UNIVERSITE PARIS DESCARTES

UNITE INSERM U970 – PARCC HEGP

ANNEE 2014

THESE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université Paris Descartes

École doctorale : Biologie et biotechnologie (B2T)

Présentée et soutenue publiquement par

Safa MELLAK

TRAFIC MONOCYTAIRE DANS L'ANEVRISME DE L'AORTE ABDOMINALE

Le 10 novembre 2014

Devant un jury composé de :

Dr Giuseppina CALIGIURI	Rapporteur
Dr Philippe LESNIK	Rapporteur
Pr Emmanuel MESSAS	Examinateur
Pr Ziad MALLAT	Directeur de thèse

Résumé

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde et voient leur incidence augmenter avec l'expansion de leurs principaux facteurs de risque, tels que le vieillissement, l'obésité et le diabète. Parmi ces maladies l'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA), dont on sait aujourd'hui que le système immunitaire favorise le développement. Il est parmi les pathologies les plus courantes de l'aorte abdominale et représente un problème de santé publique. Le rôle des macrophages dans l'AAA a été récemment mis en évidence. Ces cellules inflammatoires sont les plus représentées dans l'adventice anévrismale, et ont tendance à s'accumuler au cours du temps dans l'AAA. Des données récentes montrent que leur accumulation est particulièrement accrue dans les premiers jours de la formation de l'AAA chez la souris, et que l'inhibition de la voie CCR2/MCP1 ou la déplétion précoce des monocytes circulants ont un effet protecteur. Il semble donc essentiel de comprendre les mécanismes d'infiltration des monocytes lors de l'initiation et du développement de l'AAA.

Mon travail de thèse se focalise sur le rôle des sous-types monocytaires et l'impact de leur trafic sur le développement de l'AAA. En utilisant un modèle d'induction d'anévrisme chez des souris *ApoE*$^{-/-}$, nous avons montré que l'angiotensine-II (Ang II) entraine la mobilisation des monocytes 'Ly-6C^{high}', et des monocytes 'Ly-6C^{low}' à un moindre degré, à partir de la rate, puis leur recrutement au niveau de l'aorte. La splénectomie ou la déficience en lymphocyte B inhibe cette mobilisation monocytaire et protège de l'anévrisme. En revanche, la reconstitution de souris immuno-déficientes *Apoe*$^{-/-}$*Rag2*$^{-/-}$ par des splénocytes totaux, contrairement aux splénocytes déplétés en lymphocytes B, restaure la mobilisation monocytaire et restitue la susceptibilité de ces souris à l'AAA.

Cette thèse apporte de nouveaux indices sur les événements précoces impliqués dans la formation d'AAA, en mettant l'accent sur le rôle du réservoir monocytaire splénique dans ce processus. Elle identifie également une fonction jusque-là méconnue des lymphocytes B dans la mobilisation rapide et transitoire des monocytes en réponse à l'Ang II.
Il conviendra par la suite d'identifier les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces interactions, ce qui devrait permettre d'envisager de nouvelles voies thérapeutiques visant à moduler l'effet de ces types cellulaires dans l'AAA.

Mots clés : Monocytes, Anévrisme, Angiotensin II, lymphocytes B

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the first cause of mortality around the industrialized world with a continuous increase in their incidence along with the expansion of the major risk factors such as aging, obesity and diabetes. In abdominal aortic aneurysm (AAA), the presence of inflammatory infiltrates, and particularly monocytes/macrophages, has underscored the contribution and importance of immuno-inflammatory responses in aneurysmal degeneration. It is one of the most common diseases of the abdominal aorta and presents a major health problem. The importance of macrophages has recently been highlighted by a number of evidence, which are the main population observed within the site of aneurysm, are believed to derive from circulating monocytes although no direct evidence has been provided to date. Recent evidence has shown that their accumulation is particularly enhanced in the early onset of AAA in mice, and that the inhibition of CCR2/ MCP1 signaling as well as the early depletion of circulating monocytes, are protective. Hence, it seems crucial to understand the mechanisms of monocyte recruitment in the initiation and progression of AAA.

In this PhD project with a particular interest in abdominal aortic aneurysm, we were particularly interested in understanding the trafficking behavior of monocyte subsets in AAA and their role in disease pathogenesis. Using a mouse model of aneurysm induction in ApoE-/- mice, we showed that Ang II triggered the mobilization of Ly-6C^{high}, and to a lesser extent Ly-6C^{low} monocytes, from the spleen and their consequent recruitment in the aorta. Spleen removal or B lymphocyte deficiency in *Apoe*$^{-/-}$ mice similarly impaired early monocyte mobilization in response to Ang II and protected against AAA development, independently of blood pressure. Reconstitution of *Apoe*$^{-/-}$ *Rag*$^{-/-}$ mice with total splenocytes but not with B-cell depleted splenocytes restored monocyte mobilization in response to Ang II and enhanced susceptibility to AAA.

Taken together, this study provides novel mechanistic insights on the early events involved in AngII-induced AAA formation. It highlights the role of the splenic monocyte reservoir in this process and identifies an intriguing role for B lymphocytes in mediating AngII-induced early and transient mobilization of splenic monocytes. Nevertheless, Further understanding of the molecular mechanisms that underlie such interactions is likely to lead to the identification of effective therapeutic targets.

Keywords: Monocytes, Aneurysm, Angiotensin II, B lymphocytes

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je remercie chaleureusement Ziad MALLAT et Alain TEDGUI de m'avoir accueilli au sein de leur équipe. Je remercie Ziad et Alain pour tout ce qu'ils m'ont enseigné sur le plan scientifique, pour leur disponibilité et leur enthousiasme pour l'immunologie.

Je remercie Stéphane qui a encadré ce travail et l'ensemble des membres de mon équipe pour leur soutien et leur aide.

Je remercie tous les autres membres de l'unité 970, pour les moments agréables que nous avons partagés lors de ces trois dernières années.

Je remercie bien évidemment toute ma famille.

Table des matières

AVANT-PROPOS 6

Introduction Bibliographique 8

I. PHYSIOLOGIE DE L'AORTE 10

A. *Généralités sur le système cardiovasculaire* 10

B. *Classification des vaisseaux sanguins* 10

C. *Description de l'aorte : anatomie* 13

D. *Histologie de l'aorte* 15

1. Structure de la matrice extracellulaire 17
2. Dégradation de la matrice extracellulaire 18

II. LA PATHOLOGIE : ANÉVRISME DE L'AORTE ABDOMINALE 22

A. *Généralités* 22

B. *Principaux syndromes génétiques associés aux anévrismes* 24

1. Syndrome de Marfan 24
2. Syndrome de Loeys-Dietz 25
3. Syndrome d'Ehlers-Danlos vasculaire 26
4. Syndrome d'ostéoarthrite-anévrisme 26

C. *Critères décisionnels d'intervention chirurgicale* 27

D. *Traitement de l'anévrisme : État de l'art* 28

1. Thérapie pharmacologique 28
2. La chirurgie 29

III. MODÈLES ANIMAUX DE L'ANÉVRISME DE L'AORTE ABDOMINALE 34

A. *Modèle de traitement au chlorure de calcium* 35

B. *Modèle de perfusion locale d'élastase* 35

C. *Modèle de perfusion systémique d'angiotensine II (souris hypercholestérolémiques)* 36

1. Actions de l'angiotensine II 37
2. Induction d'AAA par perfusion chronique d'angiotensine II 38

D. *Modèle d'infusion systémique d'angiotensine II et neutralisation du TGF-β (souris normocholestérolémiques)* 42

IV. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'AAA 44

A. *Concept général* 44

B. *Considérations structurales* 46

C. Facteurs génétiques *46*
D. Facteurs hémodynamiques *47*
E. Facteurs physiopathologiques *47*
1. Activité enzymatique 47
2. Réponse inflammatoire 53

V. LES MONOCYTES : CARACTÉRISTIQUES ET RÔLES DANS L'INFLAMMATION 64

A. Les monocytes : définition et caractéristiques *65*
1. Hétérogénéité des monocytes humains 66
2. Hétérogénéité des monocytes murins 69
3. Homologie entre les monocytes humains et murins 72
B. Développement et différenciation des monocytes *74*
1. Progéniteurs dans la moelle osseuse 74
2. Le lien entre les deux sous-types monocytaires 75
3. La différenciation au-delà du monocyte 76
C. Trafic des monocytes et leurs rôles dans l'inflammation *80*
1. Origine médullaire et réservoir splénique 80
2. Trafic monocytaire et chimiokines 82
3. Techniques d'analyse des comportements migratoires des monocytes *in vivo* 84
4. Trafic monocytaire à l'état basal 85
5. Recrutement monocytaire aux sites d'infection et d'inflammation 86

OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE 97

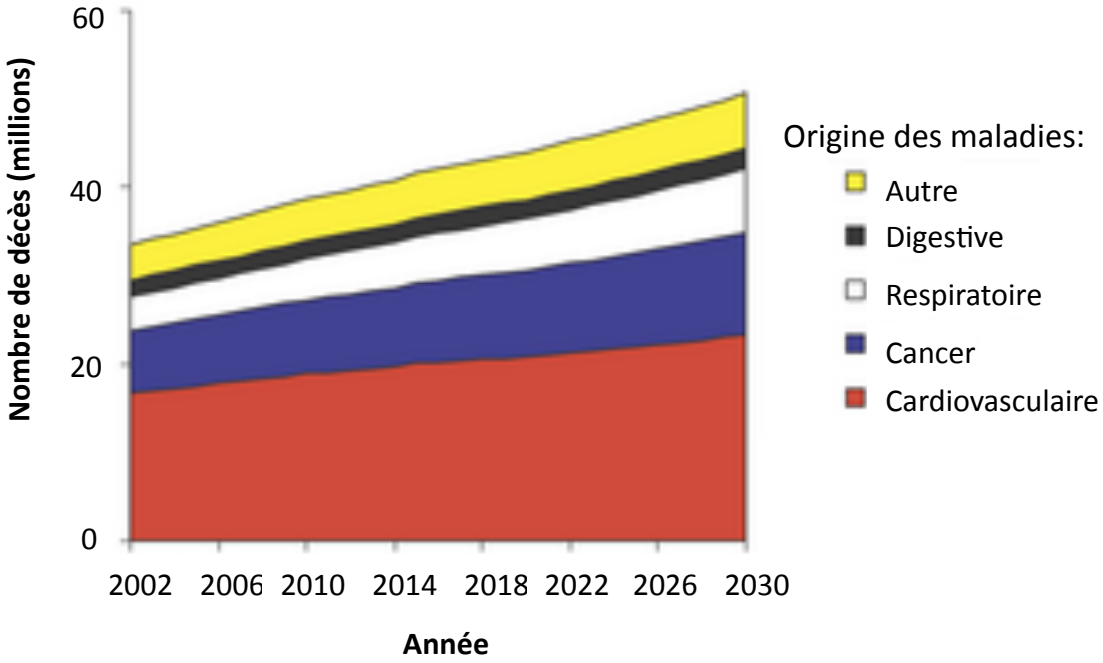
Résultats 98
Discussion 132
Références Bibliographiques 142
Annexes 179

Table des figures

Figure 1 : Système cardiovasculaire chez l'homme. 10
Figure 2 : Structure des vaisseaux sanguins: artères, veines et capillaires. 12
Figure 3 : Les segments aortiques et leurs collatérales. 14
Figure 4 : Structure de la paroi d'une artère. 16
Figure 5 : Représentation d'un anévrisme de l'aorte abdominale. 22
Figure 6 : Les types d'anévrismes (Les 'vrais' et les pseudoanévrismes). 24
Figure 7 : Les interventions chirurgicales possibles lors d'un AAA. 30
Figure 8 : Les actions inflammatoires des principaux effecteurs du SRAA. 38
Figure 9 : AAA chez une souris femelle ApoE$^{-/-}$. 41
Figure 10 : Les différents facteurs pouvant contribuer à la formation d'AAA. 45
Figure 11 : Diagramme schématique des principaux mécanismes impliqués dans l'AAA. 54
Figure 12 : Les principaux sous-types monocytaires humains. 67
Figure 13 : Différences entre le recrutement des monocytes Ly-6C^{high} (a) et des monocytes Ly-6C^{low} (b). 71
Figure 14 : Origine et différenciation des monocytes en macrophages et cellules dendritiques. 75
Figure 15 : Développement des phagocytes mononucléaires chez la souris. 77
Figure 16 : Différenciation et fonction des sous-types monocytaires chez la souris. 80
Figure 17 : Le trafic des sous-types monocytaires circulants. 82
Figure 18 : Recrutement des monocytes Ly-6C^{high} contre des infections bactériennes, parasitaires, fongiques ou virales. 88
Figure 19 : Les monocytes circulants dans l'athérosclérose. 91
Figure 20 : Les phases de recrutement des sous-populations monocytaires dans un modèle d'infarctus du myocarde. 92
Figure 21 : Modèle bi-phasique de l'accumulation des monocytes/macrophages dans l'IM. 94
Figure 22 : Modèle d'expansion d'AAA mettant en évidence le rôle des monocytes. 95

AVANT-PROPOS

Les maladies cardiovasculaires représentent un problème majeur de santé publique dans le monde. Chaque année, on compte plus de 17 millions de décès imputables à une maladie cardiovasculaire, soit 30% de la mortalité mondiale totale (OMS, 2011). Bien que la mortalité liée à ces maladies n'a cessé de décroitre depuis les années 80, leur incidence augmente et les estimations prévoient que les maladies cardiovasculaires resteront en tête des causes de mortalité dans les prochaines années avec des prévisions de plus de 22 millions de morts en 2030 (Mathers and Loncar, 2006, OMS, 2011).



Estimations des causes de décès dans le monde.

Les projections prévoient que le nombre de décès liés aux maladies cardiovasculaires va passer de 16,7 millions en 2002 à 23,3 millions en 2030. Adapté de (Mathers and Loncar, 2006, OMS, 2011).

A l'échelle nationale, les maladies cardiovasculaires sont aujourd'hui la deuxième cause de décès en France (29%), derrière les cancers (30%), et demeurent les plus coûteuses en termes de consommation de soins et de biens médicaux (CNAMTS, 2010).

Les anévrismes de l'aorte abdominale (AAA) sont un problème de santé majeur dans les pays occidentaux. En effet, les AAA touchent à peu près 5% des hommes de plus de 60 ans et représentent la 13ème cause de décès dans les pays développés. L'aspect multifactoriel de cette pathologie en fait un champ de recherche particulièrement attrayant. La compréhension

des mécanismes immunophysiopathologiques qui gouvernent le développement de cette maladie silencieuse, constitue un enjeu majeur de la recherche biomédicale.

Dans les présents travaux, nous nous intéressons au rôle des sous-types monocytaires et à l'impact de leur trafic sur le développement des AAA.

Cette thèse est composée des parties suivantes :

- Une introduction bibliographique sur les connaissances actuelles autour de l'anévrisme de l'aorte abdominale ainsi qu'une brève description des caractéristiques des monocytes, de leur trafic et leurs implications dans la maladie ;
- Une partie exposant les principaux résultats expérimentaux, intégrant la publication principale de cette étude ;
- Une discussion générale et des perspectives.

Introduction Bibliographique

I. PHYSIOLOGIE DE L'AORTE

A. Généralités sur le système cardiovasculaire

Le système cardiovasculaire assure le transport sanguin au sein de l'organisme. Sa fonction principale est de permettre un apport continu, à travers le sang, d'éléments indispensables au bon fonctionnement de l'organisme (oxygène, nutriments, etc.), et d'éliminer les déchets (dioxyde de carbone, catabolites, etc.) (Figure 1).

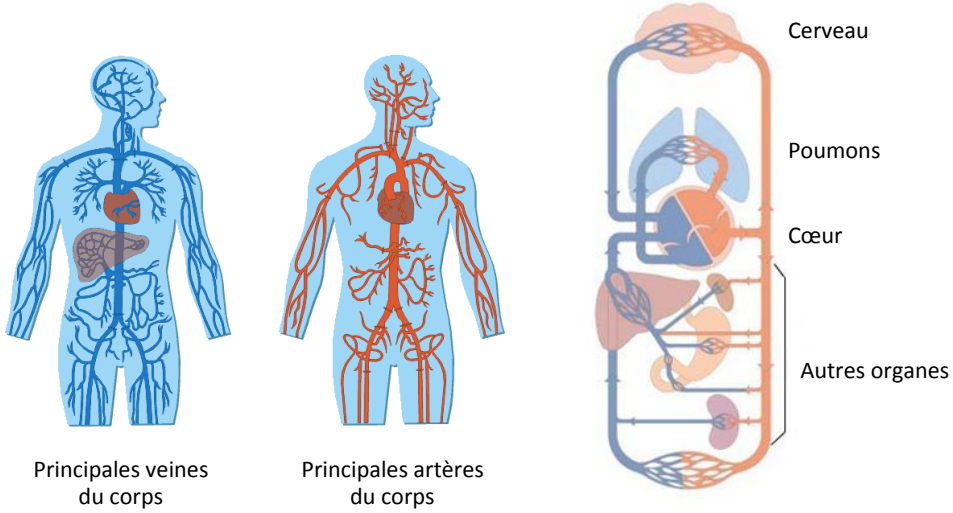


Figure 1 : Système cardiovasculaire chez l'homme.

Présentation des principales artères et veines dans l'organisme et schéma de la circulation

Il est constitué du cœur et du système vasculaire, composé des vaisseaux de la macro-circulation artérielle, de la macro-circulation veineuse et de la microcirculation. On distingue trois familles de vaisseaux sanguins qui diffèrent structurellement et fonctionnellement selon leur rôle et leur localisation dans le corps : les artères, les capillaires et les veines.

B. Classification des vaisseaux sanguins

Les artères : conduisent en périphérie le sang éjecté à haute pression par le cœur et de maintenir la pression sanguine. Deux types d'artères ont été décrits chez l'homme. Les artères de gros calibre dites de conductance ou **élastiques** grâce à une dominante de l'élastine dans leur composition (40% d'élastine), sont à proximité du cœur et sont soumises à de fortes

pressions hémodynamiques. Elles font 1 à 4 cm de diamètre et sont caractérisées par une paroi plus épaisse. Les artères de moyen et petit calibre dites de résistance ou **musculaires** (10% d'élastine), de taille moyenne, sont moins extensibles que les artères élastiques et ont pour rôle de conduire le sang en périphérie et de s'adapter aux besoins métaboliques en modifiant leur diamètre. Elles se divisent ensuite en artérioles de diamètre inférieur à 0,5 mm qui ont une composition similaire à celle des artères musculaires. Les artères peuvent également être subdivisées en deux familles : les artères systémiques, qui transportent le sang oxygéné vers la périphérie ; les artères pulmonaires, qui ensuite mènent le sang pauvre en oxygène vers la microcirculation des poumons.

Les capillaires : assurent le lien entre les réseaux artériel et veineux. Les capillaires sont les plus petits des vaisseaux sanguins, principalement formés d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) entourée d'une membrane basale, avec une longueur de 1mm et un diamètre compris entre 8 et 10 μm en moyenne.

Les veines : canalisent le retour du sang au cœur. Similaires structurellement aux artères mais moins élastiques, les veines ont une lumière plus importante et une paroi plus fine que celle des artères et possèdent des valves anti-reflux qui imposent une circulation sanguine à sens unique, de la périphérie vers le cœur.

Ainsi le sang chargé d'oxygène est propulsé du ventricule gauche du cœur dans l'aorte, l'artère principale du corps humain, pour emprunter de nombreuses artères secondaires le conduisant vers les organes. Les capillaires sont le lieu d'échange entre le sang et les tissus et établissent le lien artérioveineux. Le retour sanguin débute à la sortie de l'anastomose capillaire, empruntant des vaisseaux de petit calibre (les veinules) qui convergent vers les veines pour atteindre l'oreillette droite du cœur (Figure 2).

Dans ce processus de propulsion du sang vers la périphérie, l'artère joue un rôle actif et complémentaire du cœur. Grâce à son élasticité, l'aorte se dilate pendant la systole pour emmagasiner un certain volume de sang, puis se contracte pendant la diastole afin de propulser le sang, de façon pulsatile, dans le corps entier.

Nous rappellerons succinctement la structure et l'organisation générale de l'aorte dans la partie suivante.

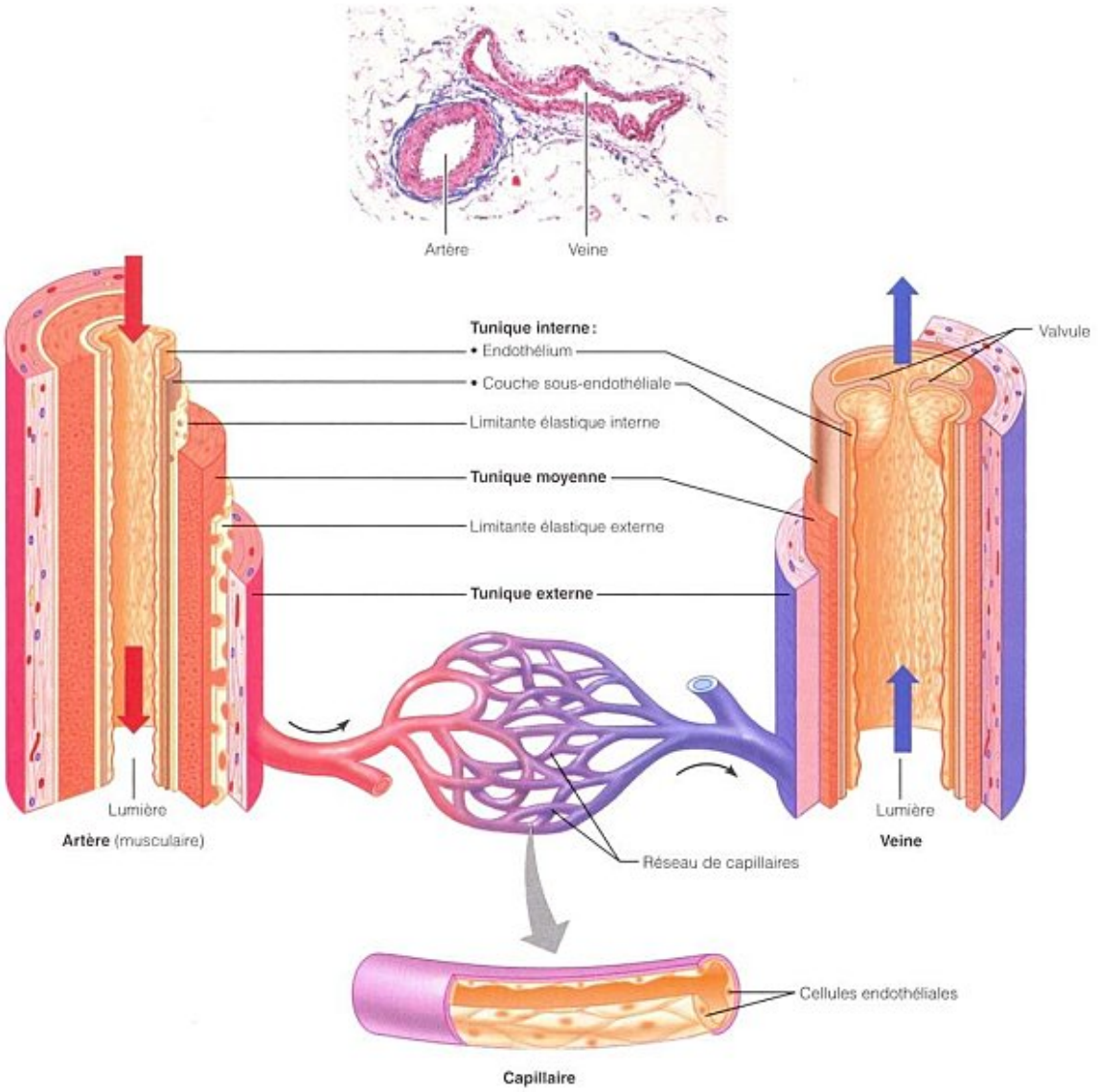


Figure 2 : Structure des vaisseaux sanguins: artères, veines et capillaires.

C. Description de l'aorte : anatomie

L'aorte est l'artère principale de l'organisme dont la principale fonction est de propager l'onde de pouls dans tout l'arbre artériel. Directement connectée au ventricule gauche du cœur, au niveau de la valve aortique, elle fait partie des artères élastiques. Cette propriété de déformation élastique lui confère des caractéristiques physiques impliquées dans la conversion du débit cardiaque pulsé à haute pression, en un flux continu à faible pression au niveau des capillaires permettant ainsi d'assurer un débit continu dans les organes.

L'aorte est constituée de quatre segments (Figure 3) :

- Segment I : l'aorte thoracique (AT) ascendante. Elle constitue la partie initiale de l'aorte qui nait à partir du sinus de Valsalva et de la valve aortique cardiaque jusqu'au tronc artériel brachio-céphalique ;

- Segment II : la crosse aortique. Elle assure la vascularisation du cerveau, cervelet et tronc cérébral, en donnant naissance à trois artères collatérales : le tronc artériel brachio-céphalique, l'artère carotide primitive gauche et l'artère sous-clavière gauche ;

- Segment III : l'aorte thoracique descendante. Elle longe la colonne vertébrale et permet la vascularisation de la moelle épinière, des bronches et des poumons. Elle va de l'artère sous-clavière gauche jusqu'au hiatus aortique diaphragmatique puis entre dans la cavité abdominale.

- Segment IV : l'aorte abdominale (AA). L'ensemble des vaisseaux irriguant les organes abdominaux nait à partir de l'AA. Elle fait l'objet principal de cette étude.

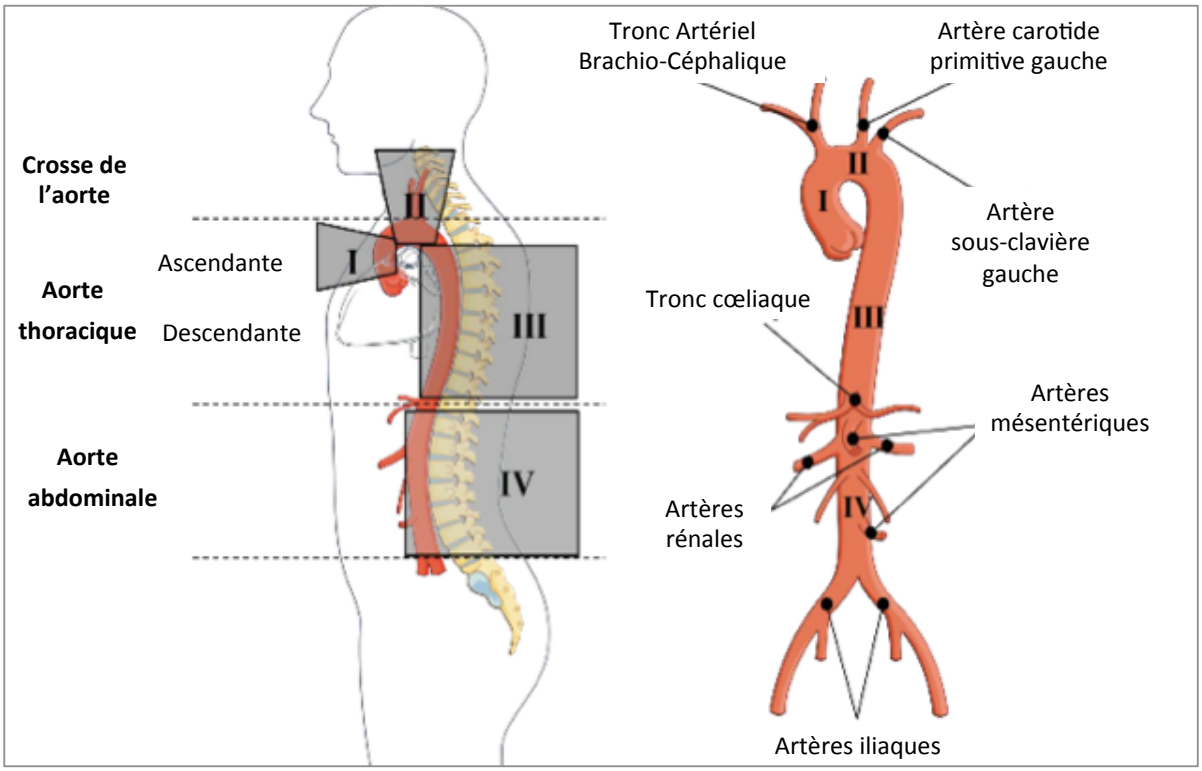


Figure 3 : Les segments aortiques et leurs collatérales.

I : l'aorte thoracique ascendante, II : la crosse aortique, III : l'aorte thoracique descendante, IV : l'aorte abdominale.

D. Histologie de l'aorte

Toutes les artères, dont l'aorte, ont une composition en multicouches (Wolinsky and Glagov, 1967). On distingue classiquement trois couches concentriques de cellules, de la lumière à la périphérie (Figure 4) : l'intima, la média et l'adventice.

Structure de la paroi aortique

- Tunique interne : *l'intima.* Composée principalement de collagène et d'une monocouche continue de CE, elle repose sur une fine couche de tissu conjonctif appelée la lame basale. Cette dernière est elle-même supportée par une lame élastique appelée la limitante élastique interne, agissant comme une frontière entre l'endothélium et la matrice extracellulaire (MEC) de la média. L'intima joue un rôle majeur d'interface entre le sang circulant et la paroi artérielle dans laquelle les CE jouent un rôle essentiel dans la modulation de la vasomotricité artérielle, ainsi que dans les processus de thrombolyse et de coagulation.

- Tunique moyenne : *la média*. Constituée de cellules musculaires lisses (CML) et d'une MEC riche en fibres d'élastine et de collagène, elle est considérée comme la partie active de l'artère. Cette couche est la plus épaisse de la paroi artérielle, elle est composée d'une succession de sous-couches d'élastine et de CML, délimitée par deux limitantes élastiques ; une lame élastique interne du côté de la lumière vasculaire et une lame élastique externe. Cette architecture confère à l'aorte la capacité de modifier son calibre et son état de tension et donc de moduler le niveau de pression sanguine grâce à sa contraction et dilatation.

- Tunique externe : *l'adventice*. Cette dernière est située à l'extérieur de la limitante élastique externe. Elle est constituée d'un réseau lâche de fibres interstitielles de collagène, d'élastine, de fibroblastes, cellules immunitaires, terminaisons nerveuses et vasa vasorum (vaisseaux nourriciers). Il a été montré récemment que cette partie abrite des progéniteurs cellulaires qui se différencient en CML et contribuent à certaines pathologies vasculaires (Torsney et al., 2005, Hu et al., 2004, Passman et al., 2008). Cette tunique permet de protéger et de fixer l'artère aux organes environnants

mais également de participer à la synthèse de la MEC grâce aux fibroblastes qui la constituent.

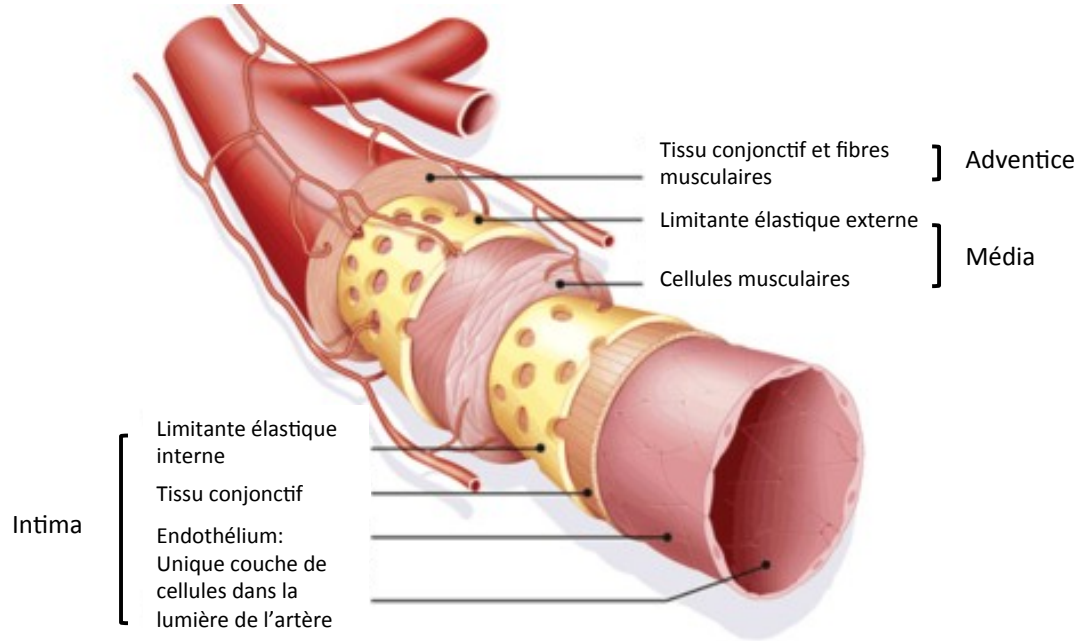


Figure 4 : Structure de la paroi d'une artère.

Trois couches de tissus composent la paroi artérielle : l'intima, la média et l'adventice. Issue de Sanofi-aventis.

1. Structure de la matrice extracellulaire

La MEC est une composante cruciale de la paroi artérielle. Elle participe au même titre que les cellules à ses propriétés fonctionnelles. Non seulement elle procure à l'aorte sa structure et ses propriétés mécaniques, mais elle intervient également dans la croissance cellulaire et la différenciation tissulaire et joue un rôle dans l'immunité grâce aux cytokines, facteurs de croissances, et cellules immunitaires qu'elle contient (Labat-Robert and Robert, 2005, Jacob, 2003). Les macromolécules de la MEC sont regroupées en quatre catégories :

- l'**élastine**, procure l'élasticité tissulaire. C'est une protéine fibreuse, composée essentiellement d'acides aminés hydrophobes. Elle est synthétisée par les CE, les CML et les fibroblastes sous forme d'un précurseur, la tropoélastine. L'élastine représente de 70 à 90% des fibres élastiques qui procurent à la paroi artérielle son élasticité et son extensibilité. Ces fibres élastiques sont constituées d'une association d'élastine et de glyprotéines de structure pour former les microfibrilles.

- les **protéoglycanes**, assurent l'organisation de la MEC et son hydratation (Mukaratirwa and Nederbragt, 2002) . Les protéoglycanes (PGs) sont des macromolécules membranaires ou sécrétées, composées d'une combinaison de chaines de polypeptides et de glycosaminoglycanes. Grâce à leur forte charge électrostatique négative, les protéoglycanes (PGs) contrôlent les mouvements des ions et contribuent ainsi à l'hydratation des tissus. Par ailleurs, ils sont situés à l'interface MEC/ membrane plasmique, ce qui leur permet d'assurer l'intégrité structurale des tissus et d'impacter de multiples fonctions cellulaires telles que la croissance, l'adhésion et la migration. De plus, les PGs sont capables de former des complexes avec les autres macromolécules de la MEC, ce qui les rend indispensables pour le dépôt de la MEC synthétisée par les CMLs du vaisseau.

- les **glycoprotéines de structure**. Particulièrement impliquées dans la jonction cellulaire et la cohésion entre les cellules et les autres macromolécules de la MEC (Laurie et al., 1986). En dehors du collagène, ces protéines fibrillaires adhésives et insolubles assurent l'organisation de la MEC ainsi que la cohésion entre les cellules et la matrice. Elles sont principalement composées de liaisons entre chaines protéiques

et des polysaccharides ramifiés. Ces glycoprotéines comportent plusieurs molécules fibrillaires, notamment la fibrilline et la fibronectine ainsi que d'autres protéines non filamenteuses, telles que les laminines (principale composante de la lame basale).

- le **collagène**, procure une résistance mécanique et apporte la solidité aux tissus (Robins, 1995). Les collagènes sont des glycoprotéines fibreuses synthétisées par les CE, les CML et les fibroblastes. Ces protéines sont présentes dans tous les tissus chez les mammifères. Chez l'homme, elles représentent jusqu'à 80% des protéines matricielles et jouent un rôle essentiel dans le support structural et les propriétés mécaniques des vaisseaux. Suivant leur type, parmi les sept classes de collagène identifiées, les collagènes interviennent dans la régulation de certaines fonctions cellulaires en plus de leur rôle dans l'architecture tissulaire et la résistance aux forces d'étirement et de tension.

Cet assemblage de macromolécules dote la MEC de diverses propriétés structurales, et d'une importante quantité d'informations cryptiques, qui influencent la modulation de l'activité cellulaire (Bosman and Stamenkovic, 2003). Les cellules synthétisent la MEC environnante, qui en retour module leur phénotype.

La qualité de la MEC dépend d'un équilibre entre la synthèse de nouvelles protéines par les cellules pariétales et leur dégradation par des enzymes protéolytiques telles que des élastases, des collagénases ou des métalloprotéinases. Il en résulte un renouvellement lent mais permanent de la paroi artérielle.

2. Dégradation de la matrice extracellulaire

Comme décrit précédemment, la MEC est un réseau dynamique de macromolécules en constant remodelage. Sa dégradation est observée lors de situations physiologiques telles que la croissance, le développement et la réparation des tissus, mais également dans des conditions pathologiques telles que l'arthrite, le cancer, l'athérosclérose et l'anévrisme. Plusieurs types de protéinases sont impliqués dans la dégradation de la MEC, mais les enzymes principales appartiennent à une famille d'endopeptidases, les métalloprotéinases matricielles (MMPs) (Mott and Werb, 2004, Visse and Nagase, 2003).

a) Métalloprotéinases matricielles

Chez l'homme, les MMPs forment un groupe de 23 enzymes. Bien que chacune ait son unique spécificité, elles sont capables de dégrader conjointement toutes les protéines de la MEC (Nagase et al., 2006). La majorité des séquences des MMPs est composée d'abord par (i) un peptide signal qui permet l'orientation vers les voies de sécrétion. Puis (ii) un pro-domaine composé d'un résidu cystéine qui maintient les pro-MMPs sous forme inactive. Enfin, (iii) un domaine catalytique conservé, responsable de l'activité catalytique de l'enzyme.

En se basant sur la structure primaire et la spécificité par rapport au substrat, on distingue six familles de MMPs (Nagase et al., 2006) (Tableau1). Les MMPs sont souvent synthétisées en tant que pro-MMPs, une forme inactive de zymogènes, par un grand nombre de cellules mésenchymateuses ou hématopoïétiques telles que les monocytes/macrophages, les lymphocytes et les neutrophiles. Cet état inactif est maintenu par un pro-domaine dont le clivage est nécessaire pour leur activation. Peu exprimées dans les tissus sains, les MMPs augmentent leur expression lors des processus de remodelage tissulaire physiologique ou pathologique sous l'effet de cytokines inflammatoires ou de facteurs de croissance capables de moduler leur expression génique. Les MMPs ont donc pour fonction principale de dégrader les protéines de la MEC, et d'orienter ces changements. Néanmoins, cette protéolyse des macromolécules de la MEC affecte également les interactions cellules-matrice et cellules-cellules (Endo et al., 2003, Yamada et al., 2001), et permet le relargage de fragments bioactifs séquestrés dans la MEC, comme des facteurs de croissance tels que le VEGF et le TGF-β, ou des cytokines (McCawley and Matrisian, 2001, Schenk and Quaranta, 2003, Ortega and Werb, 2002).

Type	MMP
Collagénases interstitielles	MMP-1, - 8 et -13
Gélatinases	MMP-2 et -9
Stromélysines	MMP-3 et -10
Matrilysines	MMP-7, -11 et -26
Métalloprotéinases membranaires	MMP-14, -17, -24 et -25
Groupe hétérogène	MMP-12, -18 à -23, -27 et -28

Tableau 1 : Classification des métalloprotéinases matricielles.

Les MMPs sont regroupées en six classes distinctes, selon leur structure primaire et leur spécificité. Les MMPs -4, -5, -6 et -22 sont identiques à d'autres membres de la liste, et ne sont donc pas classées (Nagase et al., 2006).

De nombreuses études ont montré l'implication des MMPs dans les maladies cardiovasculaires, digestives, inflammatoires et dans l'initiation de la pathologie anévrismale qui fait l'objet principal de ce travail de thèse.

Les MMP-2 et -9 jouent un rôle prépondérant dans la rupture et la dysfonction cardiaque dans des modèles expérimentaux d'infarctus du myocarde (Hayashidani et al., 2003, Matsumura et al., 2005, Heymans et al., 1999, Romanic et al., 2002), mais également dans le développement des anévrismes thoraciques (AAT) et abdominaux (AAA) (Longo et al., 2002, Ikonomidis et al., 2005). Des formes actives de ces MMPs ont été mises en évidence dans le sang de patients présentant des ruptures aortiques (Sakalihasan et al., 1996), avec des corrélations positives entre les taux plasmatiques des MMPs, en particulier MMP-2 et -9, et la croissance des AAA (Hovsepian et al., 2000, Lindholt et al., 2000, Petersen et al., 2000, Goodall et al., 2001). D'autres études ont associé l'expression de la MMP-2 aux anévrismes peu développés, et celle de la MMP-9 aux gros anévrismes (Freestone et al., 1995). Une augmentation de l'expression et de l'activation des MMP-1, -8 et -13, a également été décrite au niveau des AAA humains (Mao et al., 1999a, Theruvath et al., 2012). De plus, des études réalisées sur des modèles expérimentaux d'induction d'AAA par infusion d'angiotensine II

(Ang II), ont montré l'implication de la MMP-14 dans la fragmentation des fibres élastiques (Xiong et al., 2009).

Cette implication des MMPs dans la physiopathologie de l'AAA en fait une cible thérapeutique d'intérêt. Ainsi, l'administration d'un inhibiteur non-spécifique des MMPs, la doxycycline, a permis de réduire l'expression de la MMP-9 et de stabiliser les AAA chez des patients (Curci et al., 1998, Lindeman et al., 2009). Il a également été suggéré que la doxycycline pouvait prévenir le développement des AAT chez des patients atteints de la maladie de Marfan (Chung et al., 2008).

L'activité protéasique est régulée par le rapport entre les protéases actives et leurs inhibiteurs. Dans un contexte pathologique, une modulation inadaptée de l'expression des MMPs et de leurs inhibiteurs peut entrainer des déséquilibres tissulaires : la dégradation de la MEC ou, à l'inverse, une accumulation matricielle et tissulaire. L'activité de ces protéases est donc finement régulée au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Cette régulation est modulée par des facteurs de croissance, des hormones et des cytokines, et affecte l'expression des MMPs et de leurs inhibiteurs : les TIMPs (Tissue inhibitors of matrix metalloproteases).

b) Les inhibiteurs des métalloprotéinases

L'activité catalytique des MMPs est contrôlée par des inhibiteurs endogènes : les TIMPs 'Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase'. Ils forment une famille de quatre protéines : Timp-1, -2, -3 et -4. Ils sont composés d'environ 194 acides aminés comportant deux sous-domaines : N-terminal et C-terminal. Pour inhiber l'activité des MMPs, une unité indépendante du domaine N-terminal interagit avec le domaine catalytique des MMPs et leur bloque l'accès à l'atome de zinc (Newby, 2012, Nagase et al., 2006). Le domaine C-terminal, en revanche, n'intervient pas dans l'inhibition de l'activité des MMPs mais stabilise l'interaction entre les TIMPs et les MMPs (Gomis-Ruth et al., 1997). En dehors de leur propriété inhibitrice, les TIMPs peuvent agir comme facteurs de croissance (Hayakawa et al., 1992): TIMP-1 induit, *in vitro*, la croissance de nombreuses cellules, notamment les CMLs, fibroblastes et CE ; et TIMP-2 stimule la croissance des fibroblastes (Hayakawa et al., 1994). Ainsi, les TIMPs jouent de multiples rôles et participent non seulement à l'inhibition de la dégradation de la MEC, mais aussi à la cicatrisation du tissu après blessure.

II. LA PATHOLOGIE : ANÉVRISME DE L'AORTE ABDOMINALE

A. Généralités

L'anévrisme est défini comme une maladie de la paroi artérielle, responsable d'une augmentation localisée et permanente du diamètre vasculaire, d'au moins 50% de sa taille initiale en considérant les conditions physiologiques de l'individu (Johnston et al., 1991). Cette dilatation segmentaire est associée à une perte de parallélisme des bords d'une artère et implique des remaniements structuraux des trois tuniques de la paroi artérielle. Ces altérations affectent les propriétés mécaniques de l'artère qui perd ainsi sa capacité à résister aux forces de distension et finit par rompre et causer la mort du patient, très souvent d'une hémorragie.
L'anévrisme peut affecter tous les segments artériels. Lorsque la dilatation se situe au niveau de la partie abdominale de l'aorte et particulièrement au niveau sous-rénal, on parle alors d'Anévrisme de l'Aorte Abdominale (AAA) qui représente 60% des anévrismes artériels (Figure 5). Les autres localisations sont principalement l'aorte thoracique ascendante, les artères poplitées, les artères iliaques et les artères viscérales.

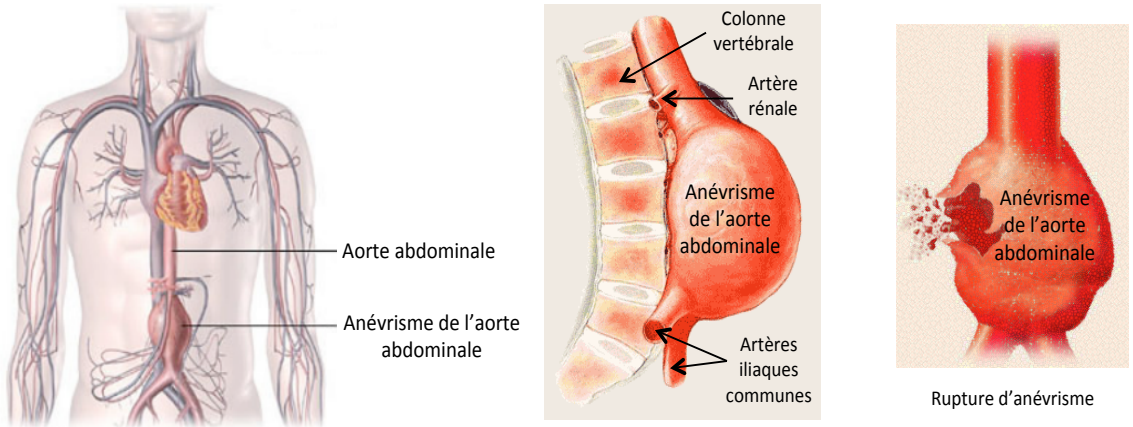


Figure 5 : Représentation d'un anévrisme de l'aorte abdominale.

Adapté de www.crlsurgical.com.

Chez l'homme, l'AAA est le plus souvent localisé entre les artères rénales et la bifurcation des artères iliaques. Dans la majorité des études épidémiologiques, une aorte est considérée atteinte d'AAA lorsque son diamètre devient supérieur ou égal à 3 cm, soit une augmentation de 50% par rapport au diamètre moyen de l'aorte infra-rénale qui est de 2 cm (Lederle et al., 1997). L'évolution naturelle de l'AAA tend vers l'augmentation inéluctable de son calibre et la rupture. Il existe une corrélation directe entre le risque de rupture et le diamètre de l'anévrisme (Ballard et al., 2008). Le risque de mortalité dû à la rupture d'AAA est de 80% parmi les patients qui arrivent à l'hôpital, et de 50% parmi ceux qui ont recours à la chirurgie.

L'AAA atteint 5% des hommes de plus de 55 ans (Chong and How, 2004), et survient six fois plus chez les hommes que chez les femmes (Scott et al., 2002). Les AAA représentent un problème de santé publique : 500 000 nouveaux cas sont détectés chaque année à travers le monde (Vande Geest et al., 2006), et sa principale complication qui est la rupture, provoque 15 000 morts par an aux États Unis, ce qui représente la 13ème cause de mortalité dans ce pays (Li and Kleinstreuer, 2006). La mortalité imputable aux AAA est de l'ordre de 1 à 2% des décès en Europe.

On rencontre principalement deux formes anatomiques d'anévrismes :

- Les « vrais » anévrismes, caractérisés par une déformation des trois tuniques de la paroi artérielle. Ils se présentent le plus souvent sous la forme d'un fuseau à cause d'une dilatation diffuse et progressive (anévrismes fusiformes), mais peuvent être moins fréquemment retrouvés sous la forme d'un sac accroché de façon latérale à l'artère (anévrismes sacciformes) (Figure 6).

- Les « pseudo-anévrismes » ou anévrismes disséquant, résultent d'une dissection secondaire à un traumatisme causant la rupture de l'intima et de la média de la paroi vasculaire, laissant ainsi le sang s'infiltrer et former une poche artificielle (Baxter, 2005).

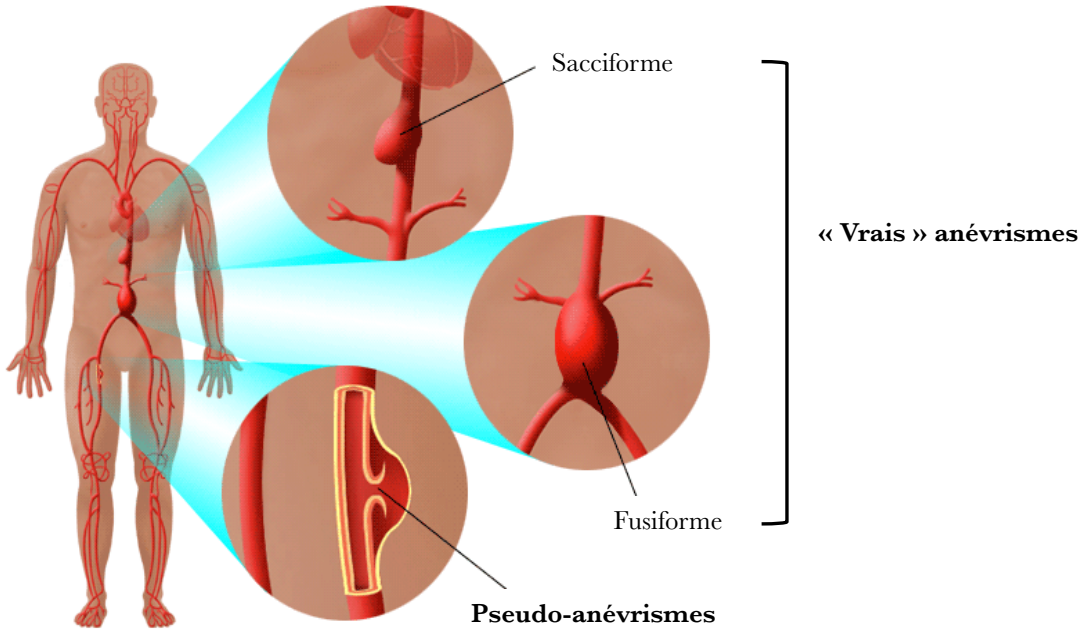


Figure 6 : Les types d'anévrismes (Les 'vrais' et les pseudoanévrismes).

B. Principaux syndromes génétiques associés aux anévrismes

Outre les anévrismes qui se développent tardivement avec l'âge, il existe d'autres anévrismes dits syndromiques, résultant de mutations des gènes codant les protéines matricielles ou affectant la signalisation du « Transforming Growth factor- β » (TGF- β).

1. Syndrome de Marfan

Le syndrome de Marfan (MFS) est la maladie héréditaire la plus fréquente du tissu conjonctif. Elle est transmise selon un mode autosomique dominant, et causée par une mutation hétérozygote du gène de la fibrilline-1 qui code pour une importante protéine de la matrice extracellulaire (tissu conjonctif) (Dietz et al., 1991). Cette maladie est principalement caractérisée par une combinaison de manifestations musculo-squelettiques (croissance excessive des os), ophtalmologiques (ectopie du cristallin) et cardiovasculaires (anévrisme/dissection et atteintes valvulaires mitrales). La progression inexorable des anévrismes de l'aorte ainsi que les dissections aortiques (irruption de sang à l'intérieur de la paroi de l'aorte, qui se divise en deux couches séparées par le 'faux chenal'), représentent les

complications les plus redoutables du MFS. Chez les porteurs de ce syndrome, les anévrismes aortiques se développent le plus souvent au niveau du sinus de Valsalva, mais aussi à d'autres segments de l'aorte (Dietz, 1993).

Jusqu'il y a peu, on pensait que les manifestations du MFS étaient causées uniquement par une défaillance du rôle de la fibrilline-1, en partie défectueuse, dans le maintien structural de la MEC, fragilisant ainsi la structure de l'aorte, des ligaments et de plusieurs autres organes. Or grâce aux études récentes de modèles murins et d'affections apparentées au MFS, il a été montré que la fibrilline-1 est loin de se limiter à une molécule de structure microfibrillaire (Neptune et al., 2003, Habashi et al., 2006, Judge et al., 2004). Elle est aussi un puissant régulateur de la signalisation du TGF-β. Ainsi, le MFS trouve son origine dans le dérèglement du TGF-β (Lindsay and Dietz, 2011), qui altère le muscle lisse et la matrice extracellulaire. Une anomalie de la fibrilline peut engendrer des déficits structuraux, mais également des modifications dans la constitution des tissus extracellulaires suite à une activité accrue du TGF-β.

2. Syndrome de Loeys-Dietz

Le syndrome de Loeys-Dietz (LDS) est une pathologie de transmission autosomique dominante, cliniquement proche du MFS. Dans sa présentation la plus typique, le LDS est caractérisé par des manifestations cliniques squelettiques proches de celles du syndrome de Marfan. En outre, on relève d'autres manifestations notables mais inconstantes du LDS, notamment un hypertélorisme, une luette bifide, une division palatine, la survenue d'anévrismes/dissections des artères cérébrales, thoraciques et abdominales avec une tortuosité artérielle généralisée (Loeys et al., 2005).

Des équipes en France et aux États Unis ont décrit au début des années 2000, l'implication de mutations des gènes codant pour les récepteurs au TGF-β (Loeys et al., 2005, Mizuguchi et al., 2004). Cette affection est secondaire à une perte de fonction dans les récepteurs TGF-βR1 (25% des cas) et TGF-βR2 (75% des cas) (Loeys and Dietz, 1993, Loeys et al., 2006), mais cause paradoxalement une augmentation de la voie de signalisation du TGF-β au niveau du tissu artériel. Plusieurs explications sont possibles, notamment la modification du trafic des récepteurs à la surface cellulaire, l'activation de la cascade de signalisation du TGF-β non canonique alternative impliquant les voies des MAP kinases ERK1/2 (Lindsay and Dietz,

2011) ou une modification de l'équilibre entre différentes cytokines de la superfamille TGF-β (Lindsay et al., 2012). Récemment, une étude a utilisé un modèle de souris LDS pour montrer qu'un excès de pSMAD2 pourrait être responsable de l'augmentation de l'expression du ligand TGF-β1 dans le tissu aortique (Gallo et al., 2014).

3. Syndrome d'Ehlers-Danlos vasculaire

Les syndromes d'Ehlers-Danlos (SED) représentent un groupe hétérogène de pathologies génétiquement déterminées du tissu conjonctif. Ils évoquent la maladie de Marfan (en particulier la forme vasculaire SEDv : type IV) par plusieurs caractéristiques : atteinte cutanée (peau fine et translucide), hypermobilité articulaire, anomalies de squelette, dilatation aortique ou prolapsus valvulaire mitral (Beighton et al., 1998).

Le SEDv est considéré comme la forme la plus sévère des SED. Il est associé à de sérieuses complications vasculaires chez les jeunes adultes, comme la rupture des artères de moyen et gros calibres sans dilatation artérielle préalable (Pepin and Byers, 1993). Il est caractérisé, dans 95% des cas, par une mutation du gène COL3A1 (Superti-Furga et al., 1988), transmise suivant un mode autosomique dominant, et entrainant des anomalies du collagène fibrillaire de type III. Des mutations des gènes codant pour les récepteurs du TGF-β ont également été récemment rapportées (Loeys et al., 2006).

4. Syndrome d'ostéoarthrite-anévrisme

Le syndrome d'ostéoarthrite-anévrisme est une maladie autosomale dominante du tissu conjonctif, caractérisée par la présence d'anévrismes, de dissections et de tortuosités aortiques ainsi que par de légères malformations crânio-faciales et des anomalies du squelette et de la peau. Contrairement aux autres formes syndromiques d'anévrismes, les patients affectés développent l'ostéoarthrite à un jeune âge. Ce syndrome est dû à des mutations hétérozygotes du gène *SMAD3*, qui induisent une augmentation de l'expression aortique de plusieurs acteurs clés de la signalisation du TGF-β (van de Laar et al., 2011).

C. Critères décisionnels d'intervention chirurgicale

L'AAA se développe selon un processus souvent irréversible, qui au fil du temps se complique, et les risques de rupture augmentent. La rupture d'AAA survient lorsque la contrainte mécanique de la paroi du vaisseau dépasse sa résistance. À ce jour, aucun traitement pharmacologique n'est validé comme thérapie pour ralentir la dégénérescence anévrismale, et uniquement des approches chirurgicales peuvent être envisagées. Celles-ci peuvent être classiques ou endovasculaires, et ne sont proposées que lorsque l'anévrisme présente un risque de rupture suffisant pour contrebalancer le risque opératoire.

À l'heure actuelle, l'évaluation du risque de rupture est principalement basée sur le diamètre de l'AAA (Tableau 2) (Brewster et al., 2003). Généralement la décision chirurgicale de traiter l'AAA intervient lorsque le diamètre de ce dernier excède 55 mm, et dont le taux d'expansion dépasse 10 mm/an (Brown et al., 2003). Bien que le meilleur moyen de prédiction de l'expansion d'un anévrisme semble être sa taille lors du diagnostic (Michel, 2001), la situation reste complexe en raison de la non-linéarité et à l'imprévisibilité des taux d'expansion (Powell and Brady, 2004). De meilleurs outils pronostiques pourraient donc offrir la possibilité d'élaborer une stratégie thérapeutique individualisée pour les patients.

Diamètre de l'AAA (cm)	Risque de rupture (%/an)
< 4	0
4 – 5	0,5 – 5
5 – 6	3 – 15
6 – 7	10 – 20
7 – 8	20 – 40
> 8	30 – 50

Tableau 2 : Risque de rupture d'AAA par an selon le diamètre

Le risque de rupture dépend principalement du diamètre de l'anévrisme de l'aorte abdominale. Issu de (Brewster et al., 2003).

D. Traitement de l'anévrisme : État de l'art

1. Thérapie pharmacologique

Les statines : L'élaboration de médicaments capables de ralentir la progression anévrismale représente un grand intérêt clinique. Malgré l'absence d'une relation directe entre le cholestérol et l'expansion d'AAA, de nombreuses études suggèrent que les statines, par leurs effets pléiotropes, réduisent la croissance de l'anévrisme (Steinmetz et al., 2005, Evans et al., 2007, Schouten et al., 2006, Sukhija et al., 2006). Une étude utilisant un modèle murin d'AAA par infusion d'élastase (qui sera décrit dans le chapitre suivant), a montré que l'administration de simvastatine a pu réduire le diamètre aortique ainsi que le pourcentage d'incidence d'AAA chez les animaux (Steinmetz et al., 2005). L'addition de cerivastatin chez des souris transplantées par des échantillons d'AAA humains, réduit les niveaux tissulaires des MMP-9, sans réduire le nombre de macrophages et de neutrophiles au niveau des AAA. Ce qui suggère que la thérapie par les statines agit plutôt par inhibition de l'activation des cellules inflammatoires que par la réduction de leurs nombres totaux.
Pour confirmer ces effets chez l'homme, une équipe a conduit une étude prospective dans laquelle 32 patients ont été randomisés pour recevoir soit un placebo, soit un traitement par la simvastatine pendant 3 semaines avant de subir une chirurgie ouverte de reconstruction aortique (Evans et al., 2007). Les niveaux de MMP-9 dans les tissus d'anévrismes excisés étaient plus faibles dans le groupe traité par la statine comparé au groupe placebo. Bien que l'association entre la thérapie aux statines et la réduction de l'expansion d'AAA soit également rapportée par des études observationnelles (Schouten et al., 2006, Sukhija et al., 2006), les recommandations ACC/AHA en 2005 ne soutiennent pas officiellement l'emploi de cette thérapie pour le traitement des petits anévrismes suite au manque de preuves d'efficacité issues de larges essais cliniques randomisés (Hirsch et al., 2006).

Les β-bloquants et les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC) : Les études chez l'animal suggèrent que le propranolol, un β-bloquant non sélectif, pourrait avoir des effets bénéfiques sur la maladie anévrismale grâce à ses propriétés hémodynamiques et à son effet inhibiteur sur les protéines de la matrice extracellulaire (Boucek et al., 1983, Brophy et al., 1989). Cependant, un essai clinique randomisé prospectif n'a pas réussi à démontrer l'effet de cette thérapie sur le ralentissement de l'expansion

anévrismale (Propanolol Aneurysm Trial, 2002), malgré l'association rapportée par deux études cliniques rétrospectives (Gadowski et al., 1994, Leach et al., 1988).
Dans des modèles d'AAA par infusion d'élastase ou d'angiotensine II, les IEC sont capables de limiter le développement d'AAA (Inoue et al., 2009). Néanmoins, les résultats chez les patients restent ambigus et les données sont limitées à des analyses rétrospectives (Hackam et al., 2006, Lederle and Taylor, 2006).

Les antibiotiques : **les tétracyclines et les macrolides**. Grâce à leur capacité de diminution des taux de MMPs et de l'inhibition de l'activation des neutrophiles, les tétracyclines se révèlent utiles dans le traitement de l'anévrisme. Des études ont montré, dans deux modèles animaux d'AAA, que la doxycycline inhibe l'activité MMP au niveau de la paroi aortique, la dégradation d'élastine, et le développement d'anévrisme (Petrinec et al., 1996, Prall et al., 2002). D'autres études chez l'homme ont montré la capacité de la doxycycline à inhiber les MMPs dans le tissu anévrismal et limiter l'infiltration des neutrophiles dans des AAA humains (Baxter et al., 2002, Curci et al., 2000).
Les macrolides, traitement utilisé contre les infections à *Chlamydia pneumoniniae*, peuvent également diminuer l'activité protéasique dans des échantillons d'AAA humains (Golledge and Powell, 2007, Lindholt et al., 2001a, Vammen et al., 2001). Cependant, les essais cliniques n'ont pas réussi à démontrer une corrélation entre les taux sérologiques de la bactérie et le taux de croissance de l'anévrisme.

Les antiagrégants plaquettaires : Ces agents se révèlent utiles en prévention secondaire chez les porteurs d'anévrismes. L'essai clinique conduit par Karlsson *et al.* ainsi que d'autres études, ont décrit une association entre le traitement par ces antiagrégants plaquettaires et une réduction d'expansion d'AAA (Dai et al., 2009, Karlsson et al., 2009).

Toutefois, l'efficacité de tout cet arsenal médicamenteux dans la prévention de la croissance des anévrismes demande à être vérifiée par de grands essais cliniques randomisés.

2. La chirurgie

Actuellement, la chirurgie est le seul traitement capable de prévenir la rupture d'AAA. Cependant, elle présente un risque non négligeable pour le patient. La mortalité opératoire pour une cure sans urgence se situe autour de 5% (1998, Lederle et al., 2002). Ce risque est

encore plus accru en cas d'ischémie cardiaque, d'insuffisance cardiaque ou rénale, d'atteinte pulmonaire, ainsi qu'avec un âge avancé du patient. Ainsi, plusieurs facteurs sont à considérer avant la décision d'opérer, notamment l'espérance de vie du patient ou la préférence de ce dernier. Deux types de traitement sont classiquement utilisés : le traitement conventionnel par chirurgie ouverte ou le traitement endovasculaire avec pose d'endoprothèse, qui ont chacun des avantages et des inconvénients, résumés dans le tableau 3, à prendre en considération (Figure 7).

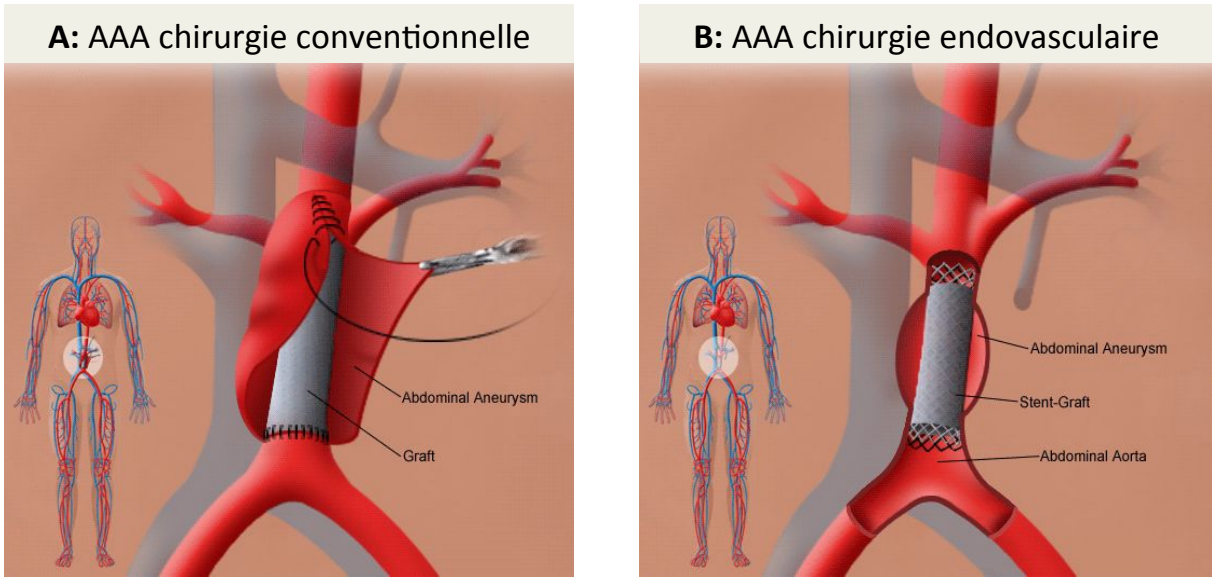


Figure 7 : Les interventions chirurgicales possibles lors d'un AAA.

*En chirurgie ouverte (**A**), l'anévrisme est ouvert par le chirurgien et la prothèse suturée. Lors du traitement endovasculaire (**B**), la prothèse, composée d'une structure métallique recouverte de tissu, est déployée depuis l'intérieur du vaisseau et permet de rediriger le courant sanguin dans l'anévrisme.*

a) Traitement chirurgical ouvert (« open surgery » ou « OPEN »)

Utilisée depuis les années 50, cette technique a pour but à la fois de prévenir la rupture et de réparer le vaisseau (Dubost et al., 1951). Elle permet de remplacer le segment lésé de l'artère par une prothèse synthétique qui représente un nouveau canal pour la circulation sanguine. L'acte chirurgical nécessite l'ouverture de l'abdomen du patient et le clampage de l'aorte de part et d'autre de l'anévrisme. La prothèse est suturée entre les extrémités de l'AAA à l'intérieur du sac anévrismal qui est préservé pour recouvrir la prothèse et la protéger des viscères adjacents.

Cette opération est très invasive et peut engendrer de graves complications (Elkouri et al., 2004). Ces dernières sont souvent des atteintes cardiaques (15%), pulmonaires (5-12%), ou rénales (5-12%) (Elkouri et al., 2004), d'où l'intérêt du nouveau type de chirurgie semi-invasive : le traitement endovasculaire.

b) Traitement chirurgical endovasculaire (« Endovascular Aneurysm Repair » ou « EVAR »)

Cette technique moderne pour le traitement des AAA fit son apparition au début des années 90 (Chuter et al., 1993, Parodi et al., 1991). Cette technique beaucoup moins invasive que la chirurgie classique, est exclusivement dédiée à l'intervention préventive. Cette technique peut nécessiter une petite incision pour exposer les artères fémorales mais elle peut se faire par approche percutanée, sans incision. À l'aide d'un cathéter et d'un dispositif de radiographie ou de fluoroscopie, la poche anévrismale est exclue de la circulation suite à la mise en place d'une prothèse aortique (stents) à l'intérieur de l'aorte pathologique, créant ainsi un nouveau circuit pour la circulation du sang. Plusieurs complications peuvent survenir en période post-opératoire, notamment d'ordre pulmonaire, cardiaque, rénal et infectieux. Cependant, les endofuites représentent les complications les plus fréquentes relatives à cette méthode. Elles surviennent lorsque le sang parvient à circuler entre l'artère et la prothèse. Il existe également d'autres défaillances telles que la thrombose du jambage ou la migration du dispositif. En effet, la prothèse peut causer de multiples problèmes liés au vieillissement du dispositif, ce qui nécessite parfois des ré-interventions chez ces patients.

	Chirurgie ouverte	Traitement endovasculaire
Avantages	• Traitement définitif • Pas de suivi à vie	• Méthode moins effractive • Hospitalisation plus courte (environ 2 jours) • Moins de morbidité et de mortalité à court terme
Inconvénients	• Méthode plus effractive • Hospitalisation plus longue (5 – 7 jours) • Complications à long terme de la laparotomie (adhérences, hernie incisionnelle)	• Besoin de suivi à vie et d'examens d'imagerie en série • Effet cumulatif des rayonnements • Augmentation du nombre de réintervention • Risque de rupture qui persiste

Tableau 3 : Les avantages et les inconvénients des deux traitements de l'AAA

Le chirurgien prend en considération ces différents éléments, ainsi que la préférence du patient pour proposer l'un ou l'autre des traitements.

III. MODÈLES ANIMAUX DE L'ANÉVRISME DE L'AORTE ABDOMINALE

De nombreux modèles expérimentaux d'AAA ont été mis au point afin de permettre l'étude de cette pathologie et d'évaluer les différentes possibilités thérapeutiques. Ces modèles récapitulent certaines facettes de la pathologie humaine, telle que la dégradation de la média, l'inflammation, la formation du thrombus et la rupture. Leur validation pourrait permettre d'élucider les mécanismes potentiels dans la physiopathologie des AAA. La première modélisation des anévrismes a été réalisée chez le rat, puis plusieurs modèles ont été décrits chez le lapin et la souris (tableau 4).

Espèce	Modèle d'AAA
Rat	- Perfusion locale de l'aorte à l'élastase (Anidjar et al., 1990) - Xénogreffe décellularisée (Allaire et al., 1994)
Lapin	- Perfusion locale de l'aorte à l'élastase (aussi sur carotide) (Matsushita et al., 1999) - Traitement de l'aorte au chlorure de calcium ($CaCl_2$) (Freestone et al., 1997)
Souris	- Perfusion locale de l'aorte à l'élastase (Pyo et al., 2000) - Traitement de l'aorte au $CaCl_2$ (Chiou et al., 2001) - Perfusion systémique d'Ang II chez la souris hypercholestérolémique (*ApoE*$^{-/-}$, ou *LDLr*$^{-/-}$ sous régime riche en cholestérol) (Daugherty and Cassis, 1999, Daugherty et al., 2000) - Perfusion systémique d'Ang II et neutralisation du TGF-β chez la souris normocholestérolémique (Wang et al., 2010)

Tableau 4 : Les modèles animaux d'anévrismes.

La souris est particulièrement prisée dans la recherche biomédicale pour de multiples raisons comme la petite taille, le coût raisonnable et la capacité de manipuler son génome. Au delà du choix de l'animal, plusieurs méthodes ont été utilisées pour induire la maladie, comme la

manipulation génétique ou l'induction chimique. Les modèles murins suivants sont les plus amplement utilisés à ce jour.

A. Modèle de traitement au chlorure de calcium

Ce modèle a été initialement développé chez le lapin hyperlipidémique. La formation d'anévrisme est induite par l'application, au niveau de la carotide, d'une solution de 0.5 M de chlorure de calcium ($CaCl_2$) pendant 15 minutes (Gertz et al., 1988). La combinaison du $CaCl_2$ et du thioglycollate, ainsi qu'un régime riche en cholestérol aggravent significativement le développement d'AAA chez le lapin (Freestone et al., 1997). Ce modèle a été ensuite adapté à la souris pour développer des AAA (Chiou et al., 2001). L'application du $CaCl_2$ sur l'aorte abdominale, entre les artères rénales et la bifurcation iliaque, induit une inflammation marquée ainsi qu'une dilatation du diamètre de 110 % à la fin de la 3ème semaine de traitement (Chiou et al., 2001, Longo et al., 2002).
Cette technique a permis de définir le rôle des MMPs dans le processus anévrismal mais sa limite principale réside dans la nécessité d'un lourd acte chirurgical.

B. Modèle de perfusion locale d'élastase

La perfusion d'élastase pancréatique porcine au niveau du segment infra-rénal de l'aorte abdominale chez le rat a été fréquemment utilisée comme modèle d'AAA (Anidjar et al., 1990). La dégradation de l'élastine dans les AAA et ses propriétés impliquées dans le maintien de l'intégrité structurale de l'artère représentent les éléments principaux derrière la logique du développement de cette technique. Ce modèle a été adapté pour induire des AAA dans la région aortique infra-rénale chez la souris (Pyo et al., 2000). La procédure implique l'introduction d'un cathéter au niveau de la bifurcation iliaque et l'isolation d'un segment de l'aorte abdominale (environ 1 cm) par une suture distale. L'élastase porcine est introduite dans la lumière artérielle et incubée pendant 5 minutes (jusqu'à deux heures chez le rat) avant la restauration du flux sanguin (Dobrin, 1999, Saatchi et al., 2012). Cette perfusion induit une dilatation immédiate et soutenue d'environ 30%, mais qui ne correspondrait pas à un vrai anévrisme, suite aux très peu de répercussions sur la média et les lames élastiques. Pendant les 2-5 jours qui suivent, cette dilatation continue à se développer jusqu'à atteindre une augmentation de 300-400% de son diamètre. À la fin de la 2ème semaine de traitement, une

destruction considérable des lames élastiques est observée, accompagnée d'une infiltration importante de cellules inflammatoires au niveau de la média et particulièrement des macrophages et lymphocytes T. Ces cellules, plus particulièrement les macrophages, sont connues pour leur sécrétion d'élastase, de collagénase et d'une variété de cytokines capables de contribuer à la destruction du tissu conjonctif.

On assiste également à un fort afflux de polynucléaires neutrophiles (PMN) au niveau de l'adventice de la paroi aortique.

Ce modèle a permis l'étude du rôle des MMPs dans la dégénérescence anévrismale à travers des modifications géniques et des agents pharmacologiques (Holmes et al., 1996, Dobrin et al., 1996, Ricci et al., 1996, Petrinec et al., 1996, Thompson et al., 2006). Les principales limitations de ce modèle sont liées d'abord à la chirurgie, ensuite au caractère rapide et variable de la dilatation de la paroi aortique, et enfin à l'afflux des PMN qui sont habituellement très rares en dehors du thrombus des lésions anévrismales. De plus, il est difficile de déterminer les doses d'élastase, et le taux de reproductivité est généralement inférieur à 50-60%.

C. Modèle de perfusion systémique d'angiotensine II (souris hypercholestérolémiques)

Ce modèle est le plus utilisé pour l'induction des AAA chez la souris. Basé sur l'invalidation pour le récepteur aux LDL ($LDLr^{-/-}$) ou pour l'apolipoprotéine E ($ApoE^{-/-}$), il représente un modèle complexe d'athérosclérose. Nakashima et al. ont initialement décrit une association entre les plaques d'athérome et l'infiltration de la paroi aortique par des cellules inflammatoires, une dégradation des lames élastiques et une dilatation modérée de l'aorte (Nakashima et al., 1994). Ensuite, une autre équipe a adapté ce modèle de souris $ApoE^{-/-}$ à l'induction d'anévrisme (Daugherty et al., 2000). L'Ang II est administré pendant une certaine période aux souris $ApoE^{-/-}$ via l'implantation sous-cutanée de mini-pompes osmotiques. La majorité des AAA induits sont localisés au niveau de la portion supra-rénale de l'aorte abdominale, contrairement à l'homme où ils sont plutôt infra-rénaux. Récemment, des études ont rapporté que la perfusion d'Ang II pouvait également induire des anévrismes au niveau de l'aorte ascendante (Daugherty et al., 2010, Rateri et al., 2011).

Avant de décrire ce modèle que l'on a choisi pour réaliser ce travail de thèse, je vais d'abord détailler les principaux mécanismes d'action de l'angiotensine II dans le remodelage vasculaire.

1. Actions de l'angiotensine II

Le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) est un système endocrine majeur qui affecte plusieurs fonctions cardiovasculaires et rénales en régulant la pression artérielle, le volume des fluides ainsi que la balance sodium/potassium (Ferrario and Strawn, 2006). Il participe également en conditions physiologiques et pathologiques à la régulation de l'inflammation, la vasomotricité et du remodelage vasculaire.

L'angiotensine II est l'effecteur majeur de ce système. Cet octapeptide vasoconstricteur très puissant agit sur ses cellules cibles à travers des récepteurs membranaires sélectifs dont il existe deux types, AT-1 et AT-2 (Bergsma et al., 1992, Mukoyama et al., 1993, de Gasparo et al., 2000). L'activation du récepteur AT-1 induit la vasoconstriction, le relargage d'aldostérone ainsi que d'autres fonctions qui tendent à augmenter la pression artérielle et causent l'hypertrophie ou l'hyperplasie des cellules cibles. AT-1, qui assure la majorité des fonctions du SRAA, est exprimé par plusieurs cellules impliquées dans le remodelage vasculaire, notamment les leucocytes, les CE, les CML et les fibroblastes. A l'opposé, il est admis que le récepteur AT-2, beaucoup moins connu, inhibe la croissance cellulaire et favorise la différenciation et l'apoptose cellulaires.

L'Ang II a plusieurs effets, indépendants de la pression artérielle, directement associés au développement d'athérosclérose notamment la stimulation du recrutement monocytaire, l'activation des macrophages et des PMN, et l'augmentation du stress oxydatif.

En effet, il a été montré qu'un traitement aigu à l'Ang II *in vivo* augmente significativement l'adhésion leucocytaire au niveau des artères mésentériques chez le rat (Alvarez et al., 2004). De plus, plusieurs études menées chez l'humain et l'animal ont rapporté que l'Ang II induit des réponses pro-inflammatoires dans les artères, le cœur et les reins à travers la régulation de l'expression de différentes cytokines et chimiokines. Dans les CML humaines, l'Ang II induit l'activation de NF-κB et l'expression de l'IL-6, MCP-1 et du TNF-a au niveau des monocytes (Hahn et al., 1994). Il induit également l'augmentation de l'expression de VCAM-1 au niveau de l'aorte du rat via l'activation de NF-κB. Le traitement *in vitro* de CML de rat avec de l'Ang II conduit à l'up-régulation de MCP-1, et son blocage avec le losartan, un agent pharmacologique antagoniste de l'Ang II, prévient l'expression de MCP-1 et la migration des

monocytes vers la paroi aortique ou d'autres organes cibles, et présente un effet bénéfique sur le ralentissement de la formation des lésions athéromateuses.

En plus de son rôle vasoconstricteur, l'Ang II induit un endommagement endothélial à travers l'inhibition de la régénération des CE. L'Ang II agit comme second messager pour activer des voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la prolifération et l'apoptose. Dans les vaisseaux lésés, l'Ang II procure un feedback positif dans l'inflammation vasculaire via le recrutement de cellules inflammatoires, qui produisent ensuite encore plus d'Ang II, et perpétuent l'inflammation vasculaire (Figure 8).

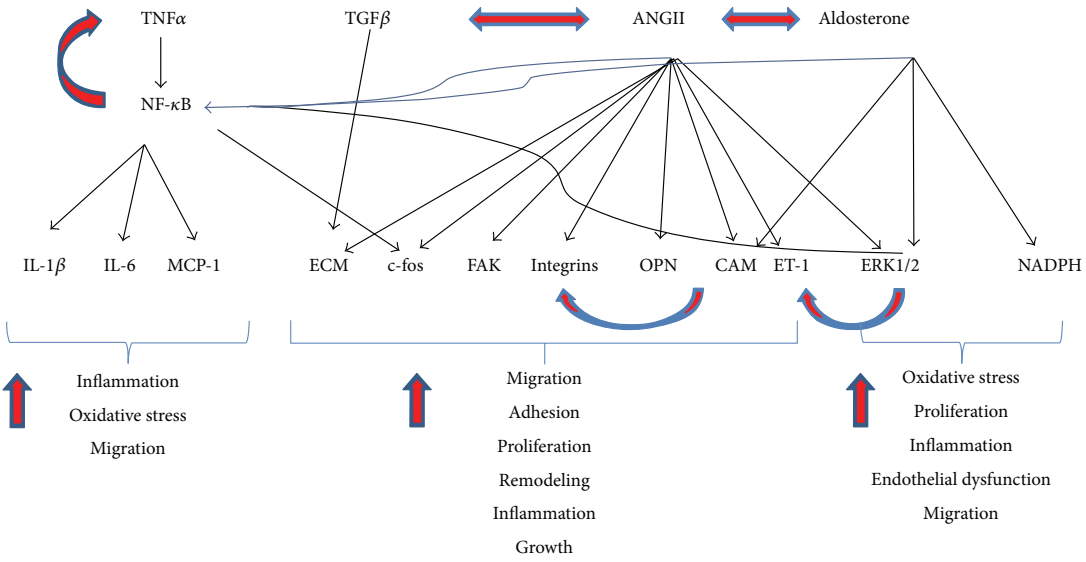


Figure 8 : Les actions inflammatoires des principaux effecteurs du SRAA.

(Adapté de Pacurari et al. « The renin-angiotensin-aldosterone system in vascular inflammation and remodeling »)

2. Induction d'AAA par perfusion chronique d'angiotensine II

Depuis sa première description dans les années 2000, ce modèle d'induction d'AAA a servi pour de nombreuses études (Bruemmer et al., 2003) afin de répondre à des questions d'ordre mécanistique et pharmacologique impliquées dans la pathologie anévrismale (Cassis et al., 2009, Rush et al., 2009, Inoue et al., 2009, Qin, 2008). Il a été montré que la perfusion sous-cutanée de l'Ang II, généralement à une dose de 1000 ng/kg/min pendant 28 jours, favorise la

formation des anévrismes aortiques chez la souris (Daugherty et al., 2000). Cette perfusion systémique d'Ang II chez des souches de souris hyperlipidémiques, telles que les souris déficientes pour le gène codant pour le récepteur à la lipoprotéine de basse densité (souris $LDLr^{-/-}$) ou pour celui codant l'apolipoprotéine E (souris $ApoE^{-/-}$), exacerbe une prédisposition préexistante au développement d'AAA chez ces souris (Tangirala et al., 1995). Il a été rapporté récemment que des AAA peuvent se développer chez la souris normo-cholestérolémique « wild-type » (WT) C56Bl/6 (Deng et al., 2003). L'incidence des AAA est faible chez la souris WT par rapport à la souris hyperlipidémique, mais la taille des anévrismes développés est équivalente (Uchida et al., 2011). Ainsi, même si l'hyperlipidémie n'est pas nécessaire pour le développement des AAA expérimentaux, elle augmente leur incidence.

Bien que l'hypertension soit un facteur de risque majeur dans la pathologie anévrismale humaine (Cronenwett, 1996), il a été montré que l'augmentation de la pression artérielle suite à la perfusion d'Ang II n'est pas entièrement responsable du développement d'anévrisme dans ce modèle (Cassis et al., 2009). En effet, aucune augmentation du diamètre aortique n'a été observée suite à l'augmentation de pression artérielle par la norépinephrine. De plus, le traitement par l'hydralazine n'affecte pas le développement d'AAA chez les souris $ApoE^{-/-}$ perfusée à l'Ang II malgré son effet sur la diminution de la pression artérielle.

Dans ce modèle expérimental d'athérosclérose, la perfusion d'Ang II induit la formation d'AAA, qui a été associée à l'activation des leucocytes circulants. Une greffe de moelle osseuse provenant de souris $AT\text{-}1^{-/-}$ prévient la formation de ces AAA (Manning et al., 2002). De même, les inhibiteurs du SRAA freinent le développement athéromateux chez les souris $ApoE^{-/-}$ et les lapins hypercholestérolémiques. Il a été montré que l'irbesartan, un antagoniste du récepteur AT-1 de l'Ang II, diminue les lésions d'athérosclérose chez la souris $ApoE^{-/-}$ en diminuant le phénotype inflammatoire de la plaque (Dol et al., 2001).

Cette association entre les AAA et l'athérosclérose, bien qu'elle existe également chez l'homme, complique l'interprétation des résultats dans ce modèle. Ces anévrismes expérimentaux présentent d'autres similitudes avec la pathologie humaine notamment au niveau de la tendance accrue au développement d'AAA chez les mâles, ces derniers étant presque deux fois plus enclins aux anévrismes que les femelles.

La fréquence et la taille des AAA induits chez ces souris par la perfusion d'Ang II augmentent de façon similaire à celle des autres approches d'induction chimique. Les principales caractéristiques pathologiques générées par cette méthode rappellent celles de la

pathologie humaine. Elles incluent la dégradation de la média aortique, l'inflammation, la dilatation du vaisseau et la présence d'un thrombus.

La séquence d'événements cellulaires ayant lieu lors de l'initiation et la maturation des AAA a été récemment mise en évidence à travers la caractérisation de segments aortiques de souris $ApoE^{-/-}$ perfusée à l'Ang II de 1 à 56 jours (Saraff et al., 2003). Cette séquence est initiée par l'accumulation des macrophages au niveau la paroi aortique susceptible de développer l'AAA, en parallèle de la dégradation d'élastine. Cependant, il n'est toujours pas clair si cette accumulation agit en tant que stimulus pour la dégradation des lames élastiques ou vice versa. Du $3^{ème}$ au $10^{ème}$ jour, des dissections évidentes de l'aorte conduisent à la formation d'hématomes vasculaires au niveau du site de rupture (thrombus), qui entrainent la dissection de l'adventice à laquelle la majorité des souris survit, avec seulement 15% de décès dus à la rupture aortique. La dissection représente une caractéristique majeure des AAA induits par l'Ang II, mais n'est pas commune dans les AAA humains.

La réponse inflammatoire est restreinte à une infiltration initiale prononcée de macrophages, suivie par le dépôt de MEC et l'infiltration d'autres populations leucocytaires tels que les lymphocytes B et T (Koch et al., 1990). La région dilatée de l'aorte continue son expansion comme l'ont montré des mesures échographiques et regagne graduellement en lames élastiques avec la mise en place d'un important remodelage vasculaire.

Les caractéristiques de ces formes d'AAA expérimentaux sont consistantes avec l'activation d'une réponse inflammatoire ainsi que la stimulation de la cascade protéolytique. Cela a été montré dans des études qui ont décrit une augmentation de l'expression de NF-κB et d'urokinase au niveau du tissu anévrismal de souris $ApoE^{-/-}$ sous Ang II (Tham et al., 2002, Wang et al., 2001). Le rôle de l'urokinase dans le développement d'AAA a été confirmé chez des souris WT ou $ApoE^{-/-}$ déficientes en urokinase (Deng et al., 2003). De plus, un inhibiteur de MMP à large spectre, la doxycyline, réduit de façon significative l'incidence et la sévérité des AAA induits par l'Ang II (Manning et al., 2003).

Contrairement aux anévrismes infra-rénaux chez l'homme, les AAA expérimentaux ont tendance à se développer au niveau de la partie supra-rénale (Figure 9). Ceci pourrait refléter une propriété inhérente de la paroi artérielle qui promeut la formation anévrismale à cet endroit précis. Ce phénomène peut être expliqué par l'hétérogénéité des réponses à différentes régions aortiques, due aux multiples origines des cellules médiales (Hungerford and Little, 1999).

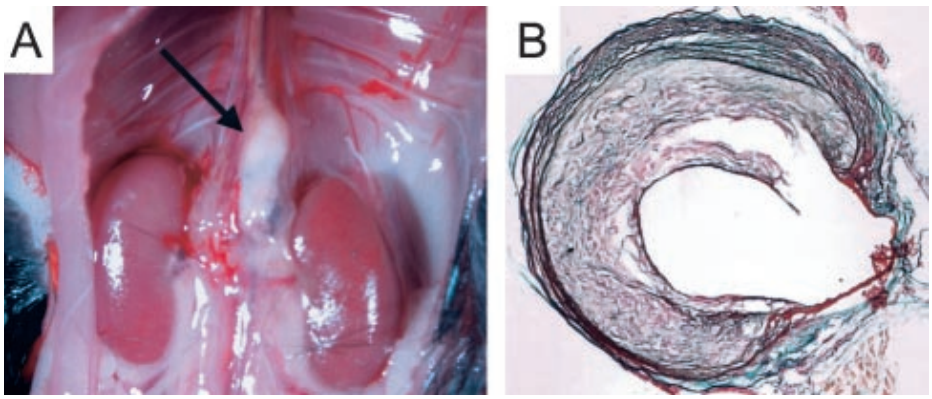


Figure 9 : AAA chez une souris femelle ApoE$^{-/-}$.

A : On note le développement d'anévrisme dans la portion supra-rénale de l'aorte. B : Coupe histologique avec une coloration du Gomori montrant l'importante dilatation et le dépôt de la MEC (Daugherty and Cassis, 2004).

D. Modèle d'infusion systémique d'angiotensine II et neutralisation du TGF-β (**souris normocholestérolémiques**)

Initialement, plusieurs études ont décrit les principales caractéristiques des AAA humains comme étant l'association d'une inflammation chronique au niveau de la paroi aortique, la perte de CML ainsi que le remodelage destructif de la MEC (Thompson et al., 2002, Wassef et al., 2007). Étant donné le rôle du TGF-β dans la régulation de la production et du remodelage matriciels (Roberts et al., 1986, Bobik, 2006), ces études suggèrent indirectement un rôle protecteur de cette cytokine contre le développement de la pathologie. Cela était en accord avec une seule étude montrant que la surexpression du TGF-β médiée par un adénovirus, stabilise des anévrismes aortiques déjà formés dans un modèle de xéno-transplantation (Dai et al., 2005). Cependant, le rôle précis de l'activité endogène du TGF-β dans les formes inflammatoires natives reste inexploré, et les hypothèses concernant le rôle protecteur du TGF-β ont été remises en question par des travaux décrivant une augmentation de la signalisation du TGF-β chez les patients atteints de la maladie de Marfan, ainsi que l'identification de mutations responsables de l'augmentation de l'activité du TGF-β, au niveau des gènes codants pour les récepteurs TGF-βR1 et 2 chez les patients atteints du syndrome de Loeys-dietz (Neptune et al., 2003, Pannu et al., 2005, Loeys et al., 2006). De plus, des études récentes ont rapporté une augmentation de l'expression du TGF-β dans des formes anévrismales syndromiques et non syndromiques de l'aorte ascendante (Gomez et al., 2009), ainsi que dans le modèle d'induction d'AAA par Ang II (Rush et al., 2009), suggérant un rôle pathogène de l'activité TGF-β dans le développement anévrismal.
Récemment, Wang et al. (Wang et al., 2010) ont développé un modèle qui consiste à administrer à des souris WT une combinaison d'Ang II et d'anti-TGF-β avec une forte incidence d'AAA et des taux de rupture de près de 80%. Il s'agit du seul modèle expérimental présentant un taux de rupture d'AAA aussi élevé, ce qui permet de suivre les mécanismes impliqués dans ce processus fatal qui représente la complication majeure de la maladie chez l'homme.

Ces travaux indiquent que le rôle pathogène de l'activité du TGF-β décrit dans la maladie de Marfan ne peut être extrapolé aux AAA expérimentaux induits par l'Ang II, et que l'augmentation de l'expression du TGF-β dans ce modèle (Rush et al., 2009) devrait être considérée comme un mécanisme de contre-régulation protecteur requis pour la préservation

de l'intégrité du vaisseau chez la souris. Cet effet protecteur implique un rôle critique de cette cytokine dans la régulation de l'activation excessive des monocytes/macrophages, de l'inhibition de la dégradation de la MEC et de la préservation de la survie des CML de la média. Ainsi, la neutralisation du TGF-β induit des anévrismes aortiques présentant une infiltration importante de monocytes/macrophages et de lymphocytes T au niveau de la média et de l'adventice de la paroi artérielle dès les premiers jours du traitement, suivie par la dégradation des lames élastiques

IV. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'AAA

A. Concept général

Les causes exactes des AAA ne sont toujours pas bien cernées. Néanmoins, il est admis que c'est une maladie multifactorielle dégénérative sollicitant des processus biologiques et des changements hémodynamiques (Figure 10). Plusieurs facteurs de risque favorisent le développement de cette pathologie, notamment l'âge, le sexe, le tabagisme, l'hypertension, l'obésité et l'aspect héréditaire (Nordon et al., 2011, Lee et al., 1997, Johnston et al., 1991).

L'AAA appartient aux maladies asymptomatiques (Kleinstreuer et al., 2007) dites 'Silent and Instant Killers'. Généralement, il est découvert de façon fortuite lors de manifestations cliniques n'ayant, pour la plupart des cas, aucun lien avec l'anévrisme. Les AAA, souvent associés à la présence de lésions athéromateuses, sont considérés aujourd'hui comme un processus pathologique bien distinct (Johnsen et al., 2010) et non une complication des plaques d'athéroscléroses avancées. La formation des AAA dégénératifs implique l'activation des voies protéolytiques, l'apoptose, le stress oxydatif, l'inflammation, la dégradation de la matrice de la paroi artérielle ainsi qu'un côté génétique et biomécanique (Norman and Powell, 2010, Nordon et al., 2011). Malgré la localisation focalisée et segmentaire des lésions anévrismales, des études indiquent que les patients atteints d'AAA présentent des anomalies au niveau de tout l'arbre vasculaire (Baxter et al., 1994, Tilson and Dang, 1981, Ward, 1992), ce qui reflète une composante systémique de la maladie.

La rupture d'AAA est le résultat d'un processus long et complexe. Étant donné la forte sollicitation de la paroi artérielle par les forces hémodynamiques de pression et de cisaillement au cours du cycle cardiaque, l'endommagement de la paroi artérielle peut mener à une distension progressive de l'aorte et ainsi l'apparition d'un anévrisme. Ce dernier continue son expansion progressive accompagnée par l'amincissement et la fragilisation de la paroi artérielle, jusqu'à sa fissuration ou rupture. Par conséquent, en réponse à la dilatation de l'artère, il résulte de fortes modifications de l'écoulement sanguin et l'apparition de zones de recirculation favorables au développement d'un thrombus. Ce dernier est retrouvé dans 75% des AAA (Harter et al., 1982), mais son rôle est controversé dans le processus de rupture d'anévrisme (Folkesson et al., 2011).

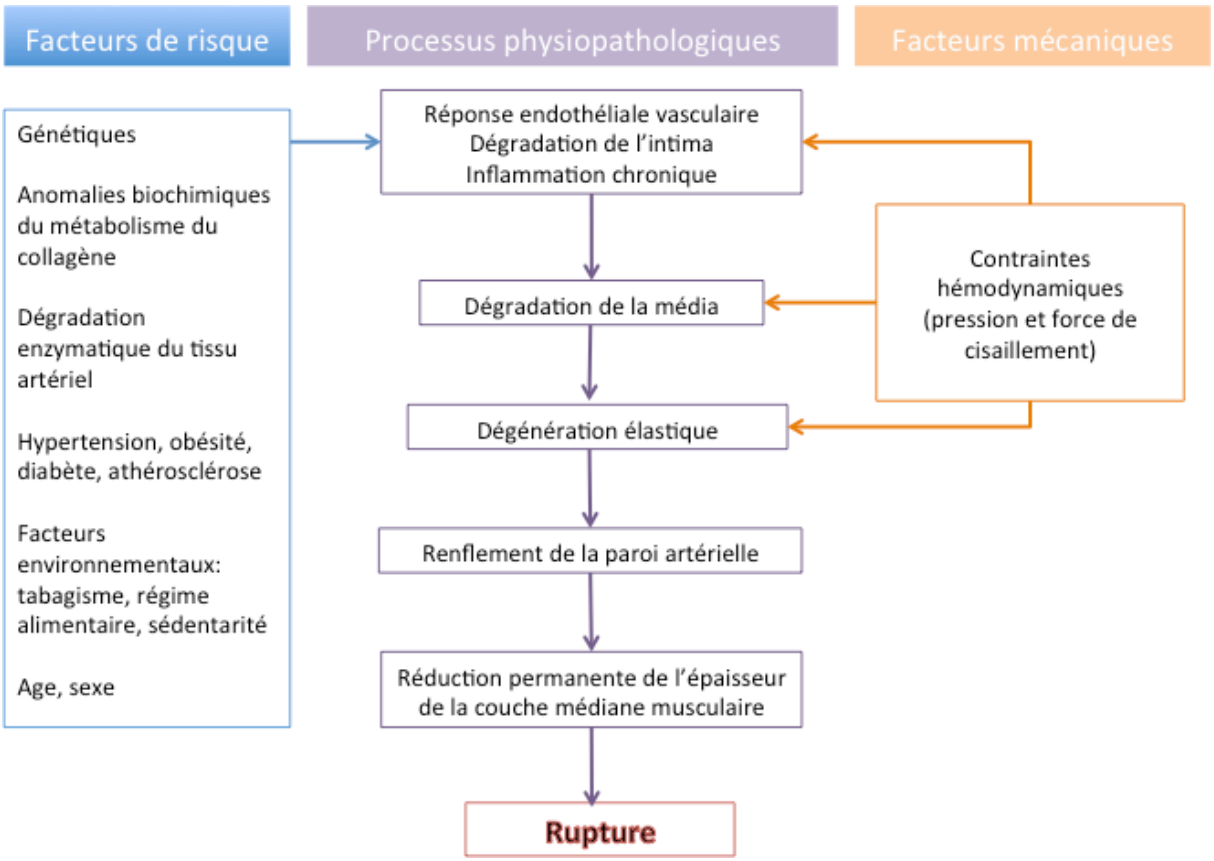


Figure 10 : Les différents facteurs pouvant contribuer à la formation d'AAA.

La maladie anévrismale est une pathologie multifactorielle et dégénérative qui résulte de l'interaction de processus biologiques et hémodynamiques. D'après Juan C. Lasheras « The biomechanics of arterial aneurysms ».

B. Considérations structurales

De multiples facteurs sont impliqués dans la pathogenèse de l'anévrisme et conduisent à des changements destructifs du tissu conjonctif, de la média et de l'adventice de la paroi aortique conduisant à la formation d'anévrisme et éventuellement à sa rupture. La média est principalement composée de lames élastiques, de CML et de MEC, tandis que l'adventice n'a pas de structure lamellaire, et est composé d'un tissu conjonctif lâche, de fibroblastes associés à des fibres de collagène et des vasa vasorum. L'intégrité de la paroi aortique dépend d'un remodelage équilibré de la MEC, et plus particulièrement de l'élastine, le collagène et les CMLs (Dobrin and Mrkvicka, 1994). Les examens histologiques des anévrismes révèlent un épaississement de la média, une dégradation du tissu conjonctif et une perte d'élastine conduisant à l'effacement de l'architecture lamellaire. Le rôle de la média aortique dans la contribution à la stabilité de la paroi est soutenu à travers des études qui soulignent une formation anévrismale suite à la destruction de la média par résection chirurgicale, par le froid ou par l'injection d'acetrizoate ou d'autres agents nocifs. D'autres travaux ont confirmé une diminution des taux d'élastine accompagnée d'une augmentation de collagène au niveau de la paroi artérielle conduisant à une baisse du ratio élastine/collagène.

C. Facteurs génétiques

Les facteurs génétiques dans la pathologie anévrismale sont basés sur l'existence d'AAA dans des maladies à transmission héréditaire (MFS, SEDv..) et sur l'existence de modèles génétiques d'AAA chez l'animal. Des études épidémiologiques suggèrent que la présence d'un AAA chez des parents de premier degré augmente le risque de survenue de la pathologie (de 1.9 à 2.4). De même, 20% de la fratrie des patients souffrant d'AAA développeraient la même pathologie (Rizzo et al., 1989). Le criblage génomique a mis en évidence plusieurs gènes candidats qui auraient un rôle potentiel dans le développement d'AAA. Ces gènes sont localisés au niveau des chromosomes 19q13, 4q31, et 9p21 et incluent le gène de l'IL-15, du récepteur d'endothéline A, de la mort cellulaire programmée 5 (PDCD5), et d'une protéine liée au récepteur aux LDL (LRP).

Il existerait un mode de transmission héréditaire mal connu associé à une interaction gène-environnement, dans la genèse des AAA.

D. Facteurs hémodynamiques

La paroi artérielle subit trois types de forces induites par le fluide : (1) la pression créée par les forces hydrostatiques, (2) la dilatation circonférentielle appliquant les forces longitudinales, et (3) les contraintes de cisaillement (‘shear stress’ en anglais) créées par le frottement du sang sur l’endothélium. La pression agit de façon perpendiculaire à la paroi, et les forces de cisaillement agissent tout au long de la paroi. Une perturbation du flux contribuerait à la croissance anévrismale en créant une blessure endothéliale et en accélérant la dégénérescence de la paroi artérielle. Il a été montré que des régions qui subissent des oscillations extrêmes de forces de cisaillement, qu’elles soient trop fortes ou trop faibles, corrèlent avec le développement d’athérosclérose dans l’aorte. Toutefois, les effets de ces forces dans l’anévrisme sont très peu connus.

Le flux à l’intérieur de l’anévrisme est affecté par la géométrie du sac anévrismal ainsi que par la vascularisation environnante comme l’existence, la taille et la symétrie des branches naissant près de la lésion, mais également la position du sac anévrismal par rapport au vaisseau parent. Plusieurs efforts ont été déployés afin d’établir des corrélations entre le risque de rupture et ces différentes caractéristiques géométrique, mais sont restés non concluants à cause de l’absence de modèles spécifiques pour étudier ces anomalies sous différentes conditions.

E. Facteurs physiopathologiques

1. Activité enzymatique

La dégénérescence protéolytique est un des facteurs les plus impliqués dans la formation et la progression des AAA. Un excès de protéases participant à la régulation et au remodelage de la MEC a été identifié dans les AAA ainsi que dans d’autres pathologies aortiques. La maladie anévrismale évolue à travers l’initiation, la progression pour potentiellement aboutir à la rupture. La protéolyse a lieu tout au long de ce processus, mais la corrélation entre ces étapes et la taille d’AAA n’est pas encore élucidée. En plus de causer une dégradation externe de la paroi aortique, la protéolyse est essentielle à l’initiation de la translocation des cellules inflammatoires de la lumière vasculaire ou vasa vasorum, à la média aortique. En plus, la dégradation des protéines de la MEC facilite la croissance de micro-vaisseaux au sein de la média. L’activité protéasique au sein du mur anévrismal implique des membres des familles

de MMPs, de cystéine-protéases (cathepsines), de sérine-protéases (système fibrinolytique), et d'autres (Choke et al., 2005).

Des travaux menés sur des modèles chez l'animal ont étudié le rôle de la protéolyse dans l'AAA. Les rôles individuels de l'élastine et du collagène dans l'AAA, ont été largement évalués dans des modèles animaux de dilatation aortique. Ces études expérimentales ont mis en évidence l'élongation et la dilatation du vaisseau suivant le traitement par l'élastase, et la rupture suite à la perfusion de collagénase. L'identification de mutations affectant le gène de collagène III COL3A1 ou le gène d'élastine chez des patients atteints d'AAA, soutient le rôle prépondérant de ces deux protéines matricielles dans le maintien de l'intégrité de la paroi vasculaire (Pepin and Byers, 1993, Szabo et al., 2006).
Chez le rat, la perfusion de l'aorte abdominale avec de l'élastase induit le développement d'AAA (Anidjar et al., 1990). Inversement, dans un modèle de perfusion de $CaCl_2$ chez le rat, le traitement de l'aorte avec un polyphénol qui lie l'élastine (le pentagalloylglucose), permet de maintenir l'intégrité de la média et de protéger contre le développement d'AAA (Isenburg et al., 2007).

Dans une étude menée sur un modèle de souris $ApoE^{-/-}$ perfusées à l'Ang II, une mutation du collagène lui procurant une résistance aux collagénases, induit l'accumulation de collagène dans l'adventice aortique, la dégradation des lames élastiques et l'accélération du développement d'AAA. Ces derniers n'étaient pas associés à une augmentation des protéases mais plutôt à une désorganisation des fibres de collagène par rapport aux souris contrôles (Deguchi et al., 2009). En effet, il a été montré chez l'homme, qu'une forte accumulation et une désorganisation du collagène peuvent contribuer au développement d'AAA. Une étude a rapporté la présence de taux élevés de collagène ayant une altération micro-architecturale dans la paroi anévrismale par rapport à l'aorte saine (Lindeman et al., 2010).

a) Les métalloprotéinases matricielles

De nombreuses études montrent l'implication des MMP dans la physiopathologie de l'AAA. Plusieurs formes actives de MMP ont été détectées au niveau des extraits d'anévrismes ou dans le sang circulant des patients atteints d'AAA (Irizarry et al., 1993, Newman et al., 1994b, Sakalihasan et al., 1996).

Plus récemment, une étude *in vivo* a montré qu'un inhibiteur de MMP, la doxycycline, préserve l'élastine en diminuant les taux de MMPs (en particulier MMP-2 et MMP-9) et en augmentant TIMP-1 (Yamawaki-Ogata et al., 2010).
La dégradation d'élastine stimule la production de MMPs et d'autres protéases dérivées des macrophages et des CML (Ailawadi et al., 2003). L'infiltrat inflammatoire ainsi que les néo-vaisseaux sont des sources majeures de MMPs dans la paroi anévrismales ce qui contribue considérablement à l'instabilité de la paroi lésée (Reeps et al., 2009). Il a été suggéré que la balance du remodelage vasculaire entre les MMPs, les TIMPs et d'autres inhibiteurs de protéases pourrait favoriser la dégradation d'élastine et de collagène ce qui induit la destruction de la MEC et participe au développement de l'AAA (Knox et al., 1997).

MMP-9 (gélatinase) : Sécrétée majoritairement par les macrophages et les CMLs, les MMP-9 sont les plus étudiées des métalloprotéinases. De fortes concentrations de MMP-9 ont été notées chez les patients atteints d'AAA par rapport aux sujets sains (McMillan et al., 1995). De façon intéressante, Pyo et al. ont montré dans une étude expérimentale, que l'invalidation du gène MMP-9 empêche la dégénérescence anévrismale dans des modèles murins (Pyo et al., 2000). Le développement d'anévrisme est restauré chez ces souris après une injection de macrophages WT. Des corrélations ont été établies entre des taux plasmatiques élevés des MMP-9 et -1, la croissance des AAA (Hovsepian et al., 2000, Lindholt et al., 2000) et leur rupture (Wilson et al., 2008, Petersen et al., 2000).

MMP-2 (gélatinase) : La MMP-2 est sécrétée par les CMLs adventitielles et les fibroblastes, elle est exclusivement activée par les MT-MMPs. Elle a la particularité de dégrader l'élastine et le collagène et jouerait donc un rôle dans l'initiation du processus anévrismal. Dans les modèles murins transgéniques, la MMP-2 complémente et facilite l'activité dégénérative de la MMP-9 mais des études ont pourtant suggéré que la MMP-2 est dotée d'une capacité élastolytique plus importante comparée à la MMP-9. Freestone et al. montrent une prédominance de la MMP-2 dans les petits anévrismes contrairement à la MMP-9 qui caractérise les anévrismes plus larges (Freestone et al., 1995).
Les taux plasmatiques de MMP-2 sont élevés chez les patients atteints d'AAA par rapport aux contrôles. La MMP-2 est souvent détectée dans sa forme active, ce qui soutient son rôle dans la dégradation de la MEC. Des études réalisées dans un modèle d'AAA chez le rat, ont montré que l'inhibition du développement d'anévrisme suite à la surexpression de TIMP-1 est accompagnée d'une inhibition de l'activation des MMP-2 et -9 (Wilton et al., 2008).

MMP-3 : La MMP-3 dégrade la MEC et contribuerait au développement d'une pathologie de l'aorte ascendante thoracique et abdominale (Lesauskaite et al., 2006, Newman et al., 1994b). L'invalidation du gène MMP-3 chez la souris a suggéré un rôle pour cette protéase dans la dégradation des composants de la matrice et dans la promotion de la formation d'anévrisme via la dégradation des lames élastiques (Silence et al., 2001).

MMP-12 (macrophage métalloélastase) : Ayant une grande affinité pour l'élastine dans sa forme active, la MMP-12 est impliquée dans la pathogenèse de l'AAA (Longo et al., 2005, Curci et al., 1998). Cette prédominance d'activité élastolytique a également été rapportée dans un modèle d'AAA chez des souris $ApoE^{-/-}$ et la déficience en MMP-12 confère une protection contre la destruction de la média ce qui suggère l'implication de cette protéase dans le processus anévrismal (Luttun et al., 2004).

Les collagénases (MMP-1, -8 et -13) : Une forte activité collagénolytique a été identifiée dans les AAA. Toutefois, la protéolyse du collagène est souvent associée à la rupture terminale de l'AAA. Ceci a été confirmé par la présence de taux élevés de ces protéases dans des échantillons d'AAA rompus (Busuttil et al., 1980). La MMP-1 fut la première MMP détectée dans l'AAA. Elle est localisée dans les cellules mésenchymateuses (CMLs, fibroblastes et CE) et régulée par des médiateurs de l'inflammation. Une plus forte expression protéique et transcriptionnelle de la pro-MMP-1, MMP-1 a été rapportée chez les patients atteints d'AAA en comparaison avec le vaisseau sain (Irizarry et al., 1993). L'expression de la MMP-8 a été décrite dans la dissection aortique aigue (Li et al., 2010). L'expression de la MMP-13 a également été documentée dans les tissus anévrismaux (Mao et al., 1999a).

Les inhibiteurs des MMPs (TIMPs) : L'expression des MMPs est souvent associée à celle de leurs inhibiteurs locaux (Birkedal-Hansen et al., 1993, Woessner, 1991, Matrisian, 1990, Gomez et al., 1997). La diminution de l'expression de ces TIMPs dans des AAA expérimentaux a été associée au développement des lésions anévrismales. Knox et al. ont souligné que le déséquilibre entre l'expression des MMPs et des TIMPs engendre une augmentation de l'activité protéolytique dans la paroi anévrismale chez l'homme (Knox et al., 1997). Dans un modèle expérimental chez le rat, la surexpression locale de TIMP-1 prévient la dégradation et la rupture associées aux AAA (Allaire et al., 1998a, Silence et al., 2002).

A l'inverse, on note une augmentation du nombre de micro-anévrismes dans un modèle de souris ApoE$^{-/-}$ invalidées pour TIMP-1 (Lemaitre et al., 2003, Lemaitre et al., 2009). Pareillement, dans un modèle murin de perfusion d'élastase, les souris TIMP-1$^{-/-}$ développent des anévrismes plus importants que les souris contrôles (Eskandari et al., 2005). En revanche, la déficience en TIMP-2 dans un modèle d'induction d'AAA au $CaCl_2$ chez la souris, induit une diminution du développement anévrismal (Xiong et al., 2006).
Par ailleurs, des études ont montré que la production des TIMPs est augmentée dans les AAA humains (Mao et al., 1999b, Elmore et al., 1998).

b) Les cathepsines

Les cathepsines sont des cystéines protéases qui jouent un rôle important dans la dégradation des protéines par le lysosome. De nombreuses études rapportent une augmentation d'expression ou d'activité d'un certain nombre de cathepsines dans les AAA humains et inversement une baisse de l'expression d'un inhibiteur endogène principal des cathepsines, la cystatine C (Gacko and Chyczewski, 1997, Gacko and Glowinski, 1998b, Gacko et al., 1999, Shi et al., 1999, Lindholt et al., 2001b, Abdul-Hussien et al., 2007, Siergiejuk et al., 2011, Gacko and Glowinski, 1998a). La déficience de la cystatine C dans un modèle de souris ApoE$^{-/-}$ a permis la mise en évidence de son rôle dans l'anévrisme. Les auteurs ont montré une augmentation de la taille de l'AAA, de l'infiltrat inflammatoire notamment les macrophages et les lymphocytes T, de l'apoptose des CMLs, ainsi que l'augmentation de l'activité des cathepsines et de la dégradation des lames élastiques (Sukhova et al., 2005, Schulte et al., 2010).
L'étude de souris déficientes en dipeptidyl peptidase I (DPPI) a permis la mise en évidence de l'implication directe des cathepsines dans le développement de l'AAA. Ces souris ont montré une diminution du recrutement des PMN et de la production locale de la chimiokine CXCL2 au niveau de la paroi anévrismale ainsi qu'une résistance au développement d'AAA induit par la perfusion d'élastase (Pagano et al., 2007). D'autres cathepsines ont été impliquées dans le développement des AAA en affectant l'infiltrat inflammatoire, la survie des CML et la dégradation de la MEC (Sun et al., 2011, Sun et al., 2012, Qin et al., 2012).

c) Le système fibrinolytique

La fibrinolyse est un processus physiologique complexe qui permet la dissolution des caillots sanguins par son acteur principal : la plasmine. Cette dernière représente la forme active du plasminogène sous l'effet d'activateurs tels que l'urokinase (u-PA) et l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) dont l'activité peut être inhibée par le plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1).

À ce jour, le rôle du système fibrinolytique dans la pathologie d'AAA reste controversé. Toutefois, il est admis qu'il joue un rôle important dans le remodelage vasculaire et plus particulièrement dans l'activation des MMPs (Lijnen, 2001). En effet, des études ont confirmé que la plasmine induit l'activation de la pro-MMP-12 et ainsi la dégradation de l'élastine. Elle peut également activer les pro-formes des MMP-3, -9 et -13 (Carmeliet et al., 1997).

L'augmentation de l'activité fibrinolytique a été mise en évidence dans la paroi anévrismale (Tromholt et al., 1993, Reilly et al., 1994). Des études ont souligné l'augmentation de l'expression de la plasmine, et de son activité, au niveau d'extraits d'aortes atteintes d'AAA en comparaison aux contrôles (Jean-Claude et al., 1994). De même, une augmentation de l'expression d'u-PA dans les AAA induits par perfusion d'Ang II chez des souris $ApoE^{-/-}$ (Wang et al., 2001, Uchida et al., 2011). Les études expérimentales dans un modèle de souris $ApoE^{-/-}$ perfusées à l'Ang II et dans un modèle de xénogreffe chez le rat, ont permis de souligner que la surexpression locale de l'inhibiteur PAI-1 protège contre le développement d'AAA (Qian et al., 2008, Allaire et al., 1998b). Inversement, dans un modèle de perfusion d'élastase chez la souris, la déficience en PAI-1 favorise le développement de la pathologie (DiMusto et al., 2012).

De façon intéressante, plusieurs études ont rapporté des observations contradictoires entre les différents acteurs de la fibrinolyse et le développement d'AAA (Adam et al., 1999, Sofi et al., 2005, Lindholt et al., 2001c, Schneiderman et al., 1998). En effet, la déficience en u-PA a mené à deux résultats opposés. Deng et al. ont montré, dans un modèle de perfusion d'Ang II chez des souris WT ou $ApoE^{-/-}$, que la déficience en u-PA protège de l'AAA (Deng et al., 2003). À l'opposé, Uchida et al. ont rapporté, dans un même modèle de perfusion d'Ang II chez des souris normocholestérolémiques WT, que la déficience en u-PA induit au contraire une augmentation de la mortalité par rupture d'AAA (Uchida et al., 2011).

La dégradation de la MEC résultant de cette activité enzymatique dans l'AAA libère des fragments d'élastines qui peuvent avoir une action chimioattractante sur les monocytes (Hance et al., 2002). Elle participe ainsi au processus d'inflammation qui représente une caractéristique principale du développement d'AAA.

2. Réponse inflammatoire

L'anévrisme est défini comme une maladie inflammatoire associée à un déséquilibre protéolytique. L'infiltration des cellules inflammatoires, majoritairement dans l'adventice aortique, est l'une des caractéristiques principales des AAA humains (Rizas et al., 2009). Ces cellules sont principalement des macrophages, lymphocytes T, en majorité les CD4+, et les lymphocytes B, qui joueraient un rôle régulateur à travers le relargage d'une cascade de cytokines (Satta et al., 1998, Koch et al., 1990). Chez les patients atteints d'AAA, on retrouve des taux élevés de cytokines inflammatoires circulantes, et une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires dans le tissu anévrismal (Juvonen et al., 1997, Newman et al., 1994a). Ces cytokines sont capables de réguler l'expression des MMPs, des cathepsines et des sérines protéases créant un microenvironnement favorable au développement d'AAA (Shimizu et al., 2005). Par contre, il n'est toujours pas clair si l'inflammation observée au sein de la paroi aortique est la cause de l'expansion anévrismale ou bien le simple reflet du processus dégénératif (Freestone et al., 1995).

Des modèles animaux ont fourni des indices sur la contribution de l'inflammation dans la pathogenèse de l'AAA. Dans un modèle d'induction d'AAA par perfusion de $CaCl_2$ au niveau de l'adventice aortique, les lymphocytes T CD4+ semblent jouer un rôle central dans la modulation de la production des MMP-2 et -9 via l'IFNγ (Xiong et al., 2009, Gertz et al., 1988). Des études ont montré que six jours après un traitement à l'élastase, l'aorte exposée subit une destruction significative des lames élastiques associée à une forte infiltration de macrophages activés et de lymphocytes T (Anidjar et al., 1994). L'étude de ce modèle de perfusion d'élastase a montré que l'infiltrat inflammatoire est accompagné d'une augmentation des MMP-2 et -9. De façon intéressante, cet infiltrat inflammatoire n'est pas proéminent au niveau de la paroi aortique des AAA rompus. En revanche, ces régions de rupture présentent une augmentation considérable des néo-vaisseaux et des taux de MMPs totales et activées (Choke et al., 2006).

D'autres études ont décrit l'infiltration d'autres types cellulaires, notamment les neutrophiles, les mastocytes, les cellules dendritiques, les cellules NK et les plasmocytes dans la paroi des

AAA humains (Sun et al., 2007, Mayranpaa et al., 2009, Bobryshev and Lord, 2001, Forester et al., 2005). En effet, de grandes quantités d'immunoglobulines, en particulier les IgG, ont été observées dans les lésions anévrismales (Figure 11) (Gregory et al., 1996).

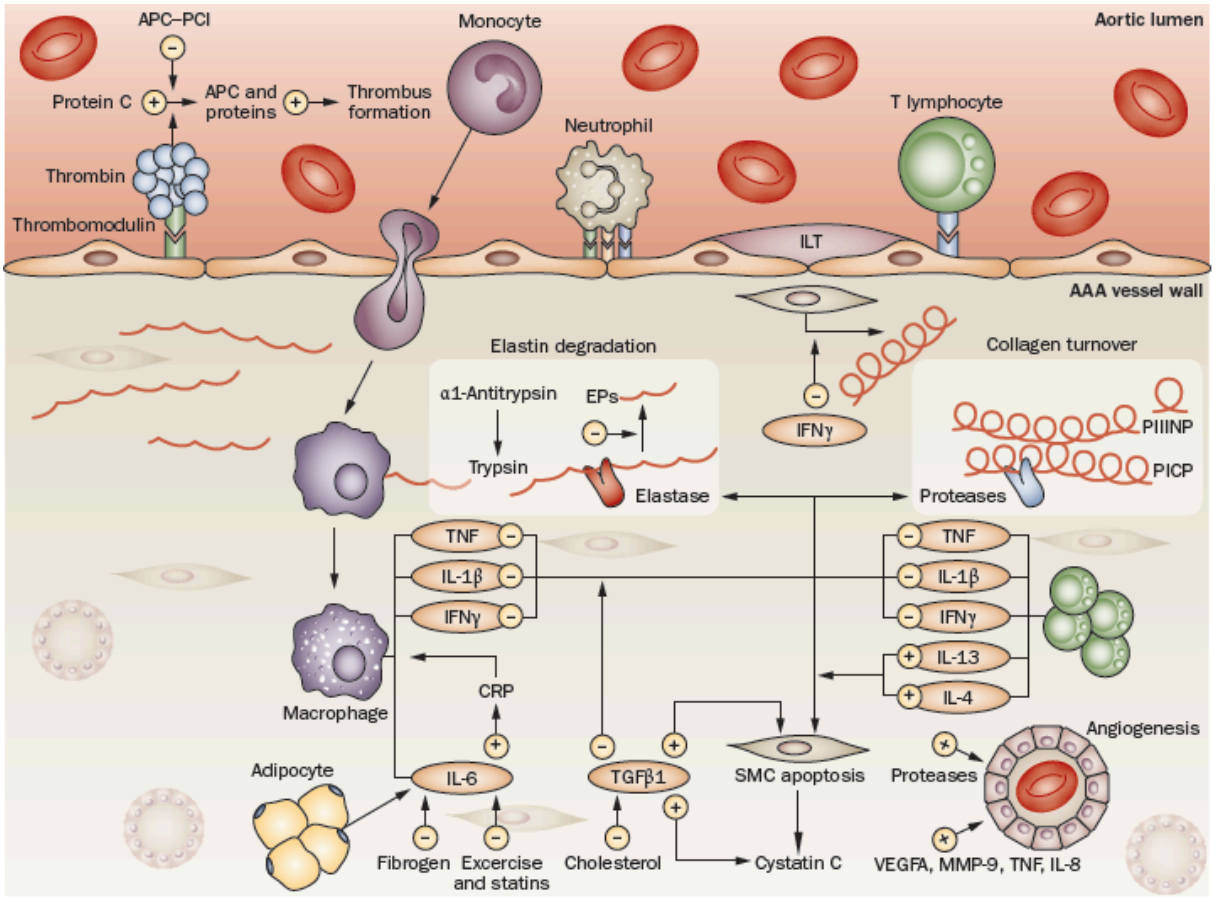


Figure 11 : Diagramme schématique des principaux mécanismes impliqués dans l'AAA.

Ces mécanismes se résument à deux processus majeurs : l'inflammation et le turnover de la MEC (adapté de (Hellenthal et al., 2009)).

a) Les cellules hématopoiétiques

Les monocytes/macrophages

Les macrophages représentent une partie majeure de l'infiltrat inflammatoire dans les AAA, mais de façon surprenante, très peu d'études se sont intéressées à la fonction spécifique de ce type cellulaire. Boytard et al. ont décrit la présence de macrophages inflammatoires dans l'adventice et le thrombus d'AAA humains. Cette étude a souligné que l'augmentation d'expression de peroxiredoxin-1 pourrait constituer une cible potentielle pour réguler le développement d'AAA (Boytard et al., 2013). L'expression d'une autre molécule dérivée des macrophages, angiopoietin-like protein 2, est augmentée dans des extraits d'AAA humains ainsi que dans un modèle murin d'anévrisme induit par $CaCl_2$, ce qui suggère son implication dans la formation d'anévrisme (Tazume et al., 2012).

Les produits de la dégradation d'élastine sont possiblement responsables du recrutement de macrophages. En effet, les forces hémodynamiques sont capables de réguler l'adhésion, la migration et la survie des macrophages (Sho et al., 2004). Ces cellules présentatrices d'antigènes sont des acteurs clés dans la réponse immune et la destruction de la MEC. Elles sont principalement présentes dans l'adventice de la paroi aortique et sont capables, via la production de multiples cytokines (IL-1β, IL-6, IL-8, and TNFα) et de protéases (MMP-2 et -9), de recruter d'autres cellules inflammatoires et de stimuler la production de cytokine et de protéases, la différenciation des lymphocytes B, la sécrétion d'anticorps, la différenciation de lymphocytes T cytotoxiques et la néovascularisation (Lindholt and Shi, 2006). En plus de leur production de cytokines et de protéases, les macrophages produisent également les TIMPs, ce qui confirme leur rôle dans la régulation des mécanismes physiopathologiques impliqués dans les AAA. Des études expérimentales menées chez l'animal ont permis de suggérer un rôle pivot de ces cellules dans la réponse inflammatoire. Saraff et al. ont montré dans un modèle de souris $ApoE^{-/-}$ perfusées à l'Ang II que l'accumulation des macrophages au niveau de l'élastine dégradée représente l'événement initial du développement des AAA induits (Saraff et al., 2003).
Le rôle des monocytes dans l'AAA sera discuté de façon plus détaillée dans le chapitre suivant.

Les lymphocytes

Les lymphocytes T représentent les cellules les plus représentées (58%) au niveau des AAA, suivis par les lymphocytes B (41%) et enfin les macrophages (2%) (Forester et al., 2005). Cette forte représentation des lymphocytes suggère leur implication dans la pathogenèse anévrismale. En revanche, peu d'études démontrent leur rôle exact dans cette pathologie.

Les études expérimentales chez les souris déficientes en lymphocytes B et T n'ont pas donné de résultats concluants concernant leur implication dans l'AAA. Des résultats de notre laboratoire ont montré que les souris $Rag2^{-/-}$ développaient moins d'AAA et étaient partiellement protégées de la rupture d'AAA par rapport aux souris contrôles, dans un modèle de souris WT perfusées par l'Ang II et traitées à l'anti-TGF-β (Wang et al., 2010). De même la déficience en lymphocytes T CD4+ induit une diminution de l'expression des MMP-2 et -9 dans la paroi aortique et protège contre le développement d'AAA induits par le $CaCl_2$ (Xiong et al., 2004). A l'opposé, Uchida et al. ont montré que la déficience en lymphocytes chez les souris $ApoE^{-/-}$ $Rag1^{-/-}$, n'a pas eu d'impact sur le développement d'AAA en réponse à l'Ang II (Uchida et al., 2010). Une autre étude expérimentale met en évidence le rôle pathogène des lymphocytes B dans l'AAA. En utilisant un modèle d'induction d'AAA à l'élastase, une étude a montré que la déficience en lymphocytes B chez des souris μMT protège contre le développement d'AAA, et que l'injection des immunoglobulines IgG restore leur susceptibilité à développer la maladie (Zhou et al., 2012).

D'autres études ont souligné le rôle pathogène des lymphocytes T dans l'AAA. Les lymphocytes T CD8+ pourraient induire l'apoptose des CML et contribuer ainsi au développement d'AAA (Henderson et al., 1999).

- Balance Th1/Th2 : Les lymphocytes T CD4+, les plus retrouvés dans l'infiltrat des T dans l'AAA, sont activés par des cellules présentatrices d'antigènes comme les macrophages, les CMLs et les CE. Ces cellules immunitaires jouent un rôle considérable dans la régulation de la réponse immune.

Les lymphocytes T sécrètent IFNγ et IL-4, deux cytokines qui peuvent avoir des rôles opposés dans de nombreux processus biologiques. Les lymphocytes CD4+ Th1 et les CD8+

cytotoxiques Tc1 produisent généralement de l'IFNγ, de l'IL-2 et du TNFα, tandis que les Th2 et Tc2 produisent les IL-4, -5, -10 et -13 (Shimizu et al., 2006). Les cytokines Th1 induisent des réponses inflammatoires cellulaires notamment l'activation des macrophages. Quant aux cytokines Th2, elles jouent des rôles importants dans des processus inflammatoires distincts, en particulier l'allergie, l'asthme et la dermatite atopique, mais inhibent certaines formes d'auto-immunité (Gordon, 2003). En plus des lymphocytes T Th2 et Tc2, les autres types cellulaires présents dans la paroi anévrismale, notamment les lymphocytes B, les NK, les mastocytes, les basophiles, les CE et les macrophages, produisent également des cytokines Th2 (Shimizu et al., 2006).

Dans l'AAA, des études ont suggéré que la réponse Th2 en particulier caractérise les AAA humains (Schonbeck et al., 2002) alors qu'à l'opposé d'autres études ont retrouvé que la réponse Th1 est prédominante au niveau des AAA (Galle et al., 2005). Il a été montré que le blocage d'un des principaux médiateurs de la réponse Th1 (l'IFNγ) et l'augmentation d'un médiateur principale de la réponse Th2 (IL-4), provoquaient le développement d'AAA avec une dégradation d'élastine, une surexpression des MMP-9 et -12 et une forte réponse inflammatoire (Shimizu et al., 2004)

Une étude mesurant l'expression protéique d'un large spectre de cytokines par western blot a été réalisée afin de distinguer les différences entre les réponses inflammatoires de l'AAA et des lésions aortiques occlusives. Les résultats de cette étude ne sont pas en faveur d'une polarisation franche Th1 ou Th2 dans l'anévrisme car elle montre l'augmentation d'expression des médiateurs associés aux deux types de réponses (Lindeman et al., 2008). Ainsi, seuls des travaux complémentaires permettront de cerner plus clairement les mécanismes impliqués dans cette réponse immunitaire.

- Les lymphocytes Treg : Yin et al. ont établi une association entre de faibles taux de lymphocytes T régulateurs CD4+ CD25+ Foxp3+, et le développement d'AAA chez l'homme (Yin et al., 2010). Les patients ayant des AAA présentaient significativement moins de lymphocytes régulateurs que les sujets sains. De plus, la fonction suppressive des lymphocytes régulateurs isolés de patients atteints d'AAA est plus faible par rapport aux contrôles.

Caligiuri et al. ont également montré une diminution des lymphocytes T CD31+ circulants dans le sang des patients ayant des AAA ainsi qu'une corrélation positive entre le pourcentage des lymphocytes T CD31+ circulants et la taille des AAA (Caligiuri et al., 2006). Cette population est capable de diminuer la prolifération des lymphocytes T CD8 *in vitro*.

Chez la souris, Ait-Oufella et al. ont apporté des preuves expérimentales sur le rôle des Treg dans le développement d'AAA (Ait-Oufella et al., 2013). Ils ont montré que la déplétion génétique ou par administration d'anticorps déplétants promeut l'activation de la réponse lymphocytaire T et induit une accélération du développement et de la sévérité de l'AAA chez la souris. L'ensemble de ces données (Ait-Oufella et al., 2013, Caligiuri et al., 2006, Yin et al., 2010) suggère un rôle important des lymphocytes Treg dans la limitation du développement des AAA.

- Les lymphocytes Th17 : Le rôle de ces lymphocytes dans l'AAA reste très peu étudié à ce jour. D'ailleurs, les résultats des études expérimentales montrent un rôle mitigé de cette voie dans l'AAA. Une étude expérimentale de notre laboratoire a montré un effet protecteur de l'IL-17 et des lymphocytes Th17 dans l'AAA. En effet, l'inhibition de STAT3, une protéine importante pour la différenciation des Th17, conduit à une augmentation de la sévérité d'AAA dans un modèle de souris WT sous Ang II et anti-TGF-β. De manière concordante, la surexpression de SOCS3 chez des souris WT (SOCS3-Tg) induit une diminution de l'activation de STAT3, avec une augmentation de la sévérité des AAA ainsi que la mort par rupture d'AAA chez ces souris. De plus, l'administration d'un anticorps anti-IL-17 neutralisant à des souris $ApoE^{-/-}$ perfusées à l'Ang II, induit une augmentation du développement des lésions par rapport à l'administration d'IgG contrôles associée à une augmentation de l'infiltration de lymphocytes T CD3+ (Romain et al., 2013, Taleb et al., 2009). Cependant, une étude récente indique dans un modèle de souris $ApoE^{-/-}$ perfusées à l'Ang II, que la déficience en IL-17 n'a pas d'effet sur le développement d'AAA (Madhur et al., 2011).
A l'opposé, une autre étude a montré dans un modèle murin d'induction d'AAA par élastase, le rôle néfaste de l'IL-17 dans le développement de l'AAA. Ils ont montré que l'absence d'IL-17 ou d'IL-23, des cytokines importantes dans l'expansion et le maintien de la lignée Th17, induit une diminution de l'inflammation et du développement d'AAA (Sharma et al., 2012). Le rôle de l'IL-17 dans le développement des AAA est donc toujours débattu.

Les neutrophiles

Les neutrophiles (PMN) produisent de grandes quantités de protéases, en particulier la MMP-9, qui est impliquée dans la dégradation de la MEC (Hobeika et al., 2007, Houard et al., 2009a). De nombreuses études expérimentales ont pu mettre en évidence un rôle déterminant des PMN dans le développement de l'AAA (Eliason et al., 2005, Pagano et al., 2007, Hannawa et al., 2005). Dans cette pathologie, les neutrophiles sont retrouvés principalement au niveau de la face luminale du thrombus intraluminal (TIL) non-occlusif (Houard et al., 2007), et produisent de l'élastase qui empêche la recolonisation de ce dernier par les cellules mésenchymateuses telles que les CMLs, inhibant ainsi la cicatrisation de l'AAA. Le TIL sera détaillé plus loin dans cette partie.

Dans un modèle de perfusion à l'élastase chez la souris, l'injection d'un anticorps anti-PMN induit une forte neutropénie et une diminution du nombre de monocytes entrainant une diminution de l'expression de la MMP-8, une réduction de l'infiltration des macrophages dans la paroi et une inhibition de la formation d'AAA (Eliason et al., 2005). En utilisant le même modèle murin, une autre étude a confirmé que la déplétion des neutrophiles par la neutralisation de Gr1 (anti-Gr1), qui est fortement exprimé par les neutrophiles mais également par les monocytes classiques (décrits dans le chapitre suivant), confère également une protection contre le développement anévrismal (Pagano et al., 2007). Cette même étude met en évidence le rôle critique d'une cystéine-protéase dans le recrutement des neutrophiles, ainsi que l'implication de ce recrutement dans le développement et la progression de l'AAA. D'autres équipes ont mis en évidence d'autres médiateurs potentiels de recrutement de PMN comme la L et P-selectine, et des chimioattractants comme RANTES, IL-8 et Leukotriene B4 (Houard et al., 2009b, Touat et al., 2006, Hannawa et al., 2005). Cependant, ces médiateurs seuls ne semblent pas suffisants pour expliquer l'abondance des neutrophiles activés au sein du TIL.

b) Les cellules non hématopoïétiques

Les cellules endothéliales

Au delà de leur présence au niveau de l'intima, les CE sont retrouvées dans les anévrismes aortiques, en particulier suite à la néo-vascularisation ayant lieu dans la média. Ces cellules pourraient jouer un rôle dans le remodelage de la MEC à travers leur production d'IL-1β et d'IL-8 qui stimule l'expression d'ICAM-1 et pourrait ainsi augmenter le recrutement de cellules inflammatoires. En effet, il a été suggéré que l'amplitude de néo-angiogenèse est associée à la sévérité de la dégradation aortique. De plus, une étude histologique a souligné une corrélation positive entre le degré de néo-vascularisation et le degré d'inflammation dans la paroi aortique anévrismale.
D'autre part, l'endothélium en prolifération pourrait également jouer un rôle dans la dégradation matricielle à travers la production de nombreuses MMPs et TIMPs (Lindholt and Shi, 2006).

Les fibroblastes

Le rôle exact des fibroblastes dans la pathogenèse anévrismale demeure incertain. Les fibroblastes sont des cellules sécrétrices d'élastine et de collagène, ainsi leur dysfonction pourrait affecter le maintien de la structure aortique et contribuer à la pathogenèse de l'AAA. Néanmoins, une étude a mis en évidence un rôle délétère de ces cellules dans le développement de la pathologie. Elle suggère que la production d'IL-6 par les fibroblastes causerait la stimulation d'une cascade de différenciation des lymphocyte B et T cytotoxiques ainsi que la stimulation des MMPs, et contribuerait ainsi au développement de l'AAA (Thompson and Parks, 1996).

Les cellules musculaires lisses

Les cellules musculaires lisses sont les principales cellules sécrétrices d'élastine et de collagène au sein de la paroi aortique. Leur apoptose est donc un des éléments importants dans le développement des AAA. Elles sont également capables de produire des protéases et leurs inhibiteurs et participent ainsi au remodelage de la matrice extracellulaire.

Cependant, il a été démontré que ces cellules jouaient un rôle crucial mais sous-estimé dans la protection contre l'AAA. En effet, une première évaluation du nombre de CML dans cette pathologie a montré que leur nombre était réduit de 74% au niveau de la média aortique anévrismale en comparaison avec le tissu sain. Cette diminution est associée à une augmentation d'apoptose des CMLs ainsi qu'à une co-localisation avec des acteurs de l'apoptose tels que Fas et p53 (Henderson et al., 1999, Lopez-Candales et al., 1997, Zhang et al., 2003, Satta et al., 2002). Ces éléments suggèrent que l'infiltrat immunitaire activé présent dans la paroi aortique lésée, en produisant des médiateurs cytotoxiques tels que les cytokines, les perforines et les Fas/FasL, pourrait induire l'apoptose et ainsi contribuer à l'élimination des CMLs (Henderson et al., 1999, Jacob et al., 2001).

L'apoptose des CMLs est d'ailleurs une caractéristique rapportée par tous les modèles expérimentaux d'AAA. Dans un modèle de souris ApoE$^{-/-}$, des travaux ont montré que l'administration d'un inhibiteur de caspase, une protéase qui joue un rôle important dans l'apoptose, avant la perfusion d'Ang II diminue l'apoptose des CMLs et l'inflammation dans la média et réduit l'incidence des AAA de 80% par rapport au groupe contrôle (Yamanouchi et al., 2010). Il a également été montré *in vitro* que les CMLs issus d'explants aortiques anévrismaux présentent un aspect morphologique altéré, et une plus faible capacité de prolifération en comparaison à des aortes saines (Liao et al., 2000). Leur prolifération aurait un effet bénéfique dans cette pathologie. En effet, une étude a montré dans un modèle d'induction d'AAA à l'élastase chez la souris, que la prolifération des CMLs induite par la surexpression du facteur de croissance des fibroblastes (FGF) au niveau de la paroi aortique limite le développement d'AAA (Hoshina et al., 2004).

Les CMLs ont également un effet paracrine protecteur dans l'AAA. Ceci a été observé dans une étude réalisée sur un modèle de xénogreffe chez le rat, où l'injection de CMLs en suspension induit une diminution de l'élastolyse et de l'infiltration des macrophages dans la paroi et protège les animaux contre le développement d'anévrisme (Allaire et al., 2002).

c) Autres facteurs

Le thrombus

Le thrombus intraluminal (TIL) est un tissu biologiquement actif de structure stratifiée et de taille variable, qui recouvre la surface luminale de l'AAA, remplace l'endothélium ou l'intima et présente une interface avec les composants du sang circulant (Michel et al., 2011, Fontaine et al., 2002). Ce thrombus retrouvé dans 75% des AAA (Harter et al., 1982) est principalement caractérisé par l'agglutination des hématies et des plaquettes permettant la libération d'hémoglobine libre et favorisant la formation de fibrine, suite à l'activation des plaquettes et de la thrombine. Le TIL est également responsable de la rétention du plasminogène et du « tissue-plasminogen activator », impliqués dans la fibrinolyse progressive, ainsi que la rétention leucocytaire, en majorité les neutrophiles (Houard et al., 2007, Houard et al., 2009b). Ces derniers sont prédominants dans ce thrombus du fait de leur forte affinité pour le réseau de fibrine-fibronectine via les intégrines (Kuijper et al., 1997).

Le rôle du TIL dans la rupture d'AAA est controversé (Folkesson et al., 2011), mais de plus en plus de preuves démontrent que le TIL participe à la dilatation de l'AAA (Wolf et al., 1994). La présence du TIL a été associée à un amincissement de la paroi aortique, une augmentation d'élastolyse, une plus faible densité de CMLs dans la média et une forte immuno-inflammation dans l'adventice (Vorp et al., 2001, Kazi et al., 2003), ce qui suggère que le TIL joue un rôle important dans la pathologie anévrismale. En effet, Fontaine et al. ont montré que l'activation du plasminogène en plasmine pourrait avoir lieu au niveau de l'interface entre le thrombus et la paroi anévrismale (Fontaine et al., 2002). En plus de sa capacité de fibrinolyse, la plasmine est capable d'activer les MMPs, de mobiliser le TGF-β et de dégrader les protéines péri-cellulaires adhésives, telle que la fibronectine, entrainant le détachement des cellules mésenchymateuses et leur apoptose (Meilhac et al., 2003). Il a également été rapporté que les neutrophiles infiltrant le thrombus sont une source importante de MMP9, ce qui pourrait contribuer à la dégradation de la MEC et ainsi favoriser le développement d'AAA (Fontaine et al., 2002, Touat et al., 2006).

Le stress oxydatif

L'augmentation du stress oxydatif dans les AAA humains suggère sa contribution à la pathogenèse des AAA.

Le stress oxydatif est l'ensemble des altérations tissulaires qui résultent de l'augmentation de la production locale et/ou de la diminution de la destruction des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (McCormick et al., 2007). Dans une étude analysant des extraits d'AAA infra-rénaux humains, les taux d'anions superoxyde O2- sont deux fois et demi plus élevés dans le tissu anévrismal que dans les tissus non anévrismaux adjacents, et dix fois plus importants qu'une aorte contrôle (Miller et al., 2002). Après la mise en évidence du stress oxydatif dans le tissu anévrismal, plusieurs études se sont intéressées à son rôle potentiel dans la pathogenèse de l'anévrisme en utilisant des modèles animaux d'AAA. Dans un modèle de perfusion d'élastase chez le rat, les analyses du profil d'expression génique soulignent une induction du stress oxydatif (Yajima et al., 2002). Il a également été montré que le remodelage aortique secondaire aux forces hémodynamiques associées aux AAA était accompagné d'une augmentation du stress oxydatif (De Keulenaer et al., 1998).

De plus, il a été montré, dans des modèles expérimentaux, que le traitement avec un anti-oxydant, la vitamine E, avait un effet bénéfique sur le développement des AAA, se manifestant par une diminution du stress oxydatif, une réduction de l'infiltrat macrophagique et de la taille des AAA et un plus faible taux de rupture (McCormick et al., 2007, Gavrila et al., 2005, Nakahashi et al., 2002).

V. LES MONOCYTES : CARACTÉRISTIQUES ET RÔLES DANS L'INFLAMMATION

Comme rapporté dans le chapitre précédent, plusieurs cellules immunitaires sont potentiellement impliquées dans la pathogenèse de l'AAA. La réponse immunitaire innée est la première ligne de défense naturelle. Elle est indispensable à l'établissement d'une réponse immunitaire adaptative. Les monocytes représentent un type cellulaire majoritaire qui joue une fonction cruciale dans l'immunité innée. Ces cellules ont une capacité phagocytaire permettant la clairance des débris cellulaires, mais aussi une capacité de modulation d'un environnement de cytokines clé dans l'orientation des différentes réponses immunitaires (Auffray et al., 2009b, Gordon and Taylor, 2005).

Générés dans la moelle osseuse, les monocytes rejoignent la circulation brièvement avant de migrer dans les tissus et se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques (dendritic cells ou DCs). C'est la raison pour laquelle ils sont souvent perçus comme des cellules transitoires dont le phénotype dépend de l'environnement particulier où ils s'accumulent. Or, depuis ces dernières années, ces cellules ne sont plus réduites à un statut transitoire mais sont qualifiées de réactives (Guilliams et al., 2014). Les monocytes sont fonctionnellement hétérogènes chez plusieurs espèces. Ils peuvent être inflammatoires ou anti-inflammatoires, ne proviennent pas exclusivement de la moelle osseuse et n'ont pas besoin de se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques pour participer à l'immunité. Pour résumer, les monocytes sont des éléments actifs du système immunitaire.

Nous verrons dans ce chapitre les caractéristiques des monocytes et leur implication au cours des maladies inflammatoires. Mes travaux de thèse se focalisent principalement sur cet aspect.

A. Les monocytes : définition et caractéristiques

Le système de phagocytes mononuclées a été défini comme étant un réseau de cellules myéloïdes non granulocytaires connues pour leurs rôles importants dans le remodelage tissulaire, l'homéostasie ainsi que dans les aspects activateurs et régulateurs du système immunitaire inné et adaptatif (van Furth and Cohn, 1968). Ce système est composé de trois types cellulaires ; les macrophages (MΦ), les cellules dendritiques (DCs) et les monocytes.

Les monocytes circulants se développent dans la moelle osseuse (MO) à partir de progéniteurs myéloïdes communs avec les granulocytes, et sont ensuite relâchés dans la circulation périphérique (van Furth et al., 1979). La différenciation des monocytes est essentiellement dépendante du facteur de croissance M-CSF (Macrophage-colony stimulating factor ou CSF-1) dont le récepteur (CD115) est présent sur les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (Auffray et al., 2009b). Les monocytes jouent un rôle important dans le développement et l'homéostasie, en partie via la clairance des cellules apoptotiques et des toxines (Franc et al., 1996, Williams, 2007). Chez les mammifères, les monocytes représentent également des cellules accessoires qui font le lien entre l'inflammation et les défenses innées contre les pathogènes, et les réponses immunes adaptatives. En effet, une des fonctions principales des monocytes est de fournir un réservoir considérable de précurseurs myéloïdes pour le renouvellement des macrophages tissulaires et des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes (Serbina and Pamer, 2006, Randolph et al., 1999, Geissmann et al., 2003, Varol et al., 2007). Cependant, la différenciation des monocytes en cellules dendritiques est souvent observée dans des conditions inflammatoires, et des preuves indiquent que le renouvellement de macrophages tissulaires et de DCs ne repose pas uniquement sur les monocytes circulants (Waskow et al., 2008, Massberg et al., 2007, Fogg et al., 2006).

Les monocytes sont classiquement définis comme cellules du sang circulant, qui constituent approximativement 10% des leucocytes périphériques chez l'homme et 4% des leucocytes chez la souris. La demi-vie du monocyte circulant a été estimée à trois jours chez l'homme et à un jour chez la souris (van Furth et al., 1979, Liu et al., 2007). Les monocytes circulants ont longtemps été classifiés selon leur morphologie cellulaire irrégulière et leur densité (van Furth et al., 1972, Grage-Griebenow et al., 2001, Bennett and Cohn, 1966). Cependant, ces critères

morphologiques présentaient un degré important d'hétérogénéité. Par exemple, la variabilité au niveau de la taille, la morphologie nucléaire et la granularité, complique leur distinction par des critères histologiques seuls (Figdor et al., 1982, Yasaka et al., 1981). D'autres techniques, notamment la cytométrie en flux, ont permis une meilleure classification et une meilleure description de l'hétérogénéité de ces monocytes.

1. Hétérogénéité des monocytes humains

De nombreuses preuves indiquent que les rôles des monocytes pourraient être attribués à des sous-types fonctionnels. Basées sur des techniques de centrifugation et d'élutriation, des études ont suggéré l'existence d'une hétérogénéité morphologique et fonctionnelle pendant les années 80. Elles ont mis en évidence un sous-type 'classique', prédominant, dense et large, exprimant le corécepteur du Lipopolysaccharide (LPS), le CD14. Ce sous-type est doté d'une forte capacité de phagocytose, produit des cytokines tels que l'IL-1 et le « colony stimulating factor » ou CSF, a une importante activité myéloperoxydase (MPO) et de cytotoxicité cellulaire dépendant de l'anticorps (ADCC). Le second sous-type, minoritaire, est d'une taille plus petite, moins dense, moins phagocytaire, exprime moins de CD14 et plus de HLA-DR, présente une plus forte capacité de présentation d'antigène et produit de grandes quantités d'IFNα (Figdor et al., 1982, Yasaka et al., 1981, Akiyama et al., 1983, Schreiber et al., 1983, Weiner and Mason, 1984, Elias et al., 1985, Esa et al., 1986).

Ensuite, en plus des critères morphologiques, la caractérisation des sous-types monocytaires a été affinée par l'analyse de leur expression de récepteurs de chimiokines et de molécules de surface spécifiques (Grage-Griebenow et al., 2001).

Une description s'est focalisée sur l'expression du FcγR-III (CD16) et suit le même schéma que la description précédente (Passlick et al., 1989, Ziegler-Heitbrock et al., 1988). Il a été montré que la population majoritaire des monocytes, très phagocytaire, n'exprimait pas le CD16, avec une faible expression de HLA-DR, et une forte expression du récepteur de chimiokine CCR2. Un deuxième sous-type minoritaire était $CD16^+$, $HLA\text{-}DR^+$, $CCR2^-$ et $CCR5^+$. Vu la capacité des monocytes $CD16^-$ à up-réguler le CD16, il a été postulé que le sous-type $CD16^+$ était une forme plus mature du premier sous-type $CD16^-$ (Ziegler-Heitbrock et al., 1993). Ainsi, les monocytes $CD16^+$ étaient appelés pro-inflammatoires à cause de leur capacité de produire le TNFα en réponse au LPS (Belge et al., 2002, Frankenberger et al.,

1996). D'autres études ont montré la capacité de ce sous-type à se différencier en cellules dendritiques, à répondre à la fractalkine (Sanchez-Torres et al., 2001, Randolph et al., 2002, Ancuta et al., 2003) et à proliférer en conditions d'inflammation (Ziegler-Heitbrock, 2007, Horelt et al., 2002, Fingerle-Rowson et al., 1998, Mizuno et al., 2005, Noel et al., 2007).

Grage-Griebnow et al. ont ensuite proposé l'existence de 3 sous-types monocytaires, dont deux font partie de la population $CD16^{+}$. Les monocytes $CD14^{++}CD16^{-}$, majoritaires, appelés « monocytes classiques », correspondent aux critères initialement attribués aux monocytes prédominants. A l'opposé, les monocytes $CD14^{+}$ (ou dim) $CD16^{++}$ (ou cellules $CD16^{+}$) sont appelés « non-classiques » (Passlick et al., 1989, Ziegler-Heitbrock et al., 1993). Un troisième sous-type est maintenant décrit chez l'homme: les monocytes $CD14^{++}CD16^{+}$ appelés « intermédiaires » (Figure 12).

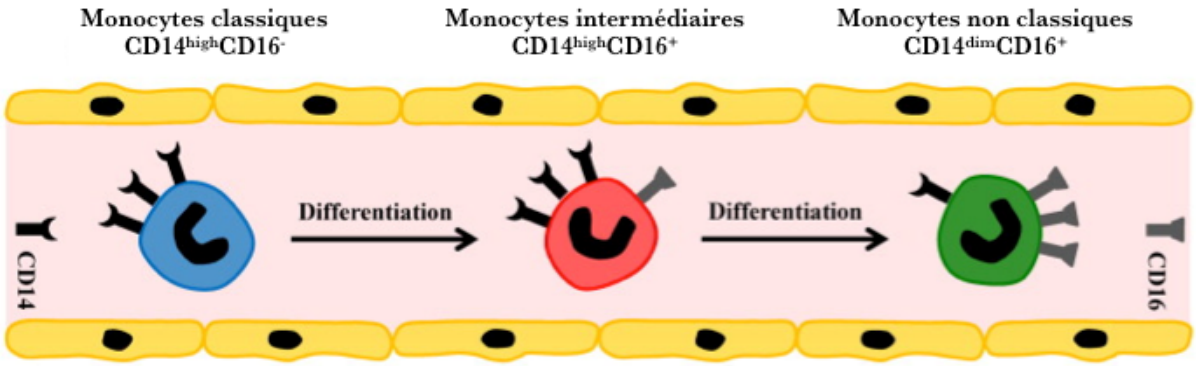


Figure 12 : Les principaux sous-types monocytaires humains.

Les monocytes classiques CD14^{high} CD16^{-}

Les monocytes classiques correspondent à la sous-population qui n'exprime pas le CD16. CD16^{-} CD14^{++}, ces monocytes sont majoritaires (plus de 80% des monocytes), fortement phagocytaires et désignés comme pro-inflammatoires suite à leur production préférentielle de cytokines pro-inflammatoires, tels que le TNFα, IL-1β et IL-6 (Belge et al., 2002). Cette population exprime fortement le récepteur CCR2 mais très peu le CX3CR1 (CCR2^{+}CX3CR1^{low}). Ces récepteurs membranaires ainsi que leur signature transcriptionnelle, permettent la caractérisation de leur phénotype (Gordon and Taylor, 2005, Grage-Griebenow et al., 2001).

Les monocytes intermédiaires CD14^{high} CD16^{+}

Au rôle encore peu connu, cette population CD16^{+} de monocytes dits intermédiaires exprime les récepteur CD64 et CD32. Elle présente une forte activité de phagocytose, et un fort potentiel inflammatoire suite à la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, tels que le TNFα et IL-1β en réponse au LPS (Cros et al., 2010), et à la production élevée des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Zawada et al., 2011). De part son haut niveau d'expression du CD32 (FcγRII) et des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, ces monocytes sont dotés d'une forte capacité de présentation d'antigènes et pourraient être des précurseurs des macrophages résidents et des cellules dendritiques migratoires (Gordon and Taylor, 2005, Randolph et al., 2002).

Les monocytes non classiques CD14^{dim} CD16^{+}

Ces monocytes CD14^{dim}CD16^{+} représentent environ 10% des monocytes circulants. Ils n'expriment ni CD64 ni CD32, et contrairement aux monocytes classiques, ils expriment faiblement CCR2 et fortement CX3CR1 (CCR2- CX3CR1+). Ils sont peu phagocytaires et ne produisent pas de TNFα ou d'IL-1β en réponse au LPS (Cros et al., 2010). Cependant, il a été montré qu'ils peuvent être activés par des virus et des acides nucléiques via les voies TLR7-TLR8-MyD88-MEK (Cros et al., 2010). De plus, ces monocytes non classiques expriment un large éventail de molécules d'adhésion leur permettant d'assurer une surveillance locale innée

des tissus en agissant comme sentinelles au niveau de l'endothélium, ce qui en fait des acteurs clés de l'immunité innée (Cros et al., 2010).

La démarcation des sous-types monocytaires selon leur expression du CD16 perdure. Cependant, l'étude des conséquences fonctionnelles de cette hétérogénéité monocytaires *in vivo* est désormais possible grâce à la découverte des sous-types monocytaires corrélés chez la souris.

2. Hétérogénéité des monocytes murins

Chez la souris, les monocytes sont d'abord définis par leur expression du CD115 (M-CSF), CD11b et F4/80. Deux principaux sous-types monocytaires ayant des propriétés migratoires différentes ont été décrits ; les monocytes classiques et les monocytes non classiques. Ils sont caractérisés par l'expression d'un épitope de l'antigène de différenciation myéloïde Gr1, le Ly-6C. Gr1 est un marqueur membranaire présenté par plusieurs cellules myéloïdes notamment les monocytes (Ly-6C) et les PMN (Ly-6G). Ceci explique les différentes dénominations de ces sous-types telles que $Gr1^{high}$ ou $Ly\text{-}6C^{high}$ pour les monocytes classiques, et $Gr1^{low}$ ou $Ly\text{-}6C^{low}$ pour les monocytes non classiques.

Les monocytes classiques ($Gr1^{high}$ ou $Ly\text{-}6C^{high}$)

Chez la souris comme chez l'homme, les sous-types monocytaires diffèrent par l'expression membranaire de deux récepteurs aux chimiokines : CCR2 et CX3CR1. Ces monocytes $CCR2^{high}$ CX_3CR1^{low} $CD62L^{+}$ ont une demi-vie courte, et sont recrutés sur les sites d'inflammation ou d'infection ainsi qu'au niveau des ganglions (Randolph, 2008, Geissmann et al., 2003, Palframan et al., 2001). Ils sont les précurseurs des macrophages et des cellules dendritiques en conditions inflammatoires qui produisent le TNFα et les ROS (Serbina et al., 2008, Narni-Mancinelli et al., 2007). Ils sont également nommés 'monocytes inflammatoires' à cause de leur accumulation préférentielle dans le péritoine en réponse à un stimulus inflammatoire. Leur recrutement au sein des sites d'inflammation implique le récepteur CCR2 et CD62-ligand (L-sélectine) (Figure 13) (Geissmann et al., 2003).

Les monocytes non classiques (Gr1^{low} ou Ly-6C^{low})

Par contre, les monocytes non classiques sont CCR2^{low} CX3CR1^{high} CD62L^{-} avec une forte expression de l'intégrine LFA-1. Ces cellules ont une demi-vie longue et sont appelées 'monocytes résidents' à cause de leur présence apparente dans les tissus non inflammés à l'état basal ainsi qu'en conditions d'inflammation, même si leurs fonctions exactes restent encore obscures (Geissmann et al., 2003, Sunderkotter et al., 2004). Récemment, une étude a montré, en utilisant une technique de microscopie intra-vitale, que cette population 'résidente' surveille en permanence les tissus en se déplaçant le long de l'endothélium des vaisseaux sanguins, ce qui leur confère l'avantage d'envahir rapidement le tissu face à une infection (Auffray et al., 2007). Ces cellules sentinelles agissent en véritables « patrouilles de surveillance », elles sécrètent alors des cytokines et des chimiokines pour le recrutement d'autres types de cellules immunitaires nécessaires à la lutte contre les infections (Auffray et al., 2007). Par la suite, elles se différencient en macrophages et contribuent à la réparation tissulaire comme décrit par l'analyse transcriptomique. Ce comportement spécifique de « patrouille » serait du à l'expression de LFA1 et du récepteur à la fractalkine, CX3CR1, dont le rôle a déjà été décrit dans le cadre de pathologies inflammatoires (Figure 13) (Umehara et al., 2004, Lesnik et al., 2003).

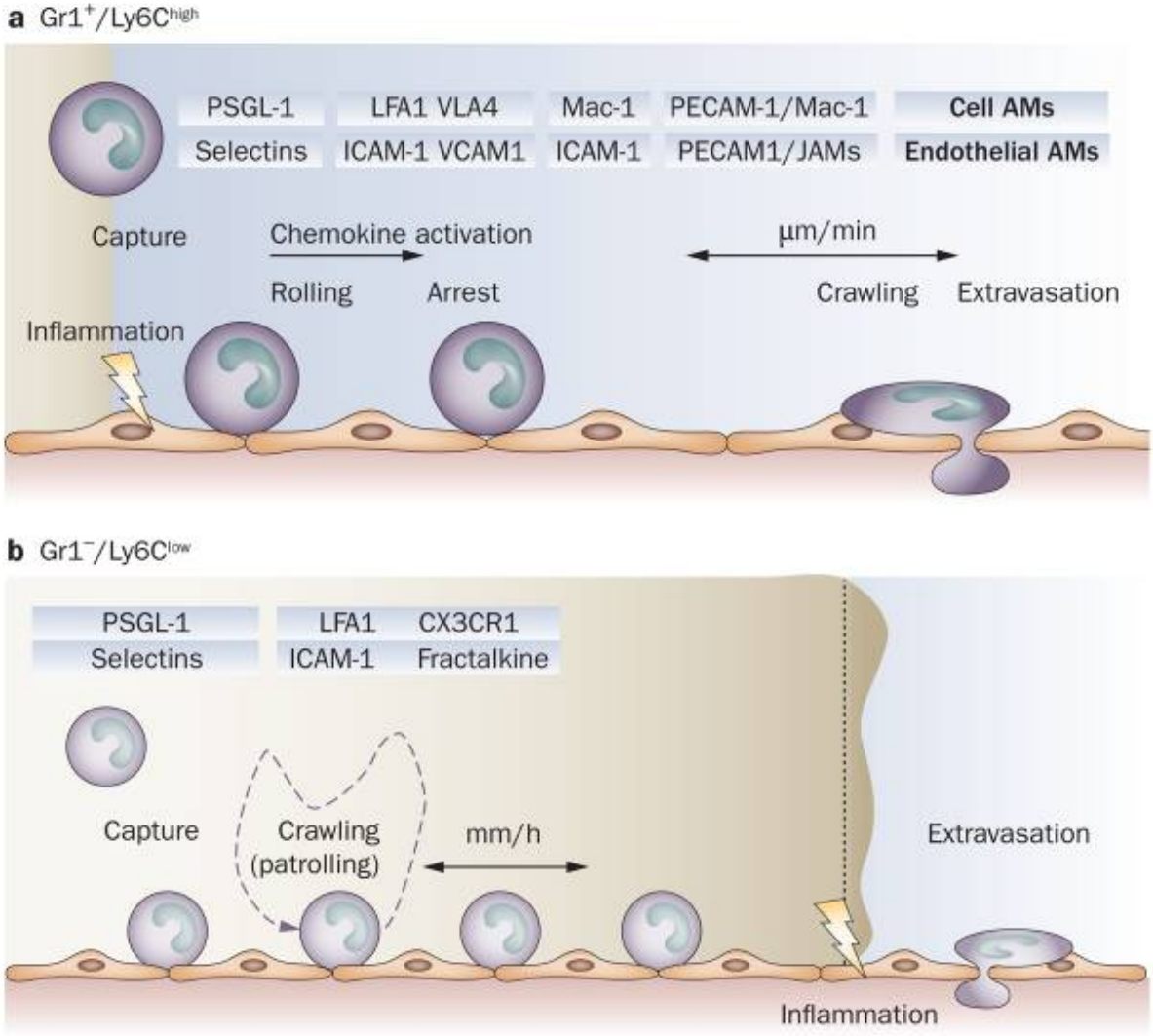


Figure 13 : Différences entre le recrutement des monocytes Ly-6C^{high} (a) et des monocytes Ly-6C^{low} (b).

AM : adhesion molecules (Woollard and Geissmann 2010)

Ainsi, la classification des monocytes classiques et non classiques semble être définie par un ensemble distinct de molécules d'adhésion et de récepteurs de chimiokines, suggérant que ces sous-types monocytaires exercent des fonctions différentes et présentent des modes migratoires distincts.

3. Homologie entre les monocytes humains et murins

Des études récentes ont utilisé des analyses de l'expression génique et de la classification hiérarchique pour comparer les sous-types monocytaires chez l'homme et la souris. Ingersoll et al. ont regroupé les sous-populations monocytaires humaines en fonction de l'expression du CD16 (Ingersoll et al., 2010). Le sous-type dominant « classique » a été classé comme $CD14^{+}CD16^{-}$, et le sous-type non classique a été représenté par la population $CD16^{+}$ avec une large expression du CD14 ($CD14^{+/low/-}$). Les auteurs ont conclu qu'en général, les monocytes $CD16^{-}$ et $CD16^{+}$ présentent de fortes ressemblances avec les Ly-$6C^{high}$ et Ly-$6C^{low}$ murins respectivement (Ingersoll et al., 2010) avec quelques différences au niveau de l'expression de récepteurs 'scavengers' qui reconnaissent aussi bien les lipides que les microorganismes.

Une autre étude comparative a classé les monocytes humains en trois populations distinctes : un sous-type dominant $CD16^{-}$, un sous-type intermédiaire $CD14^{+}CD16^{+}$ et un sous-type $CD14^{low/dim}$ $CD16^{+}$ (Cros et al., 2010). Les auteurs ont éclairé les débats sur l'analogie fonctionnelle des monocytes humains et murins et ont montré que les monocytes $CD14^{high}$ $CD16^{-}$ et $CD14^{+}CD16^{+}$ présentent des caractéristiques phénotypiques communes avec les monocytes Ly-$6C^{high}$/Gr-1^{high} murins, alors que les monocytes $CD14^{dim}$ $CD16^{+}$ présentent des ressemblances avec les monocytes Ly-$6C^{low}$. Cette étude remet en question l'utilisation du CD16 comme marqueur discriminant et propose l'utilisation du CD14 comme marqueur essentiel pour la caractérisation des deux sous-types monocytaires majeurs. De plus les auteurs complètent cette caractérisation phénotypique par des tests fonctionnels pour les trois sous-types. En réponse au LPS, les monocytes $CD14^{+}CD16^{+}$ sécrètent des cytokines inflammatoires, tels que le TNFα, l'IL1β et l'IL6, et les monocytes $CD14^{high}$ $CD16^{-}$ produisent préférentiellement le CCL2, l'IL10, l'IL8, les ROS et la MPO ainsi que des taux élevés d'IL6. Quant aux monocytes $CD14^{dim}$ $CD16^{+}$, exprimant faiblement le CCR2 et fortement le CX3CR1 et ayant un comportement sentinelle, ils exhibent une forte ressemblance avec les Ly-$6C^{low}$ murins. La stimulation de ces cellules $CD14^{dim}$ via des agonistes des TLR7 et 8 induit l'up-régulation de l'expression des cytokines inflammatoires (Cros et al., 2010). D'autres travaux ont rapporté que ces cellules étaient capables de produire du TNFα en réponse au LPS (Skrzeczynska-Moncznik et al., 2008, Wong et al., 2011).

Ces observations plaident contre la description d'un sous-type particulier comme 'inflammatoire', puisque que chaque cellule est 'inflammatoire' à sa façon. Les deux sous-

populations sont recrutées aux sites d'inflammation (Auffray et al., 2007, Landsman et al., 2007, Nahrendorf et al., 2007), et les deux peuvent contribuer à la résolution d'inflammation et à la réparation tissulaire (Nahrendorf et al., 2007, Shechter et al., 2009). Ainsi, pour établir une comparaison entre les trois sous-types humains distincts transcriptionnellement et leurs homologues murins (Wong et al., 2011, Zawada et al., 2011) en se basant sur les aspects phénotypiques et fonctionnels, on peut associer les monocytes $CD16^{-}$ $CD14^{high}$ et $CD16^{+}$ $CD14^{+}$ avec les monocytes Ly-$6C^{high}$ murins, et les $CD14^{dim}$ avec les Ly-$6C^{low}$ murins (Tableau 5).

Sous-type	Marqueurs	Récepteurs de chimiokines	Fonctions
Souris			
$LY6C^{hi}$	$CD11b^{+}CD115^{+}LY6C^{hi}$	$CCR2^{hi}CX_3CR1^{low}$	Rôles pro-inflammatoires et antimicrobien
$LY6C^{lo}$	$CD11b^{+}CD115^{+}LY6C^{low}$	$CX_3CR1^{hi}CCR2^{low}$	Sentinelle, réponse rapide, réparation tissulaire
Homme			
Classique	$CD14^{++}CD16^{-}$	$CCR2^{hi}CX_3CR1^{low}$	Proches des $LY6C^{hi}$ sur la base d'étude d'expression génique
Intermédiaire	$CD14^{++}CD16^{+}$	$CX_3CR1^{hi}CCR2^{low}$	Rôles pro-inflammatoires
Non classique	$CD14^{+}CD16^{++}$	$CX_3CR1^{hi}CCR2^{low}$	Sentinelle, rôle anti-viral

Tableau 5 : Les sous-types monocytaires chez la souris et chez l'homme.

D'après (Shi and Pamer, 2011).

B. Développement et différenciation des monocytes

1. Progéniteurs dans la moelle osseuse

Les monocytes circulants proviennent de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes Lin$^-$ Sca-1+ CD117+ (c-kit) dans la moelle (Iwasaki and Akashi, 2007). Ces dernières se différencient en des précurseurs myéloïdes communs 'common myeloid progenitor cells' (CMPs), ainsi que des précurseurs lymphoïdes communs 'common lymphoid progenitor cells' (CLPs). Les CMPs donnent ensuite naissance aux progéniteurs médullaires communs aux macrophages et aux cellules dendritiques 'Macrophages Dendritic cells Progenitors' (MDPs), qui expriment le CD115 (M-CSF receptor) et se développent en réponse au M-CSF (Auffray et al., 2009b, Geissmann et al., 2003). Récemment, les MDPs ont été isolés à partir de la MO de souris CX3CR1$^{gfp/+}$ comme des cellules GFP$^+$ CD117$^+$ Lin$^-$. Ils génèrent des monocytes médullaires Ly-6C$^+$ et CX3CR1$^+$ qui donnent naissance à leur tour aux deux sous-types monocytaires circulants (Figure 14). Cependant, les détails des différentes étapes de différenciation et des intermédiaires entre les MDPs et les sous-types monocytaires matures au niveau de la MO ne sont pas tout à fait connus.

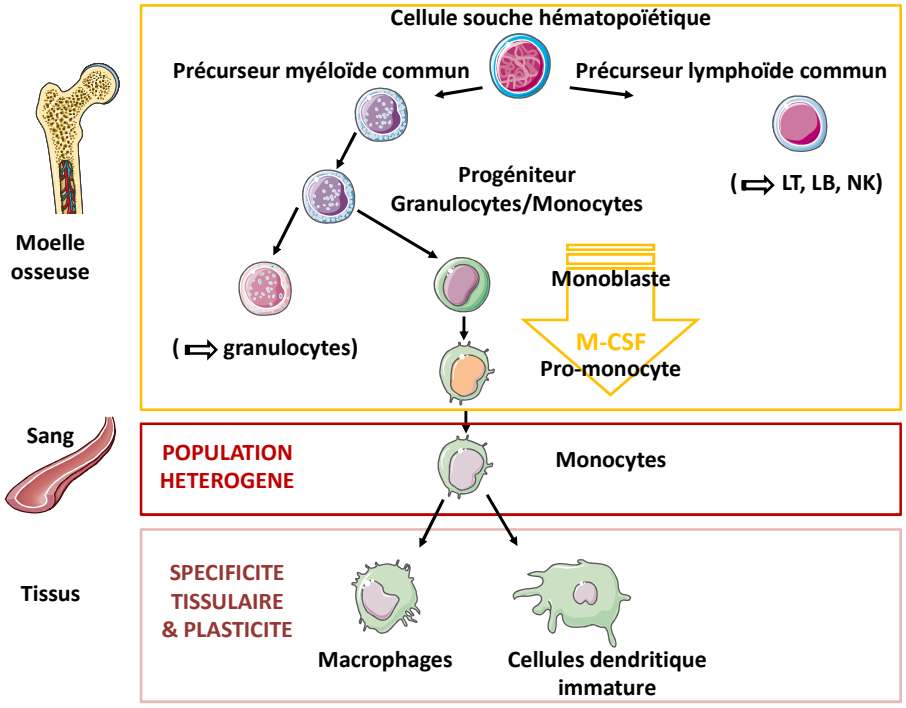


Figure 14 : Origine et différenciation des monocytes en macrophages et cellules dendritiques.

2. Le lien entre les deux sous-types monocytaires

Comme mentionné dans la partie précédente, il a été suggéré que le sous-type monocytaire humain $CD16^+$ est une forme plus mature du sous-type $CD16^-$. De la même façon chez la souris, plusieurs arguments soutiennent la conversion des monocytes Ly-$6C^{high}$ en monocytes Ly-$6C^{low}$ (Yona et al., 2013, Geissmann et al., 2010b). Pour soutenir cette hypothèse, Sunderkotter et al. ont déplété les monocytes périphériques en utilisant des liposomes chargés en clodronate et ont montré que les monocytes Ly-$6C^{high}$ sont les premiers à apparaître dans la circulation, suivis par les monocytes Ly-$6C^{low}$ (Sunderkotter et al., 2004). En absence d'inflammation, les monocytes Ly-$6C^{high}$ retournent à la MO se convertissent en monocytes Ly-$6C^{low}$ au bout de 3 jours. Les travaux conduits par Varol et al. ont également révélé que les monocytes Ly-$6C^{high}$ s'accumulent dans la moelle osseuse et se convertissent en monocytes Ly-$6C^{low}$ avant de rejoindre la circulation (Varol et al., 2007). Ces résultats ont permis de clarifier des observations précédentes décrivant la disparition de monocytes Ly-$6C^{high}$ introduits par transfert adoptif, en absence de stimulus inflammatoire (Sunderkotter et al., 2004, Geissmann et al., 2003).

D'autres études expérimentales chez la souris ont montré que les Ly-$6C^{low}$ ont une demi-vie considérablement plus longue que les Ly-$6C^{high}$. Il a donc été suggéré que l'apparition séquentielle de ces deux sous-types monocytaires dans le sang serait due à une différenciation différée dans le temps plutôt qu'une conversion (Liu et al., 2007). *In vitro*, la différenciation rapide des monocytes en macrophages complique la vérification de l'hypothèse de conversion.

Des études sur des animaux transgéniques ont contribué au débat sur la question. Une première étude a rapporté que les souris $Nur77^{-/-}$ sont déficientes en monocytes Ly-$6C^{low}$, tout en ayant une population monocytaire Ly-$6C^{high}$ (Hanna et al., 2011). En revanche, il n'est pas clair si ce facteur de transcription agit au niveau de la conversion des monocytes Ly-$6C^{high}$, ou au niveau de la différenciation en amont des monocytes Ly-$6C^{low}$, indépendamment des monocytes Ly-$6C^{high}$. Une seconde étude a décrit une déficience en monocytes Ly-$6C^{high}$ chez des chimères de MO déficiente en Kruppel-like factor 4 (KLF4), un facteur de transcription impliqué dans la différenciation cellulaire, tout en ayant de faibles taux de monocytes Ly-$6C^{low}$ (Alder et al., 2008). Ces études expérimentales fournissent de nouveaux outils pour élucider les mécanismes liant le développement des deux sous-types monocytaires.

Cependant, les chercheurs n'ont pas encore identifié des facteurs ou un précurseur spécifiques aux monocytes Ly-6C^{low}, ce qui fait de la conversion une explication plausible du lien entre les deux sous-types monocytaires (Figure 15) (Auffray et al., 2009b).

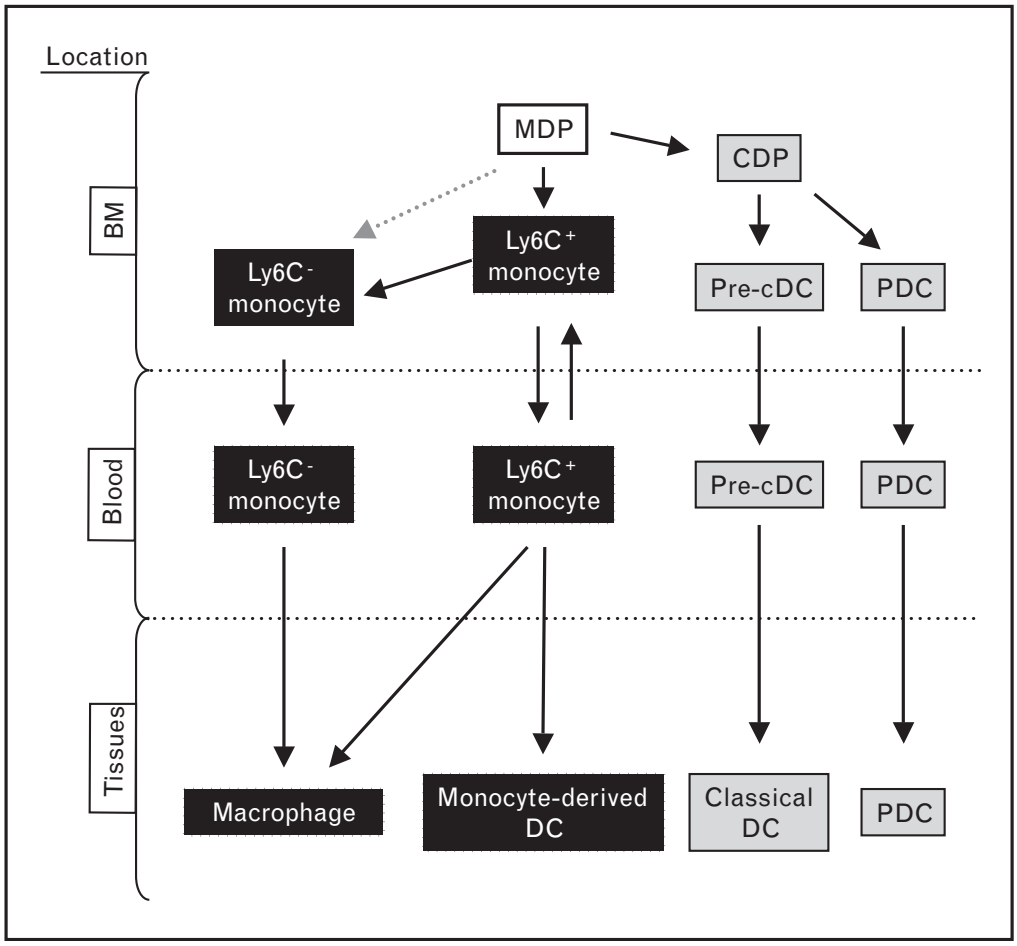


Figure 15 : Développement des phagocytes mononucléaires chez la souris.

D'après (Yona and Jung, 2010)

3. La différenciation au-delà du monocyte

Les monocytes circulants sont précurseurs de plusieurs populations de cellules phagocytaires et présentatrices d'antigène dans les tissus lymphoïdes et non-lymphoïdes ; les macrophages et les cellules dendritiques. Les MΦ et DCs sont morphologiquement et phénotypiquement hétérogènes et sont dotés d'une plasticité remarquable, ce qui les rend difficilement

caractérisables (Geissmann et al., 2010a). Néanmoins, il est admis que ces populations participent dans plusieurs processus biologiques importants. Une des questions les plus intrigantes du point de vue de la biologie monocytaire, est de savoir si les différents sous-types sont restreints à générer des MΦ et des DCs avec des fonctions définies, ou si ces différences de sous-types monocytaires disparaissent après leur accumulation dans le tissu.

La différenciation en macrophages

Les macrophages tissulaires ont diverses fonctions dans le maintien de l'homéostasie du tissu, par exemple à travers la clairance de cellules sénescentes, remodelage tissulaire, réparation et la résolution de la réponse inflammatoire (Lawrence et al., 2002, Gilroy et al., 2004, Gordon, 2007). Les macrophages ont longtemps été considérés comme dérivés du réservoir monocytaire sanguin, mais de nombreuses études ont pu démontrer qu'à l'état basal, les macrophages tissulaires résidents sont largement maintenus par leur prolifération locale comme c'est le cas pour les macrophages alvéolaires (Sawyer et al., 1982, Tarling et al., 1987, Landsman et al., 2007), les macrophages métallophiliques et ceux de la zone marginale (Wijffels et al., 1994), les cellules hépatiques de Kupffer (Crofton et al., 1978) ainsi que la microglie du cerveau (Mildner et al., 2007). Les mécanismes par lesquels les monocytes contribuent aux populations de MΦ et de DCs à l'état basal restent inconnus.

Des MΦ fonctionnellement distincts peuvent être dérivés des monocytes *in vitro*. L'activation classique des macrophages, se produit à travers l'incubation de cellules de MO avec du M-CSF, LPS ou IFN-γ et permet d'obtenir des macrophages inflammatoires de type 'M1' caractérisés par la sécrétion du TNFα, IL-1β, IL-6, IL-12 et iNOS. L'activation alternative implique une incubation avec de l'IL-4, IL-10 ou IL-13 et génère des macrophages anti-inflammatoires de type 'M2' définis par l'expression d'arginase-1, IL-10, CD206 et Fizz. Bien que ces définitions soient convenables aux études *in vitro* et élégantes dans leur simplicité, elles doivent être utilisées avec précaution dans un cadre *in vivo*.

De nouvelles preuves indiquent que les monocytes Ly-6C^{low}, et non pas les monocytes Ly-6C^{high}, pourraient être spécialement dédiées à générer des macrophages après leur extravasation de la circulation périphérique. En effet, une étude a montré dans un modèle de transfert adoptif de monocytes chez des souris déficientes en macrophages ou en DCs, que seuls les monocytes Ly-6C^{low} ont le potentiel immédiat de se différencier en macrophages

parenchymateux dans les poumons (Landsman et al., 2007). Pour soutenir ce lien entre les monocytes Ly-6C^{low} et les macrophages, la détermination des profils de transcription de ces monocytes isolées du péritoine de souris infectés par Listeria a révélé un programme distinct de différenciation en macrophage, contrairement aux monocytes Ly-6C^{high} qui présentent une signature de DCs (Auffray et al., 2007).

Toutefois, les monocytes Ly-6C^{high} qui prédominent la monocytose associée à l'athérosclérose génèrent des MΦ CD11b^{+} F4/80^{high} dans les lésions athéromateuses (Robbins et al., 2012, Swirski et al., 2007), mais il n'est toujours pas clair si ces monocytes donnent spécifiquement un sous-type de MΦ, ou si ces MΦ sont capables de se différencier d'un sous-type à l'autre localement. Il a été proposé que les monocytes Ly-6C^{low}, exprimant faiblement le CD11c, se différencient préférentiellement en DCs CD11c+ dans les lésions athéromateuses (Tacke et al., 2007). Pour ajouter une couche de complexité à la question, il a été montré récemment que des progéniteurs adventitiels Sca-1+ pouvaient se différencier localement en macrophages chez des souris C57Bl/6 et ApoE$^{-/-}$ (Psaltis et al., 2012). Vu la rare fréquence de ces cellules dans le tissu aortique leur relevance fonctionnelle reste à déterminer.

La différenciation en cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont une population hétérogène de cellules présentatrices d'antigène spécialisées, répandues dans les tissus lymphoïdes et non-lymphoïdes. Elles ont été décrites pour la première fois par Steinman et Cohn dans les années 70. Elles présentent une morphologie unique et un potentiel inégalé à stimuler les lymphocytes T naïfs (Steinman and Witmer, 1978). La notion de différenciation des monocytes en DCs découle d'une série d'expériences *in vitro*. La mise en culture de monocytes isolés du sang en présence du GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor) et d'IL-4 produit des DCs immatures, qui sont capables d'atteindre leur maturité suite au traitement avec des ligands des TLR ou avec du TNFα (Sallusto and Lanzavecchia, 1994, De Smedt et al., 1996). En effet, les cellules dendritiques dérivées des monocytes et de la moelle osseuse ont fait l'objet de nombreuses études et ont été utilisés comme substituts convenables des isolats *ex vivo*. De façon surprenante, les DCs classiques résidentes des organes lymphoïdes ne sont pas dérivées des monocytes *in vivo* (Varol et al., 2007, Naik et al., 2006). Elles se développement

exclusivement à partir des MDPs via les CDPs et des cellules appelées pré-cellules dendritiques classiques (pre-cDC) (Liu et al., 2009).

Sous des conditions inflammatoires, les monocytes circulants peuvent se différencier en DCs ayant différentes caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles. Les travaux remarquables dirigés par Eric Pamer, ont établi dans un modèle d'infection par Listeria, que les monocytes Ly-6C^{high} sont capables de se différencier dans la rate en une population de cellules dendritiques produisant TNFa et iNOS appelées Tip-DC, critiques pour le contrôle de l'infection (Serbina et al., 2003).

Plus de preuves qui soutiennent cette différenciation en DCs découlent des travaux du Dr Randolph. Ils ont montré qu'après leur recrutement vers les sites d'inflammation, les monocytes Ly-6C^{high} se différencient DCs et migrent dans les ganglions. Nakano et al. ont également montré, dans le cas d'une infection influenza (H1N1), que les monocytes Ly-6C^{high} sont recrutés dans les ganglions où ils se différencient en DCs CD11c^{+} CD11b^{high} Ly-6C^{high} CD40^{int} qui stimulent la réponse Th1 via la production de l'IL-12p70 (Nakano et al., 2009). Une autre équipe a montré la différenciation des monocytes Ly-6C^{high} en une population de DC de la lamina propria intestinale, contrairement aux monocytes Ly-6C^{low} qui eux donnent naissance à des cellules à morphologie ressemblant aux macrophages. Dans un modèle d'inflammation de la peau, le groupe du Dr Merad a montré que les monocytes Ly-6C^{high} infiltrent l'épiderme et donnent naissance a des cellules qui ont les caractéristiques des cellules de Langerhans (Ginhoux et al., 2006).

Dans l'athérosclérose, les DCs aortiques CD11c+ peuvent être divisées en deux sous-populations majeures ; les DCs CD11b^{+}CD103^{-}F4/80^{+} et les DCs CD11b^{-}CD103^{+}F4/80^{-} (Zhu et al., 2009). Il est admis que la première sous-population CD11b^{+}CD103^{-} dérive des monocytes alors que la sous-population CD11b^{-}CD103^{+} dérive des CDP sans intermédiaire monocytaire. La déplétion du Flt3 chez les souris LDLr$^{-/-}$ conduit à l'ablation sélective des DCs CD103^{+} et aggrave l'athérogenèse (Choi et al., 2011). Ce qui suggère que les cellules dendritiques dérivées des monocytes sont pro-athérogènes, contrairement aux DCs classiques qui sont antiathérogènes.
Ces données suggèrent que la relation complexe entre les différents sous-types et leur contribution à la médiation de la pathologie reste encore à définir (Figure 16).

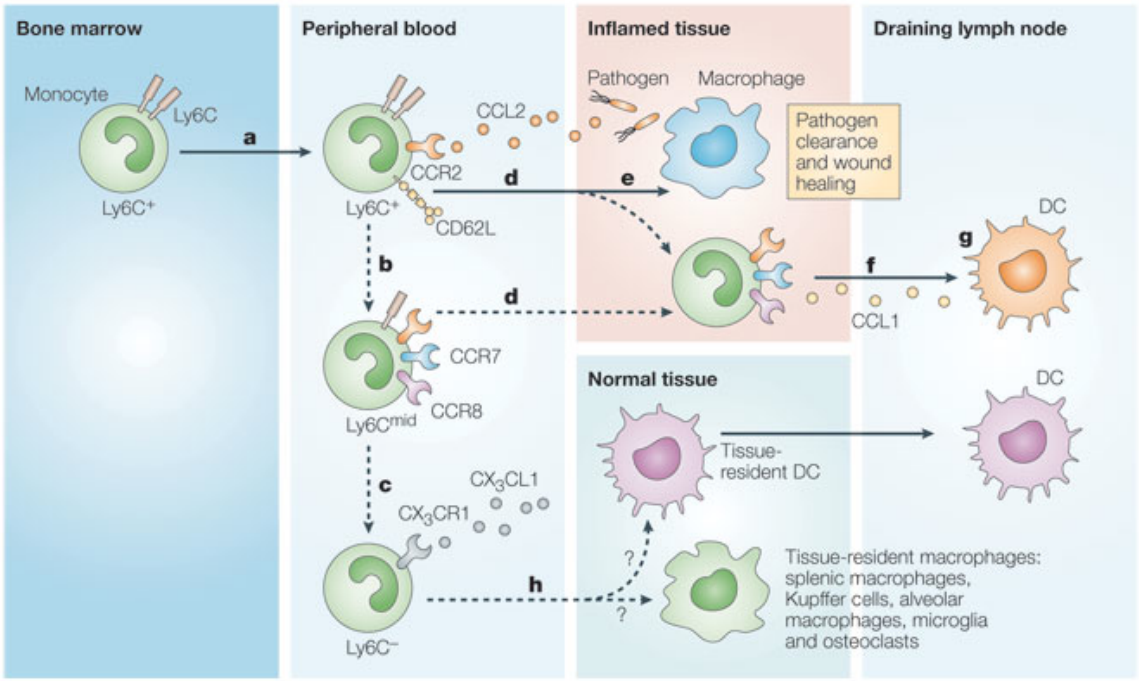


Figure 16 : Différenciation et fonction des sous-types monocytaires chez la souris.

D'après (Gordon and Taylor, 2005).

C. Trafic des monocytes et leurs rôles dans l'inflammation

1. Origine médullaire et réservoir splénique

De nombreux auteurs se sont intéressés à la localisation d'où les monocytes proviennent. Pendant plusieurs années, on a pensé que les monocytes étaient exclusivement générés et stockés dans la MO (van Furth and Cohn, 1968). Bien que ce paradigme ait été supporté par de nombreuses études (Auffray et al., 2009b), il a été récemment montré que les monocytes pouvaient également résider dans un réservoir splénique, en grands nombres mais avec le même ratio des sous-types monocytaires que dans le sang (Swirski et al., 2009a). Les monocytes spléniques se regroupent dans la pulpe rouge sous-capsulaire, et sont disctincts des macrophages et cellules dendritiques de la rate. Les monocytes spléniques et sanguins sont identiques morphologiquement et transcriptionnellement. Cependant, contrairement aux monocytes du sang qui nécessitent CCR2 pour entrer dans la circulation (partie décrite dans « trafic monocytaire et chimiokines ») (Serbina and Pamer, 2006, Tsou et al., 2007), la sortie des monocytes splénique est indépendante du CCR2.

Ce réservoir splénique pourrait permettre la mobilisation rapide d'un grand nombre de monocytes dans la circulation pour rejoindre le site d'inflammation et ainsi jouer un rôle crucial dans une réponse inflammatoire aigue (Figure 17) (Swirski et al., 2009a).

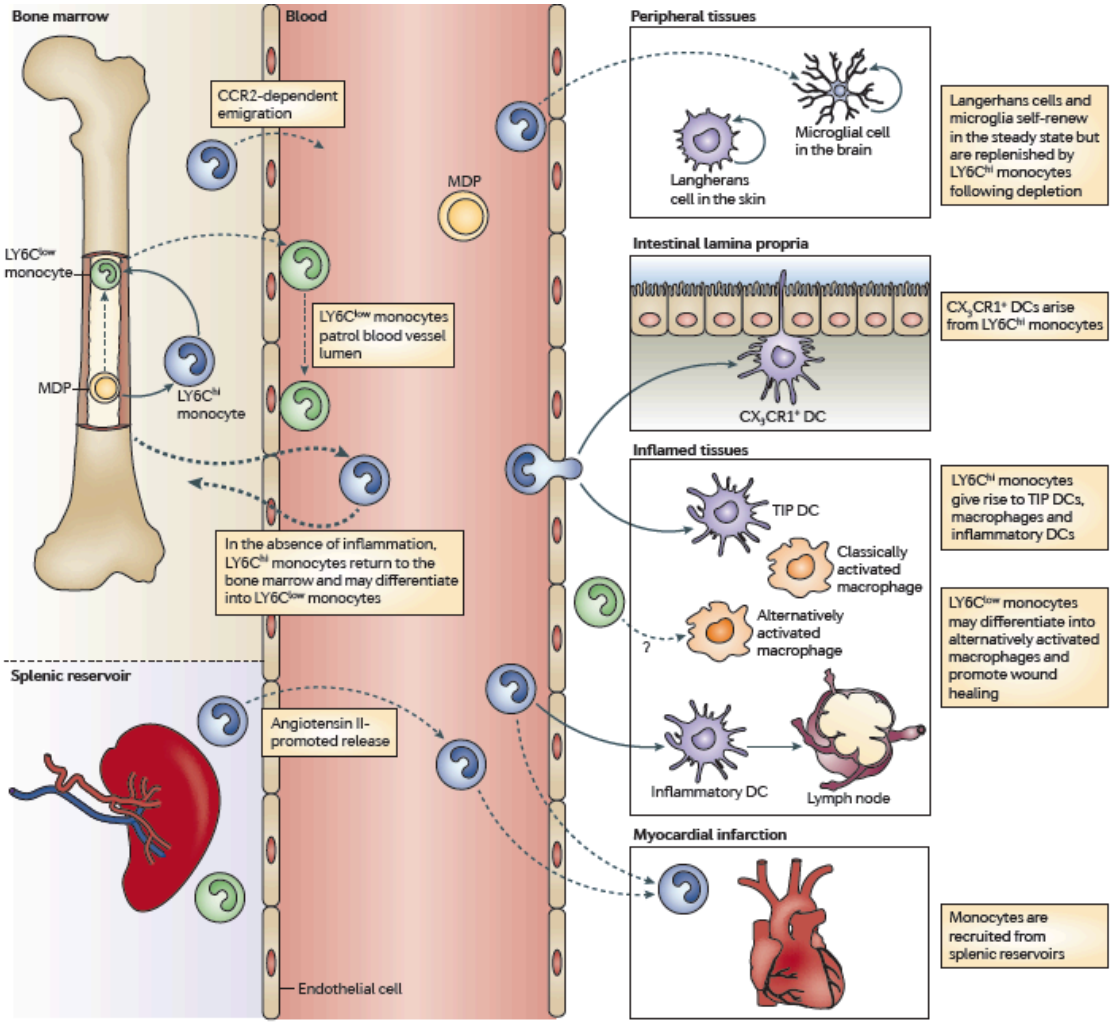


Figure 17 : Le trafic des sous-types monocytaires circulants.

D'après (Shi and Pamer, 2011).

2. Trafic monocytaire et chimiokines

Les chimiokines sont de petites cytokines avec des propriétés chimiotactiques sélectives impliquées dans la coordination de la circulation monocytaire en condition homéostatiques et en cas d'inflammation. Bien qu'ils soient exprimés par différentes cellules hématopoïétiques, les récepteurs aux chimiokines CCR2, CX3CR1 et CCR5 jouent un rôle crucial dans le trafic monocytaire et la survie cellulaire (le cas du CX3CR1 et son ligand CX3CL1), et pourraient conditionner leur recrutement vers les sites d'inflammation.

CCR2 et ses ligands. *Assure l'égression médullaire des monocytes Ly-6C^{high} et leur recrutement.*

Les chimiokines CCL2 et CCL7, également connues sous les noms MCP-1 et MCP-3 respectivement, sont des ligands du CCR2 et jouent un rôle important dans la modulation du recrutement des monocytes Ly-6C^{high} (Tsou et al., 2007). En effet, la déficience en CCR2 réduit significativement le trafic des monocytes Ly-6C^{high} aux sites d'inflammation (Kuziel et al., 1997, Kurihara et al., 1997). CCR2 joue également un rôle dans le trafic des cellules souches hématopoïétiques (HSCs) aux sites d'inflammation chez la souris (Si et al., 2010). Bien que l'expression du CCR2 soit restreinte à quelques types cellulaires, notamment les monocytes, les HSCs et un sous-type de cellules « natural killer » (NK), la grande majorité des cellules nucléées produisent le CCL2 après leur stimulation par des cytokines pro-inflammatoires ou par la stimulation des récepteurs de l'immunité innée par un ensemble de molécules microbiales (Struyf et al., 1998, Tsuboi et al., 2002, Rollins and Pober, 1991, Brown et al., 1994). Plusieurs cas d'inflammation induisent l'expression de CCL2 ce qui résulte en des taux importants de CCL2 dans le sérum et dans les tissus lésés. La production de CCL7 est également induite par les infections bactériennes et contribue au recrutement des monocytes Ly-6C^{high} (Tsou et al., 2007, Jia et al., 2008). La déficience en CCL2 ou en CCL7 réduit le recrutement monocytaire pendant l'infection par *Listeria Monocytogene* d'environ 40-50% (Jia et al., 2008). Cependant les contributions spécifiques de ces deux chimiokines dans le processus de recrutement restent obscures. Deux autres ligands, CCL8 et CCL12, sont capables d'interagir avec le récepteur CCR2, mais la délétion des gènes codant pour ces chimiokines n'a pas eu d'impact palpable sur le trafic monocytaire à l'état basal (Tsou et al., 2007).

L'axe CX3CL1-CX3CR1 : *Participe à la survie et au recrutement des monocytes Ly-6C^{low}.*
De part leur expression du récepteur CX3CR1, les monocytes Ly-6C^{low} répondent à la fractalkine (CX3CL1). La fractalkine est une chimiokine soluble ou liée à la membrane exprimée par plusieurs types cellulaires, notamment les macrophages, les DCs, les CMLs, les cellules endothéliales activées et bien d'autres (Ludwig et al., 2002, Muehlhoefer et al., 2000, Papadopoulos et al., 1999). La déficience en CX3CR1 entraine une diminution du 'crawling' le long des vaisseaux par des monocytes résidents Ly-6C^{low}, et une augmentation du recrutement des monocytes Ly-6C^{high} aux sites spléniques d'infection bactérienne (Auffray et al., 2009a). L'expression du CX3CL1 a été décrite dans la zone marginale de la rate lors d'une infection bactérienne, et serait impliquée dans le recrutement précoce des monocytes Ly-6C^{low} vers la rate. En plus de leur rôle dans le trafic monocytaire, CX3CR1 et son ligand fournissent un signal de survie aux monocytes Ly-6C^{low} à la fois à l'état basal et en cas d'inflammation (Landsman et al., 2009).

CCR1 et CCR5 : *Contribuent probablement au recrutement des monocytes aux sites d'inflammation.*
Les monocytes expriment également les récepteurs CCR1 et CCR5 (Mack et al., 2001, Kaufmann et al., 2001), qui ont des ligands communs ; CCL3 et CCL5, mais ils sont capables de lier d'autres chimiokines. Des études *in vitro* ont montré que ces deux récepteurs ont des rôles distincts dans le recrutement monocytaire (Weber et al., 2001). CCR1 joue un rôle dans l'arrêt des monocytes en présence d'un flux de cisaillement ou 'shear flow', et CCR5 contribue plutôt à la diffusion des monocytes. D'autre part, des études *in vivo* menées sur des souris déficientes en CCR1 ou en CCR5, ont montré que ces récepteurs jouent des rôles non redondants dans le recrutement de cellules inflammatoires (Eis et al., 2004, Broxmeyer et al., 1999, Gao et al., 1997, Gerard et al., 1997, Braunersreuther et al., 2007, Zernecke et al., 2006), avec des conséquences sur le développement et la progression de l'athérosclérose, la sclérose en plaques, et l'arthrite rhumatoide (Charo and Ransohoff, 2006). De plus, d'autres études ont mis en évidence l'implication de ces récepteurs dans le recrutement des monocytes dans différents contextes inflammatoires (Tacke et al., 2007, Mahad et al., 2004). Cependant, l'expression de ces récepteurs par une multitude de types cellulaires complique l'évaluation de leurs rôles dans le recrutement monocytaire, et l'altération du recrutement monocytaire observé chez les souris déficientes en CCR1 ou en CCR5 pourrait être secondaire à un recrutement défectueux d'autres populations cellulaires.

CCR6 et CXCR2

Bien que ces récepteurs soient moins étudiés, des travaux ont suggéré leur implication dans le recrutement monocytaire. *In vitro*, les monocytes circulants expriment très peu le CCR6 (Geissmann et al., 2003), et ne répondent pas à la stimulation par le CCL20 (ligand du CCR6) (Vanbervliet et al., 2002). De façon curieuse, le transfert adoptif de monocytes Ly-6C^{high} rétablit les défauts fonctionnels observés chez la souris CCR6$^{-/-}$ dans des modèles d'immunisation épithéliale et d'infection intradermique (Ravindran et al., 2007, Le Borgne et al., 2006). Les auteurs suggèrent donc un rôle du CCR6 dans la migration et la fonction des monocytes dans les tissus inflammés.

Une étude a décrit l'implication du CXCR2 dans la médiation de l'arrêt monocytaire via son association avec un facteur d'inhibition de migration de macrophages (MIF) (Bernhagen et al., 2007).

3. Techniques d'analyse des comportements migratoires des monocytes *in vivo*

De nombreuses approches ont été adoptées pour caractériser le trafic monocytaire.

- Approche génétique : déplétion de gènes. Cette technique consiste à utiliser des modèles génétiques de souris invalidées pour des gènes codant des chimiokines ou des récepteurs aux chimiokines qui jouent un rôle dans le recrutement ou la survie des monocytes, ou des molécules d'adhésion impliquées dans l'extravasation des monocytes dans les tissus périphériques (Lesnik et al., 2003). Une des limites majeures de cette approche, réside dans le fait que la délétion génique s'éloigne des conditions homéostatiques. Une des techniques permettant de s'affranchir des mécanismes compensatoires générés, est la transplantation de moelle (Hanna et al., 2011).

- Approche génétique : insertion d'un gène rapporteur. Cette technique permet de marquer les monocytes caractérisés par le gène du récepteur aux chimiokines CX3CR1 et CCR2, et de suivre leur circulation dans les différents tissus par l'expression de la GFP (green fluorescent protein) (Jung et al., 2000). Bien qu'elle permette de suivre les monocytes *in vivo*, cette technique présente des limites au niveau de l'expression des récepteurs qui n'est pas limitée aux monocytes, et au

niveau de l'expression de la GFP qui peut augmenter ou diminuer suite à la différenciation cellulaire.

- Transfert adoptif. Consiste à isoler des monocytes à partir d'un modèle murin et de les injecter aux souris en expérimentation (Geissmann et al., 2003). Cependant, très peu de cellules sont retrouvées dans la circulation après l'injection, ce qui ne reflète pas les conditions du trafic monocytaire chez une souris normale. Une autre limitation majeure de cette technique, est que les monocytes sont rapidement différenciables *in vitro*. Leur manipulation expérimentale pourrait donc affecter leurs fonctions effectrices.

- Marquage *in vivo* par microbilles. Le laboratoire du Dr Randolph a développé une technique de « pulse-labeling » permettant de quantifier le recrutement des monocytes Ly-6C^{high} et Ly-6C^{low} dans la plaque d'athérosclérose (Tacke et al., 2006). Cette approche repose sur l'injection de microbilles fluorescentes qui marquent les monocytes qui les ont capturées dans la circulation. Cette technique présente l'avantage de marquer un grand nombre de monocytes *in vivo* en évitant l'utilisation du transfert adoptif de monocytes. Ces billes ne perturbent ni le phénotype, ni la capacité de migration des monocytes. Cette technique permet de marquer de façon distincte l'un ou l'autre des deux types monocytaires en traitant au préalable ou pas la souris avec des liposomes de clodronate (Tacke et al., 2006).

4. Trafic monocytaire à l'état basal

Des études expérimentales ont montré par transfert adoptif que les monocytes circulants CX3CR1^{+} (Ly-6C^{low}) parcourent les vaisseaux en s'associant à l'endothélium vasculaire, infiltrent les tissus sains et peuvent être recrutés aux sites d'inflammation et contribuer à la réparation tissulaire en se différenciant en macrophages alternatifs (M2). Or, les monocytes Ly-6C^{high} quittent la MO de façon dépendante du CCR2 et rejoignent sélectivement les sites d'inflammation où ils peuvent se différencier en DCs productrices de TNFα et d'iNOS, en DCs ou macrophages inflammatoires capables de migrer vers les ganglions. Sous certaines conditions expérimentales, les monocytes Ly-6C^{high} peuvent se différencier en cellules de Langerhans dans la peau, en microglie dans le SNC, et en phagocytes épithéliaux CX3CR1+. En l'absence d'inflammation, certains monocytes Ly-6C^{high} retournent à la MO où ils peuvent

se différencier en monocytes Ly-6C^{low} (Sunderkotter et al., 2004, Varol et al., 2007). Dans les conditions homéostatiques, les tissus périphériques sont riches en cellules dérivants des monocytes circulants, ce qui complique la détection expérimentale de la repopulation des macrophages résidents et des DCs par les monocytes circulants. La déplétion des cellules résidentes par une variété d'approches expérimentales, a été utilisée pour démontrer que sous certaines conditions, les monocytes peuvent donner naissance aux cellules Langerhans dans la peau (Ginhoux et al., 2006), à la microglie dans le SNC (Mildner et al., 2007) et aux phagocytes épithéliaux CX3CR1+ (Bogunovic et al., 2009, Varol et al., 2009). Cependant, cette recolonisation monocytaire suite à la déplétion expérimentale de cellules résidentes ne reflète pas nécessairement le processus naturel qui a lieu pendant le développement des différents tissus ou bien à l'état basal et qui pourrait impliquer des progéniteurs locaux ou myéloïdes distincts des monocytes inflammatoires (Merad et al., 2002, Ginhoux et al., 2010). Néanmoins, la capacité des monocytes de reconstituer des populations distinctes de macrophages ou de DCs suggère un rôle physiologique important de ces cellules suite à un traumatisme tissulaire ou une inflammation.

La rate représente un réservoir pour les monocytes en dehors de la MO. Dans le cas d'une inflammation aigue, comme l'infarctus du myocarde, les monocytes sont mobilisés du réservoir splénique, et les monocytes Ly-6C^{high}, de manière sélective, sont recrutés au niveau du tissu infarci (Swirski et al., 2009a).

5. Recrutement monocytaire aux sites d'infection et d'inflammation

Au delà de leur rôle dans la repopulation des macrophages résidents et des DCs à l'état basal, les monocytes sont recrutés aux sites d'infection bactérienne, protozoaire, fongique ou virale, où ils exercent une activité antimicrobienne directe (Figure 18) (Serbina et al., 2008). Durant l'infection, les monocytes participent à la clairance des microorganismes dans le sang et peuvent rejoindre les ganglions et promouvoir les réponses immunitaires adaptatives. Des études expérimentales de modèles infectieux chez la souris ont fourni de nouvelles perspectives sur les différents mécanismes mobilisant les monocytes aux sites d'infection microbienne. Les monocytes Ly-6C^{low} peuvent être recrutés à ces sites avant les monocytes Ly-6C^{high}, afin de participer à la réponse inflammatoire initiale en produisant du TNFα ainsi que des chimiokines (Auffray et al., 2007). Toutefois, dans la plupart des cas d'infections, le recrutement des monocytes Ly-6C^{high} est prédominant et robuste. Comme peu d'études ont

fourni des analyses comparatives du recrutement des différents sous-types monocytaires, la contribution des Ly-6C^{high} versus les Ly-6C^{low} reste indéterminée.

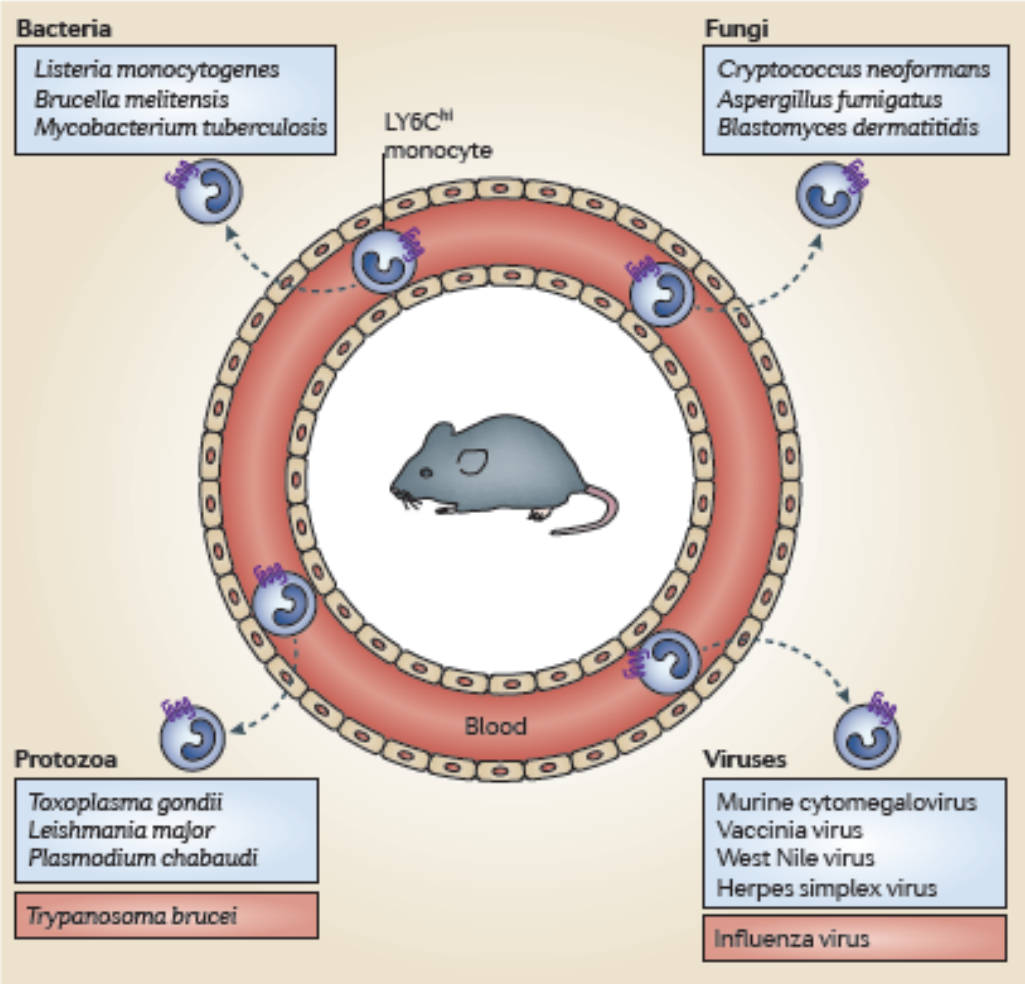


Figure 18 : Recrutement des monocytes Ly-6C^{high} contre des infections bactériennes, parasitaires, fongiques ou virales.

Pour la majorité des pathogènes, le recrutement des monocytes Ly-6C^{high} renforce la résistance à l'infection (encadrés bleus). Toutefois, lors de certaines infections (encadrés rouges), le recrutement de ces monocytes est délétère et aggrave la pathologie. (Shi and Pamer, 2011)

Le recrutement monocytaire est également impliqué dans la pathogenèse de différentes maladies inflammatoires aseptiques. Les études basées sur des modèles animaux de pathologies, en particulier l'athérosclérose et l'infarctus du myocarde, ont largement contribué à nos connaissances sur les mécanismes de recrutement monocytaire dans les pathologies cardiovasculaires. A l'état basal, les proportions des monocytes Ly-6C^{high} et des Ly-6C^{low} sont équivalentes. Dans les modèles murins d'athérosclérose, l'hypercholestérolémie induit une monocytose, préférentiellement des monocytes Ly-6C^{high}, dans la MO, le sang et la rate (Swirski et al., 2007, Tacke et al., 2007). Des travaux récents ont montré que l'hypercholestérolémie induit la prolifération des progéniteurs de cellules souches hématopoïétiques (hematopoietic stem cell progenitors, HSPC) en impliquant la signalisation d'efflux du cholestérol et ses composantes moléculaires centrales telles que ApoE et 'ATP-binding cassette transporters' ABCA1 et ABCG1. Les HSPC sécrètent ApoE qui lie les protéoglycanes à la surface cellulaire et participe à la médiation de l'efflux du cholestérol via ABCA1 et ABCG1 aux HDLs. La déficience en ApoE altère l'efflux du cholestérol, augmente le cholestérol membranaire et l'expression membranaire du récepteur IL-3/GM-CSF (Yvan-Charvet et al., 2010, Murphy et al., 2011). L'IL-3 et le GM-CSF stimulent la prolifération des HSPC dans la MO et la rate et contribue ainsi à la monocytose et à la neutrophilie (Robbins et al., 2012). Bien que l'importance de la voie du cholestérol dans l'athérosclérose soit bien connue (Castrillo and Tontonoz, 2004), ces études mécanistiques récentes ont établi un lien nouveau avec les monocytes.
Les souris déficientes en ApoE développent des lésions larges et complexes sous un régime riche en graisse et en cholestérol.

Inflammation chronique : cas de l'athérosclérose

Les monocytes sont depuis longtemps associés à l'athérosclérose (Woollard and Geissmann, 2010, Weber et al., 2008). Les plaques d'athérosclérose se développent dans les régions artérielles soumises à des flux sanguins bas et/ou oscillatoires. Dans ces zones, la dysfonction endothéliale conduit à l'accumulation de lipoprotéines de basse densité (LDL) qui s'oxydent et initient la mise en place d'une réponse inflammatoire. Les monocytes circulants sont parmi les premiers recrutés dans l'intima inflammatoire (Napoli et al., 1997), en particulier grâce à l'expression de chimiokines vasculaires (Figure 19). Les monocytes subissent d'abord un 'rolling' dépendent des molécules d'adhésion P-sélectine et E-sélectine puis utilisent VCAM1 pour renforcer l'adhésion (Galkina and Ley, 2007). Les monocytes Ly-6C^{high} sont recrutés de

façon dépendante du CCR2, CCR5 et CX3CR1 (Tacke et al., 2007, Saederup et al., 2008, Lesnik et al., 2003), et contribuent au processus inflammatoire en se différenciant en macrophages et en produisant de l'IL-1β, des ROS, et des protéases (Swirski et al., 2007). L'inhibition combinée de CCL2, CCR5 et CX3CR1 abroge le recrutement monocytaire de façon additive, diminue l'accumulation des macrophages dans la plaque et inhibe le développement de l'athérosclérose chez les souris ApoE$^{-/-}$ prédisposées au développement de cette pathologie (Potteaux et al., 2006, Combadiere et al., 2003, Combadiere et al., 2008). Ces résultats suggèrent un rôle délétère des deux sous-types de monocytes dans le développement de l'athérosclérose. Même si les monocytes Ly-6C^{low} infiltrent les lésions athéromateuses dans une moindre mesure, leur recrutement a été moins bien caractérisé. Les souris Nurr77$^{-/-}$ ApoE$^{-/-}$ ainsi que les souris LDLr$^{-/-}$ reconstituées avec une MO Nur77$^{-/-}$, ont moins de monocytes Ly-6C^{low}. Ces souris développent des lésions athéromateuses plus larges avec plus de macrophages exprimant des taux importants de TNFα, de CD36 et de SR-A (Hanna et al., 2012). Ces observations suggèrent que les monocytes Ly-6C^{low} ont une fonction antiathérogène. Toutefois, la déficience en Nur77 augmente également la production de cytokines inflammatoires par les monocytes Ly-6C^{high} et les macrophages (Hanna et al., 2012, Hamers et al., 2012), ce qui complique le jugement de l'importance relative des monocytes Ly-6C^{low} dans l'athérosclérose.

Ainsi, bien que ces monocytes Ly-6C^{low} exhibent des fonctions phagocytaires et pro-angiogéniques et se différencient potentiellement en DCs dans la lésion, leur rôle dans la progression de cette pathologie reste largement inexploré (Swirski et al., 2009b).

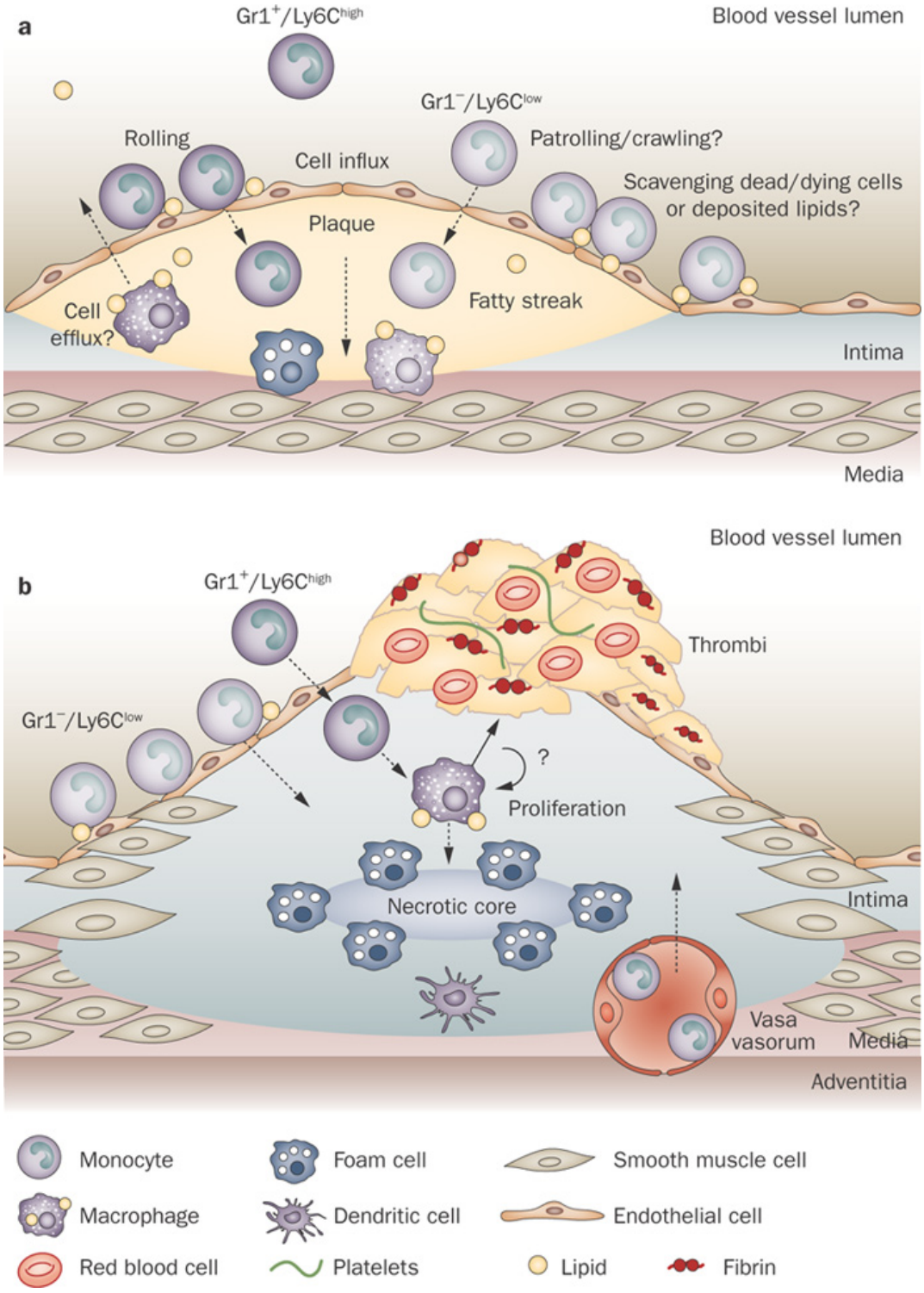


Figure 19 : Les monocytes circulants dans l'athérosclérose.

D'après (Woollard and Geissmann 2010)

Inflammation aigue : cas de l'infarctus du myocarde

L'infarctus du myocarde (IM) induit une réponse inflammatoire aigue, avec un pic initial des monocytes inflammatoires CD16-, suivi par une augmentation des monocytes CD16+ circulants, ce qui soutient un modèle de recrutement monocytaire bi-phasique dans le cœur infarci (Tsujioka et al., 2009). Des différences chronologiques similaires du recrutement des monocytes Ly-6C^{high} et Ly-6C^{low} ont été démontrées dans un modèle murin d'IM (Nahrendorf et al., 2007). Ces observations de Nahrendorf et ses collaborateurs ont décrit un recrutement séquentiel de sous-types monocytaires distincts dans l'IM et ont suggéré leurs rôles différentiels dans l'inflammation qui y est associée (Figure 20).
La première phase, appelée 'inflammatoire', est marquée par un recrutement spécifique des monocytes Ly-6C^{high} au niveau du myocarde infarci pendant les trois premiers jours. Ces monocytes phagocytent les débris et sécrètent des protéases et des cytokines pro-inflammatoires, tel que le TNFα. La seconde phase de résolution débute le quatrième jour avec une prédominance des monocytes Ly-6C^{low} qui affichent des propriétés anti-inflammatoires, sécrètent du VEGF et promeuvent le remodelage et la réparation tissulaires via l'accumulation des myofibroblastes, l'angiogenèse et le dépôt de collagène (Nahrendorf et al., 2007). Ce schéma de recrutement monocytaire bi-phasique est orchestré par une augmentation de l'expression du MCP1 dans l'infarctus dans la première phase, qui attire les monocytes Ly-6C^{high}, puis une augmentation du CX3CL1 dans la seconde phase qui favorise le recrutement des monocytes Ly-6C^{low}. Un recrutement équilibré et coordonné des deux sous-types monocytaires est probablement important dans la réparation tissulaire dans cette pathologie, vu que les souris ApoE$^{-/-}$ avec une monocytose lié à l'athérosclérose ont une altération de la cicatrisation de l'infarctus du myocarde (Panizzi et al., 2010).

D'un autre côté, Arnold et al. ont examiné la cinétique de recrutement et de différenciation des sous-types monocytaires dans la lésion du muscle squelettique (Arnold et al., 2007). Encore une fois, les monocytes Ly-6C^{high} sont les premiers recrutés au niveau du muscle lésé, et affichent un profile inflammatoire par l'expression des gènes TNFα and IL-1β. Toutefois, contrairement à l'étude de Nahrendorf, ce sont les monocytes Ly-6C^{high} recrutés initialement qui se différencient en macrophages Ly-6C^{low} F4/80^{high} lors de la phase de réparation. Ces cellules acquièrent un profile anti-inflammatoire et stimulent la réparation tissulaire, la myogenèse et la croissance des fibres pour restaurer l'intégrité musculaire.

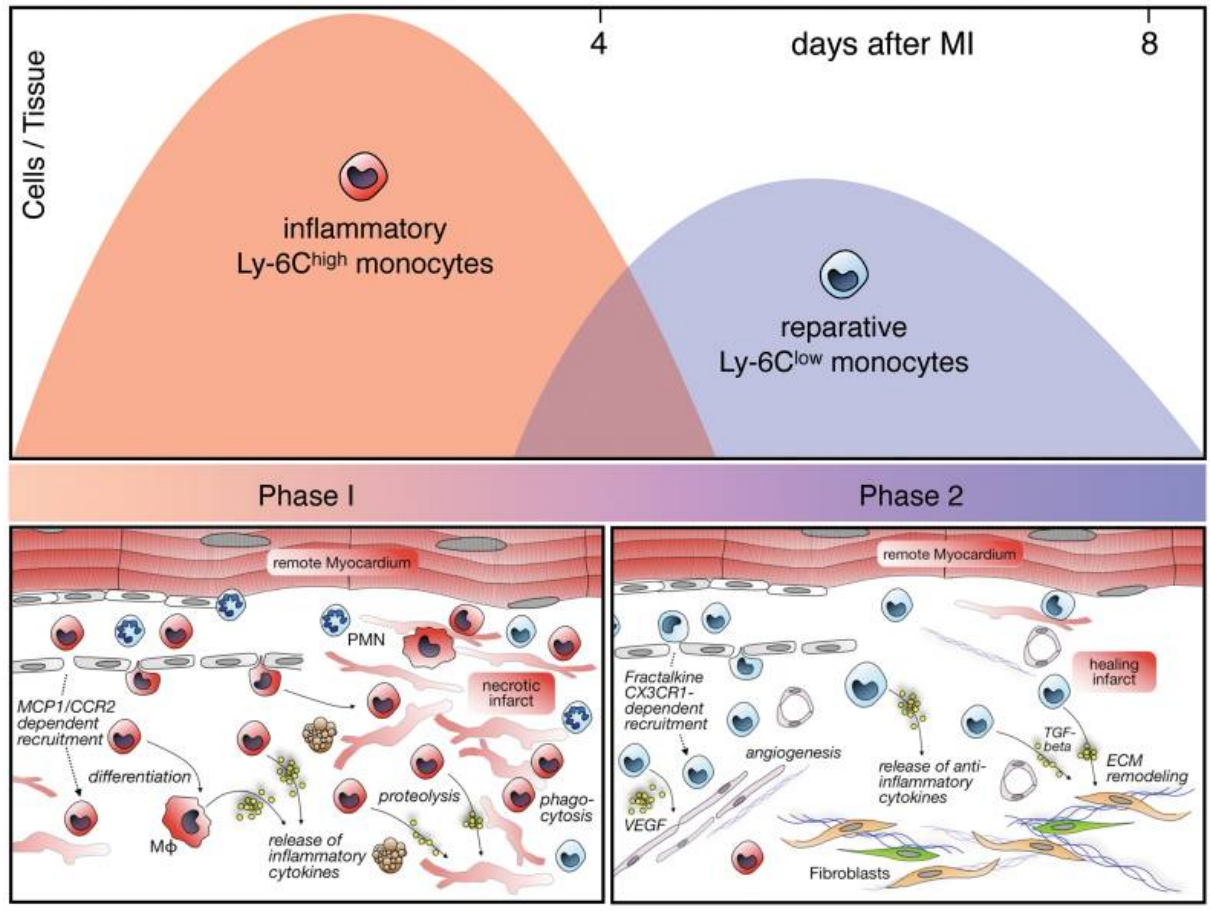


Figure 20 : Les phases de recrutement des sous-populations monocytaires dans un modèle d'infarctus du myocarde.

Phases de recrutement et de différenciation des monocytes Ly-6C^{high} (en haut) et Ly-6C^{low} (en bas) au cours de l'infarctus du myocarde. D'après (Nahrendorf et al., 2010).

Récemment, l'équipe de Nahrendorf qui avait auparavant décrit le recrutement séquentiel des monocytes inflammatoires Ly-6C^{high} et réparateurs Ly-6C^{low} dans le processus de cicatrisation de l'IM, a publié une étude qui soutient les résultats décrits dans le muscle squelettique. Ils suggèrent que l'hétérogénéité des cellules impliquées dans les deux phases pourrait résulter dans le tissu à partir d'un seul sous-type circulant via la différenciation et la polarisation locale des macrophages dérivés. Ainsi, les monocytes Ly-6C^{high} s'accumulent dans l'infarctus, perdent leur expression du Ly-6C et se différencient en macrophages réparateurs via l'activation du facteur de transcription Nur77 (Figure 21) (Hilgendorf et al., 2014).

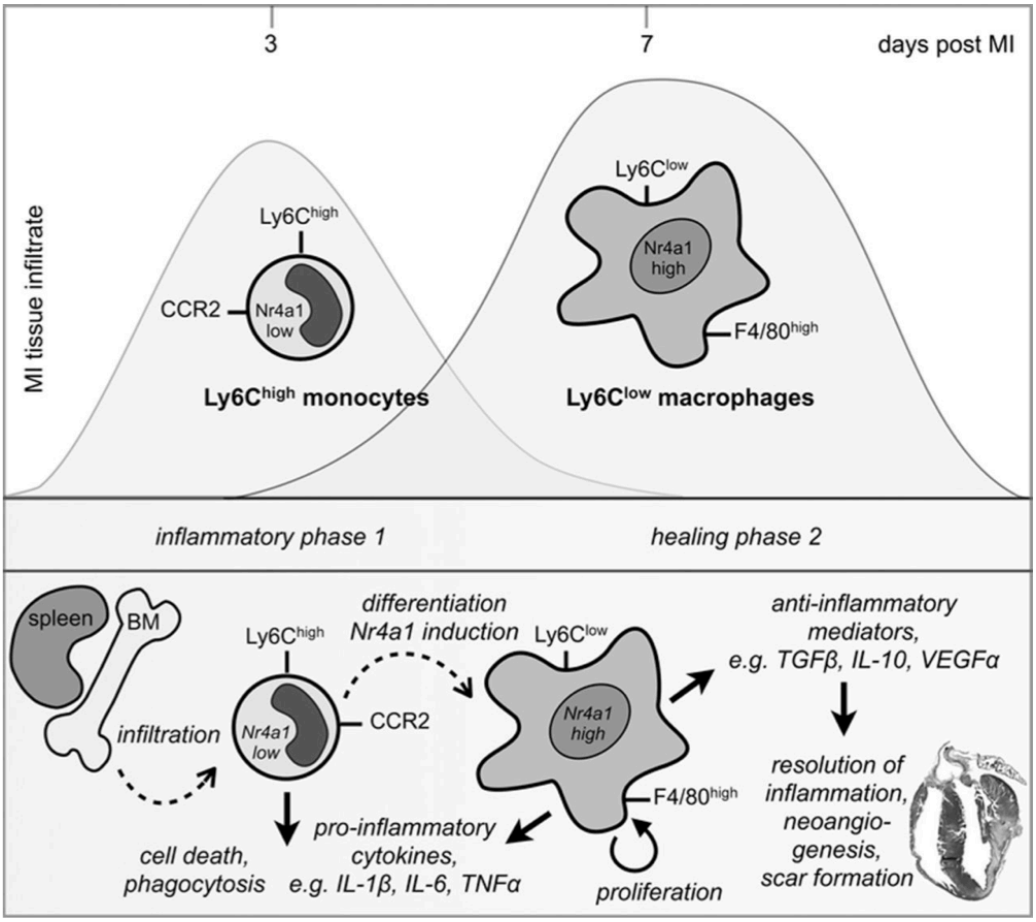


Figure 21 : Modèle bi-phasique de l'accumulation des monocytes/macrophages dans l'IM.

La cicatrisation qui suit l'IM implique une accumulation biphasique de monocytes/macrophages inflammatoires Ly-6C^{high} et réparateurs Ly-6C^{low}. Les monocytes Ly-6C^{high} recutés de façon dépendante du CCR2, perdent l'expression du Ly-6C et se différencient en macrophages réparateurs via Nur77 lors de la phase de résolution. (Hilgendorf et al., 2014).

Les monocytes et l'AAA

Les monocytes jouent un rôle important dans la réponse inflammatoire et ont été impliqués dans le processus de remodelage vasculaire (Golledge et al., 2008) et dans l'expansion anévrismale (Newby, 2008). En effet, plusieurs essais cliniques ont prouvé une efficacité modérée des thérapies par les statines et d'autres anti-inflammatoires dans la prévention de l'expansion des AAA (Hurks et al., 2010, Sweeting et al., 2012). Sur le plan expérimental, la déplétion précoce des monocytes (Wang et al., 2010) ou l'altération de l'expression des enzymes dégradant la MEC dans cette lignée cellulaire, protègent les souris du développement d'anévrisme (Longo et al., 2002, Thompson and Baxter, 1999, Pyo et al., 2000). Golledge et al. ont suggéré que la protection de l'expansion anévrismale observée chez les patients diabétiques serait due à une interaction aberrante entre les monocytes et la MEC (Golledge et al., 2008). Une étude récente a mis en évidence une association entre l'activité monocytaire et le diamètre anévrismal (Samadzadeh et al., 2014). Ils ont montré que les monocytes issus du sang de patients souffrant d'AAA ont une plus grande capacité d'adhésion, de transmigration et de sécrétion de MMP9 *in vitro* par rapport aux contrôles (Figure 22).

L'infiltration des monocytes au niveau de la paroi vasculaire lésée est facilitée par la production *in situ* de chimiokines. MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1), une chimiokine stimulant le recrutement monocytaire via son récepteur CCR2, a été impliquée dans la pathogenèse de plusieurs maladies cardiovasculaires, notamment l'AAA. Une forte expression transcriptionnelle et protéique de MCP-1 a été détectée dans les lésions anévrismales chez l'homme ainsi que dans des modèles animaux (Colonnello et al., 2003, Koch et al., 1993, Spin et al., 2011, Middleton et al., 2007). Le blocage de la signalisation du MCP-1, par invalidation génétique, par siRNA, ou par l'inhibition de son récepteur CCR2, inhibe le développement d'AAA chez la souris (Tieu et al., 2009, Moehle et al., 2011, de Waard et al., 2010). De plus, la restitution de la mobilisation monocytaire à travers l'administration de MCP-1 recombinant à des souris PKC$\delta^{-/-}$, caractérisées par un phénotype résistant à l'anévrisme, a été suffisante pour restaurer une réponse inflammatoire vasculaire et favoriser le développement d'AAA (Morgan et al., 2012).

D'autre part, le rôle de CCR2 a également été mis en évidence dans des modèles expérimentaux d'AAA ainsi que chez l'homme (MacTaggart et al., 2007, de Waard et al.,

2010, Daugherty et al., 2010, Moran et al., 2013, Katrancioglu et al., 2011). En effet, les AAA humains ont été associés à un polymorphisme au niveau du gène CCR2 (Katrancioglu et al., 2011).

En revanche, une étude de Daugherty et al. a montré que la déficience en M-CSF chez les souris op/op n'a pas d'effet significatif sur le développement d'AAA (Babamusta et al., 2006). L'interprétation des résultats de cette étude était toute fois limitée par la faible incidence d'AAA chez les souris ApoE$^{-/-}$, contrairement aux données rapportées précédemment par la même équipe (Daugherty et al., 2000).

Des études supplémentaires sont nécessaires afin de délimiter de façon plus précise le rôle des différents sous-types monocytaires dans la progression anévrismale, et de définir les facteurs monocytaires critiques impliqués dans le remodelage et la destruction tissulaire du vaisseau.

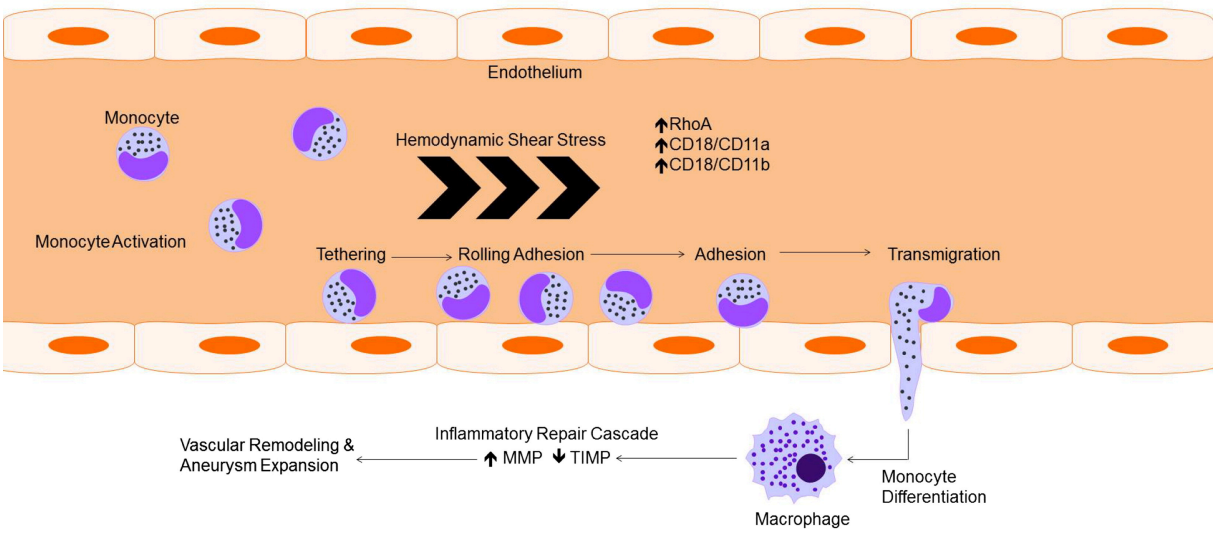


Figure 22 : Modèle d'expansion d'AAA mettant en évidence le rôle des monocytes.

L'up-régulation des molécules d'adhésion (LFA-1 et Mac-1) conduit à l'augmentation d'adhésion et de transmigration des monocytes à travers l'endothélium. L'interaction entre ce dernier et les monocytes résulte en l'augmentation d'expression des MMP9, et la réduction des inhibiteurs de protéases TIMP-4. D'après (Samadzadeh et al., 2014).

Les maladies cardiovasculaires, dont l'AAA qui fait l'objet de notre étude, sont caractérisées par une réponse hautement diversifiée et hétérogène de la population leucocytaire myéloïde dans laquelle les monocytes jouent un rôle primordial. Ces cellules établissent un lien critique entre les sites d'hématopoïèse dans la MO et les tissus périphériques. La découverte des sous-types monocytaires distincts, qui non seulement repeuplent les compartiments des macrophages tissulaires et cellules dendritiques, mais contribuent activement à l'établissement des réponses inflammatoires et participent à la surveillance immune innée de l'organisme, a significativement avancé nos connaissances sur la contribution de ces cellules dans de nombreuses pathologies.

Comment ces cellules façonnent la maladie constitue l'intérêt actuel de plusieurs laboratoires, dont le nôtre. Le but thérapeutique étant de neutraliser les sous-types fonctionnellement distincts qui aggravent la pathologie sans affecter les sous-types protecteurs. Afin d'aboutir à ces résultats, il est nécessaire de conduire des travaux mécanistiques, utilisant des modèles animaux pertinents pour renseigner sur les mécanismes fondamentaux par lesquels les monocytes participent à l'immunité.

OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE

L'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA) est une maladie dégénérative et multifactorielle, sollicitant des processus biologiques et hémodynamiques, mais dont l'étiologie reste partiellement inexpliquée. L'infiltration des cellules inflammatoires dans la partie adventitielle de la paroi aortique est l'une des caractéristiques principales des AAA humains. L'adventice qui normalement ne contient que quelques leucocytes devient hautement infiltré en cellules inflammatoires. Bien que le rôle des lymphocytes, neutrophiles et mastocytes dans l'AAA ait été démontré, le rôle des monocytes est moins connu. En particulier, l'implication spécifique des sous-types monocytaires, ainsi que la cinétique des événements impliqués dans le développement de l'AAA sont quasiment inexplorés.

L'accès à des modèles animaux est un recours précieux, il permet d'explorer différents versants de la physiopathologie. Le modèle murin par perfusion d'Ang II permet d'obtenir entre 14 et 28 jours des AAA. Cette maladie induite expérimentalement partage plusieurs facettes avec la maladie humaine, notamment l'inflammation chronique de la paroi aortique, la production de métalloprotéinases et le remodelage de la MEC, et enfin la rupture. Grâce à ce modèle, ce projet propose une analyse de la migration et du rôle des sous-types monocytaires dans les mécanismes d'inflammation dans l'AAA.

Plusieurs travaux ont mis en évidence l'implication du recrutement monocytaire dans la pathogenèse de plusieurs pathologies inflammatoires. Cependant, peu d'études ont fourni des analyses comparatives et fonctionnelles sur la contribution relative des monocytes Ly-6C^{high} et Ly-6C^{low} dans l'AAA. Le rôle des monocytes dans l'AAA a été suggéré dans un travail récent de l'équipe, où il a été montré que la déplétion ciblée des monocytes suite à des injections répétées de clodronate, induit une diminution significative de l'incidence et des complications liées à la pathologie anévrismale, notamment la mortalité par rupture d'anévrisme. Ainsi, sur la base de ces données, mon travail de thèse tend à caractériser le comportement migratoire ainsi que le rôle des monocytes Ly-6C^{high} et des monocytes Ly-6C^{low} dans la formation de l'AAA induit par perfusion d'Ang II chez la souris ApoE$^{-/-}$.

Résultats

Angiotensin II mobilizes spleen monocytes to promote the development of abdominal aortic aneurysm in *Apoe*$^{-/-}$ mice

Safa Mellak[1], Hafid Ait Oufella[1,2], Bruno Esposito[1], Xavier Loyer[1], Tedder TF[3], Alain Tedgui[1], Ziad Mallat[1,4], Stéphane Potteaux[1]

[1]INSERM UMR-S 970, Paris Cardiovascular Research Center (PARCC), Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; [2]Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Saint-Antoine, Paris, France; [3]Department of Immunology, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, USA.[4]Department of Medicine, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom.

Address correspondence to:
Stéphane Potteaux, INSERM UMR-S 970, Paris Cardiovascular Research Center (PARCC), 56 Rue Leblanc, 75015 Paris, France.

Word count: 6744
Subject codes:
[97] Other Vascular biology
[130] Animal models of human disease

ABSTRACT

***Rationale**:* Abdominal aortic aneurysm (AAA) is widespread among elderly people and results in progressive expansion and rupture of the aorta with high mortality. Macrophages, which are the main population observed within the site of aneurysm, are thought to derive from circulating monocytes although no direct evidence has been provided to date.

Objective: In this study, we were particularly interested in understanding the trafficking behavior of monocyte subsets in AAA and their role in disease pathogenesis.

***Methods and Results**:* Using bone marrow transplantation in *Apoe*$^{-/-}$ mice, we showed that circulating monocytes give rise to abdominal aortic macrophages in hypercholesterolemic mice submitted to Angiotensin II (AngII). Detailed monitoring of monocyte compartmentalization revealed that Ly-6C^{high} and Ly-6C^{low} monocytes transiently increase in blood early after AngII infusion and differentially infiltrate the abdominal aorta. The splenic reservoir accounted for the mobilization of the two monocyte subsets after 3 days of AngII infusion. Spleen removal or lymphocyte deficiency in *Apoe*$^{-/-}$ *Rag2*$^{-/-}$ mice similarly impaired early monocyte increase in blood in response to AngII and protected against AAA development, independently of blood pressure. Reconstitution of *Apoe*$^{-/-}$ *Rag2*$^{-/-}$ mice with total splenocytes but not with B-cell depleted splenocytes restored monocyte mobilization in response to AngII and enhanced susceptibility to AAA.

***Conclusions**:* Taken together, the data show that Ly-6C^{high} and Ly-6C^{low} monocytes are exclusively mobilized from the spleen in response to AngII. Intriguingly, the process is dependent on the presence of B cells and significantly contributes to the development of AAA and the occurrence of aortic rupture.

Keywords:
Monocyte, mobilization, aneurysm, splenectomy, B lymphocytes

Nonstandard Abbreviations and Acronyms:

AAA	abdominal aortic aneurysm
AngII	angiotensin II
Apoe	apolipoprotein E
BM	bone marrow
BSA	bovine serum albumin
CCL	C-C chemokine ligand
CCR	C-C chemokine receptor
CD	cluster of differentiation
CXCR	chemokine (C-X-C motif) receptor
EDTA	Ethylenedinitrilotetraacetic acid
Ly-6C	lymphocyte antigen 6C
MI	myocardial infarction

MMP	matrix metalloproteinase
PBS	phosphate buffered saline
Rag	recombination activation gene
FBS	fetal bovine serum
WT	wild type

INTRODUCTION

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is a common vascular disease of the abdominal aorta, characterized by medial degeneration and various degrees of chronic aortic wall inflammation [1]. Ruptured AAA is one of the leading causes of death among elderly men [2]. No pharmacological treatments for AAA are currently available, and despite the current progress of endovascular or invasive surgical options, tools to predict AAA rupture or delay its progression are still lacking [3].

Inflammation is a key feature of AAA onset as demonstrated by extensive medial and adventitial inflammatory cell infiltration into the vessel wall [4]. In human aneurysmal samples, macrophages are the main population observed in the arterial wall [5]. Macrophages are a major source of proteolytic enzymes such as matrix metalloproteinases that compromise the integrity of the vessel wall by degrading the extracellular matrix [6, 7]. The use of mouse models has highlighted the crucial role of macrophages in AAA. Studies have described early detection of macrophages in the abdominal aorta, and emphasized their active role in AAA development [8]. Although no direct evidence has been provided to date, it has been suggested that macrophages present in the aneurysm wall could derive from circulating monocytes [9]. Monocyte/macrophage depletion using clodronate liposomes as well as genetic or pharmacological inhibition of chemokines involved in monocyte recruitment, including CCR2/CCL2 or CX3CR1, reduced the severity of aneurysm in mice [10-12].

Phenotypic characterization of monocyte subsets has led to the distinction of at least two main subsets with specific migratory behaviors and functions in mice [13, 14]. Studies have unraveled a remarkable multipotency of these cells in diverse inflammatory environments [15-17]. Classical (inflammatory) Ly-6C^{high} monocytes rapidly infiltrate injured tissues and drive chronic inflammation in a CCR2-dependent manner [18, 19]. Non-classical (resident) Ly-6C^{low} monocytes on the other hand, express high levels of CX3CR1 and low levels of CCR2, patrol the endothelium of blood vessels, populate normal or inflammatory sites, and may contribute to wound healing [15, 20-25]. However, in atherosclerosis, Ly-6C^{high} and Ly-6C^{low} monocytes are continuously recruited to the plaque using distinct chemokine receptor axes [26-28], even though Ly-6C^{high} monocyte infiltration dominates over Ly-6C^{low} counterparts and gives rise to a large amount of plaque macrophages [29]. Blockade of monocyte recruitment has been shown to promote plaque regression [30].

Selective mobilization and trafficking patterns of the two monocyte subsets could depend on initial inflammatory triggers. For instance, Ly-6C^{high} and Ly-6C^{low} monocytes are sequentially recruited to the heart, soon after myocardial infarction. Although monocytes

are mainly mobilized from the bone marrow, recent studies have shed light on alternative mechanisms by which monocytes are rapidly deployed from the spleen in an angiotensin II-dependent manner [31]. Hence, identifying the mechanisms governing monocyte deployment might help understand their specific roles.

The purpose of this study was to investigate the trafficking pattern of the 2 monocyte subsets in response to angiotensin II (AngII) and identify their role in AAA expansion. Here, we used a mouse model of inflammatory AAA, in which AngII is infused into *Apoe*$^{-/-}$ male mice over a 28-day time course. We show that AngII induces early and transient mobilization of splenic but not bone marrow-derived Ly-6C^{high} and Ly-6C^{low} monocytes. Splenectomy, B-cell depletion or total lymphocyte deficiency impair the mobilization of splenic monocyte subsets and significantly protect from AAA development in mice.

METHODS

For further details, see the online Supplemental Material.

Animals and *in vivo* interventions : 8-12 week-old male C57Bl/6 (WT) from Charles River Laboratories, and *Apoe*$^{-/-}$, *Apoe*$^{-/-}$ *Rag2*$^{-/-}$ maintained on C57Bl/6 in our facility were used. All experiments were approved by the ethical committee of INSERM. CD45.2 WT, and CD45.2 *Apoe*$^{-/-}$ mice were lethally irradiated (2 x 6.5 Gray) and reconstituted with either CD45.1 WT or CD45.1 *Apoe*$^{-/-}$ mice. Aneurysms were induced by implanting subcutaneous pumps (Charles River) delivering AngII.

Monocyte labeling *in vivo*.
Fluorescent microsphere beads (YG, Polysciences) were used to label classical and nonclassical monocytes.

Histology.
Abdominal aortas were embedded in Tissue-Tek O.C.T. coumpound for sectioning and staining.

Flow cytometry.
All antibodies used in the study are listed in the online Supplemental Material. Cells were acquired using a BD LSRII Fortessa flow cytometer and analyzed with FlowJo.

Fluorescent imaging.
Apoe$^{-/-}$ mice were anesthetized and received an injection of a fluorescent in vivo Imaging agent MMPsense 680. Images were acquired using a fluorescence tomographic system FMT 2500.

Blood pressure.
Blood pressure was measured in conscious, male ApoE$^{-/-}$ mice by a tail cuff system (BP-2000 Visitech Systems), before and after treatment with AngII, using methods similar to those described previously [32].

Statistical analysis. Values are expressed as percentage, total numbers or means ± SEM when appropriate. Unpaired t test, nonparametric Mann-Whitney test, χ^2 test for a trend, and Fisher exact tests were applied as required. P-values were considered significant at $p \leq 0.05$.

RESULTS

Angiotensin II and hypercholesterolemia promote monocyte-derived macrophage accumulation in the abdominal aorta of Apoe$^{-/-}$ mice.

We investigated whether macrophages accumulating in the aneurysm wall derived from circulating monocytes. We conducted bone-marrow (BM) transplantation experiments, taking advantage of the congenic markers CD45.1 and CD45.2.
It has been reported that the incidence of experimental AAA is augmented in *Apoe*$^{-/-}$ compared to WT mice after AngII infusion, regardless of the increase in blood pressure [33, 34]. We first examined the effects of AngII and hypercholesterolemia, both in the vascular and the medullar compartments, in triggering macrophage accumulation in AngII-induced AAA. After lethal irradiation, *Apoe*$^{-/-}$ or WT CD45.2 mice were transplanted with *Apoe*$^{-/-}$ or WT CD45.1 BM and left for recovery for 5 weeks. Reconstituted mice were then infused with AngII for 4 weeks to promote macrophage accumulation in the abdominal aorta **(Figure 1A)**. Remarkably, transplantation of *Apoe*$^{-/-}$ BM into WT mice or WT BM into *Apoe*$^{-/-}$ mice led to a significant reduction in the amount of accumulating aortic macrophages **(Figure 1B)** along with a decrease to a similar extent of plasma cholesterol levels **(Figure 1C)** when compared to *Apoe*$^{-/-}$ mice transplanted with *Apoe*$^{-/-}$ BM. Blood pressure was similar in all groups (data not shown). Collectively, these findings point to an important role of hypercholesterolemia to induce maximal macrophage accumulation in the abdominal aorta in response to AngII infusion.
Then, using the CD45.1 and CD45.2 markers, we analyzed in each condition whether accumulating macrophages derived from circulating monocytes. Chimerism in blood, bone marrow and spleen was controlled at the end of experiment and showed that less than 5% of circulating leukocytes were of CD45.2 origin, confirming an optimal reconstitution by CD45.1 donor-derived hematopoietic cells. Flow cytometry analysis revealed that in the three groups, independently of the experimental condition, more than 95% of the accumulating leukocytes in the abdominal aorta presented a CD45.1 medullar-associated signature **(Figure 1D)**. Similarities in blood and aortic chimerism indicated that macrophages within the abdominal aorta derived from circulating monocytes (**Supplemental fig I).**

Angiotensin II-mediated transient increase in peripheral Ly-6C^{high} and Ly-6C^{low} monocytes predicts AAA incidence.

Since our previous finding showed that AngII triggers accumulation of monocytes in the abdominal aorta in the context of AAA, we investigated the modulation of monocyte subset levels in blood in response to AngII infusion. We profiled both monocyte subsets in the blood over 28 days of AngII treatment by flow cytometry **(Figure 2A).** Ly-6C^{high} monocytes peaked at day 3 and waned by days 7 and 9 when compared to control mice infused with PBS. Ly-6C^{low} monocyte levels also increased after 3 days of AngII but reached statistical significance only at day 7 **(Figure 2B)**. Monocyte subsets decreased back to the PBS level after 28 days of AngII **(supplemental figure II),** showing that early mobilization of monocyte subsets is transient and may account for early aortic macrophage accumulation during AngII delivery.
Despite controlled experimental conditions, the heterogeneity in AAA lesion development reported previously [35] and observed in our hands, prompted us to evaluate

whether changes in blood monocyte levels could be an indicator of later aneurysm formation **(Figure 2C).** In another set of experiments, we found that in mice that did not develop AAA, monocyte levels remained stable over the course of the experiment. Interestingly however, mice that developed aneurysm after 28 days of AngII showed a significant early and transient increase of Ly-6C^{high} and Ly-6C^{low} monocytes **(Figure 2D).**

Ly-6C^{high} monocyte recruitment in abdominal aorta dominates over Ly-6C^{low} monocytes during the early phase of AAA.

The recruitment process of Ly-6C^{high} and Ly-6C^{low} monocytes to an inflamed tissue occurs in part through CCR2 and CX3CR1, respectively [13, 36].
To verify whether early monocyte subset mobilization is followed by their infiltration into the aortic wall of the abdominal aorta, we quantified CCR2 and CX3CR1 expression in aortic cryosections after PBS or at day 3 and 7 of AngII infusion. Both chemokine receptors were barely detectable under PBS infusion, illustrating the very low level of monocyte accumulation in the abdominal aorta in baseline conditions. In contrast, after AngII infusion, CCR2 staining showed a peak of accumulation at day 3 that decreased by day 7. CX3CR1 staining started to increase also at day 3 and peaked at day 7 **(Figure 3A)**. These observations mirror the observed increase of monocyte subsets in blood and support our finding that both monocyte subsets enter the abdominal aorta at an early time point.
We next quantified monocyte subset recruitment to the abdominal aorta. To this end, we adapted a bead-labeling technique previously developed to label and quantify monocyte trafficking in the atherosclerotic plaque [30]. We first controlled the suitability of this technique to our model by verifying that passive infiltration of beads was low **(supplemental figure III)**. We then labeled Ly-6C^{high} and Ly-6C^{low} monocytes separately in two sets of experiments, and quantified their recruitment in the abdominal aorta by immunofluorescence. Bead injection preferentially labels Ly-6C^{low} over Ly-6C^{high} monocytes. Specific labeling of Ly-6C^{high} monocytes requires pre-treatment with clodronate liposomes [37]. Compared to PBS, AngII infusion induced 5-fold increase of Ly-6C^{high} classical monocyte recruitment at day 3, and 2-fold increase in Ly-6C^{low} non-classical monocytes at day 7 **(Figure 3B)**. Taken together, our data show that Ly-6C^{high} classical monocyte accumulation dominates within the first week of AngII delivery. Early accumulation of monocytes in the aortic wall was accompanied by an increase in local protease activity, suggesting their contribution to extra-cellular matrix degradation **(Figure 3C)**..

Angiotensin II promotes Ly-6C^{high} and Ly-6C^{low} monocyte mobilization from the spleen, and splenectomy protects against AAA development.

To evaluate the contribution of the spleen versus BM to the pool of infiltrating blood monocyte subsets following AAA induction, we infused mice with PBS or AngII for 3, 7 or 9 days. Remarkably, the increase of blood Ly-6C^{high} classical monocytes at day 3 was mirrored by their decrease in the spleen and no significant change in the BM. The decrease of Ly-6C^{high} monocytes in the splenic compartment was sustained at day 7. Ly-6C^{low} monocytes significantly decreased in the spleen at day 3 of AngII infusion but not

at a later time point **(Figure 4A, B)**. Thus, the increase of circulating Ly-6C^{high} and Ly-6C^{low} monocytes at day 3 most likely resulted from their splenic release. These results indicate that both Ly6C^{high} and Ly6C^{low} monocytes are mobilized from the spleen as an early response to AngII.
As the spleen appeared to be highly and rapidly responsive to AngII, we wondered whether monocyte release resulted from a mechanical contraction of the spleen in our model. We then administrated a bolus (10 μg) of AngII to WT mice and analyzed if monocyte subsets had migrated out of the spleen by checking their numbers in the blood and spleen 1-hour later.
We found that neither blood nor spleen had changed their monocyte content after the AngII bolus, indicating that the spleen does not release monocytes as a rapid mechanical response to AngII, **(supplemental figure IV).**

Based on our assumption that the spleen provides the pool of monocyte subsets that initiates AAA formation, we hypothesized that splenectomy prior to AngII delivery would inhibit early monocyte subset mobilization into the blood and protect against AAA. Splenectomized or sham-operated mice were infused with AngII for up to 28 days with constant blood monitoring and AAA evaluation at sacrifice. As reported previously by others [38], we noted an increase of blood monocytes rapidly after splenectomy that returned to normal levels over the weeks (data not shown). Due to this effect, we normalized circulating monocyte levels to the baseline levels monitored before AngII infusion, for each single mouse and in all splenectomy experiments. As expected, sham mice infused with AngII developed severe stages of aneurysm. In contrast, splenectomized mice were significantly protected from AAA formation **(Figure 4C).** Splenectomy-mediated protection from AngII-induced AAA was not dependent on blood pressure levels **(Supplemental figure V).**

Blood monitoring of these mice demonstrated that splenectomy significantly reduced AngII-mediated increase of Ly-6C^{high} monocytes in blood at day 3, with a tendancy towards Ly-6C^{low} monocyte decrease **(Figure 4D).** Analysis of total cholesterol did not show any difference between splenectomized mice and their sham counterparts (data not shown). Altogether, these data indicate the splenic monocyte reservoir is mobilized after AngII infusion and contributes to AAA pathogenesis.

Lymphocyte deficiency limits AngII-mediated Ly-6C^{high} and Ly-6C^{low} monocyte mobilization from the spleen and protects against AAA formation.

We next investigated whether lymphocytes are involved in early splenic mobilization of Ly-6C^{high} and Ly-6C^{low} monocytes. We compared monocyte mobilization profiles in *Apoe*$^{-/-}$ and *Apoe*$^{-/-}$ *Rag2*$^{-/-}$ mice in blood and spleen after 3 days of AngII infusion, each adjusted to their baseline level. Interestingly, absence of T and B lymphocytes impaired the expected increase of both Ly-6C^{high} and -6C^{low} monocyte levels in the blood at day 3 of AngII delivery, when compared to control immunocompetent *Apoe*$^{-/-}$ mice **(Figure 5A).** Inverse observations were noted in the spleen at day 3. The expected decrease in the

spleen of both Ly-6C^{high} and -6C^{low} monocytes observed in *Apoe*$^{-/-}$ mice, was abrogated in *Apoe*$^{-/-}$ *Rag2*$^{-/-}$ **(Figure 5B).** This indicates that lymphocyte deficiency recapitulates our findings on monocyte subset trafficking in splenectomized mice treated with Ang II. By 28 days of AngII treatment, *Apoe*$^{-/-}$ *Rag2*$^{-/-}$ mice showed significant protection from AAA development, which may be explained by a default in early Ly-6C^{high} and Ly-6C^{low} monocyte mobilization from the spleen **(Figure 5C).** We did not note any difference in cholesterol levels or blood pressure between *Apoe*$^{-/-}$ and *Apoe*$^{-/-}$ *Rag2*$^{-/-}$ mice (data not shown). These findings demonstrate that T/B lymphocytes are involved in AngII-mediated monocyte subset mobilization from the spleen and contribute to AAA pathogenesis.

Because B cells have recently been shown to induce migration of classical monocytes to the infarcted myocardium[39], we decided next to decipher the role of B and T lymphocytes in monocyte subset mobilization from the spleen. We specifically depleted either B or T cells in immunocompetent *Apoe*$^{-/-}$ mice. After an intravenous injection of depleting anti-CD4/CD8, anti-CD20 or control isotype antibodies, mice were left for 4 days to complete efficient depletion (data not shown) [40-42], and were then infused with AngII for 3 days. Flow cytometry analysis of monocyte levels at day 3 revealed that B-cell depleted mice had significantly less circulating Ly-6C^{high} and Ly-6C^{low} monocytes than the T-cell depleted or control groups, indicating an impairment of mobilization of both monocyte subsets in the absence of B cells after AngII delivery **(Figure 5D).** Collectively, our data show that B but not T-cell total depletion recapitulates findings after spleen removal or total lymphocyte deficiency, leading us to hypothesize that B cells are responsible for monocyte trafficking after AngII infusion.

Splenic B-cell depletion prevents early mobilization of Ly-6C^{high} and Ly-6C^{low} and protects against AAA formation.

In order to specifically analyze the role of splenic B cells during AngII-mediated monocyte mobilization, we transferred total (isotype Ctr) or B-cell depleted splenocytes (anti-CD20) from *Apoe*$^{-/-}$ mice into recipient immunodeficient *Apoe*$^{-/-}$ *Rag2*$^{-/-}$ mice.

After 2 weeks of recovery, mice were infused with AngII for 14 days **(Figure 6A).** Flow cytometry analysis showed that both Ly-6C^{high} and Ly-6C^{low} monocyte levels increased at day 3 in *Apoe*$^{-/-}$ *Rag2*$^{-/-}$ mice reconstituted with total *Apoe*$^{-/-}$ splenocytes, as observed previously in *Apoe*$^{-/-}$ mice, then returned to baseline at day 10 **(Figure 6B).** However, *Apoe*$^{-/-}$ *Rag2*$^{-/-}$ mice reconstituted with B-depleted splenocytes failed to mobilize both monocyte subsets at day 3, confirming the role of B lymphocytes in monocyte mobilization. Analysis of total cholesterol levels showed no difference between the two groups (data not shown).

The group reconstituted with total splenocytes not only regained monocyte mobilization at day 3 but also showed increase vascular MMP activity (**Figure 6C**) and enhanced susceptibility to AAA in comparison with the group that received B cell-depleted splenocytes **(Figure 6D)**. Thus, splenic B lymphocytes promote rapid and transient monocyte mobilization from the splenic reservoir in response to AngII delivery and participate to AAA development in *Apoe*$^{-/-}$ mice.

DISCUSSION

Monocyte trafficking in the setting of cardiovascular diseases has garnered considerable recent attention as more and more studies suggested new roles for distinct monocyte subsets in disease development and progression [27, 29, 43-46]. In AAA, the presence of inflammatory infiltrates, and particularly monocytes/macrophages, has underscored the contribution and importance of immuno-inflammatory responses in aneurysmal degeneration. Monocyte migration in response to AngII has been widely investigated through *in vitro* and *in vivo* experiments [23, 31, 39, 47], but no studies had examined the trafficking and recruitment of the monocyte subsets in the context of AAA. In this study, we described for the first time the trafficking pattern of both Ly-6C^{high} and Ly-6C^{low} monocytes during AngII-induced AAA formation in *Apoe*$^{-/-}$ mice. We found that (i) AngII drives Ly-6C^{high} and Ly-6C^{low} monocyte mobilization from the spleen and recruitment to the abdominal aorta, (ii) splenectomy or B-cell depletion abrogate both monocyte subset mobilization and protect from AAA development (iii) reconstitution of lymphocyte-deficient mice with total splenocytes but not with B-cell depleted splenocytes restores monocyte subset mobilization and susceptibility to AAA.

Our data demonstrated that continuous infusion of AngII drives macrophage accumulation in the abdominal aorta in hypercholesterolemic mice through the recruitment of circulating monocytes. This is in agreement with findings reported previously [9, 33], showing that AngII infusion promoted AAA formation in parallel with the accumulation of macrophages in the abdominal aorta of *Apoe*$^{-/-}$ mice, independently of blood pressure levels [34]. Using BM transplantation experiments and CD45.1/.2 congenic markers, our findings rule out the possibility that macrophage accumulation results from the proliferation of resident progenitors. However, other investigators [48, 49] have reported that either BM-derived or local progenitor cells may represent local vascular sources of inflammatory cells. Athough the contribution of these cells to vascular remodeling and AAA formation remains unclear, we do not exclude a role for local proliferation of the recruited monocytes or other BM-derived cells.

In line with a previous study in the context of MI showing the exit of both monocyte subsets from the spleen in response to AngII [31], we observed at day 3 a simultaneous increase of both Ly-6C^{high} and Ly-6C^{low} monocytes in the blood along with their decrease in the spleen, suggesting that they were mobilized from the splenic reservoir. Ly-6C^{low} monocytes reached their peak level in the blood at day 7 post AngII without a further decrease in the spleen, which could be accounted for by the conversion of Ly-6C^{high} monocytes into Ly-6C^{low} monocytes [50-52]. It is also possible that Ly-6C^{low} monocytes were released from crawling on the vascular endothelium[20], or arised independently from BM [53], although this was not detectable in our analysis.

Differential expression of chemokine receptor profiles has received considerable attention as markers of monocyte subsets. In atherosclerosis and aneurysm, a number of chemokine receptors relevant to monocyte recruitment have been identified including

CCR2 and CX3CR1[43]. In various models of acute inflammation, CCR2 has been shown to drive the early accumulation of Ly-6C^{high} monocytes whereas CX3CR1 has been mostly implicated in trafficking and survival of Ly-6C^{low} monocytes. Based on CCR2 and CX3CR1 expression in the abdominal aorta, we speculated that Ly-6C^{high} monocytes accumulate in the aortic wall at day 3 followed by Ly-6C^{low} monocytes at day 7 despite their initial increase in the blood at day 3. However, the recruitment of circulating Ly-6C^{low} monocytes at day 7 as quantified by the bead labeling technique was minimal. It is therefore unlikely that they contributed significantly to the accumulation of CX3CR1-positive cells in the abdominal aorta. These cells could derive from the differentiation of day 3-mobilized Ly-6C^{high} monocytes into Ly-6C^{low} macrophages as shown in a recent study [25, 54], or from local proliferation. In addition, our fluorescent tomography data showed that early accumulation of monocytes in the aortic wall was accompanied by an increase in the in situ protease activity suggesting a strong contribution of recruited monocytes in disease pathogenesis. Further investigation is required to address the mechanisms by which monocyte subsets contribute to aortic remodeling in the context of AngII-induced AAA.

A growing body of literature indicates that blood monocyte counts correlate with coronary disease development [27, 55]. As it has been shown by others, the number of Ly-6C^{high} monocytes rapidly and dramatically increases in the circulation in response to acute injury or infection [23, 56]. Here, we found that early monocyte increase in the blood predicts the incidence of AAA formation in *Apoe*$^{-/-}$ mice. We also found that this increase is most likely conferred by mobilization from the splenic monocyte reservoir. The removal of the spleen abrogated the initial Ly-6C^{high} mobilization and protected from aneurysm development. Furthermore, we noted that immunodeficient *Apoe*$^{-/-}$ *Rag2*$^{-/-}$ mice infused with AngII showed a significant protection from AAA development and more compellingly, they had a similar abrogation of monocyte mobilization at day 3. We then speculated that the observed effect of lymphocyte absence acted through monocyte mobilization. Only it was still dubious whether it was a B cell or T cell effect. Our results then showed that B cell and not T cell depletion in *Apoe*$^{-/-}$ mice impaired monocyte increase in circulation at day 3. More interestingly, adoptive transfer of total splenocytes but not B-depleted splenocytes into immunodeficient *Apoe*$^{-/-}$ *Rag2*$^{-/-}$ mice restituted early monocyte subset mobilization and restored the susceptibility of these mice to AAA development. These findings recapitulated our observations in the splenectomized and immunodeficient mice, and suggested that B cells were key actors in monocyte mobilization. Although we do not exclude a direct role for B cells in the aneurysmal pathogenesis, which could be the subject of further exploration.

Our findings are in agreement with the recently described role of B lymphocytes in the recruitment of Ly6C^{high} monocytes in the heart and subsequent alteration of cardiac function after myocardial infarction in C57Bl6 mice [39]. This highlights the importance of further research to address the effect of AngII on B cell – monocyte interaction and identify the types of B cells involved in orchestrating AAA inflammation.

In conclusion, this study provides novel mechanistic insights on the early events involved in AngII-induced AAA formation. It highlights the role of the splenic monocyte reservoir

in this process and identifies an intriguing role for B lymphocytes in mediating AngII-induced early and transient mobilization of splenic monocytes. Further understanding of the molecular mechanisms that underlie such interactions is likely to lead to the identification of effective therapeutic targets.

REFERENCES

Biliographie

1. Freestone T, Turner RJ, Coady A, Higman DJ, Greenhalgh RM, Powell JT. Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1995 Aug;15(8):1145-51.
2. Nordon IM, Hinchliffe RJ, Loftus IM, Thompson MM. Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms. Nat Rev Cardiol. 2011 Feb;8(2):92-102.
3. Golledge J, Muller J, Daugherty A, Norman P. Abdominal aortic aneurysm: pathogenesis and implications for management. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006 Dec;26(12):2605-13.
4. Hellenthal FA, Buurman WA, Wodzig WK, Schurink GW. Biomarkers of abdominal aortic aneurysm progression. Part 2: inflammation. Nat Rev Cardiol. 2009 Aug;6(8):543-52.
5. del Porto F, Proietta M, Tritapepe L, Miraldi F, Koverech A, Cardelli P, et al. Inflammation and immune response in acute aortic dissection. Ann Med. 2010 Dec;42(8):622-9.
6. Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. J Clin Invest. 2002 Sep;110(5):625-32.
7. Pyo R, Lee JK, Shipley JM, Curci JA, Mao D, Ziporin SJ, et al. Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. J Clin Invest. 2000 Jun;105(11):1641-9.
8. Tieu BC, Lee C, Sun H, Lejeune W, Recinos A, 3rd, Ju X, et al. An adventitial IL-6/MCP1 amplification loop accelerates macrophage-mediated vascular inflammation leading to aortic dissection in mice. J Clin Invest. 2009 Dec;119(12):3637-51.
9. Ishibashi M, Egashira K, Zhao Q, Hiasa K, Ohtani K, Ihara Y, et al. Bone marrow-derived monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 is critical in angiotensin II-induced acceleration of atherosclerosis and aneurysm formation in hypercholesterolemic mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004 Nov;24(11):e174-8.
10. de Waard V, Bot I, de Jager SC, Talib S, Egashira K, de Vries MR, et al. Systemic MCP1/CCR2 blockade and leukocyte specific MCP1/CCR2 inhibition affect aortic aneurysm formation differently. Atherosclerosis. 2010 Jul;211(1):84-9.

11. Moran CS, Jose RJ, Moxon JV, Roomberg A, Norman PE, Rush C, et al. Everolimus limits aortic aneurysm in the apolipoprotein E-deficient mouse by downregulating C-C chemokine receptor 2 positive monocytes. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013 Apr;33(4):814-21.
12. Wang Y, Ait-Oufella H, Herbin O, Bonnin P, Ramkhelawon B, Taleb S, et al. TGF-beta activity protects against inflammatory aortic aneurysm progression and complications in angiotensin II-infused mice. J Clin Invest. 2010 Feb;120(2):422-32.
13. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. Immunity. 2003 Jul;19(1):71-82.
14. Ingersoll MA, Spanbroek R, Lottaz C, Gautier EL, Frankenberger M, Hoffmann R, et al. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. Blood. 2010 Jan 21;115(3):e10-9.
15. Grainger JR, Wohlfert EA, Fuss IJ, Bouladoux N, Askenase MH, Legrand F, et al. Inflammatory monocytes regulate pathologic responses to commensals during acute gastrointestinal infection. Nat Med. 2013 Jun;19(6):713-21.
16. Peranzoni E, Zilio S, Marigo I, Dolcetti L, Zanovello P, Mandruzzato S, et al. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. Curr Opin Immunol. 2010 Apr;22(2):238-44.
17. Woollard KJ, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. Nat Rev Cardiol. 2010 Feb;7(2):77-86.
18. Boring L, Gosling J, Chensue SW, Kunkel SL, Farese RV, Jr., Broxmeyer HE, et al. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. J Clin Invest. 1997 Nov 15;100(10):2552-61.
19. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. Annu Rev Immunol. 2008;26:421-52.
20. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. Science. 2007 Aug 3;317(5838):666-70.
21. Shi C, Jia T, Mendez-Ferrer S, Hohl TM, Serbina NV, Lipuma L, et al. Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating toll-like receptor ligands. Immunity. 2011 Apr 22;34(4):590-601.
22. Landsman L, Varol C, Jung S. Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung. J Immunol. 2007 Feb 15;178(4):2000-7.
23. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. J Exp Med. 2007 Nov 26;204(12):3037-47.
24. Shechter R, London A, Varol C, Raposo C, Cusimano M, Yovel G, et al. Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. PLoS Med. 2009 Jul;6(7):e1000113.

25. Hilgendorf I, Gerhardt LM, Tan TC, Winter C, Holderried TA, Chousterman BG, et al. Ly-6Chigh Monocytes Depend on Nr4a1 to Balance Both Inflammatory and Reparative Phases in the Infarcted Myocardium. Circ Res. 2014 May 9;114(10):1611-22.
26. Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C, Spanbroek R, Llodra J, et al. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. J Clin Invest. 2007 Jan;117(1):185-94.
27. Combadiere C, Potteaux S, Rodero M, Simon T, Pezard A, Esposito B, et al. Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. Circulation. 2008 Apr 1;117(13):1649-57.
28. Soehnlein O, Drechsler M, Doring Y, Lievens D, Hartwig H, Kemmerich K, et al. Distinct functions of chemokine receptor axes in the atherogenic mobilization and recruitment of classical monocytes. EMBO Mol Med. 2013 Mar;5(3):471-81.
29. Swirski FK, Libby P, Aikawa E, Alcaide P, Luscinskas FW, Weissleder R, et al. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. J Clin Invest. 2007 Jan;117(1):195-205.
30. Potteaux S, Gautier EL, Hutchison SB, van Rooijen N, Rader DJ, Thomas MJ, et al. Suppressed monocyte recruitment drives macrophage removal from atherosclerotic plaques of Apoe$^{-/-}$ mice during disease regression. J Clin Invest. 2011 May;121(5):2025-36.
31. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. Science. 2009 Jul 31;325(5940):612-6.
32. Daugherty A, Rateri D, Hong L, Balakrishnan A. Measuring blood pressure in mice using volume pressure recording, a tail-cuff method. J Vis Exp. 2009(27).
33. Daugherty A, Manning MW, Cassis LA. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. J Clin Invest. 2000 Jun;105(11):1605-12.
34. Cassis LA, Gupte M, Thayer S, Zhang X, Charnigo R, Howatt DA, et al. ANG II infusion promotes abdominal aortic aneurysms independent of increased blood pressure in hypercholesterolemic mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009 May;296(5):H1660-5.
35. Sampson UK, Perati PR, Prins PA, Pham W, Liu Z, Harrell FE, Jr., et al. Quantitative estimates of the variability of in vivo sonographic measurements of the mouse aorta for studies of abdominal aortic aneurysms and related arterial diseases. J Ultrasound Med. 2011 Jun;30(6):773-84.
36. Palframan RT, Jung S, Cheng G, Weninger W, Luo Y, Dorf M, et al. Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. J Exp Med. 2001 Nov 5;194(9):1361-73.
37. Van Rooijen N, Sanders A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. J Immunol Methods. 1994 Sep 14;174(1-2):83-93.

38. Kragballe K, Nielsen JL, Solling J, Ellegaard J. Monocyte cytotoxicity after splenectomy. Scand J Haematol. 1981 Oct;27(4):271-8.
39. Zouggari Y, Ait-Oufella H, Bonnin P, Simon T, Sage AP, Guerin C, et al. B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. Nat Med. 2013 Oct;19(10):1273-80.
40. Bourgeois C, Stockinger B. CD25+CD4+ regulatory T cells and memory T cells prevent lymphopenia-induced proliferation of naive T cells in transient states of lymphopenia. J Immunol. 2006 Oct 1;177(7):4558-66.
41. Uchida J, Lee Y, Hasegawa M, Liang Y, Bradney A, Oliver JA, et al. Mouse CD20 expression and function. Int Immunol. 2004 Jan;16(1):119-29.
42. Ait-Oufella H, Herbin O, Bouaziz JD, Binder CJ, Uyttenhove C, Laurans L, et al. B cell depletion reduces the development of atherosclerosis in mice. J Exp Med. 2010 Aug 2;207(8):1579-87.
43. Gautier EL, Jakubzick C, Randolph GJ. Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009 Oct;29(10):1412-8.
44. Olivares R, Ducimetiere P, Claude JR. Monocyte count: a risk factor for coronary heart disease? Am J Epidemiol. 1993 Jan 1;137(1):49-53.
45. Weber C, Zernecke A, Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. Nat Rev Immunol. 2008 Oct;8(10):802-15.
46. Nasir K, Guallar E, Navas-Acien A, Criqui MH, Lima JA. Relationship of monocyte count and peripheral arterial disease: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 Sep;25(9):1966-71.
47. Kintscher U, Wakino S, Kim S, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. Angiotensin II induces migration and Pyk2/paxillin phosphorylation of human monocytes. Hypertension. 2001 Feb;37(2 Pt 2):587-93.
48. Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. Nat Med. 2002 Apr;8(4):403-9.
49. Psaltis PJ, Harbuzariu A, Delacroix S, Witt TA, Holroyd EW, Spoon DB, et al. Identification of a monocyte-predisposed hierarchy of hematopoietic progenitor cells in the adventitia of postnatal murine aorta. Circulation. 2012 Jan 31;125(4):592-603.
50. Sunderkotter C, Nikolic T, Dillon MJ, Van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA, et al. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. J Immunol. 2004 Apr 1;172(7):4410-7.
51. Varol C, Landsman L, Fogg DK, Greenshtein L, Gildor B, Margalit R, et al. Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. J Exp Med. 2007 Jan 22;204(1):171-80.
52. Tacke F, Ginhoux F, Jakubzick C, van Rooijen N, Merad M, Randolph GJ. Immature monocytes acquire antigens from other cells in the bone marrow and present them to T cells after maturing in the periphery. J Exp Med. 2006 Mar 20;203(3):583-97.

53. Geissmann F, Auffray C, Palframan R, Wirrig C, Ciocca A, Campisi L, et al. Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. Immunol Cell Biol. 2008 Jul;86(5):398-408.
54. Epelman S, Lavine KJ, Beaudin AE, Sojka DK, Carrero JA, Calderon B, et al. Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. Immunity. 2014 Jan 16;40(1):91-104.
55. Chapman CM, Beilby JP, McQuillan BM, Thompson PL, Hung J. Monocyte count, but not C-reactive protein or interleukin-6, is an independent risk marker for subclinical carotid atherosclerosis. Stroke. 2004 Jul;35(7):1619-24.
56. Drevets DA, Dillon MJ, Schawang JS, Van Rooijen N, Ehrchen J, Sunderkotter C, et al. The Ly-6Chigh monocyte subpopulation transports Listeria monocytogenes into the brain during systemic infection of mice. J Immunol. 2004 Apr 1;172(7):4418-24.

SOURCES OF FUNDING
This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (to SP and ZM), and by grants from Région Île-de-France (to SM).

DISCLOSURES
None.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Circulating monocytes give rise to accumulating macrophages in AngII-induced AAA.
A. Experimental design illustrating CD45.2 WT or *Apoe*$^{-/-}$ mice lethal irradiation and reconstitution with either CD45.1 WT or *Apoe*$^{-/-}$ bone marrow cells, and after 5 weeks of recovery, infusion with AngII for 4 weeks. **B.** Flow cytometric analysis of total numbers of F4/80^{+} cells in digested abdominal aortas, 4 weeks post AngII infusion. **C.** Plasma total cholesterol in the different groups.
D. Representative dot plot of flow cytometric analysis of CD45.1 and CD45.2 among CD45^{+} leukocytes in abdominal aortic tissue. Quantification of the percentage of CD45.1 and CD45.2 cells within CD45-positive leukocytes in the abdominal aorta. Results are presented as mean ± SEM, n = 4 to 7 mice per group, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001.

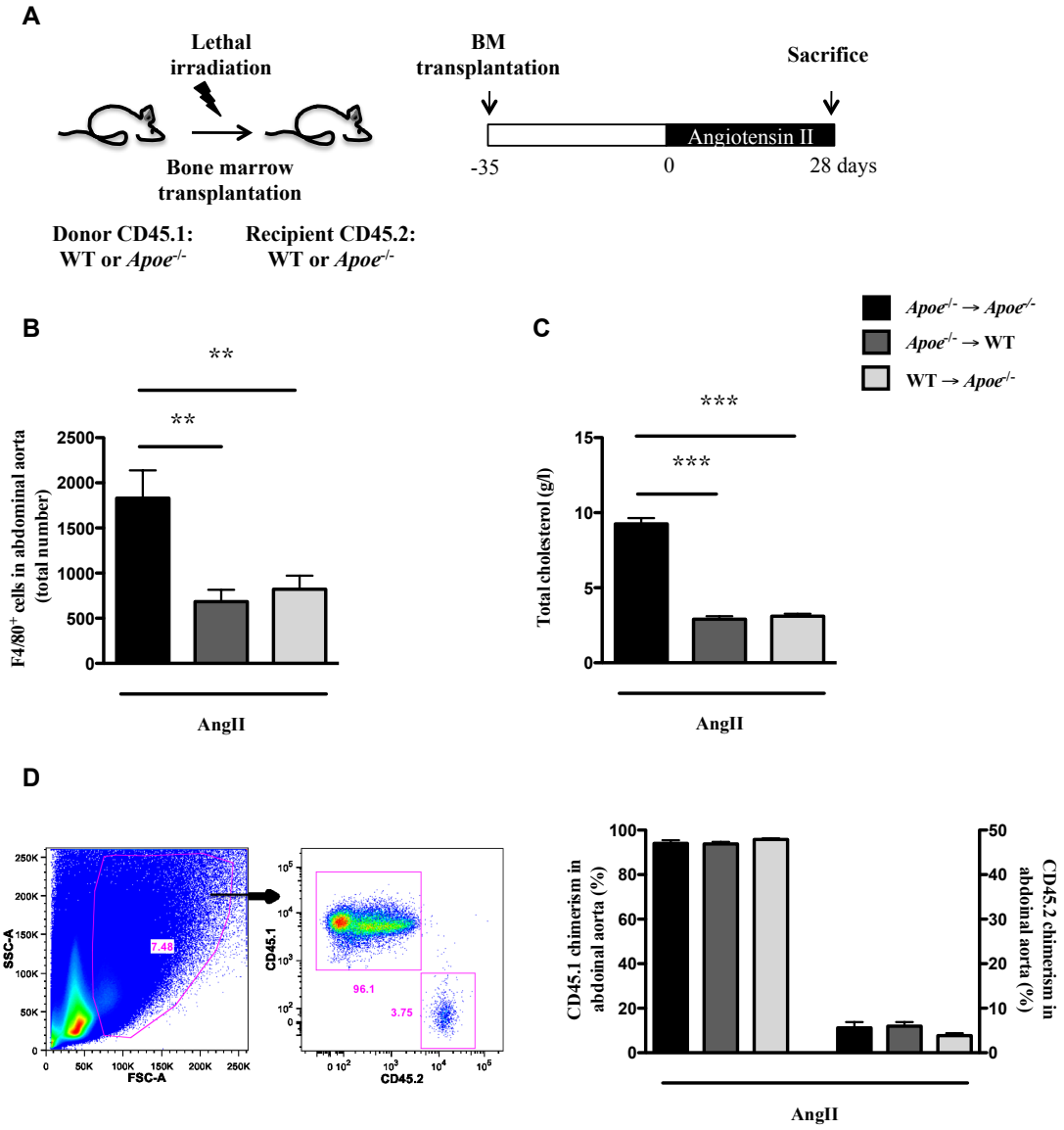
Figure 2 : Circulating Ly-6C^{high} and Ly-6C^{low} monocyte levels in reponse to AngII predict AAA development. A. Flow cytometric gating strategy for peripheral classical (CD115^{+}, Ly-6C^{high}) and nonclassical (CD115^{+}, Ly-6C^{low}) monocytes in *Apoe*$^{-/-}$ mice. **B.** Analysis of Ly-6C^{high} and Ly-6C^{low} circulating monocyte levels in percentage relative to PBS, at days 3, 7 and 9 of AngII infusion. Data are respresentative of 7 to 23 mice per group. **C.** Experimental design relating analysis of blood monocyte levels at different time points using flow cytometry and evaluation of AAA status after 28 days of AngII treatment (presence or absence of AAA). **D.** Total numbers of monocyte subsets analyzed by flow cytometry in mice that did not develop AAA (white) and mice that did (black) at days 3, 7 and 28 of AngII infusion. Results are presented as mean ± SEM. Data are respresentative of 7 to 10 mice per group, *p ≤ 0.05, ***p ≤ 0.001.

Figure 3: Ly-6C^{high} and Ly-6C^{low} monocytes are recruited to the abdominal aorta in response to AngII. A. Representative images and quantitative analysis of CCR2 and CX3CR1 immunofluorescence stainings in abdominal aortic sections after PBS or 3, 7 days of AngII infusion. Data are representative of 3 to 7 mice per group. **B.** Quantification of monocyte recruitment in abdominal aortic sections using fluorescent microbeads detected by fluorescent microscopy. Data are derived from 4 to 10 mice per group. **C.** Quantification of MMP-sense 680 activity in the abdominal aorta after 7 days of treatment, measured by fluorescent tomography. n = 6 mice per group. Results are presented as mean ± SEM, *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01.

Figure 4: Ly-6C^{high} early mobilization is prevented by splenectomy, which protects from AAA development. A. Quantification by flow cytometry of Ly-6C^{high} and **B.** Ly-6C^{low} monocyte percentage in the splenic and medullar compartments normalized to PBS after 3, 7 and 9 days of AngII delivery. Pooled data from three independent experiments. n = 7 to 21 mice per group. **C.** Classification of AAA severity in mice after 28 days of AngII (stage 1 : mild dilation of the abdominal aorta, to stage 4: rupture of the abdominal aorta). **D.** Day 3 / day 0 (n ≥ 22 per group) and day 7 / day 0 (n ≥ 17 per group) ratios of blood monocyte subsets were quantified using flow cytometry in both sham (white) and splenectomized (black) mice. Results are presented as mean ± SEM, *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001.

Figure 5: Ly-6C^{high} and Ly-6C^{low} early mobilization from the spleen is promoted by lymphocytes.
A. Circulating blood monocyte subsets in relative % to baseline *Apoe*$^{-/-}$ (white) as measured by flow cytometry at day 3 of AngII infusion in *Apoe*$^{-/-}$ (black) and *Apoe*$^{-/-}$ *Rag2*$^{-/-}$ (grey) mice. n = 3 to 20 mice per group. **B.** Spleen monocyte subsets in relative percentage to baseline *Apoe*$^{-/-}$, analyzed by flow cytometry at day 3 of AngII infusion in *Apoe*$^{-/-}$ and *Apoe*$^{-/-}$ *Rag2*$^{-/-}$ mice. n = 6 to 7 per group.
C. Classification of AAA stages in *Apoe*$^{-/-}$ and *Apoe*$^{-/-}$ *Rag2*$^{-/-}$ mice. **D.** Day 3 / day 0 percentage ratio of blood monocyte subsets in B-cell depleted mice (α-CD20) and T-cell depleted mice (α-CD4-CD8) normalized to control mice (Ctr). n = 8 to 11 mice per group. Results are expressed as mean ± SEM, *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01.

Figure 6: B-cell depletion prevents from Ly-6C^{high} and Ly-6C^{low} early mobilization and protects against AAA development. A. Experimental design showing collection of total and B-cell depleted splenocytes from *Apoe*$^{-/-}$ mice, which are transferred into *Apoe*$^{-/-}$ *Rag2*$^{-/-}$ mice. After 2 weeks of recovery, the mice were infused with AngII for 14 days. **B.** Flow cytometric analysis of total blood monocyte subset numbers in *Apoe*$^{-/-}$ *Rag2*$^{-/-}$ mice reconstitued with total splenocytes (Ctr reconstituted) or B-cell depleted splenocytes (α-CD20 reconstituted) from *Apoe*$^{-/-}$ mice at day 3 and day 10 after AngII infusion normalized to baseline (before AngII). **C.** Quantification of MMP-sens 680 activity in the abdominal aorta, measured by fluorescent tomography in *Apoe*$^{-/-}$ *Rag2*$^{-/-}$ mice reconsituted with WT total splenocytes (Ctr reconstituted) or B-cell depleted splenocytes (α-CD20 reconstituted). **D.** Classification of AAA stages in *Apoe*$^{-/-}$ *Rag2*$^{-/-}$ mice reconstituted with total splenocytes (Ctr reconstituted) or B-cell depleted splenocytes (α-CD20 reconstituted). n = 4 to 6 mice per group. Results are presented as mean ± SEM, *p ≤ 0,05, **p ≤ 0.01.


A
Lethal irradiation
Bone marrow transplantation
BM transplantation
Sacrifice
Angiotensin II
-35
0
28 days
Donor CD45.1: WT or Apoe-/-
Recipient CD45.2: WT or Apoe-/-
B
F4/80+ cells in abdominal aorta (total number)
AngII
C
Apoe-/- → Apoe-/-
Apoe-/- → WT
WT → Apoe-/-
Total cholesterol (g/l)
AngII
D
SSC-A
FSC-A
7.46
CD45.1
CD45.2
96.1
3.75
CD45.1 chimerism in abdoinal aorta (%)
CD45.2 chimerism in abdoinal aorta (%)
AngII

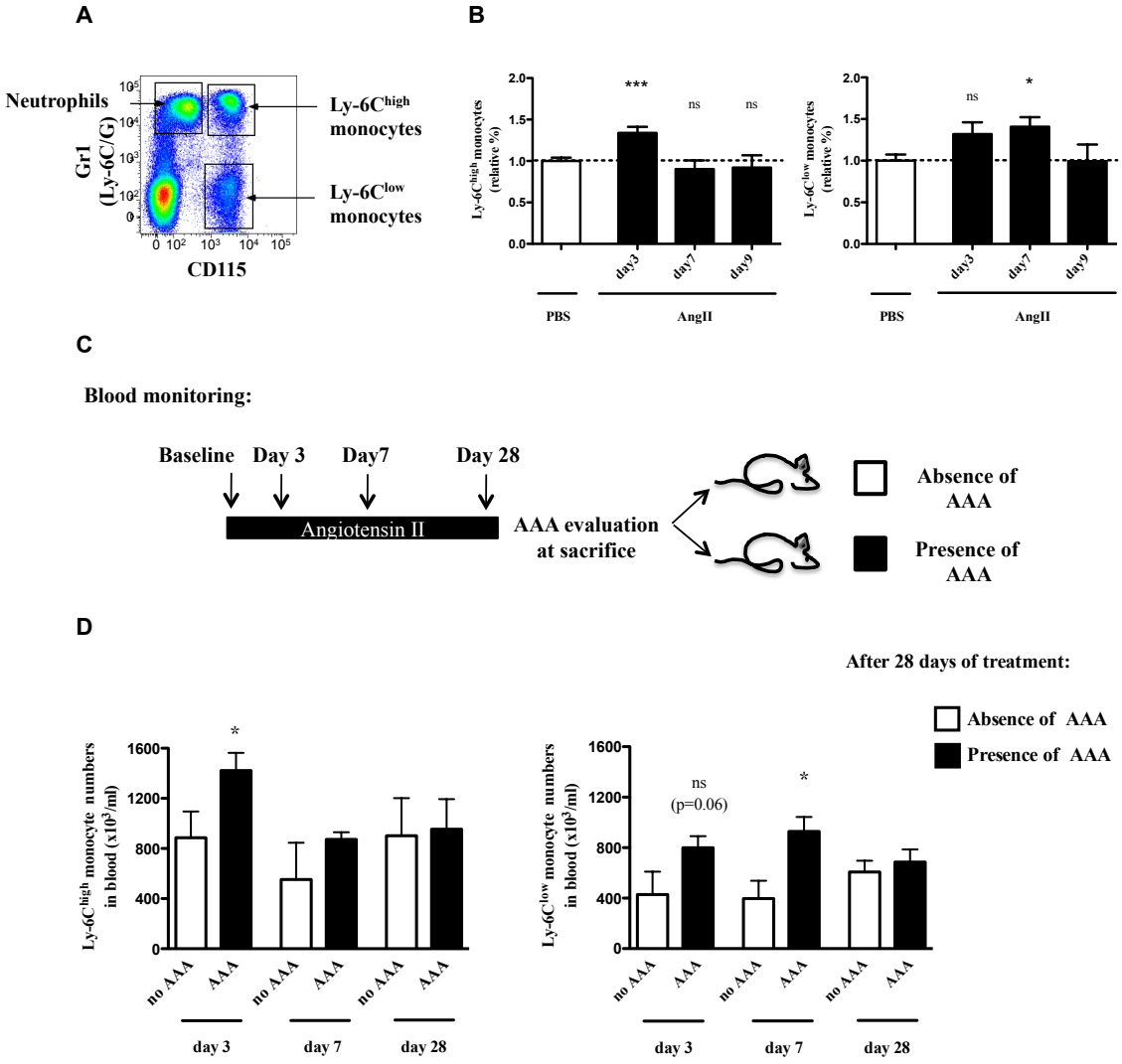

A
Neutrophils
Ly-6C^high monocytes
Ly-6C^low monocytes
Gr1 (Ly-6C/G)
CD115
B
Ly-6C^high monocytes (relative %)
Ly-6C^low monocytes (relative %)
***
ns
ns
*
day3
day7
day9
PBS
AngII
C
Blood monitoring:
Baseline
Day 3
Day7
Day 28
Angiotensin II
AAA evaluation at sacrifice
Absence of AAA
Presence of AAA
D
After 28 days of treatment:
Absence of AAA
Presence of AAA
Ly-6C^high monocyte numbers in blood (x10³/ml)
Ly-6C^low monocyte numbers in blood (x10³/ml)
ns
(p=0.06)
no AAA
AAA
day 3
day 7
day 28

FIGURE 3

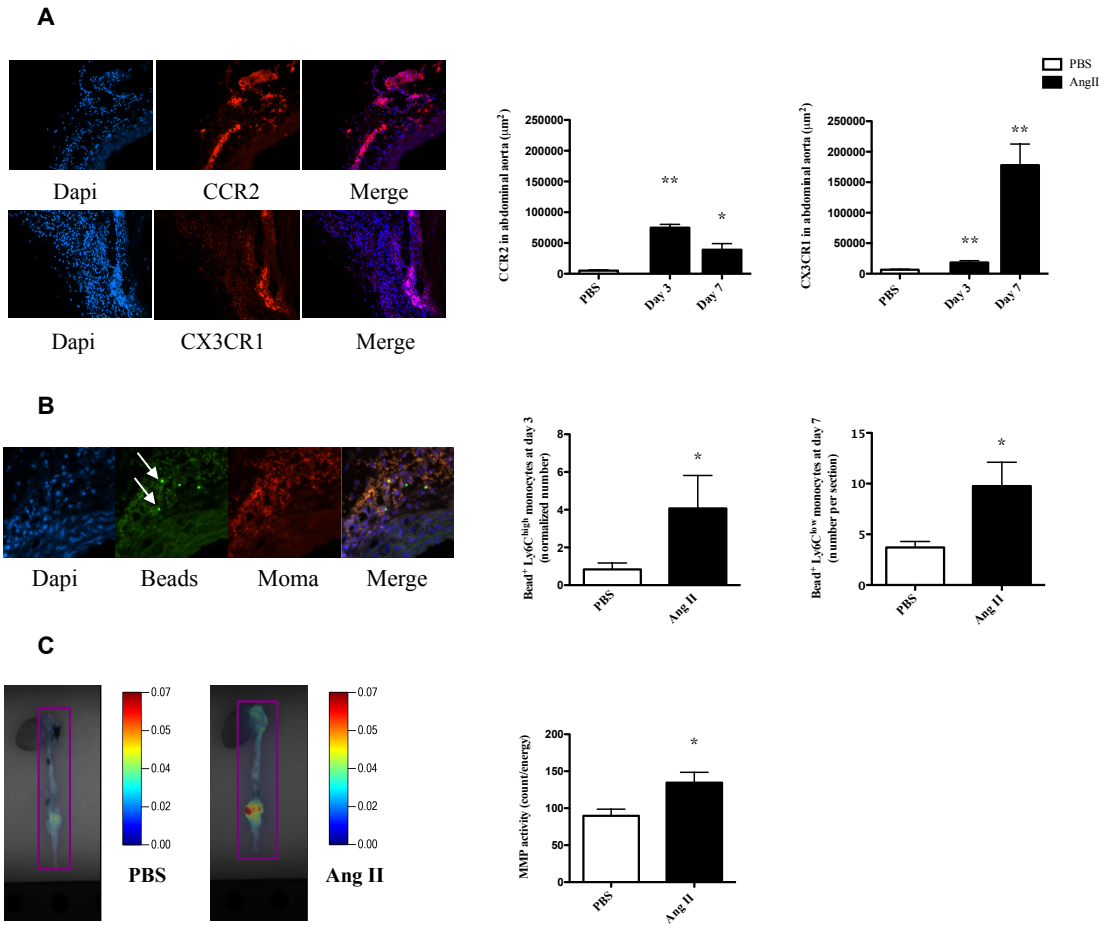

A
Dapi
CCR2
Merge
Dapi
CX3CR1
Merge
PBS
AngII
CCR2 in abdominal aorta (μm²)
CX3CR1 in abdominal aorta (μm²)
PBS
Day 3
Day 7
B
Dapi
Beads
Moma
Merge
Bead⁺ Ly6C^high monocytes at day 3 (normalized number)
Bead⁺ Ly6C^high monocytes at day 7 (number per section)
PBS
Ang II
C
PBS
Ang II
MMP activity (count/energy)

FIGURE 4

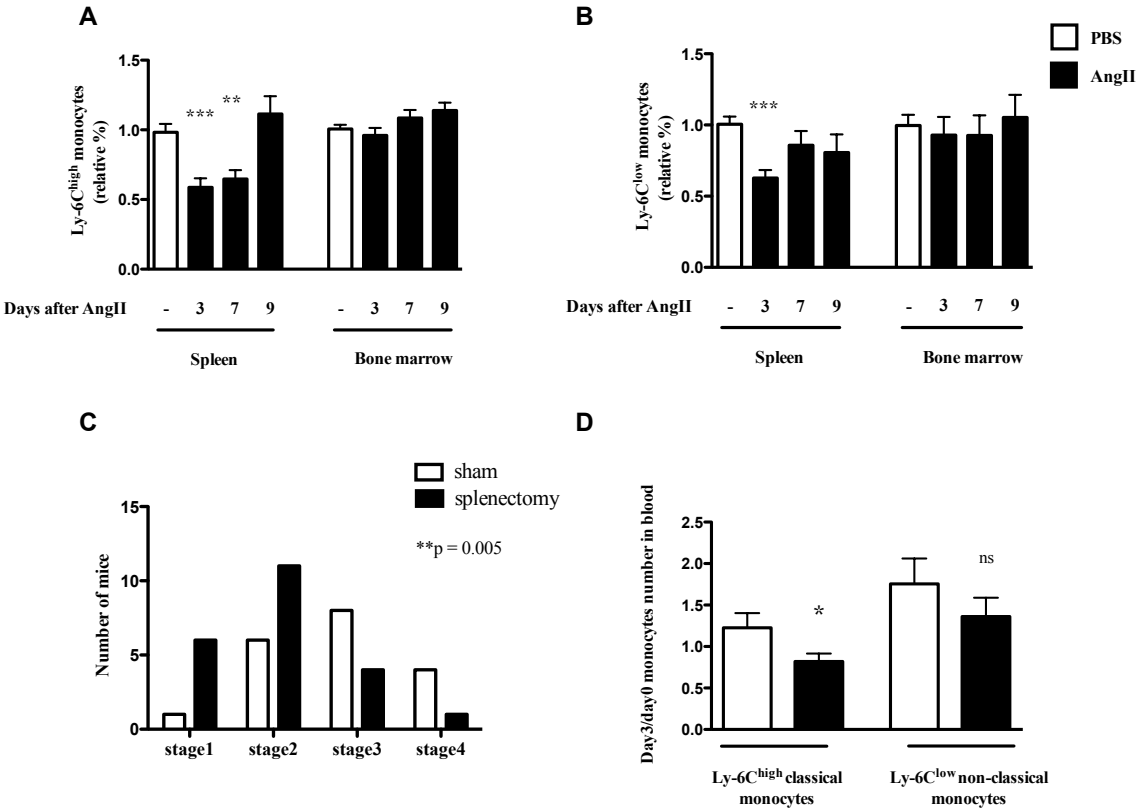
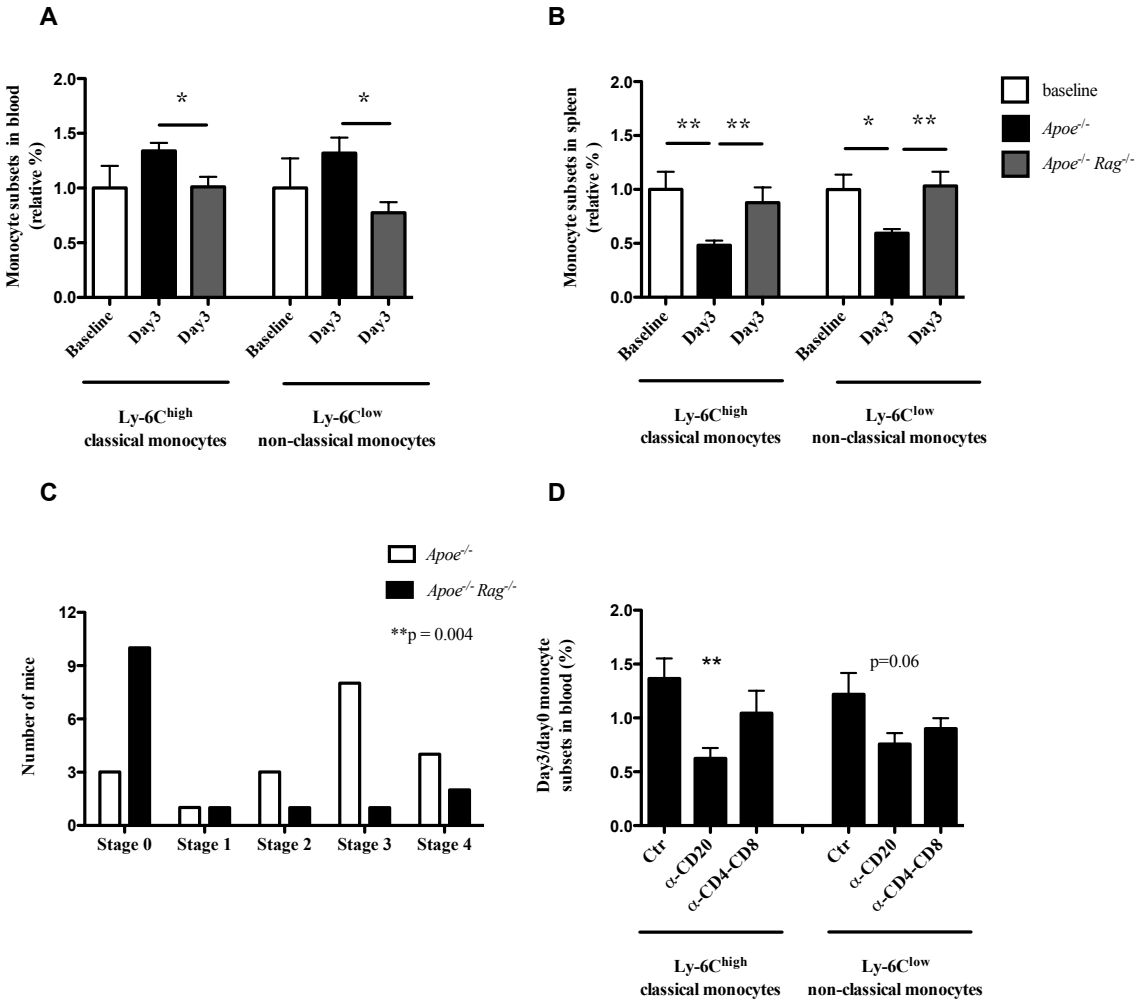
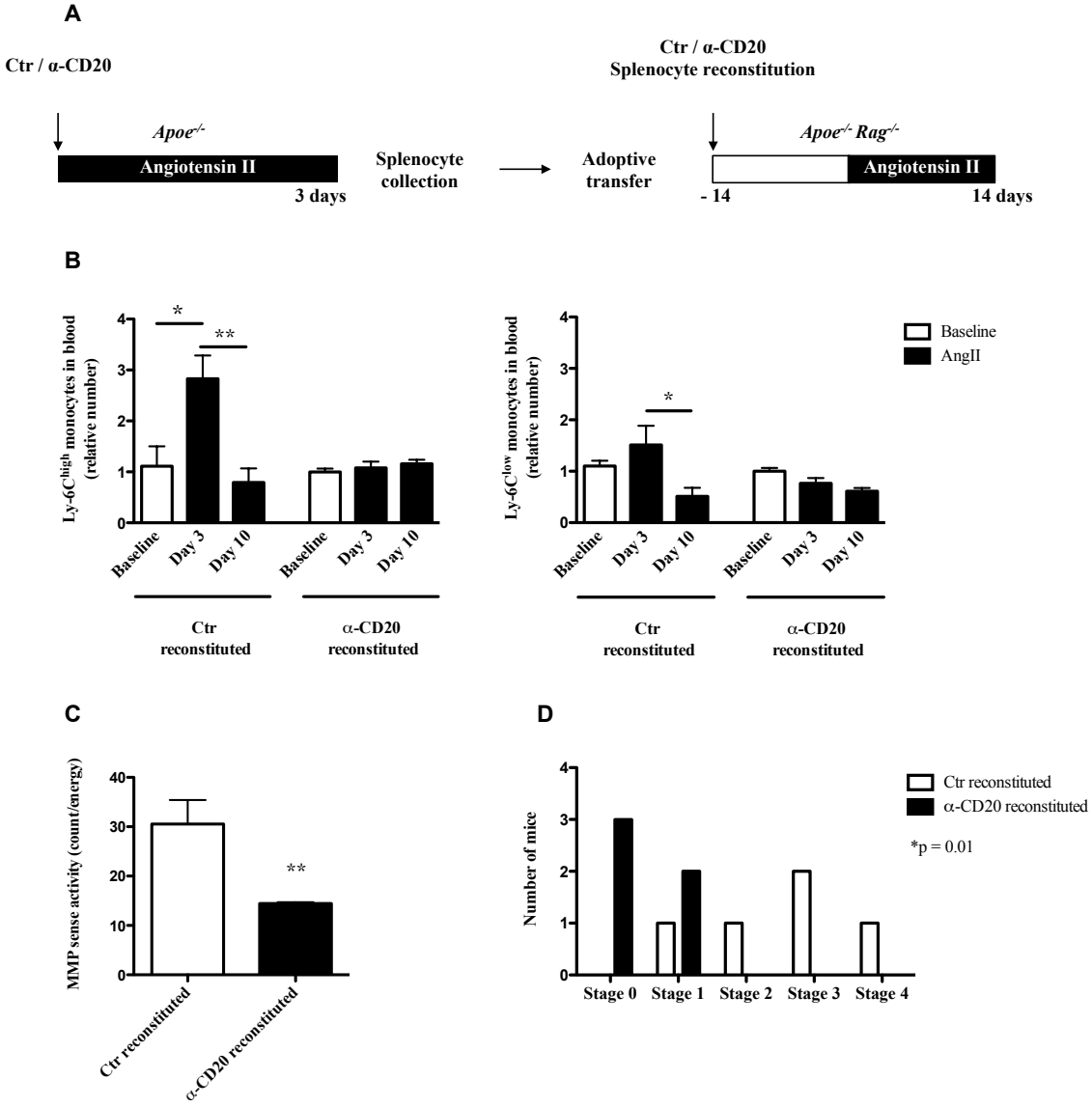

A
Ly-6C^high monocytes (relative %)
1.5
1.0
0.5
0.0
***
**
Days after AngII
-
3
7
9
-
3
7
9
Spleen
Bone marrow
B
PBS
AngII
Ly-6C^low monocytes (relative %)
1.5
1.0
0.5
0.0
***
Days after AngII
-
3
7
9
-
3
7
9
Spleen
Bone marrow
C
sham
splenectomy
**p = 0.005
Number of mice
15
10
5
0
stage1
stage2
stage3
stage4
D
Day3/day0 monocytes number in blood
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
ns
Ly-6C^high classical monocytes
Ly-6C^low non-classical monocytes

FIGURE 5


A
Monocyte subsets in blood (relative %)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
Baseline
Day3
Day3
Baseline
Day3
Day3
Ly-6C^high classical monocytes
Ly-6C^low non-classical monocytes
B
Monocyte subsets in spleen (relative %)
**
**
*
**
baseline
Apoe-/-
Apoe-/- Rag-/-
C
Apoe-/-
Apoe-/- Rag-/-
**p = 0.004
Number of mice
12
9
6
3
0
Stage 0
Stage 1
Stage 2
Stage 3
Stage 4
D
Day3/day0 monocyte subsets in blood (%)
**
p=0.06
Ctr
α-CD20
α-CD4-CD8
Ctr
α-CD20
α-CD4-CD8
Ly-6C^high classical monocytes
Ly-6C^low non-classical monocytes


A
Ctr / α-CD20
Apoe-/-
Angiotensin II
3 days
Splenocyte collection
Adoptive transfer
Ctr / α-CD20
Splenocyte reconstitution
Apoe-/- Rag-/-
Angiotensin II
- 14
14 days
B
Ly-6C^high monocytes in blood (relative number)
Baseline
Day 3
Day 10
Ctr reconstituted
α-CD20 reconstituted
Ly-6C^low monocytes in blood (relative number)
Baseline
AngII
C
MMP sense activity (count/energy)
Ctr reconstituted
α-CD20 reconstituted
D
Number of mice
Ctr reconstituted
α-CD20 reconstituted
*p = 0.01
Stage 0
Stage 1
Stage 2
Stage 3
Stage 4

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental Methods

Animals and in vivo interventions. All the experiments have been performed on 8-12 week-old male C57Bl/6 (WT) from Charles River Laboratories, and *Apoe*$^{-/-}$, *Apoe*$^{-/-}$ *Rag2*$^{-/-}$ maintained on C57Bl/6 background in our animal facility.
Experiments were conducted according to the guidelines formulated by the European Community for experimental animal use (L358-86/609EEC), approved by the Ethical Committee of INSERM and performed under the agreement n° A75-15-32 of the French Ministry of Agriculture.
Bone marrow transplantation : 8 week-old male CD45.2 WT, and CD45.2 *Apoe*$^{-/-}$ mice were lethally irradiated (2 x 6.5 Gray) and reconstituted with an intravenous injection (i.v.) in the retro-orbital vein of 10^7 bone marrow cells isolated from femurs of either CD45.1 WT or CD45.1 *Apoe*$^{-/-}$ mice. After 5 weeks of recovery, mice were infused with AngII or PBS for 28 days.
Splenectomy (sham/splenectomy) : Under Isoflurane anesthesia, mice were shaved locally to prepare for the surgical cut. The abdominal cavity was then opened and the spleen was removed after ligation of the splenic arteries with monofilament 6-0 suture (Premio). For the sham group, a surgical cut was performed without removing the spleen.
Lymphocyte depletion : 8 week-old male *Apoe*$^{-/-}$ mice received at day 0, an intraperitoneal injection of 250 µg of CD20-depleting antibody(Uchida et al., 2004), a mix of 200 µg of CD4-depleting antibody (YTS 191.1) and 100 µg of CD8 depleting antibody (Bourgeois and Stockinger, 2006) (YTS 169.4.2), or an isotype-matched control antibody IgG2b (R&D Systems). At sacrifice, splenocytes were collected for reconstitution of *Apoe*$^{-/-}$ *Rag2*$^{-/-}$ mice.
Rag splenocyte recontitution
Apoe$^{-/-}$ *Rag2*$^{-/-}$ mice were reconstituted with splenocytes from either CD20-depleted or the isotype control treated mice from the experiment described above. 2.10^7 cells were i.v. injected in the retro-orbital vein. The mice were left 2 weeks for recovery before AAA induction.

Monocyte labeling in vivo. A bead labeling technique was used to label both classical and nonclassical monocytes(Potteaux et al., 2011). Nonclassical monocytes are labeled in vivo by retro-orbital i.v. injection of 1 µm fluorescent microsphere (YG, Polysciences) diluted ¼ in sterile PBS. Classical monocytes were labeled using the same beads 3 days after i .v. administration of 250 µl clodronate loaded liposomes (www.clodronateliposomes.com)(Van Rooijen and Sanders, 1994). Cell labeling was checked 24 hours later by flow cytometry. In order to minimize technical imprecisions when using clodronate, the numbers of beads counted in the vessel wall were normalized to the percentage of circulating CD115+ bead+ cells defined by flow cytometry.

The mouse model of Ang II–induced aortic aneurysm. Aneurysms were induced in hypercholesterolemic mice (C57Bl/6 *Apoe*$^{-/-}$) by implanting subcutaneous pumps (Charles River) in the dorsum of the neck, after pre-incubation in PBS for 24 hours to assure immediate delivery of the agent after implantation. Angiotensin II (Sigma-

Aldrich) was delivered at a rate of 1,000 ng/kg/min for a maximum of 28 days (mini-pumps Alzet, model 1003D for 3 days, model 2001 for 1 week, model 2002 for 2 weeks, and model 2004 for 4 weeks ; all from Charles River Laboratories).
Aneurysm severity (stage 1 to stage 4) was evaluated based on Daugherty et al classification (Manning et al., 2002). Stage 4 was attributed to ruptured aneurysms.

Characterization of aneurysmal lesions by immunofluorescence. Only cryostat aortic sections were used. Aortas were embedded in Tissue-Tek O.C.T. coumpound (Thermo Scientific), after fixation in 4% formaldehyde, and were frozen at -80°C. The 8 µm thick sections were 4% formaldehyde fixed for 20 minutes, then incubated in 5% BSA PBS for 1 hour. Monocytes/macrophages were detected using anti-mouse MoMa (MAB 1852), classical monocytes were stained by anti-CCR2 (ab21667), and CX3CR1 (ab8021) for nonclassical monocytes both at 1/200 dilution and incubation at 4°C overnight. The secondary antibody (red) Cy-3 goat anti-rabbit IgG was used at 1/400 dilution in PBS BSA 2% for 1 hour. DAPI was used to stain the cell nuclei (blue) at a concentration of 1uM.
Negative controls were obtained by incubation with only the secondary antibody.
The percentage of the positively stained cellular area was quantified using MetaMorph software (Molecular Devices Corporation).

Flow cytometry. Samples of blood were collected for monocyte mobilisation kinetics at different timings after AngII infusion (day 1, 3, 7, 9, 28). Monocytes were identified as CD11b+CD115+, classical monocytes CD11b+CD115+Gr1^{high} and nonclassical monocytes CD11b+CD115+Gr1^{low}.
Total monocyte numbers were calculated by muliplying the total cells by percent cells within the monocyte gate.
For staining on aortic cells, the aorta was removed and flushed intensively with 2 mM 0,2% FBS PBS. The aorta was cut into pieces and digested using a cocktail of enzymes for 45 min at 37°C (450 U/ml collagenase I, 125 U/ml collagenase XI, 60 U/ml hyaluronidase I; all from Sigma-Aldrich).
Peripheral blood cells were stained with the following antibodies :
V-450 or FITC-conjugated anti-CD11b (M1/70, BD Biosciences)
PE-conjugated anti-CD115 (AFS 98, eBioscience)
Anti-Gr1 (Ly6C and G)-PERCP-Cy5 (RB6-8C5, BD Biosciences)
anti-NK1.1- PE-Cy7 (PK136, eBioscience)
anti-CD4- V-450 (RM4-5, eBioscience)
anti-CD3ε- APC (145-2C11, eBioscience)
anti-B220-V-500 (RA3-6B2, BD Biosciences)
anti-CD8a-AF-700 (53-6.7, BD Biosciences)
anti-MHCII- FITC (M5/114.15.2, eBioscience)
anti-CD19-AF-700 (6D5, BD Biosciences)
anti-CD45.1-PercpCy5.5 (A20, BD Biosciences)
anti-CD45.2-FITC (104, BD Biosciences)
Forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) were used to gate live cell excluding red blood cells, debris, and cell aggregates in total blood cells and splenocytes. Cells were

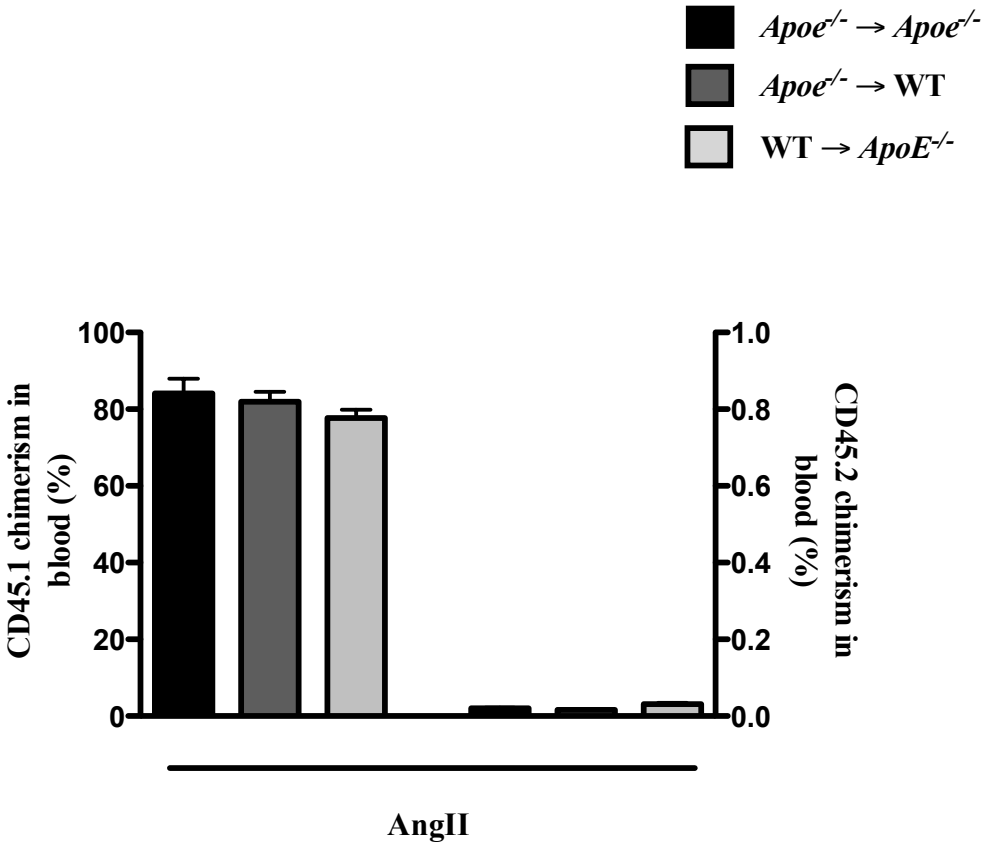
acquired using a BD LSRII Fortessa flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo (Tree Star, Inc.).

Fluorescent imaging. 12 week-old male *Apoe*$^{-/-}$ mice were anesthetized with isoflurane (2% in 2 L of Oxygen) and received an i.v. injection of 150µl of a fluorescent *in vivo* Imaging agent MMPsense 680 (NEV 10126, PerkinElmer) 7 days post AngII infusion and sacrificed 24 hours post injection. This agent is optically silent in its unactivated state and becomes highly fluorescent following activation by key matrix metalloproteinases (MMPs) including MMP-2, -3, -9 and -13. Images were acquired using a fluorescence molecular tomography system (FMT 2500^{TM}, VisEn Medical).

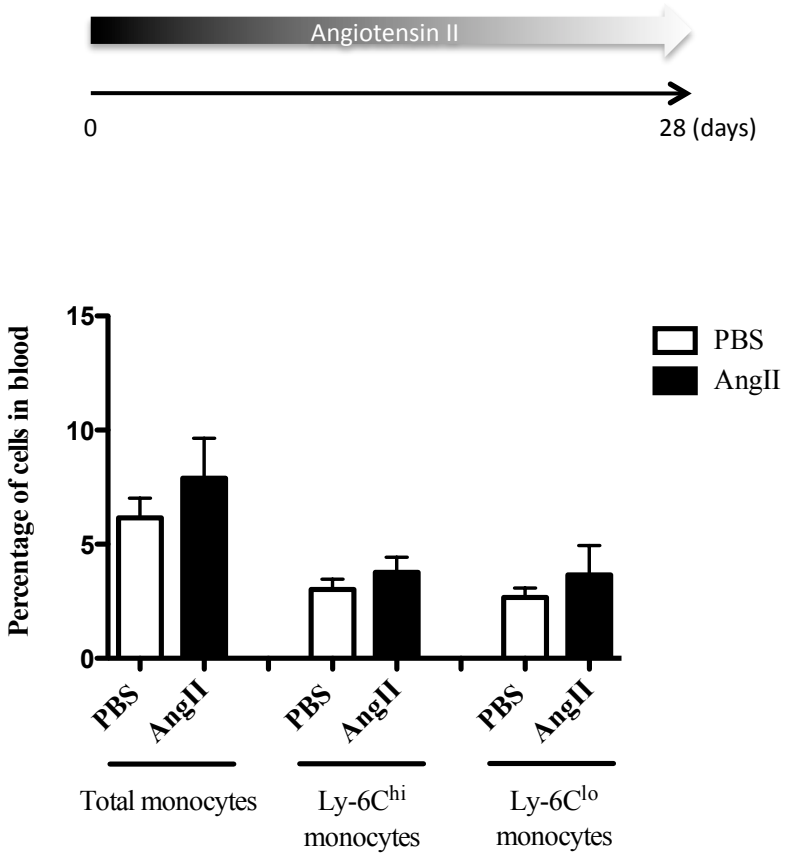
Systolic Blood Pressure Measurement. Systolic blood pressure was measured on conscious male ApoE$^{-/-}$ mice by a noninvasive tail cuff system (BP-2000 Visitech Systems), before and after treatment with AngII or saline, using methods similar to those described previously (Daugherty et al., 2009).
All the measurements were taken in a dark room. We performed 5 initial measurements without recording so that the mice get accustomed to the system, then we record 10 to 15 measurements for each animal in order to get at least 5 exploitable values. The basal recordings were collected at least three days before pump installation, then we measured blood pressure up to one week post-implantation.

Statistical analysis. Values are expressed as percentage, total numbers or means ± SEM when appropriate. Statistical differences were examined using unpaired t test, nonparametric Mann-Whitney test, χ^2 test for a trend, and Fisher exact tests and were considered significant at $p \leq 0.05$.

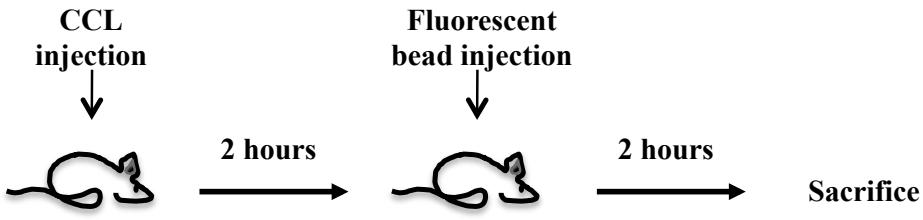
Online Figures

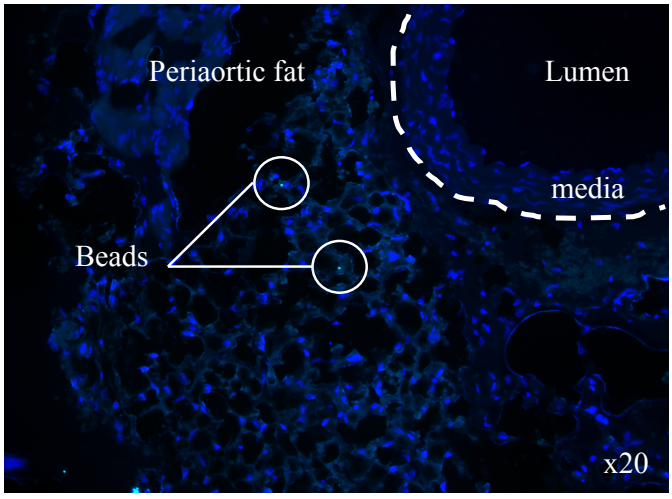


Online figure I : Quantification of the percentage of circulating CD45.1 and CD45.2 leukocytes in blood. Results are presented as mean ± SEM, n = 4 to 7 mice per group.

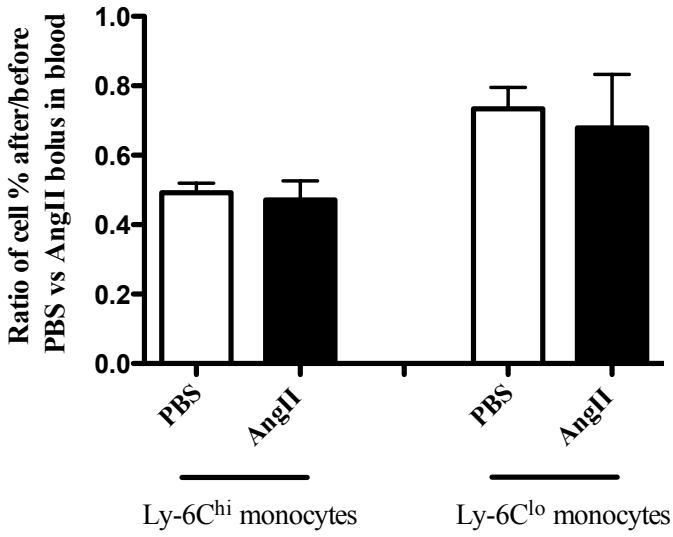


Online figure II: Flow cytometry based quantification of total monocytes ($CD11b^{+}$, $CD115^{+}$), Ly-$6C^{high}$ ($CD11b^{+}$, $CD115^{+}$, $Gr1^{high}$), and Ly-$6C^{low}$ ($CD11b^{+}$, $CD115^{+}$, $Gr1^{low}$) monocyte percentage in blood of *Apoe*$^{-/-}$ mice after 28 days of PBS or AngII treatment. Results are presented as mean ± SEM, n > 5 per group.

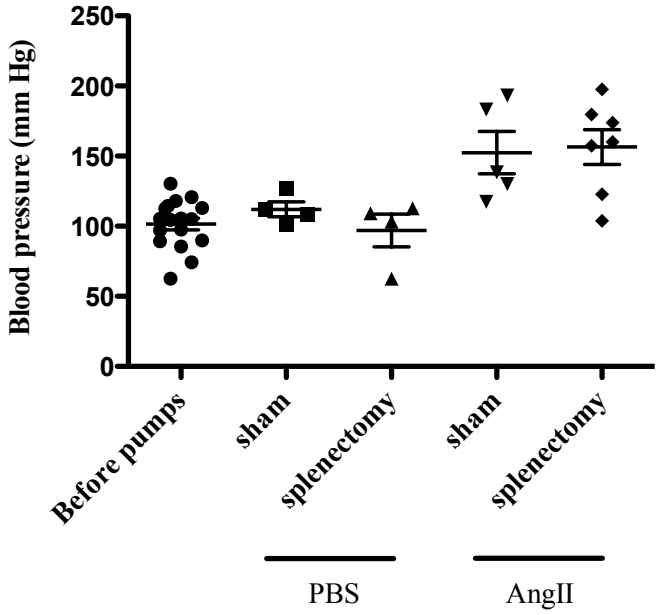




Online figure III: Experimental design illustrating clodronate injection of *ApoE*$^{-/-}$ mice prior to fluorescent bead injection and then sacrifice. Representative image of the abdominal aorta showing lack of passive bead infiltration of the aortic wall.



Online figure IV: Ly-6C^{high} and -6C^{low} cell percentage ratios after/before AngII bolus injection, as defined by flow cytometry.



Online figure V: Blood pressure measured by a tail-cuff technique before pump implantation and after PBS or AngII pumps in splenectomized and sham mice. N>4 per group. Results are presented as mean ± SEM.

BIBLIOGRAPHIE

BOURGEOIS, C. & STOCKINGER, B. 2006. CD25+CD4+ regulatory T cells and memory T cells prevent lymphopenia-induced proliferation of naive T cells in transient states of lymphopenia. *J Immunol,* 177**,** 4558-66.

DAUGHERTY, A., RATERI, D., HONG, L. & BALAKRISHNAN, A. 2009. Measuring blood pressure in mice using volume pressure recording, a tail-cuff method. *J Vis Exp*.

MANNING, M. W., CASSI, L. A., HUANG, J., SZILVASSY, S. J. & DAUGHERTY, A. 2002. Abdominal aortic aneurysms: fresh insights from a novel animal model of the disease. *Vasc Med,* 7**,** 45-54.

POTTEAUX, S., GAUTIER, E. L., HUTCHISON, S. B., VAN ROOIJEN, N., RADER, D. J., THOMAS, M. J., SORCI-THOMAS, M. G. & RANDOLPH, G. J. 2011. Suppressed monocyte recruitment drives macrophage removal from atherosclerotic plaques of Apoe-/- mice during disease regression. *J Clin Invest,* 121**,** 2025-36.

UCHIDA, J., LEE, Y., HASEGAWA, M., LIANG, Y., BRADNEY, A., OLIVER, J. A., BOWEN, K., STEEBER, D. A., HAAS, K. M., POE, J. C. & TEDDER, T. F. 2004. Mouse CD20 expression and function. *Int Immunol,* 16**,** 119-29.

VAN ROOIJEN, N. & SANDERS, A. 1994. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods,* 174**,** 83-93.

Discussion

Ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence de nouveaux indices mécanistiques sur les événements précoces impliqués dans la pathogenèse des AAA dans un modèle expérimental de souris ApoE$^{-/-}$ perfusées à l'Ang II. Ils soulignent le rôle du réservoir splénique dans ce processus et identifient un rôle des lymphocytes B dans la mobilisation initiale et transitoire des monocytes spléniques en réponse à l'Ang II.

L'implication du trafic monocytaire dans le développement des maladies cardiovasculaires a suscité un vif intérêt au cours des dernières années. Dans l'AAA, la présence d'infiltrats inflammatoires, et plus particulièrement des monocytes/macrophages, a permis de mettre en évidence l'importance de la contribution des réponses immuno-inflammatoires dans la dégénérescence anévrismale. La migration monocytaire en réponse à l'Ang II a été largement étudiée à travers des expériences *in vitro* et *in vivo*, mais il y a actuellement peu de choses connues sur le trafic et le recrutement des sous-types monocytaires dans le contexte de l'AAA.

Dans cette étude, nous avons décrit pour la première fois le comportement migratoire des monocytes Ly-6C^{high} et des monocytes Ly-6C^{low} au cours de la formation d'AAA en réponse à l'Ang II chez les souris ApoE$^{-/-}$ mâles (Lederle et al., 2001, Best et al., 2003, Acosta et al., 2006, Zhang et al., 2014). Nous avons montré que l'Ang II induit la mobilisation des monocytes Ly-6C^{high} et des monocytes Ly-6C^{low} à partir de la rate, puis leur recrutement au niveau de l'aorte abdominale. La splénectomie ou la déplétion systémique des lymphocytes B abroge la mobilisation monocytaire et protège du développement d'AAA. Toutefois, la reconstitution de souris immuno-déficientes avec des splénocytes totaux, restaure la mobilisation monocytaire chez ces souris et restitue leur susceptibilité à développer la maladie.

Nos données de transplantation de moelle CD45.1 chez des souris ApoE$^{-/-}$ ou WT portant le marqueur congénique CD45.2 ont montré que la perfusion continue de l'Ang II engendre l'accumulation de macrophages au niveau de l'aorte abdominale chez les souris hypercholestérolémiques suite au recrutement de monocytes circulants. En effet, la majorité des macrophages accumulés au niveau des aortes abdominales des souris ApoE$^{-/-}$ transplantées par une MO ApoE$^{-/-}$ avaient une signature CD45.1 suggérant leur provenance médullaire à partir de monocytes circulants. En revanche, nous avons noté une moindre accumulation de macrophages chez les souris WT transplantées par une MO ApoE$^{-/-}$ ainsi que

chez les souris ApoE$^{-/-}$ transplantées par une MO WT. Ces deux groupes de souris présentaient des taux de cholestérol moins élevés que ceux des souris ApoE$^{-/-}$ transplantées par une MO ApoE$^{-/-}$, tout en ayant des pressions artérielles équivalentes en réponse à l'Ang II. Cela suggère que l'Ang II et le cholestérol agissent en concert pour promouvoir l'accumulation des macrophages qui jouent un rôle pionnier dans le développement d'AAA chez la souris (Daugherty et al., 2000, Daugherty and Cassis, 1999).

Il est toutefois important de garder un esprit critique vis à vis des modèles murins soumis à l'irradiation. Tout d'abord, il a été montré que l'irradiation protège partiellement du développement d'AAA chez les souris ApoE (Gavish et al., 2012, Gavish et al., 2009). De plus, l'irradiation à laquelle ont été exposées ces souris pourrait induire la déplétion des macrophages résidents de l'aorte. Ainsi, la mobilisation monocytaire observée pourrait être en partie artificielle et ne pas refléter à l'identique les événements ayant lieu en conditions physiologiques.

Cependant, il a été montré dans d'autres modèles que l'Ang II provoque, de manière encore peu connue, la libération massive de monocytes vers la circulation (Swirski et al., 2009a). L'Ang II a aussi longtemps été associé à l'athérosclérose, qui est un processus caractérisé par une monocytose importante suivie par un recrutement accru au niveau des lésions athéromateuses (Libby, 2002). Chez l'homme, il existe des preuves associant l'augmentation de rénine, une étape importante pour la production d'Ang II, et l'augmentation de survenue d'événements cardiovasculaires (Alderman et al., 1991). Le rôle de l'Ang II a été souligné dans un essai clinique qui a démontré que l'administration des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC), a été associée avec une diminution de la morbidité et mortalité cardiovasculaires (Pfeffer et al., 1992). De plus, l'augmentation des IEC circulants à cause d'un génotype « délétion/délétion » (DD), a été associée à une augmentation des maladies cardiovasculaires (Samani et al., 1996). Des données cliniques et expérimentales lient l'Ang II à la formation d'AAA. Par exemple, un polymorphisme au niveau du gène des IEC a été associé au développement des anévrismes (Takenaka et al., 1998). Dans l'athérosclérose, la production locale de l'Ang II a été mise en évidence au sein des lésions d'athérosclérose à travers l'expression des enzymes nécessaires à la synthèse de l'Ang II notamment la rénine (Iwai et al., 1996), et les IEC (Diet et al., 1996).
L'accumulation d'Ang II a également été montrée par immunohistochimie dans les lésions athéromatheuses humaines (Potter et al., 1998).

L'Ang II a plusieurs mécanismes d'action potentiels qui pourrait intervenir dans la pathologie anévrismale. Il pourrait agir de façon directe via des effets hémodynamiques résultant de l'augmentation de la pression artérielle. Cependant, Cassis et al ont suggéré l'existence de mécanismes additionnels indépendamment des élévations de la pression artérielle (Cassis et al., 2009). En effet, il a été démontré que l'Ang II exerce d'autres effets qui pourraient intervenir dans le développement d'AAA, notamment la stimulation de la migration monocytaire *in vitro (Kintscher et al., 2001)*, l'activation des macrophages (Yanagitani et al., 1999) et l'augmentation du stress oxydatif (Keidar, 1998).

Une étude récente menée par Nahrendorf et al montre un recrutement séquentiel des deux sous-types monocytaires dans l'infarctus du myocarde en mettant en avant l'importance de la voie Ang II-AT1 dans la mobilisation monocytaire (Swirski et al., 2009a). Les monocytes inflammatoires Ly-6C^{high} recrutés en premier lieu, suivis par les monocytes Ly-6C^{low} qui sont recrutés dans un second lieu et participeraient à la cicatrisation tissulaire.

Nous avons donc émis l'hypothèse que la mobilisation des deux sous-types monocytaires en réponse à la diffusion d'Ang II pourrait conduire à leur recrutement au niveau de l'aorte abdominale et contribuer au développement de l'AAA.

Nous avons observé à J-3 une augmentation des monocytes Ly-6C^{high} et des monocytes Ly-6C^{low} dans le sang, accompagnée d'une diminution de leurs taux dans la rate, suggérant la contribution du réservoir splénique au pool de monocytes mobilisés. Les monocytes Ly-6C^{low} ont atteint un niveau maximal plus tardivement à J-7 sans qu'il y ait de diminution soutenue au niveau de la rate, ce qui pourrait être expliqué par la conversion des monocytes Ly-6C^{high} en monocytes Ly-6C^{low} (Sunderkotter et al., 2004, Varol et al., 2007, Tacke et al., 2006). Il est également possible que les monocytes Ly-6C^{low} se détachent de l'endothélium vasculaire qu'ils parcourent (Auffray et al., 2007), ou dérivent indépendamment de la MO (Geissmann et al., 2008), même si cela n'a pas été confirmé dans notre analyse. Ainsi les deux sous types monocytaires sont mobilisés de façon Ang II dépendante dans le cas de l'AAA, contrairement aux observations de Nahrendorf et al dans le modèle d'IM.

L'hétérogénéité phénotypique des sous-types monocytaires murins est souvent distinguée par l'expression différentielle des récepteurs aux chimiokines. Les monocytes inflammatoires Ly-

$6C^{high}$ ($CCR2^{+}/CX3CR1^{low}$) et les monocytes réparateurs Ly-$6C^{low}$ ($CCR2^{-}/CX3CR1^{high}$) ont des implications mitigées dans les maladies cardiovasculaires.

Dans le cas de l'athérosclérose et de l'AAA, des études ont identifié un certain nombre de récepteurs aux chimiokines impliqué dans le recrutement monocytaire, tels que CCR2 et CX3CR1 (Gautier et al., 2009). Il a été montré dans des modèles d'inflammation aigue, que le CCR2 est impliqué dans le recrutement des monocytes Ly-$6C^{high}$, alors que le CX3CR1 est responsable du trafic et de la survie des monocytes Ly-$6C^{low}$ (Landsman et al., 2009). En se basant sur l'expression de CCR2 et CX3CR1 au niveau de l'aorte abdominale, nous avons montré que les monocytes Ly-$6C^{high}$ s'accumulent dans la paroi aortique à J-3 suivis des monocytes Ly-$6C^{low}$ à J-7, malgré leur augmentation dans la circulation à J-3. Néanmoins, la quantification par microbilles fluorescentes a montré que le recrutement des monocytes Ly-$6C^{low}$ circulants à J-7 est minime, et ne peut probablement pas, à lui seul, expliquer l'accumulation accrue des cellules $CX3CR1^{+}$ au niveau de la paroi aortique. Ces cellules $CX3CR1^{+}$ pourraient résulter de la différenciation des monocytes Ly-$6C^{high}$ mobilisés à J-3 en macrophages Ly-$6C^{low}$ comme rapporté dans des études récentes (Hilgendorf et al., 2014, Epelman et al., 2014), ou bien elles pourraient provenir d'une prolifération locale, comme il a été montré dans un travail sur l'athérosclérose (Robbins et al., 2013). Dans notre étude, nous n'avons détecté que très peu de macrophages au niveau de l'aorte abdominale à l'état basal. Néanmoins, il a été montré auparavant que les sources vasculaires locales de cellules inflammatoires peuvent dériver de la MO ou de progéniteurs locaux (Sata et al., 2002, Psaltis et al., 2012).

Bien que la contribution de ces cellules progénitrices dans le remodelage vasculaire demeure incertaine, nous n'excluons pas l'implication d'une prolifération locale des monocytes recrutés ou d'autres cellules dérivées de la moelle. Nous envisageons d'aborder cette question dans des expériences futures.

Plusieurs recherches ont démontré une corrélation entre le nombre circulant de monocytes et le développement de maladies cardiovasculaires, notamment dans l'AAA (Chapman et al., 2004, Combadiere et al., 2008, Ghigliotti et al., 2013). Comme il a été montré par d'autres études, le nombre de monocytes augmente de façon accrue dans la circulation en réponse à une lésion aigue ou à une infection (Drevets et al., 2004, Nahrendorf et al., 2007). Dans les présents travaux, nous avons mis en évidence une corrélation entre l'augmentation monocytaire initiale et l'incidence des AAA chez les souris $ApoE^{-/-}$ soumises à l'Ang II. Nous avons également montré que cette augmentation initiale de monocytes en réponse à

l'Ang II est vraisemblablement due à leur mobilisation à partir du réservoir splénique. En effet, l'ablation de la rate, ou la splénectomie, abroge cette mobilisation initiale des monocytes Ly-6C^{high} et protège de la progression et la sévérité de la maladie anévrismale. En revanche, une des limitations de cette expérience est que la splénectomie neutralise une variété de cellules immunitaires qui pourraient affecter la réponse inflammatoire à l'Ang II différemment.

Un effet différent de la splénectomie a été rapporté par Caligiuri et al dans le cadre d'une étude d'athérosclérose, où ils montrent que la splénectomie aggrave l'athérosclérose chez des souris ApoE$^{-/-}$, en réduisant leur capacité à développer une immunité athéro-protectrice dépendante des lymphocytes B (Caligiuri et al., 2002). Dans notre étude, les souris splénectomisées protégées du développement d'AAA avaient une tendance à avoir une aggravation de l'athérosclérose. Il est important de mentionner que la splénectomie induit une augmentation des monocytes Ly-6C^{high}, qui dure plusieurs semaines après la chirurgie. Cette monocytose pourrait ainsi jouer un rôle dans l'aggravation de l'athérosclérose.

Ces résultats renforcent l'idée que les AAA et l'athérosclérose sont des processus biologiques bien distincts (Golledge and Norman, 2010).

Pour mieux comprendre la protection contre l'AAA générée par la splénectomie, nous avons évalué la contribution des populations lymphocytaires dans le développement de l'AAA chez les souris immunodéficientes ApoE$^{-/-}$ Rag2$^{-/-}$. Suite à la perfusion d'Ang II, ces souris ont montré une protection de l'AAA et de façon surprenante, elles ont également présenté une abrogation de la mobilisation monocytaire initiale à J-3. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'effet protecteur de la déficience en lymphocyte pourrait agir via un effet sur la mobilisation monocytaire. Toujours est-il de déterminer si c'est un effet lié aux lymphocytes B ou T.

La déplétion des lymphocytes B matures par un traitement à l'anticorps anti-CD20, altère la mobilisation monocytaire à J-3 chez les souris ApoE$^{-/-}$. La déplétion des lymphocytes T CD4 et CD8 a eu un effet minime sur la mobilisation monocytaire, renforçant ainsi l'hypothèse de l'implication des lymphocytes B dans la mobilisation monocytaire. De façon intéressante, le transfert adoptif de splénocytes totaux, chez des souris immunodéficientes ApoE$^{-/-}$ Rag2$^{-/-}$ restitue la mobilisation initiale des monocytes et restaure la susceptibilité de ces souris à développer l'AAA. En revanche, les souris ApoE$^{-/-}$ Rag2$^{-/-}$ reconstituées avec des splénocytes déplétés en lymphocytes B n'ont pas réussi à mobiliser les monocytes en réponse à l'Ang II et

ont gardé leur protection contre l'AAA. Ces résultats récapitulent nos observations chez les souris splénectomisées et suggèrent que les lymphocytes B sont des acteurs principaux dans la mobilisation monocytaire.

Pour renforcer notre hypothèse, une étude récente a mis en évidence le rôle des lymphocytes B dans la mobilisation des monocytes Ly-6C^{high}, et leur recrutement au niveau du myocarde infarci avec un effet délétère sur la fonction cardiaque (Zouggari et al., 2013). Néanmoins, il est possible que les lymphocytes B exercent leur effet sur la mobilisation monocytaire à travers la modulation d'une hématopoïèse monocytaire extra-médullaire au niveau de la rate (Leuschner et al., 2012). En effet, une population de lymphocytes B appelée 'les lymphocytes B activateurs de la réponse innée' (Innate response activator B cells ou IRA) a été décrite récemment dans une pathologie inflammatoire (Rauch et al., 2012). Ces lymphocytes se développent dans la rate et produisent de forts taux de GM-CSF, un facteur de croissance pléiotrope qui promeut la survie, la prolifération et l'activité de plusieurs leucocytes exprimant son récepteur (Stanley et al., 1994, Hamilton and Achuthan, 2013, Robbins et al., 2012).

En revanche, les lymphocytes B pourraient également exercer un effet direct dans cette pathologie. En effet, il a été montré que les lésions anévrismales contiennent de grandes quantités d'immunoglobulines (Gregory et al., 1996). De plus, les lymphocytes B IgA positifs et IgG positifs se trouvent en plus grands nombres dans les lésions d'AAA que dans le sang circulant des mêmes patients (Ocana et al., 2003). Cependant, très peu d'études se sont intéressées au rôle direct des lymphocytes B dans l'AAA.

Des expériences supplémentaires sont en cours pour explorer la présence des lymphocytes B au niveau de la lésion anévrismale ainsi que a production de MCP1 et MCP3 en présence de l'Ang II. Nous examinerons également leur expression de récepteurs qui pourraient les rendre sensibles aux actions de l'Ang II.

La rate est un site majeur pour les réponses immunitaires contre les antigènes circulants tels que les oxLDL mais également un réservoir principal des lymphocytes mémoires ce qui en fait l'organe le plus riche en production d'anticorps. Les lymphocytes B représentent une des populations majeures de la rate et modulent fortement l'activation des lymphocytes T et des DCs par leur sécrétion de cytokines, entre autres (Lund and Randall, 2010). Un rôle

protecteur contre l'athérosclérose leur a été attribué (Caligiuri et al., 2002, Major et al., 2002, Miller et al., 2008, Binder et al., 2004) ; les travaux du groupe Caligiuri et al ont montré que le transfert adoptif des lymphocytes B chez des souris ApoE$^{-/-}$ splénectomisées a permis de protéger ces souris du développement de la pathologie. Toutefois, les populations des lymphocytes B situées dans le péritoine, également appelées B1, ne sont pas affectées par la déplétion dans cette étude, et pourraient contribuer à l'aggravation de l'athérosclérose. Une autre étude par Major et al ont montré que la déficience en lymphocytes B chez les souris μMT aggrave les lésions d'athérosclérose.

En revanche, une étude de notre équipe a montré que la déplétion des lymphocytes B2, qui sont les lymphocytes B situés en périphérie et impliqué majoritairement dans les réponses adaptatives, à l'aide d'une thérapie à l'anti-CD20, réduit l'athérosclérose et diminue l'activation des lymphocytes T et de la production d'IFNγ, chez les souris immuncompétentes ApoE$^{-/-}$ et LDLr$^{-/-}$ (Ait-Oufella et al., 2010). Par la suite, des travaux menés par d'autres équipes ont confirmé ces résultats (Lipinski et al., 2011, Kyaw et al., 2010). Bien que la détection des lymphocytes B soit minime au niveau de la paroi vasculaire pendant les stades précoces de l'athérosclérose, l'accumulation des lymphocytes augmente considérablement avec le temps. Ils sont ainsi localisés autour des lésions avancées d'athérosclérose ainsi qu'au niveau des AAA humains et murins (Moos et al., 2005), et d'autres maladies inflammatoires du vaisseau (Aubry et al., 2004).

Ainsi les lymphocytes B peuvent moduler de façon substantielle l'inflammation (Valleala et al., 2009, Pescovitz et al., 2009, Hu et al., 2007, Hauser et al., 2008, Rauch et al., 2012), mais leur rôle reste inexploré dans la pathologie anévrismale.

L'ensemble de ces travaux met l'accent sur l'importance de nouvelles études qui pourraient aborder l'effet de l'Ang II sur l'interaction entre les lymphocytes B et les monocytes, et identifier les types des lymphocytes B impliqués dans la modulation de l'inflammation ayant lieu au cours de l'AAA. Il est toutefois nécessaire de se procurer de plus amples connaissances sur les mécanismes moléculaires sous-jacents afin de mettre au point des stratégies thérapeutiques efficaces pour la prévention de l'expansion anévrismale.

Références Bibliographiques

BIBLIOGRAPHIE

1998. Mortality results for randomised controlled trial of early elective surgery or ultrasonographic surveillance for small abdominal aortic aneurysms. The UK Small Aneurysm Trial Participants. *Lancet,* 352**,** 1649-55.

ABDUL-HUSSIEN, H., SOEKHOE, R. G., WEBER, E., VON DER THUSEN, J. H., KLEEMANN, R., MULDER, A., VAN BOCKEL, J. H., HANEMAAIJER, R. & LINDEMAN, J. H. 2007. Collagen degradation in the abdominal aneurysm: a conspiracy of matrix metalloproteinase and cysteine collagenases. *Am J Pathol,* 170**,** 809-17.

ACOSTA, S., OGREN, M., BENGTSSON, H., BERGQVIST, D., LINDBLAD, B. & ZDANOWSKI, Z. 2006. Increasing incidence of ruptured abdominal aortic aneurysm: a population-based study. *J Vasc Surg,* 44**,** 237-43.

ADAM, D. J., LUDLAM, C. A., RUCKLEY, C. V. & BRADBURY, A. W. 1999. Coagulation and fibrinolysis in patients undergoing operation for ruptured and nonruptured infrarenal abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg,* 30**,** 641-50.

AILAWADI, G., ELIASON, J. L. & UPCHURCH, G. R., JR. 2003. Current concepts in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg,* 38**,** 584-8.

AIT-OUFELLA, H., HERBIN, O., BOUAZIZ, J. D., BINDER, C. J., UYTTENHOVE, C., LAURANS, L., TALEB, S., VAN VRE, E., ESPOSITO, B., VILAR, J., SIRVENT, J., VAN SNICK, J., TEDGUI, A., TEDDER, T. F. & MALLAT, Z. 2010. B cell depletion reduces the development of atherosclerosis in mice. *J Exp Med,* 207**,** 1579-87.

AIT-OUFELLA, H., WANG, Y., HERBIN, O., BOURCIER, S., POTTEAUX, S., JOFFRE, J., LOYER, X., PONNUSWAMY, P., ESPOSITO, B., DALLOZ, M., LAURANS, L., TEDGUI, A. & MALLAT, Z. 2013. Natural regulatory T cells limit angiotensin II-induced aneurysm formation and rupture in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 33**,** 2374-9.

AKIYAMA, Y., MILLER, P. J., THURMAN, G. B., NEUBAUER, R. H., OLIVER, C., FAVILLA, T., BEMAN, J. A., OLDHAM, R. K. & STEVENSON, H. C. 1983. Characterization of a human blood monocyte subset with low peroxidase activity. *J Clin Invest,* 72**,** 1093-105.

ALDER, J. K., GEORGANTAS, R. W., 3RD, HILDRETH, R. L., KAPLAN, I. M., MORISOT, S., YU, X., MCDEVITT, M. & CIVIN, C. I. 2008. Kruppel-like factor 4 is essential for inflammatory monocyte differentiation in vivo. *J Immunol,* 180**,** 5645-52.

ALDERMAN, M. H., MADHAVAN, S., OOI, W. L., COHEN, H., SEALEY, J. E. & LARAGH, J. H. 1991. Association of the renin-sodium profile with the risk of myocardial infarction in patients with hypertension. *N Engl J Med,* 324**,** 1098-104.

ALLAIRE, E., FOROUGH, R., CLOWES, M., STARCHER, B. & CLOWES, A. W. 1998a. Local overexpression of TIMP-1 prevents aortic aneurysm degeneration and rupture in a rat model. *J Clin Invest,* 102**,** 1413-20.

ALLAIRE, E., GUETTIER, C., BRUNEVAL, P., PLISSONNIER, D. & MICHEL, J. B. 1994. Cell-free arterial grafts: morphologic characteristics of aortic isografts, allografts, and xenografts in rats. *J Vasc Surg,* 19**,** 446-56.

ALLAIRE, E., HASENSTAB, D., KENAGY, R. D., STARCHER, B., CLOWES, M. M. & CLOWES, A. W. 1998b. Prevention of aneurysm development and rupture by local overexpression of plasminogen activator inhibitor-1. *Circulation,* 98**,** 249-55.

ALLAIRE, E., MUSCATELLI-GROUX, B., MANDET, C., GUINAULT, A. M., BRUNEVAL, P., DESGRANGES, P., CLOWES, A., MELLIERE, D. & BECQUEMIN, J. P. 2002. Paracrine effect of vascular smooth muscle cells in the prevention of aortic aneurysm formation. *J Vasc Surg,* 36**,** 1018-26.

ALVAREZ, A., CERDA-NICOLAS, M., NAIM ABU NABAH, Y., MATA, M., ISSEKUTZ, A. C., PANES, J., LOBB, R. R. & SANZ, M. J. 2004. Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II. *Blood,* 104**,** 402-8.

ANCUTA, P., RAO, R., MOSES, A., MEHLE, A., SHAW, S. K., LUSCINSKAS, F. W. & GABUZDA, D. 2003. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J Exp Med,* 197**,** 1701-7.

ANIDJAR, S., DOBRIN, P. B., CHEJFEC, G. & MICHEL, J. B. 1994. Experimental study of determinants of aneurysmal expansion of the abdominal aorta. *Ann Vasc Surg,* 8**,** 127-36.

ANIDJAR, S., SALZMANN, J. L., GENTRIC, D., LAGNEAU, P., CAMILLERI, J. P. & MICHEL, J. B. 1990. Elastase-induced experimental aneurysms in rats. *Circulation,* 82**,** 973-81.

ARNOLD, L., HENRY, A., PORON, F., BABA-AMER, Y., VAN ROOIJEN, N., PLONQUET, A., GHERARDI, R. K. & CHAZAUD, B. 2007. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med,* 204**,** 1057-69.

AUBRY, M. C., RIEHLE, D. L., EDWARDS, W. D., MARADIT-KREMERS, H., ROGER, V. L., SEBO, T. J. & GABRIEL, S. E. 2004. B-Lymphocytes in plaque and adventitia of coronary arteries in two patients with rheumatoid arthritis and coronary atherosclerosis: preliminary observations. *Cardiovasc Pathol,* 13**,** 233-6.

AUFFRAY, C., FOGG, D., GARFA, M., ELAIN, G., JOIN-LAMBERT, O., KAYAL, S., SARNACKI, S., CUMANO, A., LAUVAU, G. & GEISSMANN, F. 2007. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science,* 317**,** 666-70.

AUFFRAY, C., FOGG, D. K., NARNI-MANCINELLI, E., SENECHAL, B., TROUILLET, C., SAEDERUP, N., LEEMPUT, J., BIGOT, K., CAMPISI, L., ABITBOL, M., MOLINA, T., CHARO, I., HUME, D. A., CUMANO, A., LAUVAU, G. & GEISSMANN, F. 2009a. CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med,* 206**,** 595-606.

AUFFRAY, C., SIEWEKE, M. H. & GEISSMANN, F. 2009b. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol,* 27**,** 669-92.

BABAMUSTA, F., RATERI, D. L., MOORLEGHEN, J. J., HOWATT, D. A., LI, X. A. & DAUGHERTY, A. 2006. Angiotensin II infusion induces site-specific intra-laminar hemorrhage in macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. *Atherosclerosis,* 186**,** 282-90.

BALLARD, D. J., FILARDO, G., FOWKES, G. & POWELL, J. T. 2008. Surgery for small asymptomatic abdominal aortic aneurysms. *Cochrane Database Syst Rev***,** CD001835.

BAXTER, B. T. 2005. Heritable diseases of the blood vessels. *Cardiovasc Pathol,* 14**,** 185-8.

BAXTER, B. T., DAVIS, V. A., MINION, D. J., WANG, Y. P., LYNCH, T. G. & MCMANUS, B. M. 1994. Abdominal aortic aneurysms are associated with altered matrix proteins of the nonaneurysmal aortic segments. *J Vasc Surg,* 19**,** 797-802; discussion 803.

BAXTER, B. T., PEARCE, W. H., WALTKE, E. A., LITTOOY, F. N., HALLETT, J. W., JR., KENT, K. C., UPCHURCH, G. R., JR., CHAIKOF, E. L., MILLS, J. L.,

FLECKTEN, B., LONGO, G. M., LEE, J. K. & THOMPSON, R. W. 2002. Prolonged administration of doxycycline in patients with small asymptomatic abdominal aortic aneurysms: report of a prospective (Phase II) multicenter study. *J Vasc Surg,* 36**,** 1-12.

BEIGHTON, P., DE PAEPE, A., STEINMANN, B., TSIPOURAS, P. & WENSTRUP, R. J. 1998. Ehlers-Danlos syndromes: revised nosology, Villefranche, 1997. Ehlers-Danlos National Foundation (USA) and Ehlers-Danlos Support Group (UK). *Am J Med Genet,* 77**,** 31-7.

BELGE, K. U., DAYYANI, F., HORELT, A., SIEDLAR, M., FRANKENBERGER, M., FRANKENBERGER, B., ESPEVIK, T. & ZIEGLER-HEITBROCK, L. 2002. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol,* 168**,** 3536-42.

BENNETT, W. E. & COHN, Z. A. 1966. The isolation and selected properties of blood monocytes. *J Exp Med,* 123**,** 145-60.

BERGSMA, D. J., ELLIS, C., KUMAR, C., NUTHULAGANTI, P., KERSTEN, H., ELSHOURBAGY, N., GRIFFIN, E., STADEL, J. M. & AIYAR, N. 1992. Cloning and characterization of a human angiotensin II type 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun,* 183**,** 989-95.

BERNHAGEN, J., KROHN, R., LUE, H., GREGORY, J. L., ZERNECKE, A., KOENEN, R. R., DEWOR, M., GEORGIEV, I., SCHOBER, A., LENG, L., KOOISTRA, T., FINGERLE-ROWSON, G., GHEZZI, P., KLEEMANN, R., MCCOLL, S. R., BUCALA, R., HICKEY, M. J. & WEBER, C. 2007. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med,* 13**,** 587-96.

BEST, V. A., PRICE, J. F. & FOWKES, F. G. 2003. Persistent increase in the incidence of abdominal aortic aneurysm in Scotland, 1981-2000. *Br J Surg,* 90**,** 1510-5.

BINDER, C. J., HARTVIGSEN, K., CHANG, M. K., MILLER, M., BROIDE, D., PALINSKI, W., CURTISS, L. K., CORR, M. & WITZTUM, J. L. 2004. IL-5 links adaptive and natural immunity specific for epitopes of oxidized LDL and protects from atherosclerosis. *J Clin Invest,* 114**,** 427-37.

BIRKEDAL-HANSEN, H., MOORE, W. G., BODDEN, M. K., WINDSOR, L. J., BIRKEDAL-HANSEN, B., DECARLO, A. & ENGLER, J. A. 1993. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med,* 4**,** 197-250.

BOBIK, A. 2006. Transforming growth factor-betas and vascular disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 26**,** 1712-20.

BOBRYSHEV, Y. V. & LORD, R. S. 2001. Vascular-associated lymphoid tissue (VALT) involvement in aortic aneurysm. *Atherosclerosis,* 154**,** 15-21.

BOGUNOVIC, M., GINHOUX, F., HELFT, J., SHANG, L., HASHIMOTO, D., GRETER, M., LIU, K., JAKUBZICK, C., INGERSOLL, M. A., LEBOEUF, M., STANLEY, E. R., NUSSENZWEIG, M., LIRA, S. A., RANDOLPH, G. J. & MERAD, M. 2009. Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity,* 31**,** 513-25.

BOSMAN, F. T. & STAMENKOVIC, I. 2003. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol,* 200**,** 423-8.

BOUCEK, R. J., GUNJA-SMITH, Z., NOBLE, N. L. & SIMPSON, C. F. 1983. Modulation by propranolol of the lysyl cross-links in aortic elastin and collagen of the aneurysm-prone turkey. *Biochem Pharmacol,* 32**,** 275-80.

BOYTARD, L., SPEAR, R., CHINETTI-GBAGUIDI, G., ACOSTA-MARTIN, A. E., VANHOUTTE, J., LAMBLIN, N., STAELS, B., AMOUYEL, P., HAULON, S. & PINET, F. 2013. Role of proinflammatory CD68(+) mannose receptor(-) macrophages in peroxiredoxin-1 expression and in abdominal aortic aneurysms in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 33**,** 431-8.

BRAUNERSREUTHER, V., ZERNECKE, A., ARNAUD, C., LIEHN, E. A., STEFFENS, S., SHAGDARSUREN, E., BIDZHEKOV, K., BURGER, F., PELLI, G., LUCKOW, B., MACH, F. & WEBER, C. 2007. Ccr5 but not Ccr1 deficiency reduces development of diet-induced atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 27**,** 373-9.

BREWSTER, D. C., CRONENWETT, J. L., HALLETT, J. W., JR., JOHNSTON, K. W., KRUPSKI, W. C., MATSUMURA, J. S., JOINT COUNCIL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR VASCULAR, S. & SOCIETY FOR VASCULAR, S. 2003. Guidelines for the treatment of abdominal aortic aneurysms. Report of a subcommittee of the Joint Council of the American Association for Vascular Surgery and Society for Vascular Surgery. *J Vasc Surg,* 37**,** 1106-17.

BROPHY, C. M., TILSON, J. E. & TILSON, M. D. 1989. Propranolol stimulates the crosslinking of matrix components in skin from the aneurysm-prone blotchy mouse. *J Surg Res,* 46**,** 330-2.

BROWN, W. A., MILLER, R., BIRCH, S. & SCOTT, A. 2003. Is aortic angiography necessary for accurate planning of endovascular aortic aneurysm stents? *Cardiovasc Surg,* 11**,** 1-5.

BROWN, Z., GERRITSEN, M. E., CARLEY, W. W., STRIETER, R. M., KUNKEL, S. L. & WESTWICK, J. 1994. Chemokine gene expression and secretion by cytokine-activated human microvascular endothelial cells. Differential regulation of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in response to interferon-gamma. *Am J Pathol,* 145**,** 913-21.

BROXMEYER, H. E., COOPER, S., HANGOC, G., GAO, J. L. & MURPHY, P. M. 1999. Dominant myelopoietic effector functions mediated by chemokine receptor CCR1. *J Exp Med,* 189**,** 1987-92.

BRUEMMER, D., COLLINS, A. R., NOH, G., WANG, W., TERRITO, M., ARIAS-MAGALLONA, S., FISHBEIN, M. C., BLASCHKE, F., KINTSCHER, U., GRAF, K., LAW, R. E. & HSUEH, W. A. 2003. Angiotensin II-accelerated atherosclerosis and aneurysm formation is attenuated in osteopontin-deficient mice. *J Clin Invest,* 112**,** 1318-31.

BUSUTTIL, R. W., ABOU-ZAMZAM, A. M. & MACHLEDER, H. I. 1980. Collagenase activity of the human aorta. A comparison of patients with and without abdominal aortic aneurysms. *Arch Surg,* 115**,** 1373-8.

CALIGIURI, G., NICOLETTI, A., POIRIER, B. & HANSSON, G. K. 2002. Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice. *J Clin Invest,* 109**,** 745-53.

CALIGIURI, G., ROSSIGNOL, P., JULIA, P., GROYER, E., MOURADIAN, D., URBAIN, D., MISRA, N., OLLIVIER, V., SAPOVAL, M., BOUTOUYRIE, P., KAVERI, S. V., NICOLETTI, A. & LAFONT, A. 2006. Reduced immunoregulatory CD31+ T cells in patients with atherosclerotic abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 26**,** 618-23.

CARMELIET, P., MOONS, L., LIJNEN, R., BAES, M., LEMAITRE, V., TIPPING, P., DREW, A., EECKHOUT, Y., SHAPIRO, S., LUPU, F. & COLLEN, D. 1997. Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nat Genet,* 17**,** 439-44.

CASSIS, L. A., GUPTE, M., THAYER, S., ZHANG, X., CHARNIGO, R., HOWATT, D. A., RATERI, D. L. & DAUGHERTY, A. 2009. ANG II infusion promotes abdominal aortic aneurysms independent of increased blood pressure in hypercholesterolemic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol,* 296**,** H1660-5.

CASTRILLO, A. & TONTONOZ, P. 2004. Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation. *Annu Rev Cell Dev Biol,* 20**,** 455-80.

CHAPMAN, C. M., BEILBY, J. P., MCQUILLAN, B. M., THOMPSON, P. L. & HUNG, J. 2004. Monocyte count, but not C-reactive protein or interleukin-6, is an independent risk marker for subclinical carotid atherosclerosis. *Stroke,* 35**,** 1619-24.

CHARO, I. F. & RANSOHOFF, R. M. 2006. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med,* 354**,** 610-21.

CHIOU, A. C., CHIU, B. & PEARCE, W. H. 2001. Murine aortic aneurysm produced by periarterial application of calcium chloride. *J Surg Res,* 99**,** 371-6.

CHOI, J. H., CHEONG, C., DANDAMUDI, D. B., PARK, C. G., RODRIGUEZ, A., MEHANDRU, S., VELINZON, K., JUNG, I. H., YOO, J. Y., OH, G. T. & STEINMAN, R. M. 2011. Flt3 signaling-dependent dendritic cells protect against atherosclerosis. *Immunity,* 35**,** 819-31.

CHOKE, E., COCKERILL, G., WILSON, W. R., SAYED, S., DAWSON, J., LOFTUS, I. & THOMPSON, M. M. 2005. A review of biological factors implicated in abdominal aortic aneurysm rupture. *Eur J Vasc Endovasc Surg,* 30**,** 227-44.

CHOKE, E., COCKERILL, G. W., DAWSON, J., WILSON, R. W., JONES, A., LOFTUS, I. M. & THOMPSON, M. M. 2006. Increased angiogenesis at the site of abdominal aortic aneurysm rupture. *Ann N Y Acad Sci,* 1085**,** 315-9.

CHONG, C. K. & HOW, T. V. 2004. Flow patterns in an endovascular stent-graft for abdominal aortic aneurysm repair. *J Biomech,* 37**,** 89-97.

CHUNG, A. W., YANG, H. H., RADOMSKI, M. W. & VAN BREEMEN, C. 2008. Long-term doxycycline is more effective than atenolol to prevent thoracic aortic aneurysm in marfan syndrome through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9. *Circ Res,* 102**,** e73-85.

CHUTER, T. A., GREEN, R. M., OURIEL, K., FIORE, W. M. & DEWEESE, J. A. 1993. Transfemoral endovascular aortic graft placement. *J Vasc Surg,* 18**,** 185-95; discussion 195-7.

CNAMTS 2010. « Segmentation des assurés du Régime général », Journées CNAMTS.

COLONNELLO, J. S., HANCE, K. A., SHAMES, M. L., WYBLE, C. W., ZIPORIN, S. J., LEIDENFROST, J. E., ENNIS, T. L., UPCHURCH, G. R., JR. & THOMPSON, R. W. 2003. Transient exposure to elastase induces mouse aortic wall smooth muscle cell production of MCP-1 and RANTES during development of experimental aortic aneurysm. *J Vasc Surg,* 38**,** 138-46.

COMBADIERE, C., POTTEAUX, S., GAO, J. L., ESPOSITO, B., CASANOVA, S., LEE, E. J., DEBRE, P., TEDGUI, A., MURPHY, P. M. & MALLAT, Z. 2003. Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation,* 107**,** 1009-16.

COMBADIERE, C., POTTEAUX, S., RODERO, M., SIMON, T., PEZARD, A., ESPOSITO, B., MERVAL, R., PROUDFOOT, A., TEDGUI, A. & MALLAT, Z. 2008. Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation,* 117**,** 1649-57.

CROFTON, R. W., DIESSELHOFF-DEN DULK, M. M. & VAN FURTH, R. 1978. The origin, kinetics, and characteristics of the Kupffer cells in the normal steady state. *J Exp Med,* 148**,** 1-17.

CRONENWETT, J. L. 1996. Variables that affect the expansion rate and rupture of abdominal aortic aneurysms. *Ann N Y Acad Sci,* 800**,** 56-67.

CROS, J., CAGNARD, N., WOOLLARD, K., PATEY, N., ZHANG, S. Y., SENECHAL, B., PUEL, A., BISWAS, S. K., MOSHOUS, D., PICARD, C., JAIS, J. P., D'CRUZ, D., CASANOVA, J. L., TROUILLET, C. & GEISSMANN, F. 2010. Human CD14dim

monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity,* 33**,** 375-86.

CURCI, J. A., LIAO, S., HUFFMAN, M. D., SHAPIRO, S. D. & THOMPSON, R. W. 1998. Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest,* 102**,** 1900-10.

CURCI, J. A., MAO, D., BOHNER, D. G., ALLEN, B. T., RUBIN, B. G., REILLY, J. M., SICARD, G. A. & THOMPSON, R. W. 2000. Preoperative treatment with doxycycline reduces aortic wall expression and activation of matrix metalloproteinases in patients with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg,* 31**,** 325-42.

DAI, J., LOSY, F., GUINAULT, A. M., PAGES, C., ANEGON, I., DESGRANGES, P., BECQUEMIN, J. P. & ALLAIRE, E. 2005. Overexpression of transforming growth factor-beta1 stabilizes already-formed aortic aneurysms: a first approach to induction of functional healing by endovascular gene therapy. *Circulation,* 112**,** 1008-15.

DAI, J., LOUEDEC, L., PHILIPPE, M., MICHEL, J. B. & HOUARD, X. 2009. Effect of blocking platelet activation with AZD6140 on development of abdominal aortic aneurysm in a rat aneurysmal model. *J Vasc Surg,* 49**,** 719-27.

DAUGHERTY, A. & CASSIS, L. 1999. Chronic angiotensin II infusion promotes atherogenesis in low density lipoprotein receptor -/- mice. *Ann N Y Acad Sci,* 892**,** 108-18.

DAUGHERTY, A. & CASSIS, L. A. 2004. Mouse models of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 24**,** 429-34.

DAUGHERTY, A., MANNING, M. W. & CASSIS, L. A. 2000. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest,* 105**,** 1605-12.

DAUGHERTY, A., RATERI, D. L., CHARO, I. F., OWENS, A. P., HOWATT, D. A. & CASSIS, L. A. 2010. Angiotensin II infusion promotes ascending aortic aneurysms: attenuation by CCR2 deficiency in apoE-/- mice. *Clin Sci (Lond),* 118**,** 681-9.

DE GASPARO, M., CATT, K. J., INAGAMI, T., WRIGHT, J. W. & UNGER, T. 2000. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev,* 52**,** 415-72.

DE KEULENAER, G. W., CHAPPELL, D. C., ISHIZAKA, N., NEREM, R. M., ALEXANDER, R. W. & GRIENDLING, K. K. 1998. Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. *Circ Res,* 82**,** 1094-101.

DE SMEDT, T., PAJAK, B., MURAILLE, E., LESPAGNARD, L., HEINEN, E., DE BAETSELIER, P., URBAIN, J., LEO, O. & MOSER, M. 1996. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med,* 184**,** 1413-24.

DE WAARD, V., BOT, I., DE JAGER, S. C., TALIB, S., EGASHIRA, K., DE VRIES, M. R., QUAX, P. H., BIESSEN, E. A. & VAN BERKEL, T. J. 2010. Systemic MCP1/CCR2 blockade and leukocyte specific MCP1/CCR2 inhibition affect aortic aneurysm formation differently. *Atherosclerosis,* 211**,** 84-9.

DEGUCHI, J. O., HUANG, H., LIBBY, P., AIKAWA, E., WHITTAKER, P., SYLVAN, J., LEE, R. T. & AIKAWA, M. 2009. Genetically engineered resistance for MMP collagenases promotes abdominal aortic aneurysm formation in mice infused with angiotensin II. *Lab Invest,* 89**,** 315-26.

DENG, G. G., MARTIN-MCNULTY, B., SUKOVICH, D. A., FREAY, A., HALKS-MILLER, M., THINNES, T., LOSKUTOFF, D. J., CARMELIET, P., DOLE, W. P. &

WANG, Y. X. 2003. Urokinase-type plasminogen activator plays a critical role in angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm. *Circ Res,* 92**,** 510-7.

DIET, F., PRATT, R. E., BERRY, G. J., MOMOSE, N., GIBBONS, G. H. & DZAU, V. J. 1996. Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. *Circulation,* 94**,** 2756-67.

DIETZ, H. C. 1993. Marfan Syndrome. *In:* PAGON, R. A., ADAM, M. P., ARDINGER, H. H., BIRD, T. D., DOLAN, C. R., FONG, C. T., SMITH, R. J. H. & STEPHENS, K. (eds.) *GeneReviews(R).* Seattle (WA).

DIETZ, H. C., CUTTING, G. R., PYERITZ, R. E., MASLEN, C. L., SAKAI, L. Y., CORSON, G. M., PUFFENBERGER, E. G., HAMOSH, A., NANTHAKUMAR, E. J., CURRISTIN, S. M. & ET AL. 1991. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature,* 352**,** 337-9.

DIMUSTO, P. D., LU, G., GHOSH, A., ROELOFS, K. J., SU, G., ZHAO, Y., LAU, C. L., SADIQ, O., MCEVOY, B., LASER, A., DIAZ, J. A., WAKEFIELD, T. W., HENKE, P. K., ELIASON, J. L. & UPCHURCH, G. R., JR. 2012. Increased PAI-1 in females compared with males is protective for abdominal aortic aneurysm formation in a rodent model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol,* 302**,** H1378-86.

DOBRIN, P. B. 1999. Animal models of aneurysms. *Ann Vasc Surg,* 13**,** 641-8.

DOBRIN, P. B., BAUMGARTNER, N., ANIDJAR, S., CHEJFEC, G. & MRKVICKA, R. 1996. Inflammatory aspects of experimental aneurysms. Effect of methylprednisolone and cyclosporine. *Ann N Y Acad Sci,* 800**,** 74-88.

DOBRIN, P. B. & MRKVICKA, R. 1994. Failure of elastin or collagen as possible critical connective tissue alterations underlying aneurysmal dilatation. *Cardiovasc Surg,* 2**,** 484-8.

DOL, F., MARTIN, G., STAELS, B., MARES, A. M., CAZAUBON, C., NISATO, D., BIDOUARD, J. P., JANIAK, P., SCHAEFFER, P. & HERBERT, J. M. 2001. Angiotensin AT1 receptor antagonist irbesartan decreases lesion size, chemokine expression, and macrophage accumulation in apolipoprotein E-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol,* 38**,** 395-405.

DREVETS, D. A., DILLON, M. J., SCHAWANG, J. S., VAN ROOIJEN, N., EHRCHEN, J., SUNDERKOTTER, C. & LEENEN, P. J. 2004. The Ly-6Chigh monocyte subpopulation transports Listeria monocytogenes into the brain during systemic infection of mice. *J Immunol,* 172**,** 4418-24.

DUBOST, C., ALLARY, M. & OECONOMOS, N. 1951. [Surgical treatment of arterial aneurysms; reestablishment of continuity after excision, by the use of arterial grafts]. *Sem Hop,* 27**,** 2678-85.

EIS, V., LUCKOW, B., VIELHAUER, V., SIVEKE, J. T., LINDE, Y., SEGERER, S., PEREZ DE LEMA, G., COHEN, C. D., KRETZLER, M., MACK, M., HORUK, R., MURPHY, P. M., GAO, J. L., HUDKINS, K. L., ALPERS, C. E., GRONE, H. J., SCHLONDORFF, D. & ANDERS, H. J. 2004. Chemokine receptor CCR1 but not CCR5 mediates leukocyte recruitment and subsequent renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol,* 15**,** 337-47.

ELIAS, J. A., CHIEN, P., GUSTILO, K. M. & SCHREIBER, A. D. 1985. Differential interleukin-1 elaboration by density-defined human monocyte subpopulations. *Blood,* 66**,** 298-301.

ELIASON, J. L., HANNAWA, K. K., AILAWADI, G., SINHA, I., FORD, J. W., DEOGRACIAS, M. P., ROELOFS, K. J., WOODRUM, D. T., ENNIS, T. L., HENKE, P. K., STANLEY, J. C., THOMPSON, R. W. & UPCHURCH, G. R., JR. 2005. Neutrophil depletion inhibits experimental abdominal aortic aneurysm formation. *Circulation,* 112**,** 232-40.

ELKOURI, S., GLOVICZKI, P., MCKUSICK, M. A., PANNETON, J. M., ANDREWS, J., BOWER, T. C., NOEL, A. A., HARMSEN, W. S., HOSKIN, T. L. & CHERRY, K. 2004. Perioperative complications and early outcome after endovascular and open surgical repair of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg,* 39**,** 497-505.

ELMORE, J. R., KEISTER, B. F., FRANKLIN, D. P., YOUKEY, J. R. & CAREY, D. J. 1998. Expression of matrix metalloproteinases and TIMPs in human abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg,* 12**,** 221-8.

ENDO, K., TAKINO, T., MIYAMORI, H., KINSEN, H., YOSHIZAKI, T., FURUKAWA, M. & SATO, H. 2003. Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration. *J Biol Chem,* 278**,** 40764-70.

EPELMAN, S., LAVINE, K. J., BEAUDIN, A. E., SOJKA, D. K., CARRERO, J. A., CALDERON, B., BRIJA, T., GAUTIER, E. L., IVANOV, S., SATPATHY, A. T., SCHILLING, J. D., SCHWENDENER, R., SERGIN, I., RAZANI, B., FORSBERG, E. C., YOKOYAMA, W. M., UNANUE, E. R., COLONNA, M., RANDOLPH, G. J. & MANN, D. L. 2014. Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity,* 40**,** 91-104.

ESA, A. H., NOGA, S. J., DONNENBERG, A. D. & HESS, A. D. 1986. Immunological heterogeneity of human monocyte subsets prepared by counterflow centrifugation elutriation. *Immunology,* 59**,** 95-9.

ESKANDARI, M. K., VIJUNGCO, J. D., FLORES, A., BORENSZTAJN, J., SHIVELY, V. & PEARCE, W. H. 2005. Enhanced abdominal aortic aneurysm in TIMP-1-deficient mice. *J Surg Res,* 123**,** 289-93.

EVANS, J., POWELL, J. T., SCHWALBE, E., LOFTUS, I. M. & THOMPSON, M. M. 2007. Simvastatin attenuates the activity of matrix metalloprotease-9 in aneurysmal aortic tissue. *Eur J Vasc Endovasc Surg,* 34**,** 302-3.

FERRARIO, C. M. & STRAWN, W. B. 2006. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. *Am J Cardiol,* 98**,** 121-8.

FIGDOR, C. G., BONT, W. S., TOUW, I., DE ROOS, J., ROOSNEK, E. E. & DE VRIES, J. E. 1982. Isolation of functionally different human monocytes by counterflow centrifugation elutriation. *Blood,* 60**,** 46-53.

FINGERLE-ROWSON, G., AUERS, J., KREUZER, E., FRAUNBERGER, P., BLUMENSTEIN, M. & ZIEGLER-HEITBROCK, L. H. 1998. Expansion of CD14+CD16+ monocytes in critically ill cardiac surgery patients. *Inflammation,* 22**,** 367-79.

FOGG, D. K., SIBON, C., MILED, C., JUNG, S., AUCOUTURIER, P., LITTMAN, D. R., CUMANO, A. & GEISSMANN, F. 2006. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science,* 311**,** 83-7.

FOLKESSON, M., SILVEIRA, A., ERIKSSON, P. & SWEDENBORG, J. 2011. Protease activity in the multi-layered intra-luminal thrombus of abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis,* 218**,** 294-9.

FONTAINE, V., JACOB, M. P., HOUARD, X., ROSSIGNOL, P., PLISSONNIER, D., ANGLES-CANO, E. & MICHEL, J. B. 2002. Involvement of the mural thrombus as a site of protease release and activation in human aortic aneurysms. *Am J Pathol,* 161**,** 1701-10.

FORESTER, N. D., CRUICKSHANK, S. M., SCOTT, D. J. & CARDING, S. R. 2005. Functional characterization of T cells in abdominal aortic aneurysms. *Immunology,* 115**,** 262-70.

FRANC, N. C., DIMARCQ, J. L., LAGUEUX, M., HOFFMANN, J. & EZEKOWITZ, R. A. 1996. Croquemort, a novel Drosophila hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity,* 4**,** 431-43.

FRANKENBERGER, M., STERNSDORF, T., PECHUMER, H., PFORTE, A. & ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. 1996. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood,* 87**,** 373-7.

FREESTONE, T., TURNER, R. J., COADY, A., HIGMAN, D. J., GREENHALGH, R. M. & POWELL, J. T. 1995. Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 15**,** 1145-51.

FREESTONE, T., TURNER, R. J., HIGMAN, D. J., LEVER, M. J. & POWELL, J. T. 1997. Influence of hypercholesterolemia and adventitial inflammation on the development of aortic aneurysm in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 17**,** 10-7.

GACKO, M. & CHYCZEWSKI, L. 1997. Activity and localization of cathepsin B, D and G in aortic aneurysm. *Int Surg,* 82**,** 398-402.

GACKO, M., CHYCZEWSKI, L. & CHROSTEK, L. 1999. Distribution, activity and concentration of cathepsin B and cystatin C in the wall of aortic aneurysm. *Pol J Pathol,* 50**,** 83-6.

GACKO, M. & GLOWINSKI, S. 1998a. Activities of proteases in parietal thrombus of aortic aneurysm. *Clin Chim Acta,* 271**,** 171-7.

GACKO, M. & GLOWINSKI, S. 1998b. Cathepsin D and cathepsin L activities in aortic aneurysm wall and parietal thrombus. *Clin Chem Lab Med,* 36**,** 449-52.

GADOWSKI, G. R., PILCHER, D. B. & RICCI, M. A. 1994. Abdominal aortic aneurysm expansion rate: effect of size and beta-adrenergic blockade. *J Vasc Surg,* 19**,** 727-31.

GALKINA, E. & LEY, K. 2007. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 27**,** 2292-301.

GALLE, C., SCHANDENE, L., STORDEUR, P., PEIGNOIS, Y., FERREIRA, J., WAUTRECHT, J. C., DEREUME, J. P. & GOLDMAN, M. 2005. Predominance of type 1 CD4+ T cells in human abdominal aortic aneurysm. *Clin Exp Immunol,* 142**,** 519-27.

GALLO, E. M., LOCH, D. C., HABASHI, J. P., CALDERON, J. F., CHEN, Y., BEDJA, D., VAN ERP, C., GERBER, E. E., PARKER, S. J., SAULS, K., JUDGE, D. P., COOKE, S. K., LINDSAY, M. E., ROUF, R., MYERS, L., AP RHYS, C. M., KENT, K. C., NORRIS, R. A., HUSO, D. L. & DIETZ, H. C. 2014. Angiotensin II-dependent TGF-beta signaling contributes to Loeys-Dietz syndrome vascular pathogenesis. *J Clin Invest,* 124**,** 448-60.

GAO, J. L., WYNN, T. A., CHANG, Y., LEE, E. J., BROXMEYER, H. E., COOPER, S., TIFFANY, H. L., WESTPHAL, H., KWON-CHUNG, J. & MURPHY, P. M. 1997. Impaired host defense, hematopoiesis, granulomatous inflammation and type 1-type 2 cytokine balance in mice lacking CC chemokine receptor 1. *J Exp Med,* 185**,** 1959-68.

GAUTIER, E. L., JAKUBZICK, C. & RANDOLPH, G. J. 2009. Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 29**,** 1412-8.

GAVISH, L., RUBINSTEIN, C., BERLATZKY, Y., GAVISH, L. Y., BEERI, R., GILON, D., BULUT, A., HARLEV, M., REISSMAN, P. & GERTZ, S. D. 2012. Low level laser arrests abdominal aortic aneurysm by collagen matrix reinforcement in apolipoprotein E-deficient mice. *Lasers Surg Med,* 44**,** 664-74.

GAVISH, L., RUBINSTEIN, C., BULUT, A., BERLATZKY, Y., BEERI, R., GILON, D., GAVISH, L., HARLEV, M., REISSMAN, P. & GERTZ, S. D. 2009. Low-level laser irradiation inhibits abdominal aortic aneurysm progression in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovasc Res,* 83**,** 785-92.

GAVRILA, D., LI, W. G., MCCORMICK, M. L., THOMAS, M., DAUGHERTY, A., CASSIS, L. A., MILLER, F. J., JR., OBERLEY, L. W., DELLSPERGER, K. C. & WEINTRAUB, N. L. 2005. Vitamin E inhibits abdominal aortic aneurysm formation in angiotensin II-infused apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 25**,** 1671-7.

GEISSMANN, F., AUFFRAY, C., PALFRAMAN, R., WIRRIG, C., CIOCCA, A., CAMPISI, L., NARNI-MANCINELLI, E. & LAUVAU, G. 2008. Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol Cell Biol,* 86**,** 398-408.

GEISSMANN, F., GORDON, S., HUME, D. A., MOWAT, A. M. & RANDOLPH, G. J. 2010a. Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nat Rev Immunol,* 10**,** 453-60.

GEISSMANN, F., JUNG, S. & LITTMAN, D. R. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity,* 19**,** 71-82.

GEISSMANN, F., MANZ, M. G., JUNG, S., SIEWEKE, M. H., MERAD, M. & LEY, K. 2010b. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science,* 327**,** 656-61.

GERARD, C., FROSSARD, J. L., BHATIA, M., SALUJA, A., GERARD, N. P., LU, B. & STEER, M. 1997. Targeted disruption of the beta-chemokine receptor CCR1 protects against pancreatitis-associated lung injury. *J Clin Invest,* 100**,** 2022-7.

GERTZ, S. D., KURGAN, A. & EISENBERG, D. 1988. Aneurysm of the rabbit common carotid artery induced by periarterial application of calcium chloride in vivo. *J Clin Invest,* 81**,** 649-56.

GHIGLIOTTI, G., BARISIONE, C., GARIBALDI, S., BRUNELLI, C., PALMIERI, D., SPINELLA, G., PANE, B., SPALLAROSSA, P., ALTIERI, P., FABBI, P., SAMBUCETI, G. & PALOMBO, D. 2013. CD16(+) monocyte subsets are increased in large abdominal aortic aneurysms and are differentially related with circulating and cell-associated biochemical and inflammatory biomarkers. *Dis Markers,* 34**,** 131-42.

GILROY, D. W., LAWRENCE, T., PERRETTI, M. & ROSSI, A. G. 2004. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov,* 3**,** 401-16.

GINHOUX, F., GRETER, M., LEBOEUF, M., NANDI, S., SEE, P., GOKHAN, S., MEHLER, M. F., CONWAY, S. J., NG, L. G., STANLEY, E. R., SAMOKHVALOV, I. M. & MERAD, M. 2010. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science,* 330**,** 841-5.

GINHOUX, F., TACKE, F., ANGELI, V., BOGUNOVIC, M., LOUBEAU, M., DAI, X. M., STANLEY, E. R., RANDOLPH, G. J. & MERAD, M. 2006. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol,* 7**,** 265-73.

GOLLEDGE, J., KARAN, M., MORAN, C. S., MULLER, J., CLANCY, P., DEAR, A. E. & NORMAN, P. E. 2008. Reduced expansion rate of abdominal aortic aneurysms in patients with diabetes may be related to aberrant monocyte-matrix interactions. *Eur Heart J,* 29**,** 665-72.

GOLLEDGE, J. & NORMAN, P. E. 2010. Atherosclerosis and abdominal aortic aneurysm: cause, response, or common risk factors? *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 30**,** 1075-7.

GOLLEDGE, J. & POWELL, J. T. 2007. Medical management of abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg,* 34**,** 267-73.

GOMEZ, D., AL HAJ ZEN, A., BORGES, L. F., PHILIPPE, M., GUTIERREZ, P. S., JONDEAU, G., MICHEL, J. B. & VRANCKX, R. 2009. Syndromic and non-syndromic aneurysms of the human ascending aorta share activation of the Smad2 pathway. *J Pathol,* 218**,** 131-42.

GOMEZ, D. E., ALONSO, D. F., YOSHIJI, H. & THORGEIRSSON, U. P. 1997. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol,* 74**,** 111-22.

GOMIS-RUTH, F. X., MASKOS, K., BETZ, M., BERGNER, A., HUBER, R., SUZUKI, K., YOSHIDA, N., NAGASE, H., BREW, K., BOURENKOV, G. P., BARTUNIK, H. & BODE, W. 1997. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature,* 389**,** 77-81.

GOODALL, S., CROWTHER, M., HEMINGWAY, D. M., BELL, P. R. & THOMPSON, M. M. 2001. Ubiquitous elevation of matrix metalloproteinase-2 expression in the vasculature of patients with abdominal aneurysms. *Circulation,* 104**,** 304-9.

GORDON, S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol,* 3**,** 23-35.

GORDON, S. 2007. The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol,* 37 Suppl 1**,** S9-17.

GORDON, S. & TAYLOR, P. R. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol,* 5**,** 953-64.

GRAGE-GRIEBENOW, E., FLAD, H. D. & ERNST, M. 2001. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol,* 69**,** 11-20.

GREGORY, A. K., YIN, N. X., CAPELLA, J., XIA, S., NEWMAN, K. M. & TILSON, M. D. 1996. Features of autoimmunity in the abdominal aortic aneurysm. *Arch Surg,* 131**,** 85-8.

GUILLIAMS, M., GINHOUX, F., JAKUBZICK, C., NAIK, S. H., ONAI, N., SCHRAML, B. U., SEGURA, E., TUSSIWAND, R. & YONA, S. 2014. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol,* 14**,** 571-8.

HABASHI, J. P., JUDGE, D. P., HOLM, T. M., COHN, R. D., LOEYS, B. L., COOPER, T. K., MYERS, L., KLEIN, E. C., LIU, G., CALVI, C., PODOWSKI, M., NEPTUNE, E. R., HALUSHKA, M. K., BEDJA, D., GABRIELSON, K., RIFKIN, D. B., CARTA, L., RAMIREZ, F., HUSO, D. L. & DIETZ, H. C. 2006. Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science,* 312**,** 117-21.

HACKAM, D. G., THIRUCHELVAM, D. & REDELMEIER, D. A. 2006. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and aortic rupture: a population-based case-control study. *Lancet,* 368**,** 659-65.

HAHN, A. W., JONAS, U., BUHLER, F. R. & RESINK, T. J. 1994. Activation of human peripheral monocytes by angiotensin II. *FEBS Lett,* 347**,** 178-80.

HAMERS, A. A., VOS, M., RASSAM, F., MARINKOVIC, G., KURAKULA, K., VAN GORP, P. J., DE WINTHER, M. P., GIJBELS, M. J., DE WAARD, V. & DE VRIES, C. J. 2012. Bone marrow-specific deficiency of nuclear receptor Nur77 enhances atherosclerosis. *Circ Res,* 110**,** 428-38.

HAMILTON, J. A. & ACHUTHAN, A. 2013. Colony stimulating factors and myeloid cell biology in health and disease. *Trends Immunol,* 34**,** 81-9.

HANCE, K. A., TATARIA, M., ZIPORIN, S. J., LEE, J. K. & THOMPSON, R. W. 2002. Monocyte chemotactic activity in human abdominal aortic aneurysms: role of elastin degradation peptides and the 67-kD cell surface elastin receptor. *J Vasc Surg,* 35**,** 254-61.

HANNA, R. N., CARLIN, L. M., HUBBELING, H. G., NACKIEWICZ, D., GREEN, A. M., PUNT, J. A., GEISSMANN, F. & HEDRICK, C. C. 2011. The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C- monocytes. *Nat Immunol,* 12**,** 778-85.

HANNA, R. N., SHAKED, I., HUBBELING, H. G., PUNT, J. A., WU, R., HERRLEY, E., ZAUGG, C., PEI, H., GEISSMANN, F., LEY, K. & HEDRICK, C. C. 2012. NR4A1 (Nur77) deletion polarizes macrophages toward an inflammatory phenotype and increases atherosclerosis. *Circ Res,* 110**,** 416-27.

HANNAWA, K. K., ELIASON, J. L., WOODRUM, D. T., PEARCE, C. G., ROELOFS, K. J., GRIGORYANTS, V., EAGLETON, M. J., HENKE, P. K., WAKEFIELD, T. W., MYERS, D. D., STANLEY, J. C. & UPCHURCH, G. R., JR. 2005. L-selectin-mediated neutrophil recruitment in experimental rodent aneurysm formation. *Circulation,* 112**,** 241-7.

HARTER, L. P., GROSS, B. H., CALLEN, P. W. & BARTH, R. A. 1982. Ultrasonic evaluation of abdominal aortic thrombus. *J Ultrasound Med,* 1**,** 315-8.

HAUSER, S. L., WAUBANT, E., ARNOLD, D. L., VOLLMER, T., ANTEL, J., FOX, R. J., BAR-OR, A., PANZARA, M., SARKAR, N., AGARWAL, S., LANGER-GOULD, A., SMITH, C. H. & GROUP, H. T. 2008. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med,* 358**,** 676-88.

HAYAKAWA, T., YAMASHITA, K., OHUCHI, E. & SHINAGAWA, A. 1994. Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J Cell Sci,* 107 (Pt 9)**,** 2373-9.

HAYAKAWA, T., YAMASHITA, K., TANZAWA, K., UCHIJIMA, E. & IWATA, K. 1992. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett,* 298**,** 29-32.

HAYASHIDANI, S., TSUTSUI, H., IKEUCHI, M., SHIOMI, T., MATSUSAKA, H., KUBOTA, T., IMANAKA-YOSHIDA, K., ITOH, T. & TAKESHITA, A. 2003. Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol,* 285**,** H1229-35.

HELLENTHAL, F. A., BUURMAN, W. A., WODZIG, W. K. & SCHURINK, G. W. 2009. Biomarkers of abdominal aortic aneurysm progression. Part 2: inflammation. *Nat Rev Cardiol,* 6**,** 543-52.

HENDERSON, E. L., GENG, Y. J., SUKHOVA, G. K., WHITTEMORE, A. D., KNOX, J. & LIBBY, P. 1999. Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms. *Circulation,* 99**,** 96-104.

HEYMANS, S., LUTTUN, A., NUYENS, D., THEILMEIER, G., CREEMERS, E., MOONS, L., DYSPERSIN, G. D., CLEUTJENS, J. P., SHIPLEY, M., ANGELLILO, A., LEVI, M., NUBE, O., BAKER, A., KESHET, E., LUPU, F., HERBERT, J. M., SMITS, J. F., SHAPIRO, S. D., BAES, M., BORGERS, M., COLLEN, D., DAEMEN, M. J. & CARMELIET, P. 1999. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med,* 5**,** 1135-42.

HILGENDORF, I., GERHARDT, L. M., TAN, T. C., WINTER, C., HOLDERRIED, T. A., CHOUSTERMAN, B. G., IWAMOTO, Y., LIAO, R., ZIRLIK, A., SCHERER-CROSBIE, M., HEDRICK, C. C., LIBBY, P., NAHRENDORF, M., WEISSLEDER, R. & SWIRSKI, F. K. 2014. Ly-6Chigh monocytes depend on Nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium. *Circ Res,* 114**,** 1611-22.

HIRSCH, A. T., HASKAL, Z. J., HERTZER, N. R., BAKAL, C. W., CREAGER, M. A., HALPERIN, J. L., HIRATZKA, L. F., MURPHY, W. R., OLIN, J. W., PUSCHETT, J. B., ROSENFIELD, K. A., SACKS, D., STANLEY, J. C., TAYLOR, L. M., JR., WHITE, C. J., WHITE, J., WHITE, R. A., ANTMAN, E. M., SMITH, S. C., JR., ADAMS, C. D., ANDERSON, J. L., FAXON, D. P., FUSTER, V., GIBBONS, R. J.,

HUNT, S. A., JACOBS, A. K., NISHIMURA, R., ORNATO, J. P., PAGE, R. L., RIEGEL, B., AMERICAN ASSOCIATION FOR VASCULAR, S., SOCIETY FOR VASCULAR, S., SOCIETY FOR CARDIOVASCULAR, A., INTERVENTIONS, SOCIETY FOR VASCULAR, M., BIOLOGY, SOCIETY OF INTERVENTIONAL, R., DISEASE, A. A. T. F. O. P. G. W. C. T. D. G. F. T. M. O. P. W. P. A., AMERICAN ASSOCIATION OF, C., PULMONARY, R., NATIONAL HEART, L., BLOOD, I., SOCIETY FOR VASCULAR, N., TRANSATLANTIC INTER-SOCIETY, C. & VASCULAR DISEASE, F. 2006. ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. *Circulation,* 113**,** e463-654.

HOBEIKA, M. J., THOMPSON, R. W., MUHS, B. E., BROOKS, P. C. & GAGNE, P. J. 2007. Matrix metalloproteinases in peripheral vascular disease. *J Vasc Surg,* 45**,** 849-57.

HOLMES, D. R., PETRINEC, D., WESTER, W., THOMPSON, R. W. & REILLY, J. M. 1996. Indomethacin prevents elastase-induced abdominal aortic aneurysms in the rat. *J Surg Res,* 63**,** 305-9.

HORELT, A., BELGE, K. U., STEPPICH, B., PRINZ, J. & ZIEGLER-HEITBROCK, L. 2002. The CD14+CD16+ monocytes in erysipelas are expanded and show reduced cytokine production. *Eur J Immunol,* 32**,** 1319-27.

HOSHINA, K., KOYAMA, H., MIYATA, T., SHIGEMATSU, H., TAKATO, T., DALMAN, R. L. & NAGAWA, H. 2004. Aortic wall cell proliferation via basic fibroblast growth factor gene transfer limits progression of experimental abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg,* 40**,** 512-8.

HOUARD, X., OLLIVIER, V., LOUEDEC, L., MICHEL, J. B. & BACK, M. 2009a. Differential inflammatory activity across human abdominal aortic aneurysms reveals neutrophil-derived leukotriene B4 as a major chemotactic factor released from the intraluminal thrombus. *FASEB J,* 23**,** 1376-83.

HOUARD, X., ROUZET, F., TOUAT, Z., PHILIPPE, M., DOMINGUEZ, M., FONTAINE, V., SARDA-MANTEL, L., MEULEMANS, A., LE GULUDEC, D., MEILHAC, O. & MICHEL, J. B. 2007. Topology of the fibrinolytic system within the mural thrombus of human abdominal aortic aneurysms. *J Pathol,* 212**,** 20-8.

HOUARD, X., TOUAT, Z., OLLIVIER, V., LOUEDEC, L., PHILIPPE, M., SEBBAG, U., MEILHAC, O., ROSSIGNOL, P. & MICHEL, J. B. 2009b. Mediators of neutrophil recruitment in human abdominal aortic aneurysms. *Cardiovasc Res,* 82**,** 532-41.

HOVSEPIAN, D. M., ZIPORIN, S. J., SAKURAI, M. K., LEE, J. K., CURCI, J. A. & THOMPSON, R. W. 2000. Elevated plasma levels of matrix metalloproteinase-9 in patients with abdominal aortic aneurysms: a circulating marker of degenerative aneurysm disease. *J Vasc Interv Radiol,* 11**,** 1345-52.

HU, C. Y., RODRIGUEZ-PINTO, D., DU, W., AHUJA, A., HENEGARIU, O., WONG, F. S., SHLOMCHIK, M. J. & WEN, L. 2007. Treatment with CD20-specific antibody prevents and reverses autoimmune diabetes in mice. *J Clin Invest,* 117**,** 3857-67.

HU, Y., ZHANG, Z., TORSNEY, E., AFZAL, A. R., DAVISON, F., METZLER, B. & XU, Q. 2004. Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. *J Clin Invest,* 113**,** 1258-65.

HUNGERFORD, J. E. & LITTLE, C. D. 1999. Developmental biology of the vascular smooth muscle cell: building a multilayered vessel wall. *J Vasc Res,* 36**,** 2-27.

HURKS, R., HOEFER, I. E., VINK, A., PASTERKAMP, G., SCHONEVELD, A., KERVER, M., DE VRIES, J. P., TANGELDER, M. J. & MOLL, F. L. 2010. Different effects of commonly prescribed statins on abdominal aortic aneurysm wall biology. *Eur J Vasc Endovasc Surg,* 39**,** 569-76.

IKONOMIDIS, J. S., BARBOUR, J. R., AMANI, Z., STROUD, R. E., HERRON, A. R., MCCLISTER, D. M., JR., CAMENS, S. E., LINDSEY, M. L., MUKHERJEE, R. & SPINALE, F. G. 2005. Effects of deletion of the matrix metalloproteinase 9 gene on development of murine thoracic aortic aneurysms. *Circulation,* 112**,** I242-8.

INGERSOLL, M. A., SPANBROEK, R., LOTTAZ, C., GAUTIER, E. L., FRANKENBERGER, M., HOFFMANN, R., LANG, R., HANIFFA, M., COLLIN, M., TACKE, F., HABENICHT, A. J., ZIEGLER-HEITBROCK, L. & RANDOLPH, G. J. 2010. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood,* 115**,** e10-9.

INOUE, N., MURAMATSU, M., JIN, D., TAKAI, S., HAYASHI, T., KATAYAMA, H., KITAURA, Y., TAMAI, H. & MIYAZAKI, M. 2009. Involvement of vascular angiotensin II-forming enzymes in the progression of aortic abdominal aneurysms in angiotensin II- infused ApoE-deficient mice. *J Atheroscler Thromb,* 16**,** 164-71.

IRIZARRY, E., NEWMAN, K. M., GANDHI, R. H., NACKMAN, G. B., HALPERN, V., WISHNER, S., SCHOLES, J. V. & TILSON, M. D. 1993. Demonstration of interstitial collagenase in abdominal aortic aneurysm disease. *J Surg Res,* 54**,** 571-4.

ISENBURG, J. C., SIMIONESCU, D. T., STARCHER, B. C. & VYAVAHARE, N. R. 2007. Elastin stabilization for treatment of abdominal aortic aneurysms. *Circulation,* 115**,** 1729-37.

IWAI, N., INAGAMI, T., OHMICHI, N. & KINOSHITA, M. 1996. Renin is expressed in rat macrophage/monocyte cells. *Hypertension,* 27**,** 399-403.

IWASAKI, H. & AKASHI, K. 2007. Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. *Immunity,* 26**,** 726-40.

JACOB, M. P. 2003. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother,* 57**,** 195-202.

JACOB, T., HINGORANI, A. & ASCHER, E. 2001. Examination of the apoptotic pathway and proteolysis in the pathogenesis of popliteal artery aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg,* 22**,** 77-85.

JEAN-CLAUDE, J., NEWMAN, K. M., LI, H., GREGORY, A. K. & TILSON, M. D. 1994. Possible key role for plasmin in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Surgery,* 116**,** 472-8.

JIA, T., SERBINA, N. V., BRANDL, K., ZHONG, M. X., LEINER, I. M., CHARO, I. F. & PAMER, E. G. 2008. Additive roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-mediated recruitment of inflammatory monocytes during Listeria monocytogenes infection. *J Immunol,* 180**,** 6846-53.

JOHNSEN, S. H., FORSDAHL, S. H., SINGH, K. & JACOBSEN, B. K. 2010. Atherosclerosis in abdominal aortic aneurysms: a causal event or a process running in parallel? The Tromso study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 30**,** 1263-8.

JOHNSTON, K. W., RUTHERFORD, R. B., TILSON, M. D., SHAH, D. M., HOLLIER, L. & STANLEY, J. C. 1991. Suggested standards for reporting on arterial aneurysms.

Subcommittee on Reporting Standards for Arterial Aneurysms, Ad Hoc Committee on Reporting Standards, Society for Vascular Surgery and North American Chapter, International Society for Cardiovascular Surgery. *J Vasc Surg,* 13**,** 452-8.

JUDGE, D. P., BIERY, N. J., KEENE, D. R., GEUBTNER, J., MYERS, L., HUSO, D. L., SAKAI, L. Y. & DIETZ, H. C. 2004. Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome. *J Clin Invest,* 114**,** 172-81.

JUNG, S., ALIBERTI, J., GRAEMMEL, P., SUNSHINE, M. J., KREUTZBERG, G. W., SHER, A. & LITTMAN, D. R. 2000. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol,* 20**,** 4106-14.

JUVONEN, J., SURCEL, H. M., SATTA, J., TEPPO, A. M., BLOIGU, A., SYRJALA, H., AIRAKSINEN, J., LEINONEN, M., SAIKKU, P. & JUVONEN, T. 1997. Elevated circulating levels of inflammatory cytokines in patients with abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 17**,** 2843-7.

KARLSSON, L., GNARPE, J., BERGQVIST, D., LINDBACK, J. & PARSSON, H. 2009. The effect of azithromycin and Chlamydophilia pneumonia infection on expansion of small abdominal aortic aneurysms--a prospective randomized double-blind trial. *J Vasc Surg,* 50**,** 23-9.

KATRANCIOGLU, N., MANDUZ, S., KARAHAN, O., YILMAZ, M. B., SEZGIN, I., BAGCI, G. & BERKAN, O. 2011. The role of the CCR2 gene polymorphism in abdominal aortic aneurysms. *Angiology,* 62**,** 140-3.

KAUFMANN, A., SALENTIN, R., GEMSA, D. & SPRENGER, H. 2001. Increase of CCR1 and CCR5 expression and enhanced functional response to MIP-1 alpha during differentiation of human monocytes to macrophages. *J Leukoc Biol,* 69**,** 248-52.

KAZI, M., THYBERG, J., RELIGA, P., ROY, J., ERIKSSON, P., HEDIN, U. & SWEDENBORG, J. 2003. Influence of intraluminal thrombus on structural and cellular composition of abdominal aortic aneurysm wall. *J Vasc Surg,* 38**,** 1283-92.

KEIDAR, S. 1998. Angiotensin, LDL peroxidation and atherosclerosis. *Life Sci,* 63**,** 1-11.

KINTSCHER, U., WAKINO, S., KIM, S., FLECK, E., HSUEH, W. A. & LAW, R. E. 2001. Angiotensin II induces migration and Pyk2/paxillin phosphorylation of human monocytes. *Hypertension,* 37**,** 587-93.

KLEINSTREUER, C., LI, Z. & FARBER, M. A. 2007. Fluid-structure interaction analyses of stented abdominal aortic aneurysms. *Annu Rev Biomed Eng,* 9**,** 169-204.

KNOX, J. B., SUKHOVA, G. K., WHITTEMORE, A. D. & LIBBY, P. 1997. Evidence for altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in human aortic diseases. *Circulation,* 95**,** 205-12.

KOCH, A. E., HAINES, G. K., RIZZO, R. J., RADOSEVICH, J. A., POPE, R. M., ROBINSON, P. G. & PEARCE, W. H. 1990. Human abdominal aortic aneurysms. Immunophenotypic analysis suggesting an immune-mediated response. *Am J Pathol,* 137**,** 1199-213.

KOCH, A. E., KUNKEL, S. L., PEARCE, W. H., SHAH, M. R., PARIKH, D., EVANOFF, H. L., HAINES, G. K., BURDICK, M. D. & STRIETER, R. M. 1993. Enhanced production of the chemotactic cytokines interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 in human abdominal aortic aneurysms. *Am J Pathol,* 142**,** 1423-31.

KUIJPER, P. H., GALLARDO TORRES, H. I., LAMMERS, J. W., SIXMA, J. J., KOENDERMAN, L. & ZWAGINGA, J. J. 1997. Platelet and fibrin deposition at the damaged vessel wall: cooperative substrates for neutrophil adhesion under flow conditions. *Blood,* 89**,** 166-75.

KURIHARA, T., WARR, G., LOY, J. & BRAVO, R. 1997. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med,* 186**,** 1757-62.

KUZIEL, W. A., MORGAN, S. J., DAWSON, T. C., GRIFFIN, S., SMITHIES, O., LEY, K. & MAEDA, N. 1997. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 94**,** 12053-8.

KYAW, T., TAY, C., KHAN, A., DUMOUCHEL, V., CAO, A., TO, K., KEHRY, M., DUNN, R., AGROTIS, A., TIPPING, P., BOBIK, A. & TOH, B. H. 2010. Conventional B2 B cell depletion ameliorates whereas its adoptive transfer aggravates atherosclerosis. *J Immunol,* 185**,** 4410-9.

LABAT-ROBERT, J. & ROBERT, L. 2005. Introduction: matrix biology in the 21st century. From a static-rheological role to a dynamic-signaling function. *Pathol Biol (Paris),* 53**,** 369-71.

LANDSMAN, L., BAR-ON, L., ZERNECKE, A., KIM, K. W., KRAUTHGAMER, R., SHAGDARSUREN, E., LIRA, S. A., WEISSMAN, I. L., WEBER, C. & JUNG, S. 2009. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood,* 113**,** 963-72.

LANDSMAN, L., VAROL, C. & JUNG, S. 2007. Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung. *J Immunol,* 178**,** 2000-7.

LAURIE, G. W., BING, J. T., KLEINMAN, H. K., HASSELL, J. R., AUMAILLEY, M., MARTIN, G. R. & FELDMANN, R. J. 1986. Localization of binding sites for laminin, heparan sulfate proteoglycan and fibronectin on basement membrane (type IV) collagen. *J Mol Biol,* 189**,** 205-16.

LAWRENCE, T., WILLOUGHBY, D. A. & GILROY, D. W. 2002. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol,* 2**,** 787-95.

LE BORGNE, M., ETCHART, N., GOUBIER, A., LIRA, S. A., SIRARD, J. C., VAN ROOIJEN, N., CAUX, C., AIT-YAHIA, S., VICARI, A., KAISERLIAN, D. & DUBOIS, B. 2006. Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8+ T cell crosspriming in vivo. *Immunity,* 24**,** 191-201.

LEACH, S. D., TOOLE, A. L., STERN, H., DENATALE, R. W. & TILSON, M. D. 1988. Effect of beta-adrenergic blockade on the growth rate of abdominal aortic aneurysms. *Arch Surg,* 123**,** 606-9.

LEDERLE, F. A., JOHNSON, G. R., WILSON, S. E., ANEURYSM, D. & MANAGEMENT VETERANS AFFAIRS COOPERATIVE, S. 2001. Abdominal aortic aneurysm in women. *J Vasc Surg,* 34**,** 122-6.

LEDERLE, F. A., JOHNSON, G. R., WILSON, S. E., GORDON, I. L., CHUTE, E. P., LITTOOY, F. N., KRUPSKI, W. C., BANDYK, D., BARONE, G. W., GRAHAM, L. M., HYE, R. J. & REINKE, D. B. 1997. Relationship of age, gender, race, and body size to infrarenal aortic diameter. The Aneurysm Detection and Management (ADAM) Veterans Affairs Cooperative Study Investigators. *J Vasc Surg,* 26**,** 595-601.

LEDERLE, F. A. & TAYLOR, B. C. 2006. ACE inhibitors and aortic rupture. *Lancet,* 368**,** 1571; author reply 1572.

LEDERLE, F. A., WILSON, S. E., JOHNSON, G. R., REINKE, D. B., LITTOOY, F. N., ACHER, C. W., BALLARD, D. J., MESSINA, L. M., GORDON, I. L., CHUTE, E. P., KRUPSKI, W. C., BUSUTTIL, S. J., BARONE, G. W., SPARKS, S., GRAHAM, L. M., RAPP, J. H., MAKAROUN, M. S., MONETA, G. L., CAMBRIA, R. A., MAKHOUL, R. G., ETON, D., ANSEL, H. J., FREISCHLAG, J. A., BANDYK, D.,

ANEURYSM, D. & MANAGEMENT VETERANS AFFAIRS COOPERATIVE STUDY, G. 2002. Immediate repair compared with surveillance of small abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med,* 346**,** 1437-44.

LEE, A. J., FOWKES, F. G., CARSON, M. N., LENG, G. C. & ALLAN, P. L. 1997. Smoking, atherosclerosis and risk of abdominal aortic aneurysm. *Eur Heart J,* 18**,** 671-6.

LEMAITRE, V., KIM, H. E., FORNEY-PRESCOTT, M., OKADA, Y. & D'ARMIENTO, J. 2009. Transgenic expression of matrix metalloproteinase-9 modulates collagen deposition in a mouse model of atherosclerosis. *Atherosclerosis,* 205**,** 107-12.

LEMAITRE, V., SOLOWAY, P. D. & D'ARMIENTO, J. 2003. Increased medial degradation with pseudo-aneurysm formation in apolipoprotein E-knockout mice deficient in tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Circulation,* 107**,** 333-8.

LESAUSKAITE, V., EPISTOLATO, M. C., CASTAGNINI, M., URBONAVICIUS, S. & TANGANELLI, P. 2006. Expression of matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors, and osteopontin in the wall of thoracic and abdominal aortas with dilatative pathology. *Hum Pathol,* 37**,** 1076-84.

LESNIK, P., HASKELL, C. A. & CHARO, I. F. 2003. Decreased atherosclerosis in CX3CR1-/- mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J Clin Invest,* 111**,** 333-40.

LEUSCHNER, F., RAUCH, P. J., UENO, T., GORBATOV, R., MARINELLI, B., LEE, W. W., DUTTA, P., WEI, Y., ROBBINS, C., IWAMOTO, Y., SENA, B., CHUDNOVSKIY, A., PANIZZI, P., KELIHER, E., HIGGINS, J. M., LIBBY, P., MOSKOWITZ, M. A., PITTET, M. J., SWIRSKI, F. K., WEISSLEDER, R. & NAHRENDORF, M. 2012. Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopoiesis. *J Exp Med,* 209**,** 123-37.

LI, Y., SHAO, A. Z., JIANG, H. T., DONG, G. H., XU, B., YI, J. & JING, H. 2010. The prominent expression of plasma matrix metalloproteinase-8 in acute thoracic aortic dissection. *J Surg Res,* 163**,** e99-104.

LI, Z. & KLEINSTREUER, C. 2006. Computational analysis of type II endoleaks in a stented abdominal aortic aneurysm model. *J Biomech,* 39**,** 2573-82.

LIAO, S., CURCI, J. A., KELLEY, B. J., SICARD, G. A. & THOMPSON, R. W. 2000. Accelerated replicative senescence of medial smooth muscle cells derived from abdominal aortic aneurysms compared to the adjacent inferior mesenteric artery. *J Surg Res,* 92**,** 85-95.

LIBBY, P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature,* 420**,** 868-74.

LIJNEN, H. R. 2001. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost,* 86**,** 324-33.

LINDEMAN, J. H., ABDUL-HUSSIEN, H., SCHAAPHERDER, A. F., VAN BOCKEL, J. H., VON DER THUSEN, J. H., ROELEN, D. L. & KLEEMANN, R. 2008. Enhanced expression and activation of pro-inflammatory transcription factors distinguish aneurysmal from atherosclerotic aorta: IL-6- and IL-8-dominated inflammatory responses prevail in the human aneurysm. *Clin Sci (Lond),* 114**,** 687-97.

LINDEMAN, J. H., ABDUL-HUSSIEN, H., VAN BOCKEL, J. H., WOLTERBEEK, R. & KLEEMANN, R. 2009. Clinical trial of doxycycline for matrix metalloproteinase-9 inhibition in patients with an abdominal aneurysm: doxycycline selectively depletes aortic wall neutrophils and cytotoxic T cells. *Circulation,* 119**,** 2209-16.

LINDEMAN, J. H., ASHCROFT, B. A., BEENAKKER, J. W., VAN ES, M., KOEKKOEK, N. B., PRINS, F. A., TIELEMANS, J. F., ABDUL-HUSSIEN, H., BANK, R. A. & OOSTERKAMP, T. H. 2010. Distinct defects in collagen microarchitecture underlie

vessel-wall failure in advanced abdominal aneurysms and aneurysms in Marfan syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 107**,** 862-5.

LINDHOLT, J. S., ASHTON, H. A. & SCOTT, R. A. 2001a. Indicators of infection with Chlamydia pneumoniae are associated with expansion of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg,* 34**,** 212-5.

LINDHOLT, J. S., ERLANDSEN, E. J. & HENNEBERG, E. W. 2001b. Cystatin C deficiency is associated with the progression of small abdominal aortic aneurysms. *Br J Surg,* 88**,** 1472-5.

LINDHOLT, J. S., JORGENSEN, B., FASTING, H. & HENNEBERG, E. W. 2001c. Plasma levels of plasmin-antiplasmin-complexes are predictive for small abdominal aortic aneurysms expanding to operation-recommendable sizes. *J Vasc Surg,* 34**,** 611-5.

LINDHOLT, J. S. & SHI, G. P. 2006. Chronic inflammation, immune response, and infection in abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg,* 31**,** 453-63.

LINDHOLT, J. S., VAMMEN, S., FASTING, H., HENNEBERG, E. W. & HEICKENDORFF, L. 2000. The plasma level of matrix metalloproteinase 9 may predict the natural history of small abdominal aortic aneurysms. A preliminary study. *Eur J Vasc Endovasc Surg,* 20**,** 281-5.

LINDSAY, M. E. & DIETZ, H. C. 2011. Lessons on the pathogenesis of aneurysm from heritable conditions. *Nature,* 473**,** 308-16.

LINDSAY, M. E., SCHEPERS, D., BOLAR, N. A., DOYLE, J. J., GALLO, E., FERT-BOBER, J., KEMPERS, M. J., FISHMAN, E. K., CHEN, Y., MYERS, L., BJEDA, D., OSWALD, G., ELIAS, A. F., LEVY, H. P., ANDERLID, B. M., YANG, M. H., BONGERS, E. M., TIMMERMANS, J., BRAVERMAN, A. C., CANHAM, N., MORTIER, G. R., BRUNNER, H. G., BYERS, P. H., VAN EYK, J., VAN LAER, L., DIETZ, H. C. & LOEYS, B. L. 2012. Loss-of-function mutations in TGFB2 cause a syndromic presentation of thoracic aortic aneurysm. *Nat Genet,* 44**,** 922-7.

LIPINSKI, M. J., PERRY, H. M., DORAN, A. C., OLDHAM, S. N. & MCNAMARA, C. A. 2011. Comment on "Conventional B2 B cell depletion ameliorates whereas its adoptive transfer aggravates atherosclerosis". *J Immunol,* 186**,** 4; author reply 6.

LIU, K., VICTORA, G. D., SCHWICKERT, T. A., GUERMONPREZ, P., MEREDITH, M. M., YAO, K., CHU, F. F., RANDOLPH, G. J., RUDENSKY, A. Y. & NUSSENZWEIG, M. 2009. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science,* 324**,** 392-7.

LIU, K., WASKOW, C., LIU, X., YAO, K., HOH, J. & NUSSENZWEIG, M. 2007. Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nat Immunol,* 8**,** 578-83.

LOEYS, B. L., CHEN, J., NEPTUNE, E. R., JUDGE, D. P., PODOWSKI, M., HOLM, T., MEYERS, J., LEITCH, C. C., KATSANIS, N., SHARIFI, N., XU, F. L., MYERS, L. A., SPEVAK, P. J., CAMERON, D. E., DE BACKER, J., HELLEMANS, J., CHEN, Y., DAVIS, E. C., WEBB, C. L., KRESS, W., COUCKE, P., RIFKIN, D. B., DE PAEPE, A. M. & DIETZ, H. C. 2005. A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet,* 37**,** 275-81.

LOEYS, B. L. & DIETZ, H. C. 1993. Loeys-Dietz Syndrome. *In:* PAGON, R. A., ADAM, M. P., ARDINGER, H. H., BIRD, T. D., DOLAN, C. R., FONG, C. T., SMITH, R. J. H. & STEPHENS, K. (eds.) *GeneReviews(R).* Seattle (WA).

LOEYS, B. L., SCHWARZE, U., HOLM, T., CALLEWAERT, B. L., THOMAS, G. H., PANNU, H., DE BACKER, J. F., OSWALD, G. L., SYMOENS, S., MANOUVRIER, S., ROBERTS, A. E., FARAVELLI, F., GRECO, M. A., PYERITZ, R. E., MILEWICZ, D. M., COUCKE, P. J., CAMERON, D. E., BRAVERMAN, A. C.,

BYERS, P. H., DE PAEPE, A. M. & DIETZ, H. C. 2006. Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor. *N Engl J Med,* 355**,** 788-98.

LONGO, G. M., BUDA, S. J., FIOTTA, N., XIONG, W., GRIENER, T., SHAPIRO, S. & BAXTER, B. T. 2005. MMP-12 has a role in abdominal aortic aneurysms in mice. *Surgery,* 137**,** 457-62.

LONGO, G. M., XIONG, W., GREINER, T. C., ZHAO, Y., FIOTTI, N. & BAXTER, B. T. 2002. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest,* 110**,** 625-32.

LOPEZ-CANDALES, A., HOLMES, D. R., LIAO, S., SCOTT, M. J., WICKLINE, S. A. & THOMPSON, R. W. 1997. Decreased vascular smooth muscle cell density in medial degeneration of human abdominal aortic aneurysms. *Am J Pathol,* 150**,** 993-1007.

LUDWIG, A., BERKHOUT, T., MOORES, K., GROOT, P. & CHAPMAN, G. 2002. Fractalkine is expressed by smooth muscle cells in response to IFN-gamma and TNF-alpha and is modulated by metalloproteinase activity. *J Immunol,* 168**,** 604-12.

LUND, F. E. & RANDALL, T. D. 2010. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity. *Nat Rev Immunol,* 10**,** 236-47.

LUTTUN, A., LUTGENS, E., MANDERVELD, A., MARIS, K., COLLEN, D., CARMELIET, P. & MOONS, L. 2004. Loss of matrix metalloproteinase-9 or matrix metalloproteinase-12 protects apolipoprotein E-deficient mice against atherosclerotic media destruction but differentially affects plaque growth. *Circulation,* 109**,** 1408-14.

MACK, M., CIHAK, J., SIMONIS, C., LUCKOW, B., PROUDFOOT, A. E., PLACHY, J., BRUHL, H., FRINK, M., ANDERS, H. J., VIELHAUER, V., PFIRSTINGER, J., STANGASSINGER, M. & SCHLONDORFF, D. 2001. Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. *J Immunol,* 166**,** 4697-704.

MACTAGGART, J. N., XIONG, W., KNISPEL, R. & BAXTER, B. T. 2007. Deletion of CCR2 but not CCR5 or CXCR3 inhibits aortic aneurysm formation. *Surgery,* 142**,** 284-8.

MADHUR, M. S., FUNT, S. A., LI, L., VINH, A., CHEN, W., LOB, H. E., IWAKURA, Y., BLINDER, Y., RAHMAN, A., QUYYUMI, A. A. & HARRISON, D. G. 2011. Role of interleukin 17 in inflammation, atherosclerosis, and vascular function in apolipoprotein e-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 31**,** 1565-72.

MAHAD, D. J., TREBST, C., KIVISAKK, P., STAUGAITIS, S. M., TUCKY, B., WEI, T., LUCCHINETTI, C. F., LASSMANN, H. & RANSOHOFF, R. M. 2004. Expression of chemokine receptors CCR1 and CCR5 reflects differential activation of mononuclear phagocytes in pattern II and pattern III multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol,* 63**,** 262-73.

MAJOR, A. S., FAZIO, S. & LINTON, M. F. 2002. B-lymphocyte deficiency increases atherosclerosis in LDL receptor-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 22**,** 1892-8.

MANNING, M. W., CASSI, L. A., HUANG, J., SZILVASSY, S. J. & DAUGHERTY, A. 2002. Abdominal aortic aneurysms: fresh insights from a novel animal model of the disease. *Vasc Med,* 7**,** 45-54.

MANNING, M. W., CASSIS, L. A. & DAUGHERTY, A. 2003. Differential effects of doxycycline, a broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor, on angiotensin II-induced atherosclerosis and abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 23**,** 483-8.

MAO, D., LEE, J. K., VANVICKLE, S. J. & THOMPSON, R. W. 1999a. Expression of collagenase-3 (MMP-13) in human abdominal aortic aneurysms and vascular smooth muscle cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun,* 261**,** 904-10.

MAO, D., VANVICKLE, S. J., CURCI, J. A. & THOMPSON, R. W. 1999b. Expression of matrix metalloproteinases and TIMPs in human abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg,* 13**,** 236-7.

MASSBERG, S., SCHAERLI, P., KNEZEVIC-MARAMICA, I., KOLLNBERGER, M., TUBO, N., MOSEMAN, E. A., HUFF, I. V., JUNT, T., WAGERS, A. J., MAZO, I. B. & VON ANDRIAN, U. H. 2007. Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues. *Cell,* 131**,** 994-1008.

MATHERS, C. D. & LONCAR, D. 2006. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med,* 3**,** e442.

MATRISIAN, L. M. 1990. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet,* 6**,** 121-5.

MATSUMURA, S., IWANAGA, S., MOCHIZUKI, S., OKAMOTO, H., OGAWA, S. & OKADA, Y. 2005. Targeted deletion or pharmacological inhibition of MMP-2 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *J Clin Invest,* 115**,** 599-609.

MATSUSHITA, M., KOBAYASHI, H., ODA, K., NISHIKIMI, N., SAKURAI, T. & NIMURA, Y. 1999. A rabbit model of abdominal aortic aneurysm associated with intimal thickening. *Eur Surg Res,* 31**,** 305-13.

MAYRANPAA, M. I., TROSIEN, J. A., FONTAINE, V., FOLKESSON, M., KAZI, M., ERIKSSON, P., SWEDENBORG, J. & HEDIN, U. 2009. Mast cells associate with neovessels in the media and adventitia of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg,* 50**,** 388-95; discussion 395-6.

MCCAWLEY, L. J. & MATRISIAN, L. M. 2001. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol,* 13**,** 534-40.

MCCORMICK, M. L., GAVRILA, D. & WEINTRAUB, N. L. 2007. Role of oxidative stress in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 27**,** 461-9.

MCMILLAN, W. D., PATTERSON, B. K., KEEN, R. R., SHIVELY, V. P., CIPOLLONE, M. & PEARCE, W. H. 1995. In situ localization and quantification of mRNA for 92-kD type IV collagenase and its inhibitor in aneurysmal, occlusive, and normal aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 15**,** 1139-44.

MEILHAC, O., HO-TIN-NOE, B., HOUARD, X., PHILIPPE, M., MICHEL, J. B. & ANGLES-CANO, E. 2003. Pericellular plasmin induces smooth muscle cell anoikis. *FASEB J,* 17**,** 1301-3.

MERAD, M., MANZ, M. G., KARSUNKY, H., WAGERS, A., PETERS, W., CHARO, I., WEISSMAN, I. L., CYSTER, J. G. & ENGLEMAN, E. G. 2002. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol,* 3**,** 1135-41.

MICHEL, J. B. 2001. Contrasting outcomes of atheroma evolution: intimal accumulation versus medial destruction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 21**,** 1389-92.

MICHEL, J. B., MARTIN-VENTURA, J. L., EGIDO, J., SAKALIHASAN, N., TRESKA, V., LINDHOLT, J., ALLAIRE, E., THORSTEINSDOTTIR, U., COCKERILL, G., SWEDENBORG, J. & CONSORTIUM, F. E. 2011. Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans. *Cardiovasc Res,* 90**,** 18-27.

MIDDLETON, R. K., LLOYD, G. M., BOWN, M. J., COOPER, N. J., LONDON, N. J. & SAYERS, R. D. 2007. The pro-inflammatory and chemotactic cytokine microenvironment of the abdominal aortic aneurysm wall: a protein array study. *J Vasc Surg,* 45**,** 574-80.

MILDNER, A., SCHMIDT, H., NITSCHE, M., MERKLER, D., HANISCH, U. K., MACK, M., HEIKENWALDER, M., BRUCK, W., PRILLER, J. & PRINZ, M. 2007.

Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci,* 10**,** 1544-53.

MILLER, A. M., XU, D., ASQUITH, D. L., DENBY, L., LI, Y., SATTAR, N., BAKER, A. H., MCINNES, I. B. & LIEW, F. Y. 2008. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J Exp Med,* 205**,** 339-46.

MILLER, F. J., JR., SHARP, W. J., FANG, X., OBERLEY, L. W., OBERLEY, T. D. & WEINTRAUB, N. L. 2002. Oxidative stress in human abdominal aortic aneurysms: a potential mediator of aneurysmal remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 22**,** 560-5.

MIZUGUCHI, T., COLLOD-BEROUD, G., AKIYAMA, T., ABIFADEL, M., HARADA, N., MORISAKI, T., ALLARD, D., VARRET, M., CLAUSTRES, M., MORISAKI, H., IHARA, M., KINOSHITA, A., YOSHIURA, K., JUNIEN, C., KAJII, T., JONDEAU, G., OHTA, T., KISHINO, T., FURUKAWA, Y., NAKAMURA, Y., NIIKAWA, N., BOILEAU, C. & MATSUMOTO, N. 2004. Heterozygous TGFBR2 mutations in Marfan syndrome. *Nat Genet,* 36**,** 855-60.

MIZUNO, K., TOMA, T., TSUKIJI, H., OKAMOTO, H., YAMAZAKI, H., OHTA, K., OHTA, K., KASAHARA, Y., KOIZUMI, S. & YACHIE, A. 2005. Selective expansion of CD16highCCR2- subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation. *Clin Exp Immunol,* 142**,** 461-70.

MOEHLE, C. W., BHAMIDIPATI, C. M., ALEXANDER, M. R., MEHTA, G. S., IRVINE, J. N., SALMON, M., UPCHURCH, G. R., JR., KRON, I. L., OWENS, G. K. & AILAWADI, G. 2011. Bone marrow-derived MCP1 required for experimental aortic aneurysm formation and smooth muscle phenotypic modulation. *J Thorac Cardiovasc Surg,* 142**,** 1567-74.

MOOS, M. P., JOHN, N., GRABNER, R., NOSSMANN, S., GUNTHER, B., VOLLANDT, R., FUNK, C. D., KAISER, B. & HABENICHT, A. J. 2005. The lamina adventitia is the major site of immune cell accumulation in standard chow-fed apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 25**,** 2386-91.

MORAN, C. S., JOSE, R. J., MOXON, J. V., ROOMBERG, A., NORMAN, P. E., RUSH, C., KORNER, H. & GOLLEDGE, J. 2013. Everolimus limits aortic aneurysm in the apolipoprotein E-deficient mouse by downregulating C-C chemokine receptor 2 positive monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 33**,** 814-21.

MORGAN, S., YAMANOUCHI, D., HARBERG, C., WANG, Q., KELLER, M., SI, Y., BURLINGHAM, W., SEEDIAL, S., LENGFELD, J. & LIU, B. 2012. Elevated protein kinase C-delta contributes to aneurysm pathogenesis through stimulation of apoptosis and inflammatory signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 32**,** 2493-502.

MOTT, J. D. & WERB, Z. 2004. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol,* 16**,** 558-64.

MUEHLHOEFER, A., SAUBERMANN, L. J., GU, X., LUEDTKE-HECKENKAMP, K., XAVIER, R., BLUMBERG, R. S., PODOLSKY, D. K., MACDERMOTT, R. P. & REINECKER, H. C. 2000. Fractalkine is an epithelial and endothelial cell-derived chemoattractant for intraepithelial lymphocytes in the small intestinal mucosa. *J Immunol,* 164**,** 3368-76.

MUKARATIRWA, S. & NEDERBRAGT, H. 2002. Tenascin and proteoglycans: the role of tenascin and proteoglycans in canine tumours. *Res Vet Sci,* 73**,** 1-8.

MUKOYAMA, M., NAKAJIMA, M., HORIUCHI, M., SASAMURA, H., PRATT, R. E. & DZAU, V. J. 1993. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem,* 268**,** 24539-42.

MURPHY, A. J., AKHTARI, M., TOLANI, S., PAGLER, T., BIJL, N., KUO, C. L., WANG, M., SANSON, M., ABRAMOWICZ, S., WELCH, C., BOCHEM, A. E., KUIVENHOVEN, J. A., YVAN-CHARVET, L. & TALL, A. R. 2011. ApoE regulates hematopoietic stem cell proliferation, monocytosis, and monocyte accumulation in atherosclerotic lesions in mice. *J Clin Invest,* 121**,** 4138-49.

NAGASE, H., VISSE, R. & MURPHY, G. 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res,* 69**,** 562-73.

NAHRENDORF, M., PITTET, M. J. & SWIRSKI, F. K. 2010. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation,* 121**,** 2437-45.

NAHRENDORF, M., SWIRSKI, F. K., AIKAWA, E., STANGENBERG, L., WURDINGER, T., FIGUEIREDO, J. L., LIBBY, P., WEISSLEDER, R. & PITTET, M. J. 2007. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med,* 204**,** 3037-47.

NAIK, S. H., METCALF, D., VAN NIEUWENHUIJZE, A., WICKS, I., WU, L., O'KEEFFE, M. & SHORTMAN, K. 2006. Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol,* 7**,** 663-71.

NAKAHASHI, T. K., HOSHINA, K., TSAO, P. S., SHO, E., SHO, M., KARWOWSKI, J. K., YEH, C., YANG, R. B., TOPPER, J. N. & DALMAN, R. L. 2002. Flow loading induces macrophage antioxidative gene expression in experimental aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 22**,** 2017-22.

NAKANO, H., LIN, K. L., YANAGITA, M., CHARBONNEAU, C., COOK, D. N., KAKIUCHI, T. & GUNN, M. D. 2009. Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. *Nat Immunol,* 10**,** 394-402.

NAKASHIMA, Y., PLUMP, A. S., RAINES, E. W., BRESLOW, J. L. & ROSS, R. 1994. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb,* 14**,** 133-40.

NAPOLI, C., D'ARMIENTO, F. P., MANCINI, F. P., POSTIGLIONE, A., WITZTUM, J. L., PALUMBO, G. & PALINSKI, W. 1997. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest,* 100**,** 2680-90.

NARNI-MANCINELLI, E., CAMPISI, L., BASSAND, D., CAZARETH, J., GOUNON, P., GLAICHENHAUS, N. & LAUVAU, G. 2007. Memory CD8+ T cells mediate antibacterial immunity via CCL3 activation of TNF/ROI+ phagocytes. *J Exp Med,* 204**,** 2075-87.

NEPTUNE, E. R., FRISCHMEYER, P. A., ARKING, D. E., MYERS, L., BUNTON, T. E., GAYRAUD, B., RAMIREZ, F., SAKAI, L. Y. & DIETZ, H. C. 2003. Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet,* 33**,** 407-11.

NEWBY, A. C. 2008. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 28**,** 2108-14.

NEWBY, A. C. 2012. Matrix metalloproteinase inhibition therapy for vascular diseases. *Vascul Pharmacol,* 56**,** 232-44.

NEWMAN, K. M., JEAN-CLAUDE, J., LI, H., RAMEY, W. G. & TILSON, M. D. 1994a. Cytokines that activate proteolysis are increased in abdominal aortic aneurysms. *Circulation,* 90**,** II224-7.

NEWMAN, K. M., OGATA, Y., MALON, A. M., IRIZARRY, E., GANDHI, R. H., NAGASE, H. & TILSON, M. D. 1994b. Identification of matrix metalloproteinases 3

(stromelysin-1) and 9 (gelatinase B) in abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb,* 14**,** 1315-20.

NOEL, J. G., OSTERBURG, A., WANG, Q., GUO, X., BYRUM, D., SCHWEMBERGER, S., GOETZMAN, H., CALDWELL, C. C. & OGLE, C. K. 2007. Thermal injury elevates the inflammatory monocyte subpopulation in multiple compartments. *Shock,* 28**,** 684-93.

NORDON, I. M., HINCHLIFFE, R. J., LOFTUS, I. M. & THOMPSON, M. M. 2011. Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol,* 8**,** 92-102.

NORMAN, P. E. & POWELL, J. T. 2010. Site specificity of aneurysmal disease. *Circulation,* 121**,** 560-8.

OCANA, E., BOHORQUEZ, J. C., PEREZ-REQUENA, J., BRIEVA, J. A. & RODRIGUEZ, C. 2003. Characterisation of T and B lymphocytes infiltrating abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis,* 170**,** 39-48.

OMS 2011. 'Rapport sur la situation mondiale des maladies non transmissibles 2010'
.

ORTEGA, N. & WERB, Z. 2002. New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens. *J Cell Sci,* 115**,** 4201-14.

PAGANO, M. B., BARTOLI, M. A., ENNIS, T. L., MAO, D., SIMMONS, P. M., THOMPSON, R. W. & PHAM, C. T. 2007. Critical role of dipeptidyl peptidase I in neutrophil recruitment during the development of experimental abdominal aortic aneurysms. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 104**,** 2855-60.

PALFRAMAN, R. T., JUNG, S., CHENG, G., WENINGER, W., LUO, Y., DORF, M., LITTMAN, D. R., ROLLINS, B. J., ZWEERINK, H., ROT, A. & VON ANDRIAN, U. H. 2001. Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J Exp Med,* 194**,** 1361-73.

PANIZZI, P., SWIRSKI, F. K., FIGUEIREDO, J. L., WATERMAN, P., SOSNOVIK, D. E., AIKAWA, E., LIBBY, P., PITTET, M., WEISSLEDER, R. & NAHRENDORF, M. 2010. Impaired infarct healing in atherosclerotic mice with Ly-6C(hi) monocytosis. *J Am Coll Cardiol,* 55**,** 1629-38.

PANNU, H., FADULU, V. T., CHANG, J., LAFONT, A., HASHAM, S. N., SPARKS, E., GIAMPIETRO, P. F., ZALESKI, C., ESTRERA, A. L., SAFI, H. J., SHETE, S., WILLING, M. C., RAMAN, C. S. & MILEWICZ, D. M. 2005. Mutations in transforming growth factor-beta receptor type II cause familial thoracic aortic aneurysms and dissections. *Circulation,* 112**,** 513-20.

PAPADOPOULOS, E. J., SASSETTI, C., SAEKI, H., YAMADA, N., KAWAMURA, T., FITZHUGH, D. J., SARAF, M. A., SCHALL, T., BLAUVELT, A., ROSEN, S. D. & HWANG, S. T. 1999. Fractalkine, a CX3C chemokine, is expressed by dendritic cells and is up-regulated upon dendritic cell maturation. *Eur J Immunol,* 29**,** 2551-9.

PARODI, J. C., PALMAZ, J. C. & BARONE, H. D. 1991. Transfemoral intraluminal graft implantation for abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg,* 5**,** 491-9.

PASSLICK, B., FLIEGER, D. & ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. 1989. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood,* 74**,** 2527-34.

PASSMAN, J. N., DONG, X. R., WU, S. P., MAGUIRE, C. T., HOGAN, K. A., BAUTCH, V. L. & MAJESKY, M. W. 2008. A sonic hedgehog signaling domain in the arterial adventitia supports resident Sca1+ smooth muscle progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 105**,** 9349-54.

PEPIN, M. G. & BYERS, P. H. 1993. Ehlers-Danlos Syndrome Type IV. *In:* PAGON, R. A., ADAM, M. P., ARDINGER, H. H., BIRD, T. D., DOLAN, C. R., FONG, C. T., SMITH, R. J. H. & STEPHENS, K. (eds.) *GeneReviews(R).* Seattle (WA).

PESCOVITZ, M. D., GREENBAUM, C. J., KRAUSE-STEINRAUF, H., BECKER, D. J., GITELMAN, S. E., GOLAND, R., GOTTLIEB, P. A., MARKS, J. B., MCGEE, P. F., MORAN, A. M., RASKIN, P., RODRIGUEZ, H., SCHATZ, D. A., WHERRETT, D., WILSON, D. M., LACHIN, J. M., SKYLER, J. S. & TYPE 1 DIABETES TRIALNET ANTI, C. D. S. G. 2009. Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *N Engl J Med,* 361**,** 2143-52.

PETERSEN, E., GINEITIS, A., WAGBERG, F. & ANGQUIST, K. A. 2000. Activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 in abdominal aortic aneurysms. Relation to size and rupture. *Eur J Vasc Endovasc Surg,* 20**,** 457-61.

PETRINEC, D., LIAO, S., HOLMES, D. R., REILLY, J. M., PARKS, W. C. & THOMPSON, R. W. 1996. Doxycycline inhibition of aneurysmal degeneration in an elastase-induced rat model of abdominal aortic aneurysm: preservation of aortic elastin associated with suppressed production of 92 kD gelatinase. *J Vasc Surg,* 23**,** 336-46.

PFEFFER, M. A., BRAUNWALD, E., MOYE, L. A., BASTA, L., BROWN, E. J., JR., CUDDY, T. E., DAVIS, B. R., GELTMAN, E. M., GOLDMAN, S., FLAKER, G. C. & ET AL. 1992. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med,* 327**,** 669-77.

POTTEAUX, S., COMBADIERE, C., ESPOSITO, B., LECUREUIL, C., AIT-OUFELLA, H., MERVAL, R., ARDOUIN, P., TEDGUI, A. & MALLAT, Z. 2006. Role of bone marrow-derived CC-chemokine receptor 5 in the development of atherosclerosis of low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 26**,** 1858-63.

POTTER, D. D., SOBEY, C. G., TOMPKINS, P. K., ROSSEN, J. D. & HEISTAD, D. D. 1998. Evidence that macrophages in atherosclerotic lesions contain angiotensin II. *Circulation,* 98**,** 800-7.

POWELL, J. T. & BRADY, A. R. 2004. Detection, management, and prospects for the medical treatment of small abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 24**,** 241-5.

PRALL, A. K., LONGO, G. M., MAYHAN, W. G., WALTKE, E. A., FLECKTEN, B., THOMPSON, R. W. & BAXTER, B. T. 2002. Doxycycline in patients with abdominal aortic aneurysms and in mice: comparison of serum levels and effect on aneurysm growth in mice. *J Vasc Surg,* 35**,** 923-9.

PROPANOLOL ANEURYSM TRIAL, I. 2002. Propranolol for small abdominal aortic aneurysms: results of a randomized trial. *J Vasc Surg,* 35**,** 72-9.

PSALTIS, P. J., HARBUZARIU, A., DELACROIX, S., WITT, T. A., HOLROYD, E. W., SPOON, D. B., HOFFMAN, S. J., PAN, S., KLEPPE, L. S., MUESKE, C. S., GULATI, R., SANDHU, G. S. & SIMARI, R. D. 2012. Identification of a monocyte-predisposed hierarchy of hematopoietic progenitor cells in the adventitia of postnatal murine aorta. *Circulation,* 125**,** 592-603.

PYO, R., LEE, J. K., SHIPLEY, J. M., CURCI, J. A., MAO, D., ZIPORIN, S. J., ENNIS, T. L., SHAPIRO, S. D., SENIOR, R. M. & THOMPSON, R. W. 2000. Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest,* 105**,** 1641-9.

QIAN, H. S., GU, J. M., LIU, P., KAUSER, K., HALKS-MILLER, M., VERGONA, R., SULLIVAN, M. E., DOLE, W. P. & DENG, G. G. 2008. Overexpression of PAI-1

prevents the development of abdominal aortic aneurysm in mice. *Gene Ther,* 15**,** 224-32.

QIN, Y., CAO, X., GUO, J., ZHANG, Y., PAN, L., ZHANG, H., LI, H., TANG, C., DU, J. & SHI, G. P. 2012. Deficiency of cathepsin S attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovasc Res,* 96**,** 401-10.

QIN, Z. 2008. Newly developed angiotensin II-infused experimental models in vascular biology. *Regul Pept,* 150**,** 1-6.

RANDOLPH, G. J. 2008. Emigration of monocyte-derived cells to lymph nodes during resolution of inflammation and its failure in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol,* 19**,** 462-8.

RANDOLPH, G. J., INABA, K., ROBBIANI, D. F., STEINMAN, R. M. & MULLER, W. A. 1999. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity,* 11**,** 753-61.

RANDOLPH, G. J., SANCHEZ-SCHMITZ, G., LIEBMAN, R. M. & SCHAKEL, K. 2002. The CD16(+) (FcgammaRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J Exp Med,* 196**,** 517-27.

RATERI, D. L., HOWATT, D. A., MOORLEGHEN, J. J., CHARNIGO, R., CASSIS, L. A. & DAUGHERTY, A. 2011. Prolonged infusion of angiotensin II in apoE(-/-) mice promotes macrophage recruitment with continued expansion of abdominal aortic aneurysm. *Am J Pathol,* 179**,** 1542-8.

RAUCH, P. J., CHUDNOVSKIY, A., ROBBINS, C. S., WEBER, G. F., ETZRODT, M., HILGENDORF, I., TIGLAO, E., FIGUEIREDO, J. L., IWAMOTO, Y., THEURL, I., GORBATOV, R., WARING, M. T., CHICOINE, A. T., MOUDED, M., PITTET, M. J., NAHRENDORF, M., WEISSLEDER, R. & SWIRSKI, F. K. 2012. Innate response activator B cells protect against microbial sepsis. *Science,* 335**,** 597-601.

RAVINDRAN, R., RUSCH, L., ITANO, A., JENKINS, M. K. & MCSORLEY, S. J. 2007. CCR6-dependent recruitment of blood phagocytes is necessary for rapid CD4 T cell responses to local bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 104**,** 12075-80.

REEPS, C., GEE, M. W., MAIER, A., PELISEK, J., GURDAN, M., WALL, W., MARISS, J., ECKSTEIN, H. H. & ESSLER, M. 2009. Glucose metabolism in the vessel wall correlates with mechanical instability and inflammatory changes in a patient with a growing aneurysm of the abdominal aorta. *Circ Cardiovasc Imaging,* 2**,** 507-9.

REILLY, J. M., SICARD, G. A. & LUCORE, C. L. 1994. Abnormal expression of plasminogen activators in aortic aneurysmal and occlusive disease. *J Vasc Surg,* 19**,** 865-72.

RICCI, M. A., STRINDBERG, G., SLAIBY, J. M., GUIBORD, R., BERGERSEN, L. J., NICHOLS, P., HENDLEY, E. D. & PILCHER, D. B. 1996. Anti-CD 18 monoclonal antibody slows experimental aortic aneurysm expansion. *J Vasc Surg,* 23**,** 301-7.

RIZAS, K. D., IPPAGUNTA, N. & TILSON, M. D., 3RD 2009. Immune cells and molecular mediators in the pathogenesis of the abdominal aortic aneurysm. *Cardiol Rev,* 17**,** 201-10.

RIZZO, R. J., MCCARTHY, W. J., DIXIT, S. N., LILLY, M. P., SHIVELY, V. P., FLINN, W. R. & YAO, J. S. 1989. Collagen types and matrix protein content in human abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg,* 10**,** 365-73.

ROBBINS, C. S., CHUDNOVSKIY, A., RAUCH, P. J., FIGUEIREDO, J. L., IWAMOTO, Y., GORBATOV, R., ETZRODT, M., WEBER, G. F., UENO, T., VAN ROOIJEN, N., MULLIGAN-KEHOE, M. J., LIBBY, P., NAHRENDORF, M., PITTET, M. J., WEISSLEDER, R. & SWIRSKI, F. K. 2012. Extramedullary hematopoiesis generates

Ly-6C(high) monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. *Circulation,* 125**,** 364-74.

ROBBINS, C. S., HILGENDORF, I., WEBER, G. F., THEURL, I., IWAMOTO, Y., FIGUEIREDO, J. L., GORBATOV, R., SUKHOVA, G. K., GERHARDT, L. M., SMYTH, D., ZAVITZ, C. C., SHIKATANI, E. A., PARSONS, M., VAN ROOIJEN, N., LIN, H. Y., HUSAIN, M., LIBBY, P., NAHRENDORF, M., WEISSLEDER, R. & SWIRSKI, F. K. 2013. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med,* 19**,** 1166-72.

ROBERTS, A. B., SPORN, M. B., ASSOIAN, R. K., SMITH, J. M., ROCHE, N. S., WAKEFIELD, L. M., HEINE, U. I., LIOTTA, L. A., FALANGA, V., KEHRL, J. H. & ET AL. 1986. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 83**,** 4167-71.

ROBINS, S. P. 1995. Collagen crosslinks in metabolic bone disease. *Acta Orthop Scand Suppl,* 266**,** 171-5.

ROLLINS, B. J. & POBER, J. S. 1991. Interleukin-4 induces the synthesis and secretion of MCP-1/JE by human endothelial cells. *Am J Pathol,* 138**,** 1315-9.

ROMAIN, M., TALEB, S., DALLOZ, M., PONNUSWAMY, P., ESPOSITO, B., PEREZ, N., WANG, Y., YOSHIMURA, A., TEDGUI, A. & MALLAT, Z. 2013. Overexpression of SOCS3 in T lymphocytes leads to impaired interleukin-17 production and severe aortic aneurysm formation in mice--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 33**,** 581-4.

ROMANIC, A. M., HARRISON, S. M., BAO, W., BURNS-KURTIS, C. L., PICKERING, S., GU, J., GRAU, E., MAO, J., SATHE, G. M., OHLSTEIN, E. H. & YUE, T. L. 2002. Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by targeted deletion of matrix metalloproteinase-9. *Cardiovasc Res,* 54**,** 549-58.

RUSH, C., NYARA, M., MOXON, J. V., TROLLOPE, A., CULLEN, B. & GOLLEDGE, J. 2009. Whole genome expression analysis within the angiotensin II-apolipoprotein E deficient mouse model of abdominal aortic aneurysm. *BMC Genomics,* 10**,** 298.

SAATCHI, S., AZUMA, J., WANCHOO, N., SMITH, S. J., YOCK, P. G., TAYLOR, C. A. & TSAO, P. S. 2012. Three-dimensional microstructural changes in murine abdominal aortic aneurysms quantified using immunofluorescent array tomography. *J Histochem Cytochem,* 60**,** 97-109.

SAEDERUP, N., CHAN, L., LIRA, S. A. & CHARO, I. F. 2008. Fractalkine deficiency markedly reduces macrophage accumulation and atherosclerotic lesion formation in CCR2-/- mice: evidence for independent chemokine functions in atherogenesis. *Circulation,* 117**,** 1642-8.

SAKALIHASAN, N., DELVENNE, P., NUSGENS, B. V., LIMET, R. & LAPIERE, C. M. 1996. Activated forms of MMP2 and MMP9 in abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg,* 24**,** 127-33.

SALLUSTO, F. & LANZAVECCHIA, A. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med,* 179**,** 1109-18.

SAMADZADEH, K. M., CHUN, K. C., NGUYEN, A. T., BAKER, P. M., BAINS, S. & LEE, E. S. 2014. Monocyte activity is linked with abdominal aortic aneurysm diameter. *J Surg Res,* 190**,** 328-34.

SAMANI, N. J., THOMPSON, J. R., O'TOOLE, L., CHANNER, K. & WOODS, K. L. 1996. A meta-analysis of the association of the deletion allele of the angiotensin-converting enzyme gene with myocardial infarction. *Circulation,* 94**,** 708-12.

SANCHEZ-TORRES, C., GARCIA-ROMO, G. S., CORNEJO-CORTES, M. A., RIVAS-CARVALHO, A. & SANCHEZ-SCHMITZ, G. 2001. CD16+ and CD16- human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4+ T cells. *Int Immunol,* 13**,** 1571-81.

SARAFF, K., BABAMUSTA, F., CASSIS, L. A. & DAUGHERTY, A. 2003. Aortic dissection precedes formation of aneurysms and atherosclerosis in angiotensin II-infused, apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 23**,** 1621-6.

SATA, M., SAIURA, A., KUNISATO, A., TOJO, A., OKADA, S., TOKUHISA, T., HIRAI, H., MAKUUCHI, M., HIRATA, Y. & NAGAI, R. 2002. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med,* 8**,** 403-9.

SATTA, J., MENNANDER, A. & SOINI, Y. 2002. Increased medial TUNEL-positive staining associated with apoptotic bodies is linked to smooth muscle cell diminution during evolution of abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg,* 16**,** 462-6.

SATTA, J., SOINI, Y., MOSORIN, M. & JUVONEN, T. 1998. Angiogenesis is associated with mononuclear inflammatory cells in abdominal aortic aneurysms. *Ann Chir Gynaecol,* 87**,** 40-2.

SAWYER, R. T., STRAUSBAUCH, P. H. & VOLKMAN, A. 1982. Resident macrophage proliferation in mice depleted of blood monocytes by strontium-89. *Lab Invest,* 46**,** 165-70.

SCHENK, S. & QUARANTA, V. 2003. Tales from the crypt[ic] sites of the extracellular matrix. *Trends Cell Biol,* 13**,** 366-75.

SCHNEIDERMAN, J., BORDIN, G. M., ADAR, R., SMOLINSKY, A., SEIFFERT, D., ENGELBERG, I., DILLEY, R. B., THINNES, T. & LOSKUTOFF, D. J. 1998. Patterns of expression of fibrinolytic genes and matrix metalloproteinase-9 in dissecting aortic aneurysms. *Am J Pathol,* 152**,** 703-10.

SCHONBECK, U., SUKHOVA, G. K., GERDES, N. & LIBBY, P. 2002. T(H)2 predominant immune responses prevail in human abdominal aortic aneurysm. *Am J Pathol,* 161**,** 499-506.

SCHOUTEN, O., VAN LAANEN, J. H., BOERSMA, E., VIDAKOVIC, R., FERINGA, H. H., DUNKELGRUN, M., BAX, J. J., KONING, J., VAN URK, H. & POLDERMANS, D. 2006. Statins are associated with a reduced infrarenal abdominal aortic aneurysm growth. *Eur J Vasc Endovasc Surg,* 32**,** 21-6.

SCHREIBER, A. D., KELLEY, M., DZIARSKI, A. & LEVINSON, A. I. 1983. Human monocyte functional heterogeneity: monocyte fractionation by discontinuous albumin gradient centrifugation. *Immunology,* 49**,** 231-8.

SCHULTE, S., SUN, J., LIBBY, P., MACFARLANE, L., SUN, C., LOPEZ-ILASACA, M., SHI, G. P. & SUKHOVA, G. K. 2010. Cystatin C deficiency promotes inflammation in angiotensin II-induced abdominal aortic aneurisms in atherosclerotic mice. *Am J Pathol,* 177**,** 456-63.

SCOTT, R. A., BRIDGEWATER, S. G. & ASHTON, H. A. 2002. Randomized clinical trial of screening for abdominal aortic aneurysm in women. *Br J Surg,* 89**,** 283-5.

SERBINA, N. V., JIA, T., HOHL, T. M. & PAMER, E. G. 2008. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol,* 26**,** 421-52.

SERBINA, N. V. & PAMER, E. G. 2006. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol,* 7**,** 311-7.

SERBINA, N. V., SALAZAR-MATHER, T. P., BIRON, C. A., KUZIEL, W. A. & PAMER, E. G. 2003. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity,* 19**,** 59-70.

SHARMA, A. K., LU, G., JESTER, A., JOHNSTON, W. F., ZHAO, Y., HAJZUS, V. A., SAADATZADEH, M. R., SU, G., BHAMIDIPATI, C. M., MEHTA, G. S., KRON, I. L., LAUBACH, V. E., MURPHY, M. P., AILAWADI, G. & UPCHURCH, G. R., JR. 2012. Experimental abdominal aortic aneurysm formation is mediated by IL-17 and attenuated by mesenchymal stem cell treatment. *Circulation,* 126**,** S38-45.

SHECHTER, R., LONDON, A., VAROL, C., RAPOSO, C., CUSIMANO, M., YOVEL, G., ROLLS, A., MACK, M., PLUCHINO, S., MARTINO, G., JUNG, S. & SCHWARTZ, M. 2009. Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. *PLoS Med,* 6**,** e1000113.

SHI, C. & PAMER, E. G. 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol,* 11**,** 762-74.

SHI, G. P., SUKHOVA, G. K., GRUBB, A., DUCHARME, A., RHODE, L. H., LEE, R. T., RIDKER, P. M., LIBBY, P. & CHAPMAN, H. A. 1999. Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms. *J Clin Invest,* 104**,** 1191-7.

SHIMIZU, K., LIBBY, P. & MITCHELL, R. N. 2005. Local cytokine environments drive aneurysm formation in allografted aortas. *Trends Cardiovasc Med,* 15**,** 142-8.

SHIMIZU, K., MITCHELL, R. N. & LIBBY, P. 2006. Inflammation and cellular immune responses in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 26**,** 987-94.

SHIMIZU, K., SHICHIRI, M., LIBBY, P., LEE, R. T. & MITCHELL, R. N. 2004. Th2-predominant inflammation and blockade of IFN-gamma signaling induce aneurysms in allografted aortas. *J Clin Invest,* 114**,** 300-8.

SHO, E., SHO, M., HOSHINA, K., KIMURA, H., NAKAHASHI, T. K. & DALMAN, R. L. 2004. Hemodynamic forces regulate mural macrophage infiltration in experimental aortic aneurysms. *Exp Mol Pathol,* 76**,** 108-16.

SI, Y., TSOU, C. L., CROFT, K. & CHARO, I. F. 2010. CCR2 mediates hematopoietic stem and progenitor cell trafficking to sites of inflammation in mice. *J Clin Invest,* 120**,** 1192-203.

SIERGIEJUK, M., GACKO, M. & WOROWSKA, A. 2011. Cathepsin A activity of a parietal thrombus of an abdominal aortic aneurysm. *Folia Histochem Cytobiol,* 49**,** 10-2.

SILENCE, J., COLLEN, D. & LIJNEN, H. R. 2002. Reduced atherosclerotic plaque but enhanced aneurysm formation in mice with inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene. *Circ Res,* 90**,** 897-903.

SILENCE, J., LUPU, F., COLLEN, D. & LIJNEN, H. R. 2001. Persistence of atherosclerotic plaque but reduced aneurysm formation in mice with stromelysin-1 (MMP-3) gene inactivation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 21**,** 1440-5.

SKRZECZYNSKA-MONCZNIK, J., BZOWSKA, M., LOSEKE, S., GRAGE-GRIEBENOW, E., ZEMBALA, M. & PRYJMA, J. 2008. Peripheral blood CD14high CD16+ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol,* 67**,** 152-9.

SOFI, F., MARCUCCI, R., GIUSTI, B., PRATESI, G., LARI, B., SESTINI, I., LO SAPIO, P., PULLI, R., PRATESI, C., ABBATE, R. & GENSINI, G. F. 2005. High levels of homocysteine, lipoprotein (a) and plasminogen activator inhibitor-1 are present in patients with abdominal aortic aneurysm. *Thromb Haemost,* 94**,** 1094-8.

SPIN, J. M., HSU, M., AZUMA, J., TEDESCO, M. M., DENG, A., DYER, J. S., MAEGDEFESSEL, L., DALMAN, R. L. & TSAO, P. S. 2011. Transcriptional profiling and network analysis of the murine angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm. *Physiol Genomics,* 43**,** 993-1003.

STANLEY, E., LIESCHKE, G. J., GRAIL, D., METCALF, D., HODGSON, G., GALL, J. A., MAHER, D. W., CEBON, J., SINICKAS, V. & DUNN, A. R. 1994. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major

perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 91**,** 5592-6.

STEINMAN, R. M. & WITMER, M. D. 1978. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 75**,** 5132-6.

STEINMETZ, E. F., BUCKLEY, C., SHAMES, M. L., ENNIS, T. L., VANVICKLE-CHAVEZ, S. J., MAO, D., GOEDDEL, L. A., HAWKINS, C. J. & THOMPSON, R. W. 2005. Treatment with simvastatin suppresses the development of experimental abdominal aortic aneurysms in normal and hypercholesterolemic mice. *Ann Surg,* 241**,** 92-101.

STRUYF, S., VAN COLLIE, E., PAEMEN, L., PUT, W., LENAERTS, J. P., PROOST, P., OPDENAKKER, G. & VAN DAMME, J. 1998. Synergistic induction of MCP-1 and -2 by IL-1beta and interferons in fibroblasts and epithelial cells. *J Leukoc Biol,* 63**,** 364-72.

SUKHIJA, R., ARONOW, W. S., SANDHU, R., KAKAR, P. & BABU, S. 2006. Mortality and size of abdominal aortic aneurysm at long-term follow-up of patients not treated surgically and treated with and without statins. *Am J Cardiol,* 97**,** 279-80.

SUKHOVA, G. K., WANG, B., LIBBY, P., PAN, J. H., ZHANG, Y., GRUBB, A., FANG, K., CHAPMAN, H. A. & SHI, G. P. 2005. Cystatin C deficiency increases elastic lamina degradation and aortic dilatation in apolipoprotein E-null mice. *Circ Res,* 96**,** 368-75.

SUN, J., SUKHOVA, G. K., YANG, M., WOLTERS, P. J., MACFARLANE, L. A., LIBBY, P., SUN, C., ZHANG, Y., LIU, J., ENNIS, T. L., KNISPEL, R., XIONG, W., THOMPSON, R. W., BAXTER, B. T. & SHI, G. P. 2007. Mast cells modulate the pathogenesis of elastase-induced abdominal aortic aneurysms in mice. *J Clin Invest,* 117**,** 3359-68.

SUN, J., SUKHOVA, G. K., ZHANG, J., CHEN, H., SJOBERG, S., LIBBY, P., XIA, M., XIONG, N., GELB, B. D. & SHI, G. P. 2012. Cathepsin K deficiency reduces elastase perfusion-induced abdominal aortic aneurysms in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 32**,** 15-23.

SUN, J., SUKHOVA, G. K., ZHANG, J., CHEN, H., SJOBERG, S., LIBBY, P., XIANG, M., WANG, J., PETERS, C., REINHECKEL, T. & SHI, G. P. 2011. Cathepsin L activity is essential to elastase perfusion-induced abdominal aortic aneurysms in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 31**,** 2500-8.

SUNDERKOTTER, C., NIKOLIC, T., DILLON, M. J., VAN ROOIJEN, N., STEHLING, M., DREVETS, D. A. & LEENEN, P. J. 2004. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol,* 172**,** 4410-7.

SUPERTI-FURGA, A., GUGLER, E., GITZELMANN, R. & STEINMANN, B. 1988. Ehlers-Danlos syndrome type IV: a multi-exon deletion in one of the two COL3A1 alleles affecting structure, stability, and processing of type III procollagen. *J Biol Chem,* 263**,** 6226-32.

SWEETING, M. J., THOMPSON, S. G., BROWN, L. C., POWELL, J. T. & COLLABORATORS, R. 2012. Meta-analysis of individual patient data to examine factors affecting growth and rupture of small abdominal aortic aneurysms. *Br J Surg,* 99**,** 655-65.

SWIRSKI, F. K., LIBBY, P., AIKAWA, E., ALCAIDE, P., LUSCINSKAS, F. W., WEISSLEDER, R. & PITTET, M. J. 2007. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest,* 117**,** 195-205.

SWIRSKI, F. K., NAHRENDORF, M., ETZRODT, M., WILDGRUBER, M., CORTEZ-RETAMOZO, V., PANIZZI, P., FIGUEIREDO, J. L., KOHLER, R. H., CHUDNOVSKIY, A., WATERMAN, P., AIKAWA, E., MEMPEL, T. R., LIBBY, P., WEISSLEDER, R. & PITTET, M. J. 2009a. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science,* 325**,** 612-6.

SWIRSKI, F. K., WEISSLEDER, R. & PITTET, M. J. 2009b. Heterogeneous in vivo behavior of monocyte subsets in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 29**,** 1424-32.

SZABO, Z., CREPEAU, M. W., MITCHELL, A. L., STEPHAN, M. J., PUNTEL, R. A., YIN LOKE, K., KIRK, R. C. & URBAN, Z. 2006. Aortic aneurysmal disease and cutis laxa caused by defects in the elastin gene. *J Med Genet,* 43**,** 255-8.

TACKE, F., ALVAREZ, D., KAPLAN, T. J., JAKUBZICK, C., SPANBROEK, R., LLODRA, J., GARIN, A., LIU, J., MACK, M., VAN ROOIJEN, N., LIRA, S. A., HABENICHT, A. J. & RANDOLPH, G. J. 2007. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest,* 117**,** 185-94.

TACKE, F., GINHOUX, F., JAKUBZICK, C., VAN ROOIJEN, N., MERAD, M. & RANDOLPH, G. J. 2006. Immature monocytes acquire antigens from other cells in the bone marrow and present them to T cells after maturing in the periphery. *J Exp Med,* 203**,** 583-97.

TAKENAKA, K., YAMAKAWA, H., SAKAI, H., YOSHIMURA, S., MURASE, S., OKUMURA, A., NAKATANI, K., KIMURA, T., NISHIMURA, Y., YOSHIMI, N. & SAKAI, N. 1998. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism in intracranial saccular aneurysm individuals. *Neurol Res,* 20**,** 607-11.

TALEB, S., ROMAIN, M., RAMKHELAWON, B., UYTTENHOVE, C., PASTERKAMP, G., HERBIN, O., ESPOSITO, B., PEREZ, N., YASUKAWA, H., VAN SNICK, J., YOSHIMURA, A., TEDGUI, A. & MALLAT, Z. 2009. Loss of SOCS3 expression in T cells reveals a regulatory role for interleukin-17 in atherosclerosis. *J Exp Med,* 206**,** 2067-77.

TANGIRALA, R. K., RUBIN, E. M. & PALINSKI, W. 1995. Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res,* 36**,** 2320-8.

TARLING, J. D., LIN, H. S. & HSU, S. 1987. Self-renewal of pulmonary alveolar macrophages: evidence from radiation chimera studies. *J Leukoc Biol,* 42**,** 443-6.

TAZUME, H., MIYATA, K., TIAN, Z., ENDO, M., HORIGUCHI, H., TAKAHASHI, O., HORIO, E., TSUKANO, H., KADOMATSU, T., NAKASHIMA, Y., KUNITOMO, R., KANEKO, Y., MORIYAMA, S., SAKAGUCHI, H., OKAMOTO, K., HARA, M., YOSHINAGA, T., YOSHIMURA, K., AOKI, H., ARAKI, K., HAO, H., KAWASUJI, M. & OIKE, Y. 2012. Macrophage-derived angiopoietin-like protein 2 accelerates development of abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 32**,** 1400-9.

THAM, D. M., MARTIN-MCNULTY, B., WANG, Y. X., WILSON, D. W., VERGONA, R., SULLIVAN, M. E., DOLE, W. & RUTLEDGE, J. C. 2002. Angiotensin II is associated with activation of NF-kappaB-mediated genes and downregulation of PPARs. *Physiol Genomics,* 11**,** 21-30.

THERUVATH, T. P., JONES, J. A. & IKONOMIDIS, J. S. 2012. Matrix metalloproteinases and descending aortic aneurysms: parity, disparity, and switch. *J Card Surg,* 27**,** 81-90.

THOMPSON, R. W. & BAXTER, B. T. 1999. MMP inhibition in abdominal aortic aneurysms. Rationale for a prospective randomized clinical trial. *Ann N Y Acad Sci,* 878**,** 159-78.

THOMPSON, R. W., CURCI, J. A., ENNIS, T. L., MAO, D., PAGANO, M. B. & PHAM, C. T. 2006. Pathophysiology of abdominal aortic aneurysms: insights from the elastase-induced model in mice with different genetic backgrounds. *Ann N Y Acad Sci,* 1085**,** 59-73.

THOMPSON, R. W., GERAGHTY, P. J. & LEE, J. K. 2002. Abdominal aortic aneurysms: basic mechanisms and clinical implications. *Curr Probl Surg,* 39**,** 110-230.

THOMPSON, R. W. & PARKS, W. C. 1996. Role of matrix metalloproteinases in abdominal aortic aneurysms. *Ann N Y Acad Sci,* 800**,** 157-74.

TIEU, B. C., LEE, C., SUN, H., LEJEUNE, W., RECINOS, A., 3RD, JU, X., SPRATT, H., GUO, D. C., MILEWICZ, D., TILTON, R. G. & BRASIER, A. R. 2009. An adventitial IL-6/MCP1 amplification loop accelerates macrophage-mediated vascular inflammation leading to aortic dissection in mice. *J Clin Invest,* 119**,** 3637-51.

TILSON, M. D. & DANG, C. 1981. Generalized arteriomegaly. A possible predisposition to the formation of abdominal aortic aneurysms. *Arch Surg,* 116**,** 1030-2.

TORSNEY, E., HU, Y. & XU, Q. 2005. Adventitial progenitor cells contribute to arteriosclerosis. *Trends Cardiovasc Med,* 15**,** 64-8.

TOUAT, Z., OLLIVIER, V., DAI, J., HUISSE, M. G., BEZEAUD, A., SEBBAG, U., PALOMBI, T., ROSSIGNOL, P., MEILHAC, O., GUILLIN, M. C. & MICHEL, J. B. 2006. Renewal of mural thrombus releases plasma markers and is involved in aortic abdominal aneurysm evolution. *Am J Pathol,* 168**,** 1022-30.

TROMHOLT, N., JORGENSEN, S. J., HESSE, B. & HANSEN, M. S. 1993. In vivo demonstration of focal fibrinolytic activity in abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Surg,* 7**,** 675-9.

TSOU, C. L., PETERS, W., SI, Y., SLAYMAKER, S., ASLANIAN, A. M., WEISBERG, S. P., MACK, M. & CHARO, I. F. 2007. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest,* 117**,** 902-9.

TSUBOI, N., YOSHIKAI, Y., MATSUO, S., KIKUCHI, T., IWAMI, K., NAGAI, Y., TAKEUCHI, O., AKIRA, S. & MATSUGUCHI, T. 2002. Roles of toll-like receptors in C-C chemokine production by renal tubular epithelial cells. *J Immunol,* 169**,** 2026-33.

TSUJIOKA, H., IMANISHI, T., IKEJIMA, H., KUROI, A., TAKARADA, S., TANIMOTO, T., KITABATA, H., OKOCHI, K., ARITA, Y., ISHIBASHI, K., KOMUKAI, K., KATAIWA, H., NAKAMURA, N., HIRATA, K., TANAKA, A. & AKASAKA, T. 2009. Impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol,* 54**,** 130-8.

UCHIDA, H. A., KRISTO, F., RATERI, D. L., LU, H., CHARNIGO, R., CASSIS, L. A. & DAUGHERTY, A. 2010. Total lymphocyte deficiency attenuates AngII-induced atherosclerosis in males but not abdominal aortic aneurysms in apoE deficient mice. *Atherosclerosis,* 211**,** 399-403.

UCHIDA, H. A., PODURI, A., SUBRAMANIAN, V., CASSIS, L. A. & DAUGHERTY, A. 2011. Urokinase-type plasminogen activator deficiency in bone marrow-derived cells augments rupture of angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 31**,** 2845-52.

UMEHARA, H., BLOOM, E. T., OKAZAKI, T., NAGANO, Y., YOSHIE, O. & IMAI, T. 2004. Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 24**,** 34-40.

VALLEALA, H., KORPELA, M., MOTTONEN, T., HIENONEN-KEMPAS, T., KAUPPI, M., HANNONEN, P. & LEIRISALO-REPO, M. 2009. Rituximab therapy in patients with rheumatoid arthritis refractory or with contraindication to anti-tumour necrosis factor drugs: real-life experience in Finnish patients. *Scand J Rheumatol,* 38**,** 323-7.

VAMMEN, S., LINDHOLT, J. S., OSTERGAARD, L., FASTING, H. & HENNEBERG, E. W. 2001. Randomized double-blind controlled trial of roxithromycin for prevention of abdominal aortic aneurysm expansion. *Br J Surg,* 88**,** 1066-72.

VAN DE LAAR, I. M., OLDENBURG, R. A., PALS, G., ROOS-HESSELINK, J. W., DE GRAAF, B. M., VERHAGEN, J. M., HOEDEMAEKERS, Y. M., WILLEMSEN, R., SEVERIJNEN, L. A., VENSELAAR, H., VRIEND, G., PATTYNAMA, P. M., COLLEE, M., MAJOOR-KRAKAUER, D., POLDERMANS, D., FROHN-MULDER, I. M., MICHA, D., TIMMERMANS, J., HILHORST-HOFSTEE, Y., BIERMA-ZEINSTRA, S. M., WILLEMS, P. J., KROS, J. M., OEI, E. H., OOSTRA, B. A., WESSELS, M. W. & BERTOLI-AVELLA, A. M. 2011. Mutations in SMAD3 cause a syndromic form of aortic aneurysms and dissections with early-onset osteoarthritis. *Nat Genet,* 43**,** 121-6.

VAN FURTH, R. & COHN, Z. A. 1968. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med,* 128**,** 415-35.

VAN FURTH, R., COHN, Z. A., HIRSCH, J. G., HUMPHREY, J. H., SPECTOR, W. G. & LANGEVOORT, H. L. 1972. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ,* 46**,** 845-52.

VAN FURTH, R., RAEBURN, J. A. & VAN ZWET, T. L. 1979. Characteristics of human mononuclear phagocytes. *Blood,* 54**,** 485-500.

VANBERVLIET, B., HOMEY, B., DURAND, I., MASSACRIER, C., AIT-YAHIA, S., DE BOUTEILLER, O., VICARI, A. & CAUX, C. 2002. Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces. *Eur J Immunol,* 32**,** 231-42.

VANDE GEEST, J. P., SACKS, M. S. & VORP, D. A. 2006. The effects of aneurysm on the biaxial mechanical behavior of human abdominal aorta. *J Biomech,* 39**,** 1324-34.

VAROL, C., LANDSMAN, L., FOGG, D. K., GREENSHTEIN, L., GILDOR, B., MARGALIT, R., KALCHENKO, V., GEISSMANN, F. & JUNG, S. 2007. Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med,* 204**,** 171-80.

VAROL, C., VALLON-EBERHARD, A., ELINAV, E., AYCHEK, T., SHAPIRA, Y., LUCHE, H., FEHLING, H. J., HARDT, W. D., SHAKHAR, G. & JUNG, S. 2009. Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity,* 31**,** 502-12.

VISSE, R. & NAGASE, H. 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res,* 92**,** 827-39.

VORP, D. A., LEE, P. C., WANG, D. H., MAKAROUN, M. S., NEMOTO, E. M., OGAWA, S. & WEBSTER, M. W. 2001. Association of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm with local hypoxia and wall weakening. *J Vasc Surg,* 34**,** 291-9.

WANG, Y., AIT-OUFELLA, H., HERBIN, O., BONNIN, P., RAMKHELAWON, B., TALEB, S., HUANG, J., OFFENSTADT, G., COMBADIERE, C., RENIA, L., JOHNSON, J. L., THARAUX, P. L., TEDGUI, A. & MALLAT, Z. 2010. TGF-beta

activity protects against inflammatory aortic aneurysm progression and complications in angiotensin II-infused mice. *J Clin Invest,* 120**,** 422-32.

WANG, Y. X., MARTIN-MCNULTY, B., FREAY, A. D., SUKOVICH, D. A., HALKS-MILLER, M., LI, W. W., VERGONA, R., SULLIVAN, M. E., MORSER, J., DOLE, W. P. & DENG, G. G. 2001. Angiotensin II increases urokinase-type plasminogen activator expression and induces aneurysm in the abdominal aorta of apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol,* 159**,** 1455-64.

WARD, A. S. 1992. Aortic aneurysmal disease. A generalized dilating diathesis. *Arch Surg,* 127**,** 990-1.

WASKOW, C., LIU, K., DARRASSE-JEZE, G., GUERMONPREZ, P., GINHOUX, F., MERAD, M., SHENGELIA, T., YAO, K. & NUSSENZWEIG, M. 2008. The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat Immunol,* 9**,** 676-83.

WASSEF, M., UPCHURCH, G. R., JR., KUIVANIEMI, H., THOMPSON, R. W. & TILSON, M. D., 3RD 2007. Challenges and opportunities in abdominal aortic aneurysm research. *J Vasc Surg,* 45**,** 192-8.

WEBER, C., WEBER, K. S., KLIER, C., GU, S., WANK, R., HORUK, R. & NELSON, P. J. 2001. Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and T(H)1-like/CD45RO(+) T cells. *Blood,* 97**,** 1144-6.

WEBER, C., ZERNECKE, A. & LIBBY, P. 2008. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat Rev Immunol,* 8**,** 802-15.

WEINER, R. S. & MASON, R. R. 1984. Subfractionation of human blood monocyte subsets with Percoll. *Exp Hematol,* 12**,** 800-4.

WIJFFELS, J. F., DE ROVER, Z., BEELEN, R. H., KRAAL, G. & VAN ROOIJEN, N. 1994. Macrophage subpopulations in the mouse spleen renewed by local proliferation. *Immunobiology,* 191**,** 52-64.

WILLIAMS, M. J. 2007. Drosophila hemopoiesis and cellular immunity. *J Immunol,* 178**,** 4711-6.

WILSON, W. R., ANDERTON, M., CHOKE, E. C., DAWSON, J., LOFTUS, I. M. & THOMPSON, M. M. 2008. Elevated plasma MMP1 and MMP9 are associated with abdominal aortic aneurysm rupture. *Eur J Vasc Endovasc Surg,* 35**,** 580-4.

WILTON, E., BLAND, M., THOMPSON, M. & JAHANGIRI, M. 2008. Matrix metalloproteinase expression in the ascending aorta and aortic valve. *Interact Cardiovasc Thorac Surg,* 7**,** 37-40.

WOESSNER, J. F., JR. 1991. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J,* 5**,** 2145-54.

WOLF, Y. G., THOMAS, W. S., BRENNAN, F. J., GOFF, W. G., SISE, M. J. & BERNSTEIN, E. F. 1994. Computed tomography scanning findings associated with rapid expansion of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg,* 20**,** 529-35; discussion 535-8.

WOLINSKY, H. & GLAGOV, S. 1967. A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals. *Circ Res,* 20**,** 99-111.

WONG, K. L., TAI, J. J., WONG, W. C., HAN, H., SEM, X., YEAP, W. H., KOURILSKY, P. & WONG, S. C. 2011. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood,* 118**,** e16-31.

WOOLLARD, K. J. & GEISSMANN, F. 2010. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol,* 7**,** 77-86.

XIONG, W., KNISPEL, R., MACTAGGART, J. & BAXTER, B. T. 2006. Effects of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 deficiency on aneurysm formation. *J Vasc Surg,* 44**,** 1061-6.

XIONG, W., KNISPEL, R., MACTAGGART, J., GREINER, T. C., WEISS, S. J. & BAXTER, B. T. 2009. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase regulates macrophage-dependent elastolytic activity and aneurysm formation in vivo. *J Biol Chem,* 284**,** 1765-71.

XIONG, W., ZHAO, Y., PRALL, A., GREINER, T. C. & BAXTER, B. T. 2004. Key roles of CD4+ T cells and IFN-gamma in the development of abdominal aortic aneurysms in a murine model. *J Immunol,* 172**,** 2607-12.

YAJIMA, N., MASUDA, M., MIYAZAKI, M., NAKAJIMA, N., CHIEN, S. & SHYY, J. Y. 2002. Oxidative stress is involved in the development of experimental abdominal aortic aneurysm: a study of the transcription profile with complementary DNA microarray. *J Vasc Surg,* 36**,** 379-85.

YAMADA, H., SAITO, F., FUKUTA-OHI, H., ZHONG, D., HASE, A., ARAI, K., OKUYAMA, A., MAEKAWA, R., SHIMIZU, T. & MATSUMURA, K. 2001. Processing of beta-dystroglycan by matrix metalloproteinase disrupts the link between the extracellular matrix and cell membrane via the dystroglycan complex. *Hum Mol Genet,* 10**,** 1563-9.

YAMANOUCHI, D., MORGAN, S., KATO, K., LENGFELD, J., ZHANG, F. & LIU, B. 2010. Effects of caspase inhibitor on angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 30**,** 702-7.

YAMAWAKI-OGATA, A., HASHIZUME, R., SATAKE, M., KANEKO, H., MIZUTANI, S., MORITAN, T., UEDA, Y. & NARITA, Y. 2010. A doxycycline loaded, controlled-release, biodegradable fiber for the treatment of aortic aneurysms. *Biomaterials,* 31**,** 9554-64.

YANAGITANI, Y., RAKUGI, H., OKAMURA, A., MORIGUCHI, K., TAKIUCHI, S., OHISHI, M., SUZUKI, K., HIGAKI, J. & OGIHARA, T. 1999. Angiotensin II type 1 receptor-mediated peroxide production in human macrophages. *Hypertension,* 33**,** 335-9.

YASAKA, T., MANTICH, N. M., BOXER, L. A. & BAEHNER, R. L. 1981. Functions of human monocyte and lymphocyte subsets obtained by countercurrent centrifugal elutriation: differing functional capacities of human monocyte subsets. *J Immunol,* 127**,** 1515-8.

YIN, M., ZHANG, J., WANG, Y., WANG, S., BOCKLER, D., DUAN, Z. & XIN, S. 2010. Deficient CD4+CD25+ T regulatory cell function in patients with abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 30**,** 1825-31.

YONA, S. & JUNG, S. 2010. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol,* 17**,** 53-9.

YONA, S., KIM, K. W., WOLF, Y., MILDNER, A., VAROL, D., BREKER, M., STRAUSS-AYALI, D., VIUKOV, S., GUILLIAMS, M., MISHARIN, A., HUME, D. A., PERLMAN, H., MALISSEN, B., ZELZER, E. & JUNG, S. 2013. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity,* 38**,** 79-91.

YVAN-CHARVET, L., PAGLER, T., GAUTIER, E. L., AVAGYAN, S., SIRY, R. L., HAN, S., WELCH, C. L., WANG, N., RANDOLPH, G. J., SNOECK, H. W. & TALL, A. R. 2010. ATP-binding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation. *Science,* 328**,** 1689-93.

ZAWADA, A. M., ROGACEV, K. S., ROTTER, B., WINTER, P., MARELL, R. R., FLISER, D. & HEINE, G. H. 2011. SuperSAGE evidence for CD14++CD16+ monocytes as a third monocyte subset. *Blood,* 118**,** e50-61.

ZERNECKE, A., LIEHN, E. A., GAO, J. L., KUZIEL, W. A., MURPHY, P. M. & WEBER, C. 2006. Deficiency in CCR5 but not CCR1 protects against neointima formation in atherosclerosis-prone mice: involvement of IL-10. *Blood,* 107**,** 4240-3.

ZHANG, J., SCHMIDT, J., RYSCHICH, E., SCHUMACHER, H. & ALLENBERG, J. R. 2003. Increased apoptosis and decreased density of medial smooth muscle cells in human abdominal aortic aneurysms. *Chin Med J (Engl),* 116**,** 1549-52.

ZHANG, X., THATCHER, S., WU, C., DAUGHERTY, A. & CASSIS, L. A. 2014. Castration of male mice prevents the progression of established angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*.

ZHOU, H. F., YAN, H., STOVER, C. M., FERNANDEZ, T. M., RODRIGUEZ DE CORDOBA, S., SONG, W. C., WU, X., THOMPSON, R. W., SCHWAEBLE, W. J., ATKINSON, J. P., HOURCADE, D. E. & PHAM, C. T. 2012. Antibody directs properdin-dependent activation of the complement alternative pathway in a mouse model of abdominal aortic aneurysm. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 109**,** E415-22.

ZHU, S. N., CHEN, M., JONGSTRA-BILEN, J. & CYBULSKY, M. I. 2009. GM-CSF regulates intimal cell proliferation in nascent atherosclerotic lesions. *J Exp Med,* 206**,** 2141-9.

ZIEGLER-HEITBROCK, H. W., FINGERLE, G., STROBEL, M., SCHRAUT, W., STELTER, F., SCHUTT, C., PASSLICK, B. & PFORTE, A. 1993. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol,* 23**,** 2053-8.

ZIEGLER-HEITBROCK, H. W., PASSLICK, B. & FLIEGER, D. 1988. The monoclonal antimonocyte antibody My4 stains B lymphocytes and two distinct monocyte subsets in human peripheral blood. *Hybridoma,* 7**,** 521-7.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. 2007. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol,* 81**,** 584-92.

ZOUGGARI, Y., AIT-OUFELLA, H., BONNIN, P., SIMON, T., SAGE, A. P., GUERIN, C., VILAR, J., CALIGIURI, G., TSIANTOULAS, D., LAURANS, L., DUMEAU, E., KOTTI, S., BRUNEVAL, P., CHARO, I. F., BINDER, C. J., DANCHIN, N., TEDGUI, A., TEDDER, T. F., SILVESTRE, J. S. & MALLAT, Z. 2013. B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. *Nat Med,* 19**,** 1273-80.