inhibit both endogenous and exogenous mmps via secreted timp3. *J Cell Physiol.* 2011;226:385-396
436. Ross JJ, Hong Z, Willenbring B, Zeng L, Isenberg B, Lee EH, et al. Cytokine-induced differentiation of multipotent adult progenitor cells into functional smooth muscle cells. *The Journal of clinical investigation.* 2006;116:3139-3149
437. Ali MS, Starke RM, Jabbour PM, Tjounmakaris SI, Gonzalez LF, Rosenwasser RH, et al. Tnf-alpha induces phenotypic modulation in cerebral vascular smooth muscle cells: Implications for cerebral aneurysm pathology. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013;33:1564-1573
438. Aoki T, Fukuda M, Nishimura M, Nozaki K, Narumiya S. Critical role of tnfr1 signaling in intracranial aneurysm formation. *Acta Neuropathol Commun.* 2014;2:34
439. Maddahi A, Kruse LS, Chen QW, Edvinsson L. The role of tumor necrosis factor-alpha and tnfr1 receptors in cerebral arteries following cerebral ischemia in rat. *J Neuroinflammation.* 2011;8:107
440. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:726-736

441. Fang X, Zhao R, Wang K, Li Z, Yang P, Huang Q, et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are involved in aneurysm repair in rabbits. *J Clin Neurosci*. 2012;19:1283-1286
442. Zhang S, An Q, Li Q, Huang J, Chen X, Chen X, et al. Therapeutic benefit of bone marrow-derived endothelial progenitor cell transplantation after experimental aneurysm embolization with coil in rats. *PLoS One*. 2014;9:e90069
443. Bygglin H, Laaksamo E, Myllarniemi M, Tulamo R, Hernesniemi J, Niemela M, et al. Isolation, culture, and characterization of smooth muscle cells from human intracranial aneurysms. *Acta Neurochir (Wien)*. 2011;153:311-318
444. Allaire E, Muscatelli-Groux B, Mandet C, Guinault AM, Bruneval P, Desgranges P, et al. Paracrine effect of vascular smooth muscle cells in the prevention of aortic aneurysm formation. *Journal of vascular surgery*. 2002;36:1018-1026
445. Losy F, Dai J, Pages C, Ginat M, Muscatelli-Groux B, Guinault AM, et al. Paracrine secretion of transforming growth factor-beta1 in aneurysm healing and stabilization with endovascular smooth muscle cell therapy. *Journal of vascular surgery*. 2003;37:1301-1309
446. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997;276:75-81
447. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964-967
448. Liang C, Feng H, Deng BQ, Li ZF, Huang QH, Zhao W, et al. Decreased levels and function of circulating endothelial progenitor cells in unruptured intracranial saccular aneurysm patients. *Neurol Sci*. 2014;35:23-28
449. Wei H, Mao Q, Liu L, Xu Y, Chen J, Jiang R, et al. Changes and function of circulating endothelial progenitor cells in patients with cerebral aneurysm. *J Neurosci Res*. 2011;89:1822-1828
450. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (topcare-ami). *Circulation*. 2002;106:3009-3017
451. Assmus B, Fischer-Rasokat U, Honold J, Seeger FH, Fichtlscherer S, Tonn T, et al. Transcoronary transplantation of functionally competent bmcs is associated with a decrease in natriuretic peptide serum levels and improved survival of patients with chronic postinfarction heart failure: Results of the topcare-chd registry. *Circ Res*. 2007;100:1234-1241
452. Assmus B, Honold J, Schachinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, et al. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. 2006;355:1222-1232
453. Sobrino T, Hurtado O, Moro MA, Rodriguez-Yanez M, Castellanos M, Brea D, et al. The increase of circulating endothelial progenitor cells after acute ischemic stroke is associated with good outcome. *Stroke*. 2007;38:2759-2764
454. Shirota T, Yasui H, Shimokawa H, Matsuda T. Fabrication of endothelial progenitor cell (epc)-seeded intravascular stent devices and in vitro endothelialization on hybrid vascular tissue. *Biomaterials*. 2003;24:2295-2302
455. He T, Smith LA, Harrington S, Nath KA, Caplice NM, Katusic ZS. Transplantation of circulating endothelial progenitor cells restores endothelial function of denuded rabbit carotid arteries. *Stroke*. 2004;35:2378-2384
456. Walczak P, Zhang J, Gilad AA, Kedziorek DA, Ruiz-Cabello J, Young RG, et al. Dual-modality monitoring of targeted intraarterial delivery of mesenchymal stem cells after transient ischemia. *Stroke*. 2008;39:1569-1574
457. Detante O, Valable S, de Fraipont F, Grillon E, Barbier EL, Moisan A, et al. Magnetic resonance imaging and fluorescence labeling of clinical-grade mesenchymal stem cells without impacting their phenotype: Study in a rat model of stroke. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1:333-341
458. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970;3:393-403
459. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006;119:2204-2213

460. Leobon B. Etudes des potentiels cardiogéniques et angiogéniques in vivo des cellules dérivées des tissus adipeux. *Université Toulouse III - Paul Sabatier*. 2008;PhD Thesis:233
461. Leobon B, Roncalli J, Joffre C, Mazo M, Boisson M, Barreau C, et al. Adipose-derived cardiomyogenic cells: In vitro expansion and functional improvement in a mouse model of myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2009;83:757-767
462. Caplan AI, Correa D. The msc: An injury drugstore. *Cell Stem Cell*. 2011;9:11-15
463. Li SF, Lu XF, Sun MH. [biological characteristics of mesenchymal stem cells in vitro derived from bone marrow of banna minipig inbred line]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2002;16:354-358
464. Du H, Taylor HS. Contribution of bone marrow-derived stem cells to endometrium and endometriosis. *Stem Cells*. 2007;25:2082-2086
465. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007;25:2739-2749
466. Moisan A, Pannetier N, Grillon E, Richard MJ, de Fraipont F, Remy C, et al. Intracerebral injection of human mesenchymal stem cells impacts cerebral microvasculature after experimental stroke: Mri study. *NMR Biomed*. 2012;25:1340-1348
467. Moisan A, Favre I, Rome C, De Fraipont F, Grillon E, Coquery N, et al. Intravenous injection of clinical grade human mscs after experimental stroke: Functional benefit and microvascular effect. *Cell Transplant*. 2016;25:2157-2171
468. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105:1815-1822
469. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004;363:1439-1441
470. Liu J, Kuwabara A, Kamio Y, Hu S, Park J, Hashimoto T, et al. Human mesenchymal stem cell-derived microvesicles prevent the rupture of intracranial aneurysm in part by suppression of mast cell activation via a pge2-dependent mechanism. *Stem Cells*. 2016;34:2943-2955
471. Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: Feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*. 2003;108:863-868
472. Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs*. 2001;169:12-20
473. Ikegame Y, Yamashita K, Hayashi S, Mizuno H, Tawada M, You F, et al. Comparison of mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow for ischemic stroke therapy. *Cytotherapy*. 2011;13:675-685
474. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*. 2007;100:1249-1260
475. Tian X, Fan J, Yu M, Zhao Y, Fang Y, Bai S, et al. Adipose stem cells promote smooth muscle cells to secrete elastin in rat abdominal aortic aneurysm. *PLoS One*. 2014;9:e108105
476. Ausman JI. The future of neurovascular surgery. Part i: Intracranial aneurysms. *Surg Neurol*. 1997;48:98-100
477. Murayama Y, Vinuela F, Suzuki Y, Do HM, Massoud TF, Guglielmi G, et al. Ion implantation and protein coating of detachable coils for endovascular treatment of cerebral aneurysms: Concepts and preliminary results in swine models. *Neurosurgery*. 1997;40:1233-1243; discussion 1243-1234
478. Raymond J, Roy D, Bojanowski M, Moundjian R, L'Esperance G. Endovascular treatment of acutely ruptured and unruptured aneurysms of the basilar bifurcation. *J Neurosurg*. 1997;86:211-219
479. Hayakawa M, Murayama Y, Duckwiler GR, Gobin YP, Guglielmi G, Vinuela F. Natural history of the neck remnant of a cerebral aneurysm treated with the Guglielmi detachable coil system. *J Neurosurg*. 2000;93:561-568
480. Cloft HJ. Hydrocoil for endovascular aneurysm occlusion (heal) study: 3-6 month angiographic follow-up results. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2007;28:152-154

481. Kimchi TJ, Willinsky RA, Spears J, Lee SK, ter Brugge K. Endovascular treatment of intracranial aneurysms with matrix coils: Immediate posttreatment results, clinical outcome and follow-up. *Neuroradiology*. 2007;49:223-229
482. Niimi Y, Song J, Madrid M, Berenstein A. Endosaccular treatment of intracranial aneurysms using matrix coils: Early experience and midterm follow-up. *Stroke*. 2006;37:1028-1032
483. Michel JB, Martin-Ventura JL, Egido J, Sakalihasan N, Treska V, Lindholt J, et al. Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans. *Cardiovasc Res*. 2011;90:18-27
484. Wolf YG, Thomas WS, Brennan FJ, Goff WG, Sise MJ, Bernstein EF. Computed tomography scanning findings associated with rapid expansion of abdominal aortic aneurysms. *Journal of vascular surgery*. 1994;20:529-535; discussion 535-528
485. Satta J, Laara E, Juvonen T. Intraluminal thrombus predicts rupture of an abdominal aortic aneurysm. *Journal of vascular surgery*. 1996;23:737-739
486. King PS, Cooperberg PL, Madigan SM. The anechoic crescent in abdominal aortic aneurysms: Not a sign of dissection. *AJR Am J Roentgenol*. 1986;146:345-348
487. Siegel CL, Cohan RH, Korobkin M, Alpern MB, Courneya DL, Leder RA. Abdominal aortic aneurysm morphology: Ct features in patients with ruptured and nonruptured aneurysms. *AJR Am J Roentgenol*. 1994;163:1123-1129
488. Mehard WB, Heiken JP, Sicard GA. High-attenuating crescent in abdominal aortic aneurysm wall at ct: A sign of acute or impending rupture. *Radiology*. 1994;192:359-362
489. Frosen J, Tulamo R, Paetau A, Laaksamo E, Korja M, Laakso A, et al. Saccular intracranial aneurysm: Pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol*. 2012
490. Kazi M, Thyberg J, Religa P, Roy J, Eriksson P, Hedin U, et al. Influence of intraluminal thrombus on structural and cellular composition of abdominal aortic aneurysm wall. *Journal of vascular surgery*. 2003;38:1283-1292
491. Venne D, Raymond J, Allas S, Roy D, Leclerc G, Boushira M, et al. Healing of experimental aneurysms. Ii: Platelet extracts can increase the thickness of the neointima at the neck of treated aneurysms. *J Neuroradiol*. 1999;26:92-100
492. Sherman LS, Munoz J, Patel SA, Dave MA, Paige I, Rameshwar P. Moving from the laboratory bench to patients' bedside: Considerations for effective therapy with stem cells. *Clin Transl Sci*. 2011;4:380-386
493. Gomes D, Louedec L, Plissonnier D, Dauge MC, Henin D, Osborne-Pellegrin M, et al. Endoluminal smooth muscle cell seeding limits intimal hyperplasia. *Journal of vascular surgery*. 2001;34:707-715.
494. Ingber DE. Tensegrity-based mechanosensing from macro to micro. *Prog Biophys Mol Biol*. 2008;97:163-179
495. Dunsmore SE, Shapiro SD. The bone marrow leaves its scar: New concepts in pulmonary fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113:180-182
496. Allaire E, Muscatelli-Groux Ba, Guinault A-M, Pages C, Goussard A, Mandet C, et al. Vascular smooth muscle cell endovascular therapy stabilizes already developed aneurysms in a model of aortic injury elicited by inflammation and proteolysis. *Annals of Surgery*. 2004;239:417-427
497. Autissier A, Letourneur D, Le Visage C. Pullulan-based hydrogel for smooth muscle cell culture. *J Biomed Mater Res A*. 2007;82:336-342
498. Autissier A, Visage CL, Pouzet C, Chaubet F, Letourneur D. Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze-drying/cross-linking process. *Acta Biomaterialia*. 2010;6:3640-3648
499. Bachelet L, Bertholon I, Lavigne D, Vassy R, Jandrot-Perrus M, Chaubet F, et al. Affinity of low molecular weight fucoidan for p-selectin triggers its binding to activated human platelets. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1790:141-146
500. Rouzet F, Bachelet-Violette L, Alsac JM, Suzuki M, Meulemans A, Louedec L, et al. Radiolabeled fucoidan as a p-selectin targeting agent for in vivo imaging of platelet-rich thrombus and endothelial activation. *J Nucl Med*. 2011
501. Li B, Lu F, Wei X, Zhao R. Fucoidan: Structure and bioactivity. *Molecules*. 2008;13:1671-1695

502. Kusaykin M, Bakunina I, Sova V, Ermakova S, Kuznetsova T, Besednova N, et al. Structure, biological activity, and enzymatic transformation of fucoidans from the brown seaweeds. *Biotechnol J*. 2008;3:904-915
503. Deux JF, Meddahi-Pelle A, Le Blanche AF, Feldman LJ, Collic-Jouault S, Bree F, et al. Low molecular weight fucoidan prevents neointimal hyperplasia in rabbit iliac artery in-stent restenosis model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1604-1609
504. Luyt CE, Meddahi-Pelle A, Ho-Tin-Noe B, Collic-Jouault S, Guezennec J, Louedec L, et al. Low-molecular-weight fucoidan promotes therapeutic revascularization in a rat model of critical hindlimb ischemia. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;305:24-30
505. White PM, Lewis SC, Gholkar A, Sellar RJ, Nahser H, Cognard C, et al. Hydrogel-coated coils versus bare platinum coils for the endovascular treatment of intracranial aneurysms (helps): A randomised controlled trial. *Lancet*. 2011;377:1655-1662
506. Ogilvy CS, Chua MH, Fusco MR, Griessenauer CJ, Harrigan MR, Sonig A, et al. Validation of a system to predict recanalization after endovascular treatment of intracranial aneurysms. *Neurosurgery*. 2015;77:168-173; discussion 173-164
507. Li H, Pan R, Wang H, Rong X, Yin Z, Milgrom DP, et al. Clipping versus coiling for ruptured intracranial aneurysms: A systematic review and meta-analysis. *Stroke*. 2013;44:29-37
508. Kaufmann TJ, Huston J, 3rd, Cloft HJ, Mandrekar J, Gray L, Bernstein MA, et al. A prospective trial of 3t and 1.5t time-of-flight and contrast-enhanced mr angiography in the follow-up of coiled intracranial aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2010;31:912-918
509. Brinjikji W, Yong Hong D, Dai D, Schroeder DJ, Kallmes DF, Kadirvel R. Statins are not associated with short-term improved aneurysm healing in a rabbit model of unruptured aneurysms. *J Neurointerv Surg*. 2016
510. Murayama Y, Vinuela F, Tateshima S, Gonzalez NR, Song JK, Mahdavi H, et al. Cellular responses of bioabsorbable polymeric material and Guglielmi detachable coil in experimental aneurysms. *Stroke*. 2002;33:1120-1128
511. Khan SH, Nichols C, Depowell JJ, Abruzzo TA, Ringer AJ. Comparison of coil types in aneurysm recurrence. *Clin Neurol Neurosurg*. 2012;114:12-16
512. Hoppe AL, Raghavan ML, Hasan DM. Comparison of the association of sac growth and coil compaction with recurrence in coil embolized cerebral aneurysms. *PLoS One*. 2015;10:e0123017
513. Raymond J, Leblanc P, Morel F, Salazkin I, Gevry G, Roorda S. Beta radiation and inhibition of recanalization after coil embolization of canine arteries and experimental aneurysms: How should radiation be delivered? *Stroke*. 2003;34:1262-1268
514. Raymond J, Metcalfe A, Desfaits AC, Ribourtout E, Salazkin I, Gilmartin K, et al. Alginate for endovascular treatment of aneurysms and local growth factor delivery. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2003;24:1214-1221
515. Matsumoto H, Terada T, Tsuura M, Itakura T, Ogawa A. Basic fibroblast growth factor released from a platinum coil with a polyvinyl alcohol core enhances cellular proliferation and vascular wall thickness: An in vitro and in vivo study. *Neurosurgery*. 2003;53:402-407; discussion 407-408
516. Reinges MH, Krings T, Drexler AY, Ludolph A, Sellhaus B, Bovi M, et al. Bare, bio-active and hydrogel-coated coils for endovascular treatment of experimentally induced aneurysms. Long-term histological and scanning electron microscopy results. *Interventional neuroradiology : journal of peritherapeutic neuroradiology, surgical procedures and related neurosciences*. 2010;16:139-150
517. Toma N, Imanaka-Yoshida K, Takeuchi T, Matsushima S, Iwata H, Yoshida T, et al. Tenascin-c-coated platinum coils for acceleration of organization of cavities and reduction of lumen size in a rat aneurysm model. *J Neurosurg*. 2005;103:681-686
518. Tsumoto T, Matsumoto H, Terada T, Tsuura M, Itakura T, Hamamoto T. A polyvinyl alcohol core coil containing basic fibroblast growth factor evaluated in rabbits with aneurysms induced by elastase. *Neurosurgery*. 2007;61:160-166; discussion 166
519. Kallmes DF, Fujiwara NH, Yuen D, Dai D, Li ST. A collagen-based coil for embolization of saccular aneurysms in a new zealand white rabbit model. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2003;24:591-596

520. Gao Y, Wang Q, Cui X, Liu Y, Zheng T, Chen C, et al. Controlled release of stromal cell-derived factor-1alpha from silk fibroin-coated coils accelerates intra-aneurysmal organization and occlusion of neck remnant by recruiting endothelial progenitor cells. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7:8366-8380
521. Raymond J, Mounayer C, Salazkin I, Metcalfe A, Gevry G, Janicki C, et al. Safety and effectiveness of radioactive coil embolization of aneurysms: Effects of radiation on recanalization, clot organization, neointima formation, and surrounding nerves in experimental models. *Stroke*. 2006;37:2147-2152
522. Smith MJ, Mascitelli J, Santillan A, Brennan JS, Tsiouris AJ, Riina HA, et al. Bare platinum vs matrix detachable coils for the endovascular treatment of intracranial aneurysms: A multivariate logistic regression analysis and review of the literature. *Neurosurgery*. 2011;69:557-564; discussion 565
523. Rivet DJ, Moran CJ, Mazumdar A, Pilgram TK, Derdeyn CP, Cross DT. Single-institution experience with matrix coils in the treatment of intracranial aneurysms: Comparison with same-center outcomes with the use of platinum coils. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2007;28:1736-1742
524. Piotin M, Spelle L, Mounayer C, Loureiro C, Ghorbani A, Moret J. Intracranial aneurysms coiling with matrix: Immediate results in 152 patients and midterm anatomic follow-up from 115 patients. *Stroke*. 2009;40:321-323
525. O'Hare AM, Fanning NF, Ti JP, Dunne R, Brennan PR, Thornton JM. Hydrocoils, occlusion rates, and outcomes: A large single-center study. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2010;31:1917-1922
526. Linfante I, DeLeo MJ, 3rd, Gounis MJ, Brooks CS, Wakhloo AK. Cerecyte versus platinum coils in the treatment of intracranial aneurysms: Packing attenuation and clinical and angiographic midterm results. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2009;30:1496-1501
527. Ishii A, Murayama Y, Nien YL, Yuki I, Adapon PH, Kim R, et al. Immediate and midterm outcomes of patients with cerebral aneurysms treated with matrix1 and matrix2 coils: A comparative analysis based on a single-center experience in 250 consecutive cases. *Neurosurgery*. 2008;63:1071-1077; discussion 1077-1079
528. Gunnarsson T, Tong FC, Klurfan P, Cawley CM, Dion JE. Angiographic and clinical outcomes in 200 consecutive patients with cerebral aneurysm treated with hydrogel-coated coils. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2009;30:1657-1664
529. Gaba RC, Ansari SA, Roy SS, Marden FA, Viana MA, Malisch TW. Embolization of intracranial aneurysms with hydrogel-coated coils versus inert platinum coils: Effects on packing density, coil length and quantity, procedure performance, cost, length of hospital stay, and durability of therapy. *Stroke*. 2006;37:1443-1450
530. Fiorella D, Albuquerque FC, McDougall CG. Durability of aneurysm embolization with matrix detachable coils. *Neurosurgery*. 2006;58:51-59; discussion 51-59
531. Quintavalla J, Uziel-Fusi S, Yin J, Boehnlein E, Pastor G, Blancuzzi V, et al. Fluorescently labeled mesenchymal stem cells (mscs) maintain multilineage potential and can be detected following implantation into articular cartilage defects. *Biomaterials*. 2002;23:109-119
532. Fang D, Seo BM, Liu Y, Sonoyama W, Yamaza T, Zhang C, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells is an optimal approach for plastic surgery. *Stem Cells*. 2007;25:1021-1028
533. Zhao Q, Gong P, Tan Z, Yang X. Differentiation control of transplanted mesenchymal stem cells (mscs): A new possible strategy to promote periodontal regeneration. *Med Hypotheses*. 2008;70:944-947
534. Dong JD, Gu YQ, Li CM, Wang CR, Feng ZG, Qiu RX, et al. Response of mesenchymal stem cells to shear stress in tissue-engineered vascular grafts. *Acta Pharmacol Sin*. 2009;30:530-536
535. O'Cearbhaill ED, Punchard MA, Murphy M, Barry FP, McHugh PE, Barron V. Response of mesenchymal stem cells to the biomechanical environment of the endothelium on a flexible tubular silicone substrate. *Biomaterials*. 2008;29:1610-1619

536. Ball SG, Shuttleworth CA, Kielty CM. Platelet-derived growth factor receptors regulate mesenchymal stem cell fate: Implications for neovascularization. *Expert Opin Biol Ther.* 2010;10:57-71
537. Plissonnier D, Henaff M, Poncet P, Paris E, Tron F, Thuillez C, et al. Involvement of antibody-dependent apoptosis in graft rejection. *Transplantation.* 2000;69:2601-2608
538. Schneider F, Saucy F, de Blic R, Dai J, Mohand F, Rouard H, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells stabilize already-formed aortic aneurysms more efficiently than vascular smooth muscle cells in a rat model. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery.* 2013;45:666-672
539. Viswanathan S, Read EJ. Bench-to bedside development of msc therapies: A multidisciplinary approach. In: Hematti P, Keating A, eds. *Mesenchymal stromal cells: Biology and clinical applications.* New York, NY: Springer New York; 2013:279-315.
540. Asahara T, Kawamoto A, Masuda H. Concise review: Circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. *Stem Cells.* 2011;29:1650-1655
541. Zhu JH, Wang XX, Zhang FR, Shang YP, Tao QM, Zhu JH, et al. Safety and efficacy of autologous endothelial progenitor cells transplantation in children with idiopathic pulmonary arterial hypertension: Open-label pilot study. *Pediatr Transplant.* 2008;12:650-655
542. Sukmawati D, Tanaka R. Introduction to next generation of endothelial progenitor cell therapy: A promise in vascular medicine. *Am J Transl Res.* 2015;7:411-421
543. Lalu MM, McIntyre L, Pugliese C, Fergusson D, Winston BW, Marshall JC, et al. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (safecell): A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *PLoS One.* 2012;7:e47559
544. Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy.* 2003;5:485-489
545. Mitha AP. The future of intracranial aneurysm management: Personalized medicine. *World Neurosurg.* 2013;80:230-231
546. Berge J, Blanco P, Rooryck C, Boursier R, Marnat G, Gariel F, et al. Understanding flow patterns and inflammatory status in intracranial aneurysms: Towards a personalized medicine. *J Neuroradiol.* 2016;43:141-147

RESUME

La genèse d'un anévrisme intracrânien n'est pas uniquement due à un effet mécanique mais à un ensemble d'éléments biologiques. Parmi eux, le thrombus intra-anévrysmal a un rôle majeur car il est le site d'activation de nombreuses métalloprotéinases et d'une protéolyse importante. Cependant, le thrombus du sac anévrysmal est également un substrat indispensable à la cicatrisation des anévrysmes après traitement endovasculaire car il sert de support à la recolonisation de l'anévrisme par des cellules mésenchymateuses. Dans les différents travaux présentés dans cette thèse, nous avons pu analyser une partie des phénomènes biologiques impliqués dans le succès ou l'échec des traitements endovasculaires. Les travaux présentés sont basés sur des expérimentations dans le modèle d'anévrisme à l'élastase chez le lapin et traités par coils, *flow-diverters* ou dispositifs intra-sacculaires (WEB). Ces travaux permettent de mieux comprendre les mécanismes biologiques mis en jeu par les différents traitements endovasculaires. L'analyse de ces phénomènes est indispensable pour comprendre les causes d'échec, mais aussi afin de développer de nouveaux outils biologiquement actifs pour le traitement des anévrysmes intracrâniens. Nous proposons ainsi le développement de stents *flow-diverters* biologiquement actifs. Nous proposons également trois approches différentes de thérapie cellulaire par voie endovasculaire, utilisant des cellules souches mésenchymateuses autologues, permettant une recolonisation du thrombus intra-anévrysmal et une cicatrisation accélérée de l'anévrisme.

Au total, le traitement des anévrysmes intracrâniens ne doit pas être basé uniquement sur des considérations mécaniques. Le développement des futurs dispositifs endovasculaires devra inclure une dimension biologique pour optimiser la cicatrisation complète des anévrysmes intracrâniens.

Mots-Clés : Anévrisme, Thrombus, Cicatrisation, Coils, *Flow-Diverter*, WEB, Thérapie Cellulaire.

SUMMARY

The genesis of an intracranial aneurysm is not only due to a mechanical effect but to a set of biological elements. Among them, intra-aneurysmal thrombus plays a major role, as it is the site of activation of many metalloproteinases and an important site of proteolysis. However, the thrombus of the aneurysmal sac is also crucial for the healing of the aneurysm after endovascular treatment, because it serves as a support for the recolonization of the aneurysm by mesenchymal cells. In the various works presented in this thesis, we analyzed some of the biological phenomena involved in the success or failure of endovascular treatments. The presented works are based on experiments in the elastase aneurysm model in the rabbit and treated with coils, flow-diverters or intra-saccular devices. This work enables to better understand the biological mechanisms involved in the various endovascular treatments. The analysis of these phenomena is essential to understand the causes of failure, but also to develop new biologically active devices for the treatment of intracranial aneurysms. We propose the development of biologically active flow-diverter stents. We also propose three different approaches of endovascular cell therapy, using autologous mesenchymal stem cells, allowing recolonization of the intra-aneurysmal thrombus and accelerated healing of the aneurysm.

The treatment of intracranial aneurysms can not be based solely on mechanical considerations. The development of future endovascular devices should include a biological dimension to improve the complete healing of intracranial aneurysms.

Key Words : Aneurysm, Thrombus, Healing, Coils, Flow-Diverter, WEB, Stem Cells Therapy.