



HAL
open science

Remodelage vasculaire dans les modèles expérimentaux d'anévrisme de l'aorte abdominale

Raphaël Coscas

► **To cite this version:**

Raphaël Coscas. Remodelage vasculaire dans les modèles expérimentaux d'anévrisme de l'aorte abdominale. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLV025 . tel-01565929

HAL Id: tel-01565929

<https://theses.hal.science/tel-01565929>

Submitted on 20 Jul 2017

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

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

NNT : 2017SACLV025

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE DE VERSAILLES SAINT-QUENTIN EN YVELINES

ECOLE DOCTORALE N° 577
Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV)

Spécialité Sciences de la Vie et de la Santé

Par

Monsieur Raphaël COSCAS

**Remodelage vasculaire dans les modèles expérimentaux
d'anévrisme de l'aorte abdominale**

Thèse présentée et soutenue à Boulogne-Billancourt le 19 Mai 2017

Composition du Jury :

Monsieur le Pr Olivier Goëau-Brissonnière	PU-PH, UVSQ	Président
Monsieur le Pr Eric Steinmetz	PU-PH, Université de Dijon	Rapporteur
Monsieur le Pr Yann Gouëffic	PU-PH, Université de Nantes	Rapporteur
Monsieur le Dr Jean-Baptiste Michel	DR-E, Inserm, Université Paris 7	Examineur
Monsieur le Pr Eric Allaire	PU-PH, Université Paris-Est	Examineur
Monsieur le Pr Gilles Chiocchia	PU-PH, UVSQ	Directeur
Monsieur le Pr Ziad Massy	PU-PH, UVSQ	Co-directeur

Titre : Remodelage vasculaire dans les modèles expérimentaux d'anévrisme de l'aorte abdominale

Mots clés : Anévrisme de l'aorte abdominale, Modèle expérimental, Matrice extracellulaire, Calcification

Résumé : La physiopathologie de l'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA) est complexe. Elle implique notamment des facteurs hémodynamiques, une protéolyse matricielle, un stress oxydant et une réaction immune. Des modèles expérimentaux ont été mis au point pour explorer les mécanismes impliqués dans la genèse et la croissance des AAAs. Dans ce travail, nous explorons le rôle de ces modèles dans la compréhension du remodelage vasculaire des AAAs.

Dans une première partie, une revue de la littérature sur les modèles expérimentaux d'AAA est menée. Dans une seconde partie, nous explorons l'origine et le rôle des calcifications des AAAs expérimentaux. Dans une troisième partie, le modèle de xéno greffe aortique décellularisée est utilisé pour étudier le rôle de l'immunité adaptative dans la rupture.

Notre revue identifie les principaux modèles d'AAA. Leur limite majeure est la survenue d'une cicatrisation empêchant l'évolution vers la rupture. Notre exploration des calcifications anévrysmales retrouve une co-localisation des calcifications avec de l'ADN libre et un modèle expérimental démontre la capacité de l'ADN libre à induire des calcifications. La croissance anévrysmale est toutefois ralentie par les calcifications. Notre étude sur le modèle de xéno greffe décellularisée retrouve la possibilité d'induire une rupture lorsqu'une pré-sensibilisation contre la matrice extracellulaire est réalisée. Les glycoprotéines de structure et les protéoglycannes semblent être les composants matriciels en cause dans ces ruptures.

Les modèles expérimentaux constituent des outils majeurs pour l'étude des mécanismes impliqués dans le remodelage vasculaire des AAAs.

Title : Vascular remodeling in experimental models of abdominal aortic aneurysms

Keywords : Abdominal aortic aneurysm, Experimental model, Extracellular matrix, Calcification

Abstract : Pathophysiology of abdominal aortic aneurysms (AAA) is complex. It mainly involves hemodynamics, matrix proteolysis, oxidative stress and an immune reaction. Several experimental models have been described to explore mechanisms involved in this disease. In the present work, we explore the role of experimental models in AAA vascular remodeling.

First, a literature review regarding experimental models of AAA is performed. Second, we explore the origin and the role of calcifications observed in experimental models. Third, the decellularized xenograft model is used to study the role of adaptive immunity in triggering rupture.

Our review identifies main AAA models. Their major limit is aortic healing, preventing evolution toward rupture. We find that AAA calcifications co-localized with free DNA and that free DNA could induce calcifications experimentally. However, AAA growth is decreased by calcifications. The decellularized xenograft model can evolve toward rupture when pre-sensitization against the extracellular matrix is performed. Structural glycoproteins and proteoglycans seems to be the main matrix component involved in these ruptures.

Experimental AAA models are major tools to study mechanisms involved in vascular remodeling.

REMERCIEMENTS

J'adresse mes plus sincères remerciements :

Au Dr Jean-Baptiste Michel,

Tu m'as fait l'honneur d'être le tuteur de cette thèse. T'avoir rencontré est une opportunité exceptionnelle. Ta vision translationnelle et ta connaissance de la physiopathologie vasculaire sont uniques. Tu m'as donné le goût de la recherche et transmis énormément. Il n'est pas une discussion avec toi où je n'ai appris de nouvelles choses. Je ferai de mon mieux pour garder toute ma vie cette approche de la pathologie.

Au Pr Ziad Massy,

Vous m'avez fait l'honneur de diriger cette thèse. Vous êtes un moteur hors norme dans l'aboutissement des projets. Cette thèse n'en est qu'un modeste exemple. Notre collaboration quotidienne est très importante pour moi. Puisse t elle se poursuivre tout au long de ma carrière professionnelle. Je tenterai de poursuivre ma carrière avec votre esprit de la recherche translationnelle.

Au Pr Gilles Chiocchia,

Vous m'avez fait l'honneur de diriger cette thèse. La confiance que vous m'avez donnée dès le premier jour est hautement précieuse. Elle m'a permis de travailler sereinement sur ce projet et de l'amener à sa conclusion. J'en mesure la portée et vous en suis sincèrement reconnaissant. J'espère que notre collaboration se poursuivra pour de nombreuses années car les perspectives de notre collaboration sont immenses..

Au Pr Goëau-Brissonnière,

Vous me faites l'honneur d'examiner ce travail et de présider le jury. Vous êtes le fil conducteur de ma progression depuis plus de 10 ans. Vous avez été mon directeur de thèse de médecine, m'avez soutenu pour mon année aux Etats-Unis, puis permis de m'épanouir au sein de service. Vous m'avez aussi appris l'importance de relations humaines respectueuses à tous les instants. Merci pour votre soutien et votre amitié.

Au Pr Yann Gouëffic,

Tu me fais l'honneur de rapporter ce travail. Tu fais partie des rares membres de notre communauté chirurgicale à accorder une importance égale à la recherche translationnelle et à la vie clinique. Tu es pour moi le modèle du chirurgien vasculaire moderne clinicien-chercheur. Je tenterai de marcher dans tes pas.

Au Pr Eric Steinmetz,

Vous me faites l'honneur de rapporter ce travail. Depuis le début de mon début d'internat, j'admire vos connaissances globales de la pathologie chirurgicale et votre sens de la mesure. Vous êtes un modèle de carrière et votre soutien est précieux. J'espère que nous aurons le plaisir d'échanger encore ensemble pour de nombreuses années.

Au Pr Eric Allaire,

Vous me faites l'honneur d'examiner ce travail. Vous solliciter pour être membre du jury de cette thèse était une évidence tant votre connaissance des

modèles expérimentaux d'anévrismes est étendue. J'ai toujours apprécié échanger avec vous sur les sujets chirurgicaux mais aussi extra-chirurgicaux. Votre amitié m'est précieuse.

Au Dr Marie-Paule Jacob,

Merci d'avoir été là depuis le début de ce projet. Ta rigueur et ta précision technique ont été indispensables à son accomplissement. Merci pour tout le temps passé à me transmettre ton savoir.

A Mme Liliane Louedec et à Mr Sebastien Dupont

Merci d'avoir été les chevilles ouvrières de ce travail. Votre contribution est immense, à la hauteur de vos compétences. Je suis très honoré de collaborer avec vous. J'espère que tous vos projets, professionnels et personnels se concrétiseront.

J'adresse mes plus remerciements les plus affectueux :

A Sarah, pour me soutenir quotidiennement dans ce travail mais aussi dans les projets. J'en mesure l'importance et la difficulté. Puisse notre amour être éternel.

A mes parents, Fabienne et Alain, A mes frères et leurs épouses, merci de votre soutien indéfectible en toutes circonstances. Ces liens solides ne peuvent rompre.

A mes amis de toujours, notamment Eric, Romain, Matthieu, mais aussi les autres, qui ont accompagné et soutenu ma carrière professionnelle depuis le premier jour. Et ce premier jour, c'était il y a longtemps.

A mes collègues qui m'ont permis de dégager du temps pour ce travail.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

- 1 – Considérations générales sur la paroi artérielle normale et sa résistance la pression artérielle systémique
 - 1.1 – Organisation de la paroi artérielle normale
 - 1.1.1 – L'intima
 - 1.1.2 – La media
 - 1.1.2.1 – Organisation générale de la média
 - 1.1.2.2 – La cellule musculaire lisse
 - 1.1.2.3 – La matrice extracellulaire
 - 1.1.2.3.1 – L'élastine
 - 1.1.2.3.2 – Les collagènes
 - 1.1.2.3.3 – Les protéoglycanes
 - 1.1.2.3.4 – Les glycoprotéines de structure
 - 1.1.2.3.4.1 – La fibronectine
 - 1.1.2.3.4.2 – Les laminines
 - 1.1.2.3.4.3 – Les thrombospondines
 - 1.1.2.3.4.4 – Les nidogènes
 - 1.1.2.3.4.5 – Les ténaescines
 - 1.1.2.3.4.6 – L'ostéopontine
 - 1.1.3 – L'adventice
 - 2 – L'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA): une maladie grave et fréquente
 - 2.1 – Définition
 - 2.2 – Epidémiologie
 - 2.3 – Facteurs de risque
 - 2.3.1 – Génétique et antécédents familiaux
 - 2.3.2 – L'âge et le vieillissement artériel
 - 2.3.3 – Le sexe masculin
 - 2.3.4 – Le tabagisme
 - 2.3.5 – La dyslipidémie
 - 2.3.6 – L'hypertension artérielle
 - 2.3.7 – Le diabète
 - 3 – Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la formation et l'entretien de la dilatation anévrysmale conduisant à la rupture
 - 3.1 – Le gradient de pression trans pariétal à l'origine de la convection radiale
 - 3.2 – Organisation spatiale des AAA
 - 3.2.1 – Le développement du thrombus endoluminal
 - 3.2.2 – La réaction de l'adventice
 - 3.3 – Mécanismes physiopathologiques fondamentaux impliqués dans la genèse et la croissance des AAA
 - 3.3.1 – Le stress biomécanique
 - 3.3.2 – La protéolyse médiale
 - 3.3.3 – La perte des cellules musculaires lisses

- 3.3.4 – Le stress oxydant
- 3.3.5 – La réaction immune
 - 3.3.5.1 – Concepts généraux
 - 3.3.5.2 – Immunité innée
 - 3.3.5.2.1 – Activation neutrophilaire
 - 3.3.5.2.2 – Activation du complément
 - 3.3.5.2.3 – Possible rôle d'antigènes exogènes
 - 3.3.5.3 – Immunité adaptative
 - 3.3.5.3.1 – Activation des lymphocytes T
 - 3.3.5.3.2 – Stimulation des lymphocytes B et sécrétion d'immunoglobulines
 - 3.3.5.3.3 – Activation des monocytes/macrophages
 - 3.3.5.3.4 – Activation des mastocytes
 - 3.3.5.3.5 – Implication d'autres composants cellulaires
 - 3.3.5.3.6 – Possible rôle d'un auto-antigène

PARTIE 1 : ETAT DES CONNAISSANCES CONCERNANT LES MODELES EXPERIMENTAUX D'ANEVRYSME

- 1 – Méthodes
- 2 – Principaux modèles expérimentaux d'AAA
- 3 – Limites des modèles actuels

ANNEXE A LA PARTIE 1 : ARTICLE “Translational relevance and recent advance of animal models of abdominal aortic aneurysm”

PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE DES CALCIFICATIONS OBSERVEES DANS LES MODELES D'ANEVRYSME AORTIQUE

- 1 – Etat des connaissances sur la physiopathologie des calcifications artérielles
 - 1.1 – Les calcifications artérielles : un déséquilibre entre mécanismes initiateurs et inhibiteurs
 - 1.2 – Prédisposition génétique
 - 1.3 – La cellule musculaire lisse vasculaire au cœur du phénomène
 - 1.3.1 – La transdifférenciation ostéoblastique
 - 1.3.2 – La sécrétion de vésicules matricielles
 - 1.3.3 – L'apoptose des cellules musculaires lisses
 - 1.3.4 – Le rôle potentiel des cellules souches
 - 1.4 – Diminution de l'activité ostéoclastique
 - 1.5 – Modification de l'activité des voies de signalisation pro- et anti-calcifiantes
 - 1.5.1 – Voie de signalisation de la protéine morphogénétique osseuse (*bone morphogenetic protein*, BMP)
 - 1.5.2 – Voie de signalisation Wnt
 - 1.5.3 – Métabolisme du phosphate
 - 1.5.4 – Voies de signalisation impliquées dans l'hyperglycémie et le diabète
 - 1.5.5 – Voies de signalisation du récepteur sensible au calcium
 - 1.5.6 – Voies de signalisation régulant l'activité ostéoclastique
 - 1.5.7 – Autres stress chroniques

2 – Revue des causes et conséquences des dépôts calciques dans les AAA

3 – Méthodes et Résultats

3.1 – Origine des calcifications observées dans les AAA expérimentaux

3.2 – Conséquences des calcifications observées dans les AAA expérimentaux

ANNEXE A LA PARTIE 2 : ARTICLE “Free DNA Precipitates Calcium Phosphate Apatite Crystals In The Arterial Wall *in Vivo*”

PARTIE 3 : MODELISATION EXPERIMENTALE DU ROLE DE L’IMMUNITE ADAPTATIVE DANS LA RUPTURE D’ANEVRYSME AORTIQUE

1 – Rupture et immunité adaptative

2 – Méthodes et résultats

ANNEXE A LA PARTIE 3 : ARTICLE “Exploring adaptive immunity against aortic extracellular matrix components in experimental aortic aneurysms”

DISCUSSION ET CONCLUSION

REFERENCES

INTRODUCTION

1 – Considérations générales sur la paroi artérielle normale et sa résistance la pression artérielle systémique

1.1 – Organisation de la paroi artérielle normale

A l'état physiologique, une artère possède une paroi rectiligne, tubulaire et parallèle. Le mur artériel est constitué de trois couches histologiques qui sont, de dedans en dehors, l'intima, la média et l'adventice (Figure 1).

1.1.1 – L'intima

L'intima est en contact direct avec le sang circulant. Elle est constituée par l'endothélium qui repose sur un tissu conjonctif fibro-élastique : la membrane basale. L'endothélium est fait d'une couche unique de cellules endothéliales qui constitue une barrière physique entre le sang et les couches sous-endothéliales. Il peut être à l'inverse perçu comme une surface d'échange entre le sang et les tissus qui va permettre le passage des nutriments de la lumière vers les autres cellules sous-endothéliales. Il joue également un rôle important dans la régulation de la coagulation, du tonus vasculaire et la diapédèse des neutrophiles. Les cellules sont liées les unes aux autres par des jonctions serrées (*tight junctions*), adhérentes (*adherens junctions*) et communicantes (*gap junctions*). Les jonctions serrées et les jonctions adhérentes assurent ensemble la cohésion cellulaire et l'étanchéité de l'endothélium. Elles sont composées de protéines transmembranaires reliées au cytosquelette sous-cortical d'actine par différents éléments intracellulaires (1-3).

La membrane basale est essentiellement composée de collagène de type IV (4), de protéoglycanes (5), de fibronectine (6), de laminine (7) et d'élastine (8). Elle est séparée de la média par la limitante élastique interne, faite de fibres élastiques.

1.1.2 – La média

1.1.2.1 – Organisation générale de la média

La média constitue la couche structurante de l'artère. Elle est avasculaire et un site immun privilégié. Elle consiste en un assemblage de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLv) et de matrice extracellulaire (MEC) (9) synthétisée par les CMLv (10) (Figure 2). Ainsi, dans l'aorte, les CMLv sont intercalées entre des couches concentriques de lames élastiques matricielles. Chaque lame élastique s'alterne avec une couche de CMLv pour former une unité lamellaire (11). Ces lames élastiques sont essentiellement constituées d'élastine (90%) synthétisée par les CMLv. Elles fournissent la résilience nécessaire pour absorber le stress hémodynamique de la systole et restituer cette énergie lors de la diastole (compliance). Bien que la composition de la MEC évolue le long de l'arbre artériel, on y retrouve partout 4 familles de composants que sont les collagènes, les fibres élastiques (faites d'élastine et de glycoprotéines associées à l'élastine), les glycoprotéines de structure et les protéoglycanes.

1.1.2.2 – La cellule musculaire lisse

Les CMLv sont des cellules issues du mésoderme et globalement peu différenciées. Elles présentent une organisation concentrique. Elles sont généralement fusiformes, mononuclées et mesurent de 2 à 5 μm de diamètre pour une longueur très variable selon le tissu. Elles représentent la composante cellulaire principale de la paroi vasculaire (12).

Dans les artères saines, les CMLv sont à l'état quiescent et ont un appareil contractile développé qui fonctionne pour dilater et contracter les cellules. Les fibres d'actine forment la charpente de l'appareil contractile et caractérisent les CMLv différenciées et matures (13, 14). La myosine joue également un rôle essentiel lors de ses changements de conformation en suivant les chaînes d'actine.

L'état de contraction des CMLv dépend de l'état de phosphorylation de l'appareil contractile (actine/myosine). Le calcium joue un rôle en se liant à la calmoduline pour

activer des kinases qui phosphorylent les protéines cibles de l'appareil contractile. Il existe des isoformes lentes et rapides des protéines contractiles (15). La concentration de calcium cytoplasmique est inférieure à la concentration extracellulaire et à la concentration à l'intérieur des stocks intracellulaires (surtout le réticulum endoplasmique). La hausse du taux de calcium est donc un phénomène plutôt passif. Cette régulation du taux de calcium intracellulaire fait intervenir à des

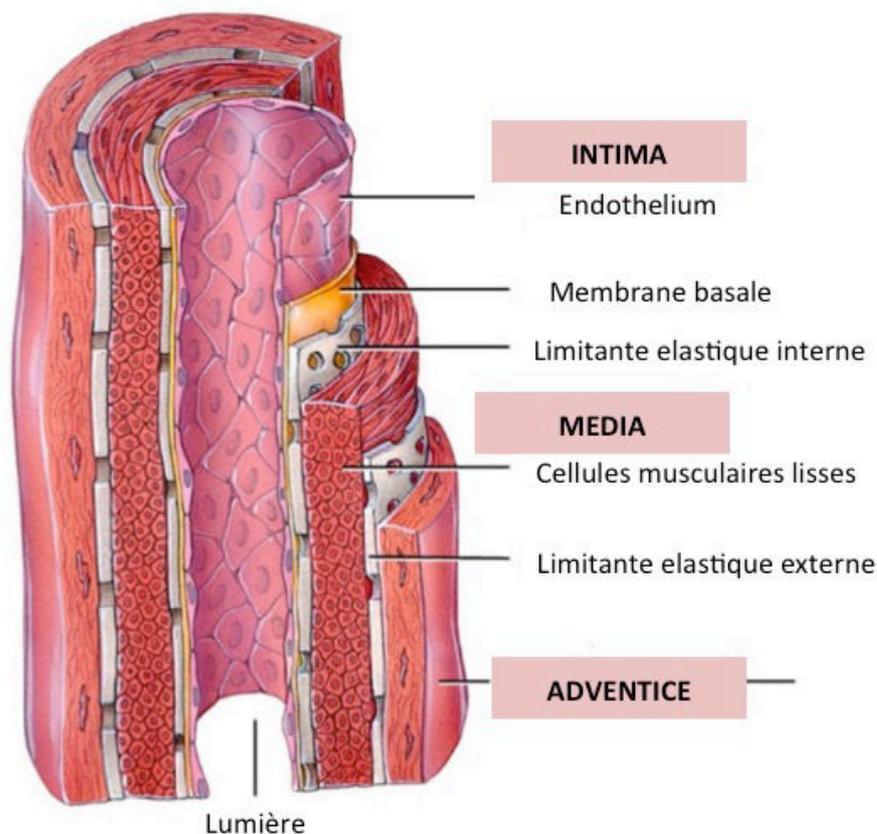


Figure 1: Schéma résumé de l'organisation de la paroi artérielle normale

degrés divers des canaux/transporteurs calciques transmembranaires voltage- ou récepteur-dépendants ainsi que le réticulum endoplasmique. Il s'agit d'une physiologie complexe faisant intervenir des signaux de type hormonal (16-19) et de type mécanique (20). Tous ces facteurs interviennent dans la contraction de la CMLv et son maintien en phénotype mature contractile.

La CMLv différenciée de phénotype contractile peut néanmoins changer de phénotype en CML immature de phénotype prolifératif et sécrétoire, en réponse à des modifications environnementales (21), notamment lorsque le stress oxydant local est augmenté (22). Elle peut alors retrouver un phénotype de différenciation très différent, comme par exemple devenir phagocyte ou ostéoblaste (23). Ces mécanismes sont aujourd'hui considérés comme fondamentaux dans le développement et l'évolution de la maladie athéromateuse (24). L'apoptose des CMLv ainsi que leur rôle dans la réorganisation de la MEC peuvent également être modulées par certaines voies de signalisation (25). Ainsi, la CMLv est aujourd'hui considérée comme un acteur capital de la maladie athéromateuse sténosante (24) mais aussi anévrysmale (26). Elle joue également un rôle clef dans la resténose après geste vasculaire (27).

1.1.2.3 – La matrice extracellulaire

1.1.2.3.1 – L'élastine

L'élastine constitue un réseau totalement insoluble de monomères de tropoélastine polymérisés entre eux (28). Il s'agit du principal constituant de la MEC aortique puisqu'elle représente à elle seule 33 % du poids sec du vaisseau (29). Elle constitue également 90% des fibres élastiques, les 10 % restant correspondant aux fibrillines et aux glycoprotéines associées aux microfibrilles (MAGP, *microfibril-associated glycoprotein*) (30). L'élastine est essentielle à l'élasticité du vaisseau (amortissement des ondes de pressions et de flux) et dans sa résistance à l'étirement.

1.1.2.3.2 – Les collagènes

Les collagènes constituent la majorité des protéines de la MEC. Ils assurent la résistance à la rupture et la rigidité du tissu. Le tropocollagène est l'unité fondamentale du collagène, et correspond à une molécule asymétrique de 280nm de long et de 1,5 nm de diamètre. Il s'agit d'une glycoprotéine formée par l'enroulement

de 3 hélices gauches α , porteuses de glucide (glucose, galactose), superenroulées en hélice droite. Cette structure supramoléculaire est induite par les coudes apportés par la répétition d'un triplet d'acides aminés Glycine-X-Y, X étant le plus souvent un résidu proline et Y, un résidu hydroxyproline (31). La triple hélice de pro-collagène est sécrétée par exocytose dans la MEC puis un clivage des pro-peptides intervient (32). Il y a ensuite auto-assemblage des pro-collagènes et pontage des résidus lysine et hydroxylysine en trimères via l'action des lysyl-oxydases pour donner les fibrilles de collagène qui constituent les fibres de collagènes.

La superfamille des collagènes peut être subdivisée sur la base des similitudes de structure adoptée par les différents collagènes, en grande partie dues aux zones n'appartenant pas à la triple hélice (33). Dans les parois vasculaires, on retrouve les collagènes fibrillaires I (60 %), III (30 %) et V, les collagènes formant un réseau IV et VI, et les FACITS (*Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple helices*) XII et XIV.

Chez l'homme, on retiendra notamment que des mutations du gène Col3a1 du collagène de type III entraînent des ruptures artérielles spontanées, dans le cadre du syndrome d'Ehlers Danlos de type IV.

1.1.2.3.3 – Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont constitués de protéines à multidomaines sur lesquelles sont attachés un ou plusieurs glycosaminoglycanes (GAG) (34). Les chaînes GAG sont des polymères de disaccharides portant des fonctions carboxylate ou sulfate. Dans la paroi artérielle, on retrouve deux classes de protéoglycanes: les gros protéoglycanes qui s'attachent au hyaluronane et les petits protéoglycanes riches en leucine (35).

Parmi les gros protéoglycanes qui s'attachent au hyaluronane dans la paroi artérielle, se trouvent le versicane et l'aggrécane. Le versicane est connu pour intervenir dans

l'adhérence, la prolifération et la migration des cellules (36). Il a été observé une forte accumulation de versicane dans la MEC artérielle au cours du vieillissement et dans différentes pathologies vasculaires comme l'athérosclérose et la resténose (36-38). Cette augmentation en versicane est corrélée avec une diminution de la quantité d'élastine. Contrairement au versicane, la fonction de l'aggrécane dans la paroi artérielle est encore mal connue.

Parmi les petits protéoglycanes riches en leucine, on trouve dans la paroi artérielle la décorine, le biglycane et le lumicane. Contrairement aux gros protéoglycanes, ces molécules ne fixent pas le hyaluronane. Elles sont connues pour fixer de nombreuses molécules de la MEC dont les collagènes, la tropoélastine, la fibronectine et certaines fibrillines. Ces petits protéoglycanes régulent la fibrillogenèse du collagène.

1.1.2.3.4 – Les glycoprotéines de structure

Les glycoprotéines de structure sont des protéines fibrillaires adhésives qui assurent l'organisation supramoléculaire de la MEC et la cohésion cellules/matrice. Bien que ces protéines soient hétérogènes par leurs tailles et leurs structures, elles possèdent des caractéristiques communes telles que des sites de fixation aux cellules via leurs séquences RGD (Arg-Gly-Asp) qui se lient aux intégrines ancrées dans la membrane des cellules, ainsi que de nombreux sites d'interactions avec les autres molécules de la MEC.

1.1.2.3.4.1 – La fibronectine

La fibronectine est sécrétée sous forme de dimères dont les deux sous-unités sont similaires et reliées entre elles par des ponts disulfure localisés dans la partie C-terminale de la protéine (33). Elle est codée par un seul gène mais il existe plusieurs isoformes de la protéine, variant de 230 à 270 kDa, suite à l'épissage alternatif des pré-ARNm. Il n'a pas été trouvé de différences fonctionnelles entre les isoformes.

Cependant, dans le plasma, on retrouve une forme soluble de la fibronectine et, dans la MEC, une forme insoluble, appelées fibronectines plasmatique et cellulaire, respectivement (39).

La fibronectine est composée de trois types de motifs répétés, appelés motif I, motif II et motif III. Ces domaines sont organisés dans les domaines fonctionnels impliqués dans les interactions avec les autres constituants de la MEC et les cellules. La région N-terminale de chaque sous-unité, constituée de motifs I, correspond à un site de liaison à l'héparine, à la fibrine et aux bactéries Gram-positives. Le motif principal présent dans la fibronectine est le motif III puisqu'il représente à lui seul plus de 60 % de la séquence protéique. On retrouve également au milieu de ces motifs III, une séquence RGD (Arg-Gly-Asp) qui est reconnue par de nombreuses intégrines, permettant ainsi l'attachement de la MEC aux cellules (40). La fibronectine permet donc une association pérenne entre les cellules et la MEC et influence ainsi l'adhérence, la migration et la survie des CML dans la paroi artérielle. D'ailleurs, la délétion de la séquence RGD par mutagenèse dirigée induit une perte de l'adhérence cellulaire (41).

1.1.2.3.4.2 – Les laminines

Les laminines constituent une famille de glycoprotéines de la membrane basale qui affectent la prolifération cellulaire, la migration et la différenciation. On compte 16 laminines différentes qui se composent de trois chaînes α , β et γ . Dans la lame basale, les laminines sont avec le collagène IV des éléments structurels très importants (42, 43). Les chaînes de collagène IV constituent la charpente de la lame basale organisée en un réseau polygonal et les laminines forment un second réseau de polymères. Les laminines interviennent dans l'adhérence des cellules endothéliales sur la membrane basale (33). Elles jouent donc un rôle central dans la formation de la membrane basale.

1.1.2.3.4.3 – Les thrombospondines

Les thrombospondines sont des glycoprotéines trimériques produites par les plaquettes et qui interagissent avec de nombreuses protéines du plasma comme le fibrinogène et le plasminogène. Elles sont aussi sécrétées par les cellules endothéliales et les CMLv et interagissent avec des protéines de la MEC ainsi qu'avec la forme latente du *transforming growth factor-beta*(TGF)- β que les thrombospondines peuvent activer (44). Les thrombospondines n'interviennent pas dans l'intégrité des tissus, mais agissent plutôt comme des modulateurs des interactions des cellules avec la MEC. Les thrombospondines possèdent de nombreuses fonctions, parmi elles, la modulation de l'angiogenèse (45, 46).

1.1.2.3.4.4 – Les nidogènes

Les nidogène-1 et -2 sont des protéines ubiquitaires des membranes basales. Le nidogène-1 sert de lien entre la laminine-1 et le collagène IV et stabilise ainsi les membranes basales (47). Cependant, des études expérimentales chez la souris montraient que les nidogènes n'étaient pas indispensables à la formation et à la maintenance des membranes basales (47, 48). La littérature reste finalement assez pauvre sur leur rôle.

1.1.2.3.4.5 – Les ténascines

Les ténascines forment une famille de protéines caractérisées par leur homologie de structure. Elles participent à la régulation de l'interaction cellules-matrice, du métabolisme cellulaire et de la transition épithélio-mésenchymateuse (49). Là aussi, la littérature est assez éparse.

1.1.2.3.4.6 – L'ostéopontine

L'ostéopontine est une glycoprotéine fortement phosphorylée, très exprimée par les monocytes/macrophages dont elle peut moduler l'adhérence, la migration, l'expression de cytokines, l'état de différenciation et la phagocytose (50). Elle

intervient dans le remodelage tissulaire, notamment cardiovasculaire, par son interaction avec les intégrines (51, 52).

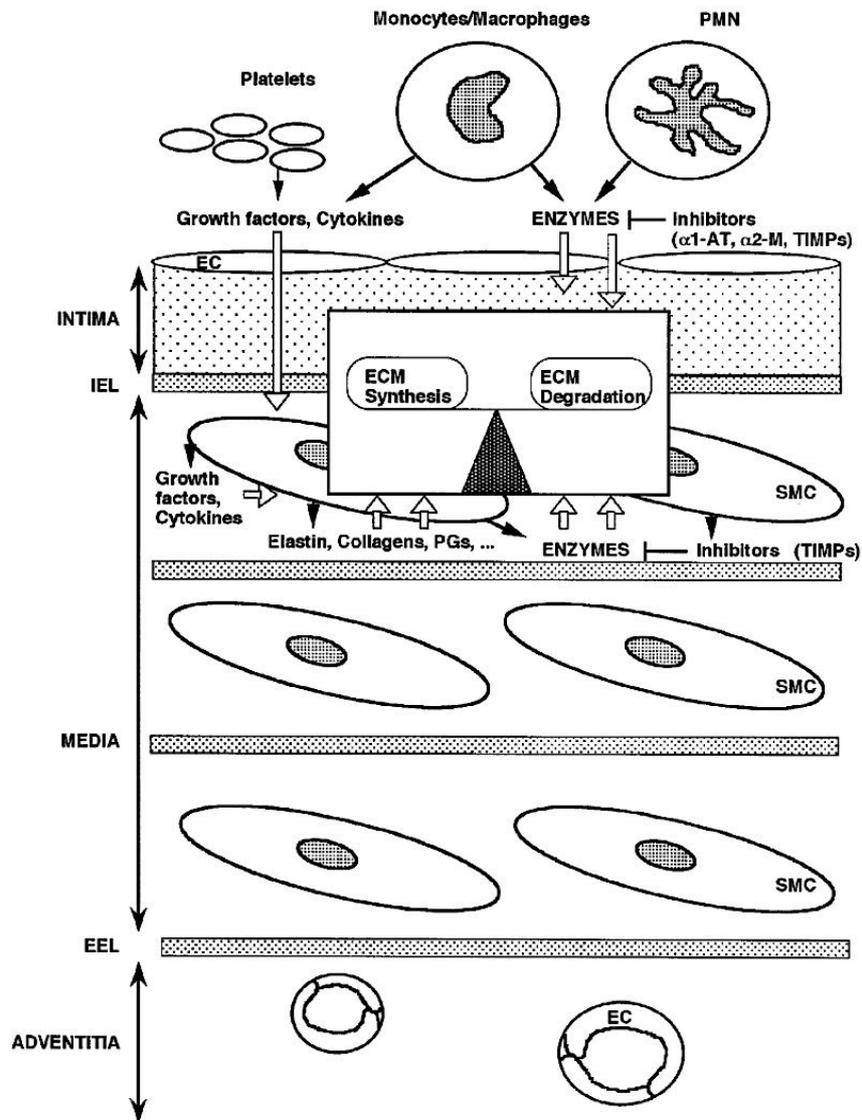


Figure 2: Illustration de la régulation de la MEC dans la paroi artérielle. La MEC résulte d'un équilibre synthèse et dégradation. D'après Jacob et al. (9)

1.1.3 – L’adventice

La limitante élastique externe sépare la média de l’adventice. Ce dernier est un tissu conjonctif peu organisé, très vascularisé, innervé, riche en collagène et contenant des fibroblastes et des adipocytes. Il se confond avec le tissu conjonctif adjacent.

L’adventice est très riche en collagènes de type I et contient, chez le rat, quelques rares fibres élastiques. On y retrouve aussi quelques CMLv, adipocytes, péricytes, macrophages, lymphocytes et monocytes. Dans certaines situations pathologiques, comme l’athérosclérose ou la pathologie anévrysmale, on y trouve des organes lymphoïdes tertiaires (adventitial tertiary lymphoid organs, ATLO) qui signent le développement d’une immunité adaptative en complément de processus immuns innés (53). Nous y reviendrons plus loin.

L’adventice est parcouru par les vasa vasorum qui ont un rôle nourricier pour l’adventice elle-même mais aussi, à l’inverse, de drainage des métabolites de la média (54). Chez l’homme, dans l’aorte thoracique, où l’épaisseur de la média est importante, les vasa vasorum pénètrent dans la partie externe de la media afin de nourrir celle-ci, alors que l’intima est alimentée directement par le flux sanguin de contact.

2 – L’anévrysme de l’aorte abdominale (AAA): une maladie grave et fréquente

2.1 – Définition

Les anévrysmes artériels constituent une pathologie grave, dont le risque principal est le décès par rupture en l’absence de traitement (55-57). Du point de vue morphologique, un anévrysme se définit par une dilatation artérielle permanente et localisée de plus de 50% par rapport au diamètre normal attendu, avec perte de parallélisme des bords (58, 59). La localisation la plus fréquente des anévrysmes artériels est l’aorte abdominale (anévrysme de l’aorte abdominale, AAA). Le diamètre

normal de l'aorte abdominale chez l'homme adulte étant en moyenne de 19,9-23,9 ($\pm 3,0-3,9$) mm, on parle d'AAA à partir de 30 mm (59), bien que le risque de rupture ne soit substantiel qu'à partir de 50 mm (60-62).

2.2 – Epidémiologie

Les raisons pour lesquelles l'aorte abdominale est plus fréquemment atteinte restent essentiellement hémodynamique. De plus, l'aorte abdominale possède de base moins de fibres élastiques que les autres segments de l'aorte (63). La prévalence des AAA est estimée entre 4,0 et 8,0% chez l'homme de plus de 65 ans (56). Dans la méta-analyse de Bown (64), la rupture d'AAA opérée était mortelle pour 48% des patients, même si une amélioration de résultats était notée au cours du temps. Cette amélioration était confirmée par les récentes études randomisées portant sur le traitement des AAA rompus puisque la mortalité des AAA rompus opérés est aujourd'hui estimée à 31-34% à 30 jours et 39-43% à 1 an (65, 66). Quoi qu'il en soit, la rupture d'AAA tue chaque année 6300, 5300, 2100 et 1300 personnes aux Etats-Unis, Royaume-Unis, Italie et Allemagne, respectivement (67). Le taux d'intervention pour rupture d'AAA semble ainsi variable d'un pays à l'autre. L'explication tient probablement dans les modalités d'accès aux soins et des seuils d'intervention prophylactique sur les AAA (68).

2.3 – Facteurs de risque

Les raisons pour lesquelles un AAA commence à se développer restent imparfaitement comprises. L'AAA est une forme particulière d'athérome dont certains facteurs de risque sont communs avec la maladie occlusive. Les 4 facteurs de risque principaux reconnus sont: les antécédents familiaux, l'âge, le sexe masculin et le tabagisme (sevré ou non). A ces facteurs s'ajoutent d'autres facteurs moins admis mais dont l'évidence émerge (taux bas de high density lipoprotein-cholesterol, HDL-

cholestérol, taux élevés de lipoprotein-associated phospholipase A2, Lp-PLA2 notamment).

2.3.1 – Génétique et antécédents familiaux

Le terrain génétique familial est indiscutablement impliqué dans la genèse de certains AAAs. Les patients possédant un antécédent familial d'AAA au premier degré ont un risque d'AAA compris entre 15 et 19% alors qu'il n'est que de 1 à 3% chez les patients n'ayant pas cet antécédent (26). Des études suédoises retrouvent une probabilité 8,7 fois supérieure d'être porteur d'un AAA lorsqu'un frère est atteint (69), et un odds-ratio de 10 chez les jumeaux homozygote en comparaison aux jumeaux hétérozygotes lorsqu'un des jumeaux est atteint (70). Des études d'association génétique pangénomiques (*genome wide association studies*, GWAS) ont identifié ces dernières années des associations entre le polymorphisme d'un seul nucléotide (*single-nucleotide polymorphism*, SNP) et la survenue d'un AAA (71). Ainsi, DAB2IP rs7025486 sur le chromosome 9q33 (72), rs7635818 sur le chromosome 3p12.3 (73), LRP1 rs1466535 (74) et le *low density lipoprotein receptor*, LDLR rs6511720 (75) étaient associés aux AAAs. Des associations avec des gènes candidats étaient également été retrouvées, comme MMP-3 rs3025058 (76), SORT1 rs599839 (77), TGFBR2 rs764522 et rs1036095 (78). Des études récentes évoquaient également le rôle de modifications épigénétiques, notamment des méthylations de l'ADN, dans l'activation de la maladie avec l'âge (79). Ceci étant basé sur le fait que plusieurs caractéristiques majeures des AAAs sont associées à des méthylations de l'ADN. Les micro-ARNs pourraient également jouer un rôle dans la répression de la transduction de certaines protéines de la paroi artérielle (80).

2.3.2 – L'âge et le vieillissement artériel

En sus des modifications épigénétiques sus-citées, l'âge est associé d'une manière générale à un élargissement des diamètres artériels (81). Le vieillissement

s'accompagne d'une diminution des CMLv par apoptose ainsi que d'une dégénérescence des fibres d'élastine (82), qui participent à la moindre résistance de la paroi artérielle à la pression systémique. En parallèle, la paroi s'enrichit en collagène et parfois en calcifications, ce qui conduit à sa rigidification et donc à une modification de l'onde de pouls (83), pouvant elle aussi avoir des effets sur l'élargissement du diamètre artériel.

2.3.3 – Le sexe masculin

Les AAA sont bien plus fréquents chez l'individu de sexe masculin (56, 84, 85). Cependant les raisons de cette différence ne sont pas clairement établies. Il existe probablement une combinaison de différences hormonales (effets immunomodulateurs des estrogènes), de susceptibilité génétique et d'expositions aux facteurs de risque (84, 85). Les seuls travaux pertinents en la matière sont expérimentaux (86, 87). Il a ainsi été montré que les estrogènes inhibaient la production de Matrice-MetalloProtéinases (MMPs), notamment la MMP-9, chez le rat et pouvaient ainsi freiner le développement des AAA.

2.3.4 – Le tabagisme

Le tabagisme joue indiscutablement un rôle même si celui-ci est aussi imparfaitement élucidé (88) puisque 85-90% des AAA surviennent chez des fumeurs (89), sevrés ou non. Le tabac augmente l'incidence (90), la vitesse de croissance (91) et le risque de rupture des AAA (91). Il existe même une relation linéaire entre la durée du tabagisme et la prévalence des AAA (90). Le tabac jouerait un rôle dans le déclenchement de la protéolyse matricielle via l'activation du *tissue plasminogen activator* (tPA, lui-même activateur de MMPs elastolytiques) (92, 93), l'augmentation de production de MMPs par les leucocytes (94, 95), l'augmentation de l'expression des gènes des MMPs (96) et l'altération de la capacité des CMLv à produire du collagène (97). Du fait de son pouvoir oxydant le tabac se comporte comme un

inhibiteur des antiprotéases (*tissue inhibitors of metalloproteinases*, TIMP et serpines). Il agirait également via des interactions épigénétiques (98). Le tabac agit aussi sur la réaction inflammatoire locale en favorisant durablement l'infiltration pariétale par les LyT (99). Un rôle direct de la nicotine est également évoqué (100).

2.3.5 – La dyslipidémie

La dyslipidémie joue un rôle dans la genèse de l'athérosclérose en étant à la source de l'accumulation pariétales de LDL et participe des phénomènes d'oxydation qui siègent dans la paroi, notamment aux stades initiaux (101). Ainsi, la dyslipidémie et notamment la baisse du taux de HDL-cholestérol sont associées à des AAA de plus larges diamètres chez l'humain (102) et expérimentalement (103, 104). Dans ce contexte le HDL est oxydé au cours de son transport transpariétal et dissocie sa fraction lipidique de sa fraction protéique (Apolipoprotéine A) diminuant par là-même le taux d'Apolipoprotéine A1 et d'HDL. Le HDL-cholestérol a des effets antioxydants, anti-inflammatoires et protecteurs contre la protéolyse (105-107). Les particules de HDL-cholestérol transportent notamment des enzymes qui inhibent la formation de dérivés réactifs de l'oxygène (108, 109).

La taille des particules d'HDL et l'effet antioxydant sont diminuées chez les porteurs d'AAA (110). Elles contiennent moins d'Apolipoprotéine A1 (111). Elles contiennent aussi moins d'alpha-1-anti-trypsine, un des plus puissant inhibiteurs de l'élastase leucocytaire (112). Elles réduisent la diapédèse des leucocytes et inhibent la capacité des cellules présentatrices d'antigène à stimuler les lymphocytes T (113). Expérimentalement, le HDL-cholestérol inhibe la protéolyse matricielle et l'apoptose des CMLv (103, 104, 111).

Les statines, qui ont un effet essentiellement sur le LDL-cholestérol, ont démontré leur effet favorable sur le développement des AAA dans certains papiers

expérimentaux (114) et cliniques (115), mais pas dans d'autres (116). Leur effet reste questionnable sur le développement des AAA.

2.3.6 – L'hypertension artérielle

Contrairement à une idée reçue, l'hypertension artérielle n'est pas un facteur de risque clairement démontré d'AAA (117). Tout au plus, une faible relation existe (118), notamment chez la femme (119). Son rôle sur la survenue d'une rupture semble mieux affirmé (120) et des données expérimentales suggèrent une croissance plus rapide des AAA chez les hypertendus (121).

2.3.7 – Le diabète

Selon plusieurs études épidémiologiques de grande ampleur, il est clair que le diabète est un facteur protecteur du risque d'AAA et de croissance anévrysmale (122-124). Ces données ont été confirmées par plusieurs méta-analyses récentes (125, 126). Les raisons évoquées sont une augmentation de la rigidité artérielle mais également une augmentation de la MEC aortique. Au cours du diabète, la glycation des protéines précurseurs de la MEC conduit à une augmentation de la formation de produits terminaux de glycation (advanced glycation end products, AGEs) (91, 127). Ces AGEs sont associés à une augmentation de la prolifération des CMLv et à une augmentation de la MEC dans la paroi vasculaire (128). Les AGEs permettent des liaisons covalentes qui induisent une rigidification de la MEC et diminuent sa susceptibilité à la rupture (129, 130). Le diabète module également l'activité MMP. Il diminue l'activité plasmine, activatrice des MMPs (131). Notamment, il a été rapporté que les patients présentant un diabète de type 2 avaient une diminution de moitié des activités MMP-2 et MMP-9, avec une diminution de la dégradation et du remodelage de la MEC aortique (132).

3 – Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la formation et l'entretien de la dilatation anévrysmale conduisant à la rupture

L'AAA constitue une forme particulière d'évolution de l'athérosclérose. Il présente les caractéristiques histologiques clefs de l'athérosclérose comme les infiltrats lipidiques, la destruction de la média et la réaction inflammatoire adventitielle. A l'exception du diabète, les facteurs de risque athéromateux énoncés ci-dessus sont constituent le terreau du déclenchement des mécanismes physiopathologiques expliquant la perte de la capacité de la paroi artérielle à résister à la pression artérielle et le développement des AAA.

3.1 – Le gradient de pression transpariétal à l'origine de la convection radiale

D'un point de vue physiopathologique, un AAA doit être perçu comme une perte de la capacité de la paroi aortique à résister à la tension pariétale (étirement radial, loi physique de Laplace). A l'état physiologique, la média est un tissu quasi-avasculaire (à l'exception de sa partie externe au niveau de l'aorte thoracique), à la différence de l'adventice qui est pénétré par les vasa-vasorum, les terminaisons nerveuses et les lymphatiques. Comme la pression interstitielle de l'adventice est basse (10-30 mmHg), il existe un important gradient de pression entre la lumière artérielle circulante (soumise à la pression artérielle systolo-diastolique, 120-80 mmHg) et l'adventice. Ceci explique les possibilités de convection radiale centrifuge des éléments plasmatiques solubles et micro-particulaires au sein de la paroi artérielle et les éventuelles agressions médiales pouvant en résulter (26, 133, 134). En l'état actuel des connaissances, ce phénomène de convection centrifuge nous apparaît fondamental dans l'explication de la formation des AAA. En parallèle, toute modification de la géométrie vasculaire provoque des phénomènes de collision des éléments figurés du sang (globules rouges, plaquettes, leucocytes) avec la paroi ou entre eux. Ces collisions participent activement à la formation d'un thrombus mural

non obstructif et à son renouvellement permanent au contact du sang circulant (Figure 3).

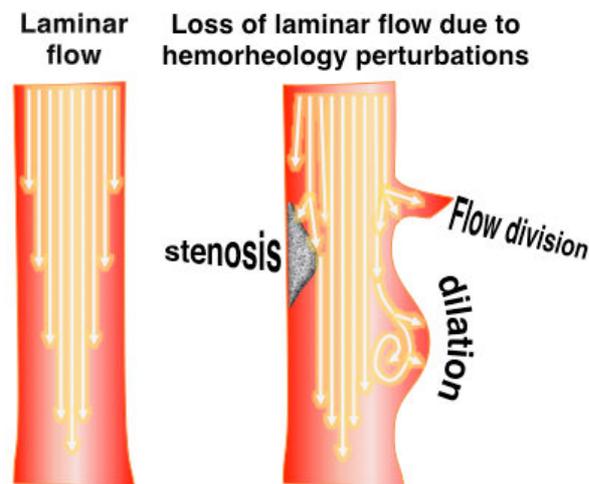


Figure 3: Illustration des phénomènes conduisant à un flux non laminaire au sein des segments artériels sténosés ou dilatés.

Les phénomènes de convection vont participer à la pénétration de certains éléments sanguins circulants depuis la lumière artérielle vers les couches les plus externes du mur aortique (26, 133, 135). L'intensité de la convection dépend de facteurs hémodynamiques comme la pression artérielle (121, 136), le stress biomécanique (135, 137), la réflexion des ondes de pression et de flux sur la bifurcation aortique (138, 139) et la porosité de la paroi aortique (135, 140). Les éléments du sang traversent ainsi l'intima pour interagir avec les CMLv et/ou la MEC de la média et induire leur destruction (Figure 4). Comme la MEC contient la pression artérielle à l'état physiologique, la destruction de cette dernière est un élément clef dans la genèse des AAAs.

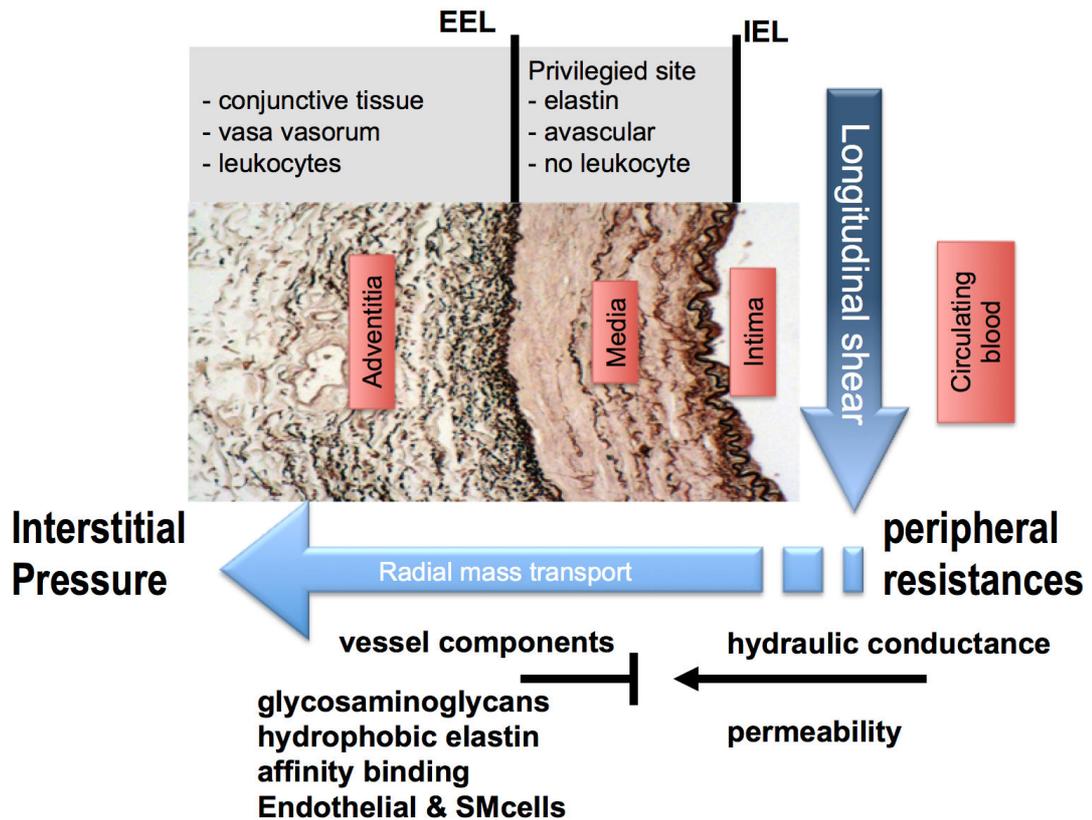


Figure 4: Illustration des phénomènes de convection centrifuge au sein de la paroi artérielle. D'après Michel et al. (53)

3.2 – Organisation spatiale des AAA

3.2.1 – Le développement du thrombus endoluminal

Le thrombus ou caillot endoluminal (*intraluminal thrombus*, ILT) se constitue par collision des éléments figurés du sang (plaquettes, globules rouges et leucocytes) entre eux et sur le mur aortique siège du processus anévrysmal (Figures 5 et 6). Il s'agit donc d'une formation dynamique et stratifiée contenant plusieurs couches de thrombus de fibrine, commençant par une couche luminale rouge et fraîche, hématique non dégradée et contenant de la fibrine réticulée, et une couche abluminale fibrinolytée et oxydée. La couche luminale est le site d'accumulation et

d'activation des plaquettes dans le réseau de fibrine et est caractérisée par l'agglutination d'érythrocytes, un processus qui libère de l'hémoglobine libre, et

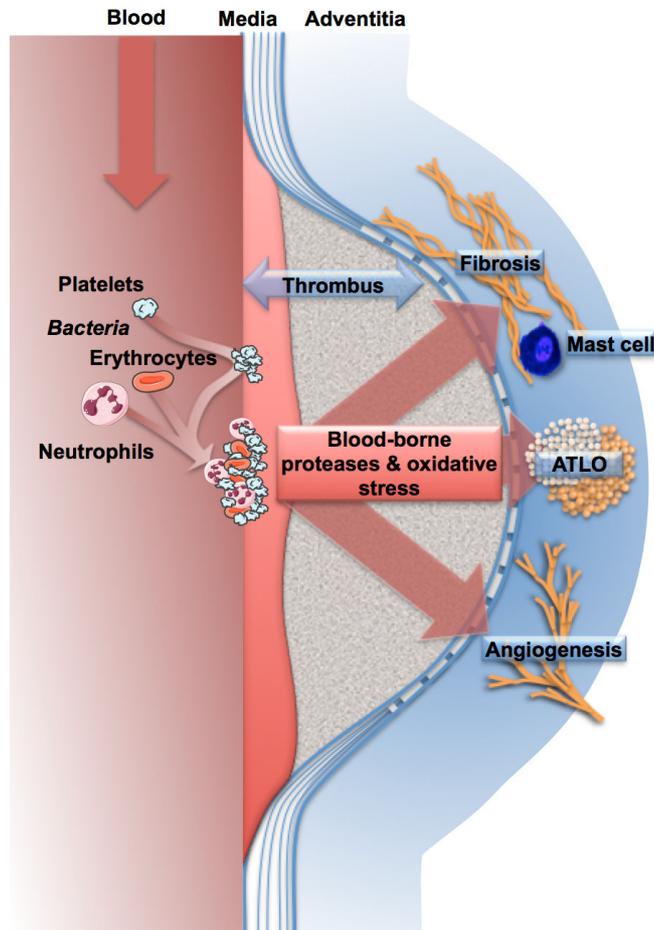


Figure 5: Illustration du rôle pivot du thrombus endoluminal dans la physiopathologie anévrysmale. Le thrombus se constitue à partir des éléments du sang circulant. Il est le siège de mécanismes intenses de protéolyse et d'oxydation à l'origine de l'arrivée d'éléments modifiés dans les couches externes de la paroi artérielle. D'après Michel et al. (53)

entraîne la formation de fibrine secondaire à l'activation des plaquettes et de la thrombine. Elle est également responsable de la rétention du t-PA et du plasminogène (141) impliqués dans la fibrinolyse spontanée du thrombus (142), et

enfin de la rétention des leucocytes, parmi lesquels prédominent les neutrophiles (via les interactions entre la P-sélectine plaquettaire et son ligand neutrophilaire).



Figure 6: Thrombus anévrysmal. Noter les différentes couches correspondant à la modification des éléments du sang au fur et à mesure de leur dégradation lors de leur progression dans la paroi. D'après Michel et al. (53)

L'hémoglobine libre contient du fer et de l'hème qui constituent d'importants catalyseurs des mécanismes d'oxydation. Le groupement hème est capable d'engager des réactions chimiques qui aboutissent à la génération de radicaux libres, impliquant le stress oxydant dans la physiopathologie de l'anévrysme, comme décrit plus loin (143). La composante globine subit une dégradation protéolytique qui génère des peptides spécifiques (144). Enfin, la rétention des neutrophiles dans l'ILT altère la capacité des progéniteurs des cellules mésenchymateuses à coloniser le thrombus (145), inhibant ainsi le processus de cicatrisation endogène. Les couches

plus externes de l'ILT sont moins riches en composants sanguins. Les neutrophiles activés sont sources de protéase (élastase, MMP-9) et de peroxydation (myeloperoxydase, MPO).

Il est maintenant prouvé que l'ILT participe à la dilatation anévrysmale, dans toutes les localisations, mais notamment au niveau de l'aorte abdominale (146). La présence d'un ILT a démontré être associée à une paroi artérielle plus fine (147), une élastolyse plus étendue, une plus faible densité de cellules musculaires lisses dans la média et un taux plus élevé de phagocytose et d'immunité (148). Ces éléments suggèrent qu'une importante partie de l'activité protéase provient de l'ILT, plutôt que directement de la paroi de l'AAA.

3.2.2 – La réaction de l'adventice

L'adventice réagit aux agressions radiaires en générant des réponses angiogéniques (149), immunes (innée et adaptative) et fibreuses (53, 150). Selon le stade évolutif de l'AAA, la réponse immuno-inflammatoire consiste en l'accumulation d'un nombre variable de macrophages dans la partie interne de l'adventice, capables de phagocyter le fer provenant de l'hémoglobine de l'ILT, et en la formation d'organes lymphoïdes tertiaires adventitiels (*adventitial tertiary lymphoid organs*, ATLO), preuves du passage une immunité adaptative. L'observation des infiltrats chroniques péri-aortiques, constituées principalement de lymphocytes, de monocytes, de cellules plasmiques et de rares mastocytes, le plus souvent sur un fond de tissu fibreux, a participé au concept du développement d'une immunité adaptative dans l'adventice des AAAs. Nous y reviendrons plus loin.

3.3 – Mécanismes physiopathologiques fondamentaux impliqués dans la genèse et la croissance des AAA

Cette organisation spatiale des AAA est cause et conséquence de plusieurs physiopathologiques fondamentaux impliqués dans les AAA.

3.3.1 – Le stress biomécanique

Les cellules endothéliales et les CMLv sont constamment exposées aux forces hémodynamiques liées à la pression et au flux sanguin. Les réponses cellulaires à ces stimuli physiques influencent l'homéostasie vasculaire pariétale. En effet, les cellules endothéliales sont sensibles aux forces hémodynamiques de friction pariétales (cisaillement) et communiquent via des mécanismes intercellulaires avec les CMLv, pouvant aboutir à différents phénotypes fonctionnels (151, 152). La réflexion des ondes de pression et de flux sur la bifurcation aortique pourrait augmenter la tension sur le mur aortique et sensibiliser l'aorte abdominale sous-rénale à la pathologie anévrysmale (153).

Plusieurs associations cliniques ont mis en exergue la valeur pathologique d'un système hémodynamique résistif sur le développement des AAA, comme la plus grande fréquence d'AAA chez les patients amputés en cuisse (139), blessés médullaires (154) ou atteints d'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (155). Les conditions hémodynamiques pourraient agir essentiellement via les effets de convection et de collision sus-décrits, initiant l'activité protéolytique et le stress oxydant (156, 157), influençant les composantes cellulaires de la paroi aortique (158) et l'infiltrat leucocytaire (159, 160).

3.3.2 – La protéolyse médiale

La dégradation de la MEC, dont l'élastine, le collagène, la laminine et la fibronectine, constitue une des modifications pathologiques fondamentales des AAAs (161, 162). Les protéases sécrétées par l'ILT jouent un rôle majeur dans ce processus (56). Les MMPs, endopeptidases zinc-dépendantes, notamment les MMP-2 et MMP-9 (aussi appelées Gélatinases A et B), ont un rôle pivot du fait de leur activité élastolytique et collagénolytique. La MEC contient du *vascular endothelial growth factor* (VEGF) et du *transforming growth factor-beta* (TGF- β), tous deux critiques pour le maintien de

son intégrité (161). Ces deux facteurs sont régulés négativement par la sécrétion de MMPs. Ces MMPs inhibent également l'angiogénèse et modulent la réponse inflammatoire locale (163).

Dans les AAA, les neutrophiles et les macrophages sont la source majeure des MMPs (164). Ainsi, le taux de MMP-9 sérique est plus élevé chez les patients porteurs d'AAA en comparaison aux contrôles (165, 166). Le traitement chirurgical des AAA fait chuter le taux de MMP-9 au niveau des patients témoins (165). Enfin, les patients présentant une endofuite après traitement endovasculaire ont un taux plus élevé de MMP-9 sérique que les patients sans endofuite (167).

La suractivité MMP retrouvée dans les AAA est liée à un déséquilibre entre les MMPs générées par la coagulation et leurs inhibiteurs tissulaires, les TIMPs (168). Ainsi, des taux moins élevés de TIMP-1 et de TIMP-2 étaient retrouvés chez les porteurs d'AAA (169). Toutes ces données étaient confirmées expérimentalement sur modèles murins. Les souris *knock-out* pour les gènes *Mm2* ou *Mm9* (170, 171), ou traitées par des inhibiteurs de MMPs comme la doxycycline (172), développaient de plus petits AAA que les témoins. Egalement, certains traitements administrés pour limiter la croissance des AAA expérimentaux diminuaient le taux de MMP-9, comme par exemple les statines (114, 173). A l'inverse, les souris *knock-out* pour le gène *Timp-1* présentaient de plus larges AAA (174).

D'autres protéases présentent une action protéolytique au niveau de la MEC, notamment collagénolytique (175). Les cystéine-protéases, dont les cathepsines S, K, et L ont des activités collagénolytiques importantes dirigées contre le collagène de type I triple hélice (176), tout comme certaines MMPs (MMP-1, MMP-8, MMP-13 et MMP-14). La Cystatine C inhibe l'activité des cathepsines au niveau local et général. Dans le tissu anévrysmal, il existe une surexpression des cathepsines G, K, L et S (177) ainsi qu'une suppression de l'activité inhibitrice de la cystatine C (178, 179).

Ceci aboutit à une augmentation du *turnover* du collagène, comme démontré par l'augmentation des produits de dégradation du collagène de type I dans les parois des AAA, en parallèle à l'augmentation des collagénases (180) telles la MMP-8 (x3, aussi appelée collagénase 2), les cathepsines K et L (x5) et la cathepsine S (x30).

3.3.3 – La perte des cellules musculaires lisses

Les CMLv ont un rôle critique dans le maintien de l'intégrité de la paroi vasculaire, en particulier via la synthèse de protéines essentielles à la MEC (collagène, élastine, laminine et protéoglycanes). Une perte des CMLv aboutit donc à un défaut de renouvellement de la MEC. Il a bien été montré que la densité des CMLv est diminuée dans les tissus anévrysmaux humains (181-183). La responsabilité en incomberait aux LyT et aux macrophages pariétaux via la production de perforine et de Fas/FasL (182) et à un contexte d'apoptose accélérée des CMLv par production de p53 (184). De même l'activation du plasminogène (plasmine) protéolyse les protéines intermédiaires d'adhésion comme la fibronectine et la fibrilline, provoquant le détachement et la mort des CML (anoïkis) (185-187).

3.3.4 – Le stress oxydant

Le stress oxydant pourrait être défini comme l'ensemble des altérations tissulaires secondaires à une augmentation de la production ou une diminution de la destruction des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) (143). On observe dans les AAA humains une augmentation du stress oxydant dans les segments aortiques anévrysmaux en comparaison aux segments non anévrysmaux (188). Ceci était démontré via une augmentation des DRO mais également de l'activité NADPH oxydase (189). Cette augmentation du stress oxydant est également retrouvée dans les AAA expérimentaux, notamment dans le modèle par perfusion intra-aortique d'élastase (190) et le modèle par perfusion d'angiotensine II (191-193).

En fait, il existe dans les AAA un important infiltrat neutrophilaire capable de sécréter la MPO et générer l'anion superoxyde O_2^- , mais aussi du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 via la NADPH oxydase membranaire. Les macrophages tissulaires libèrent également des cytokines pro-inflammatoires qui participent à l'augmentation de l'activité NADPH oxydase (194, 195). Les macrophages et les neutrophiles sont aussi porteurs de myéloperoxydase (MPO) qui catalyse la formation d'acide hypochloreux HOCl. Les autres cellules de la paroi artérielle (CMLv, cellules endothéliales, fibroblastes) sont également porteuses de NADPH oxydase non phagocytaire capable d'induire la formation d'anion superoxyde O_2^- . Le stress biomécanique joue ainsi un rôle direct dans la production de DRO via la NADPH oxydase membranaire des CMLv (156, 157). Egalement, des facteurs de croissance (angiotensine II, facteur de croissance plaquette-dérivé), des médiateurs lipidiques (leukotriènes) et les LDL oxydés régulent positivement l'activité NADPH oxydase vasculaire (134). Ces activités enzymatiques oxydantes sont fortement potentialisées par la présence de fer, essentiellement sous forme ferreux (le Fe^{++} multiplie par 20 l'activité des oxydases endogènes). Ceci permet la réaction oxydante d'Haber-Weiss et de Fenton où les deux formes de fer ionisé se comportent comme donneur et receveur d'électrons.

La production de DROs induit une augmentation des cytokines chimiotactiques et des molécules d'adhésion. Ainsi, les DRO augmentent la production de peptide chémo-attractant monocyttaire-1 et favorisent la pénétration des monocytes dans la paroi aortique. Il en est de même pour la production d'IL-8, d'ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) et d'ostéopontine dans les cellules endothéliales. La p-sélectine est également régulée positivement par l' H_2O_2 , favorisant ainsi l'adhésion des polynucléaires neutrophiles.

Il semble enfin exister un lien entre le stress oxydant et protéolyse médiale. Il a été montré que les DRO activaient les MMPs, conduisant ainsi à la dégradation de la MEC (196). Egalement, l'activité MMP est plus importante dans les cellules surexprimant la NADPH oxydase dans les anévrysmes thoraciques humains (189). Les DRO pourraient aussi promouvoir l'hypertension artérielle avec ses effets délétères sur la paroi artérielle anévrysmale (197). Enfin, les DRO pourraient participer à l'induction de l'apoptose des CMLv (198-201), même si cela reste sujet à controverse (201).

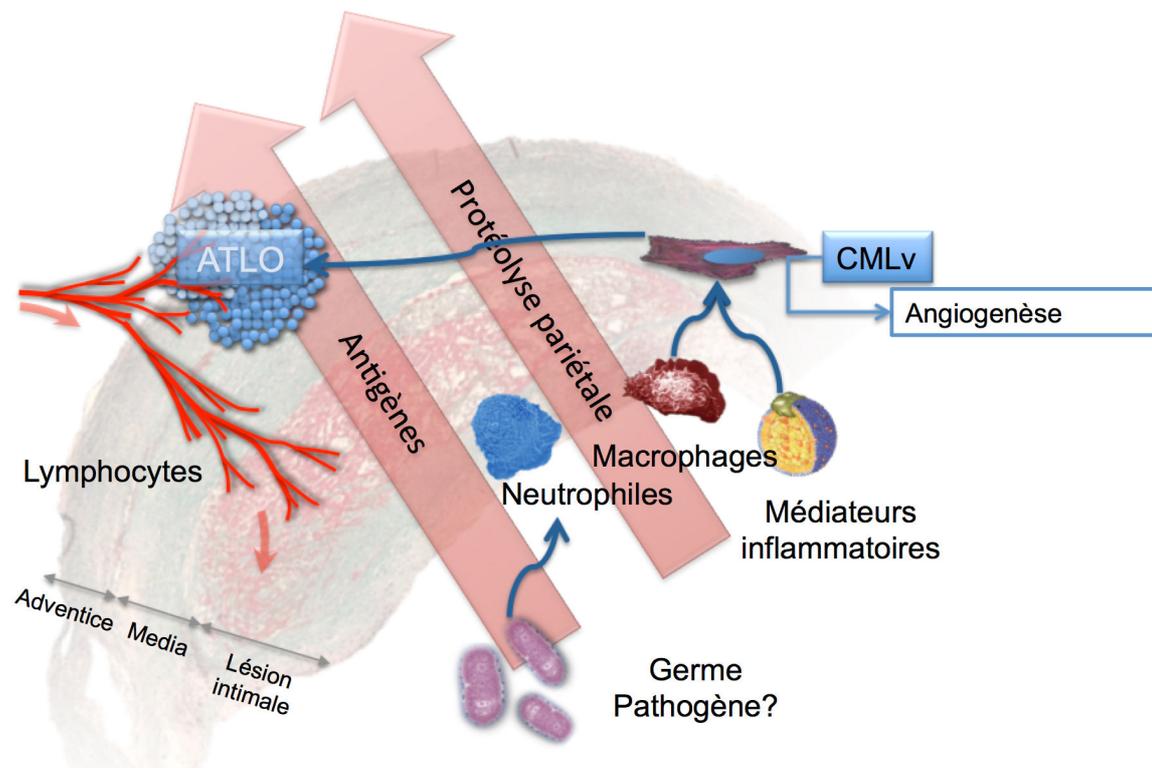


Figure 7: Illustration simplifiée des mécanismes liés à l'immunité innée et adaptative conduisant à la fabrication des organes lymphoïdes tertiaires (ATLO) dans l'adventice de la paroi des AAAs. D'après Michel et al. (53)

3.3.5 – La réaction immune

3.3.5.1 – Concepts généraux

La caractérisation des infiltrats inflammatoires (202-206), l'identification d'immunoglobulines (207), de cytokines (203, 208-210) et de protéases (142, 211) dans la paroi anévrysmale impliquent l'existence d'une réponse immune innée et adaptative. Au contraire de l'immunité innée, l'immunité adaptative s'est développée lors de l'évolution des espèces et peut être considérée comme l'acquisition d'une mémoire immunologique (212). L'activation de l'immunité innée se traduit par une stimulation neutrophilaire en réponse à la présence d'un germe pathogène. L'immunité adaptative est affirmée par la présence d'une activité essentiellement lymphocytaire B et T, peut être en réponse à un auto-antigène provenant de la paroi aortique. Cet auto-antigène pourrait provenir de la dégradation de l'ILT ou de la MEC, en association à des phénomènes d'oxydation modifiant la nature de ces auto-antigènes (Figure 7). Dans les AAA, un échappement du phénomène inflammatoire et immun conduit à des lésions tissulaires progressives et irréversibles.

3.3.5.2 – Immunité innée

3.3.5.2.1 – Activation neutrophilaire

Plusieurs travaux laissent penser que l'infiltration neutrophilaire serait à la base de la réaction immune dans les AAA (26, 213-215) puis de l'entretien du phénomène anévrysmal en empêchant la cicatrisation pariétale (142, 216-219). En général, les neutrophiles sont rapidement recrutés sur les sites agressés/lésés et sont le signe d'une inflammation aigue (220). Dans les AAAs humains, ils sont généralement retrouvés dans l'ILT (142, 216-219). Dans notre concept, ils sont un élément pivot du développement même des AAAs (26). L'infiltration précoce de neutrophiles au sein de la média artérielle suite à un stress oxydant initial, provoquerait la libération de sérine-protéases granulaires, telles que l'u-PA, l'élastase, la protéinase 3 et les

cathepsines, les MMP-9 et -8, et des pro-oxydants, tels que les activités de la NADPH-oxydase et de la MPO. Il faut signaler que si plusieurs auteurs évoquent une sécrétion de MMP-9 dépendante des macrophages, les neutrophiles sont probablement les plus à même de sécréter rapidement la MMP-9 (221). En effet, chez les neutrophiles, la pro-MMP-9 est stockée dans des granules cytoplasmiques après transcription, ce qui permet une dégranulation rapide dans la MEC. Lorsque l'AAA est développé, La localisation des neutrophiles dans la partie luminale de l'ILT est associée à un taux accru de MMP-8 et -9 (222), et d'élastase, par rapport à d'autres couches (142). L'ILT est particulièrement riche en formes pro et active de la MMP-9 (223) et complexes MMP-9/lipocaline circulants qui sont d'origine neutrophilaire (224). Les protéases neutrophilaires (notamment l'élastase) peuvent dégrader toutes les protéines de la matrice fibrillaire et donc provoquer la rupture de la paroi vasculaire. En particulier, la rétention des neutrophiles dans l'ILT altère la capacité des progéniteurs des cellules mésenchymateuses à coloniser le thrombus, inhibant ainsi le processus de cicatrisation endogène (142).

3.3.5.2.2 – Activation du complément

Les trois voies du complément (classique, alterne, lectine) ont été impliqués dans les AAA (225). Des fractions du complément ont été retrouvés dans le thrombus des parois anévrysmales, notamment C3 et C9 (226), ainsi qu'une augmentation du taux de C3 sérique dans les larges AAA. Expérimentalement, le blocage/déplétion du C3a et du C5a inhibait la formation d'AAA après perfusion d'élastase chez la souris. Il en était de même avec le facteur B issu de la voie alterne (227). Cette voie alterne est aussi activée via le dépôt d'IgG dans la paroi aortique (228). La voie des lectines est aussi activée, comme démontré dans l'étude de Zhou et al. (229). Les patients atteints d'AAA présentaient une expression différentielle de 13 gènes liés

généralement à la voie classique et à la voie des lectines, avec un taux plus élevé de C2 dans l'adventice des AAA en comparaison aux contrôles (225).

3.3.5.2.3 – Possible rôle d'antigènes exogènes

Les antigènes contre lesquels est dirigée cette immunité innée restent sujets à débat. Un mimétisme moléculaire lié à une infection exogène a pu être impliquée dans l'auto-immunité observée dans les AAA. *Chlamydia Pneumoniae* est la bactérie qui a le plus souvent été mise en cause dans les AAA mais aussi dans l'athérome en général. Le fait que la bactérie (ou ses antigènes) et des anticorps (ou des LyT) dirigés contre elle aient été retrouvés dans des parois anévrysmale (230-232) a fait émettre l'hypothèse d'une réactivité croisée entre les anticorps anti-*Chlamydia Pneumoniae* et un antigène de la paroi aortique. Ainsi, Lindholt et al. (231) trouvaient une cross-réactivité entre les protéines de la membrane externe de *Chlamydia Pneumoniae* et les chaînes lourdes des immunoglobulines retrouvée dans la paroi des AAA. Cette observation a été faite dans une moindre mesure avec *Treponema pallidum* (233).

Plus récemment, une association statistique entre AAA et maladie parodontale liée à *Porphyromonas Gingivalis*, un germe dentaire anaérobie faiblement pathogène était retrouvée chez l'humain (217, 234-239). La présence de ce germe était également retrouvée au sein de l'ILT des AAA humains. Des injections répétées de *Porphyromonas Gingivalis* étaient ainsi utilisées avec succès sur différents modèles d'AAA pour promouvoir la croissance des AAA et l'activité de l'ILT (110, 217, 240).

3.3.5.3 – Immunité adaptative

3.3.5.3.1 – Activation des lymphocytes T

Des études animales ont montré que sans les LyT (notamment CD4+), les AAAs ne pouvaient se former (241).

Les LyT sont classés suivant l'expression des molécules CD4 ou CD8 à leur surface. Les LyT CD4⁺ reconnaissent les antigènes présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, tandis que les LyT CD8⁺ reconnaissent les antigènes présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, importants dans la toxicité cellulaire (242). La plupart des LyT immunomodulateurs exprime le CD4, tandis que les LyT cytotoxiques expriment le CD8. Les LyT CD4⁺ sécrètent des cytokines qui contrôlent le recrutement des macrophages et régulent l'équilibre synthèse/protéolyse de la MEC (243). Les LyT CD4⁺ retrouvés dans les AAA sont des cellules mémoires probablement activées en réponse à des antigènes actuellement inconnus (206) qui induisent l'expansion clonale de ces LyT (244).

Les LyT CD4⁺ sont subdivisés en LyT Helpers (Th) qui incluent les Th1, Th2 et Th17, et en LyT régulateurs (Treg). L'activation des Th1 et Th2 peut être perçue comme promotrice de l'immunité cellulaire et humorale, respectivement (245, 246). Les Th1 sont activés par l'IL-12 puis produisent notamment de l'IFN- γ (mais aussi l'IL-2, l'IL-18 et le TNF β) (247). Ainsi, de haut niveau d'INF γ étaient retrouvés dans les parois d'AAA humains et expérimentaux (203). Ceci conduit à l'activation de macrophages qui produisent eux-mêmes de l'IL-12, qui potentialise la réaction inflammatoire aux Th1. L'INF γ induit la sécrétion de MMP-2 et MMP-9, contributrices majeures à la destruction de la paroi aortique (241). Les Th2 sont activés par l'IL-4 et sécrètent en retour les IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 qui ont des actions potentiellement contradictoires sur la réaction inflammatoire dans les AAA (248, 249). Leur rôle dans le développement des AAA reste ainsi sujet à controverse (248, 249). Les Th17, plus récemment découverts, semblent avoir un rôle important dans le développement des AAA. Ils sont stimulés par les IL-23, IL-1 et IL-6 et sécrètent en retour l'IL-17, déjà impliquée dans l'auto-immunité (250), dont le rôle est critique dans la production de DRO et le recrutement des macrophages. Plusieurs travaux ont ainsi retrouvé qu'une

diminution de l'IL-17 était associée à une diminution des AAA expérimentaux (209, 251). Du fait de travaux contradictoires, il persiste toutefois une controverse sur ce point (252, 253). Les Th17 sécrètent également l'IL-23 destinée à maintenir leur propre réponse (245). Les Ly Treg sont chargés de contrer les effets pro-inflammatoires et sont fondamentaux dans la tolérance immunitaire. Ils sont stimulés par l'IL-2 et le TGF- β et produisent l'IL-10 et le TGF- β . En sus de bloquer les sécrétions de TNF- α et d'IFN- γ , leur rôle majeur est de bloquer la prolifération des Ly Th. Des travaux récents retrouvaient une diminution des Ly Treg dans les AAA, évoquant une perte de contrôle sur les Th dans la maladie anévrysmale (254).

Les LyT CD4+ qui expriment le CD31 présentent également des capacités de régulation. Le CD31 est un récepteur exprimé dans les leucocytes qui permet la tolérance et prévient donc de l'auto-immunité (255). Dans les AAA, les LyT CD4+ CD31+ protègent contre la destruction des CMLv médiée par les LyT CD8+. Ils régulent également l'activité MMP-9 des macrophages. Le taux de LyT CD31+ est diminué chez les patients atteints d'AAA, ce qui suggère une perte de l'autocontrôle immunitaire dans cette pathologie (256).

3.3.5.3.2 – Stimulation des lymphocytes B et sécrétion d'immunoglobulines

Les LyB ont été moins impliqués dans la physiopathologie des AAA. Cependant des groupes de LyB étaient retrouvés dans des follicules lymphoïdes pariétaux (257) et il a été montré que des souris déficientes en LyB ne développaient pas d'AAA après une perfusion intra-aortique d'élastase (228). Dans l'étude de Bobryshev et al. (257), des agrégats de follicules lymphoïdes avec des centres germinaux étaient retrouvés dans l'adventice de la paroi anévrysmale de la majorité des patients examinés. Des cellules dendritiques étaient éparpillées en périphérie de ces follicules en contact avec des LyT et des LyB. Ces éléments suggèrent la présentation d'un antigène inconnu à ces cellules provenant probablement de la convection axiale des éléments

circulants et/ou de l'ILT. Si l'évidence reste faible, on peut raisonnablement formuler l'hypothèse que c'est la présence d'un antigène dans la paroi aortique qui pourrait conduire à une production d'anticorps par les LyB et favoriser l'expansion clonale des LyT (258).

Dans un cadre spécifique, la sécrétion d'immunoglobulines particulières, les IgG4, est associée à certains anévrysmes inflammatoires de l'aorte abdominale (259). Ces immunoglobulines ont été aussi associées au développement de nombreuses autres localisations pathologiques peu fréquentes, notamment la fibrose rétropéritonéale, la pancréatite auto-immune, la maladie de Mikulicz et certaines glomérulopathies. Les IgG4 sont la classe d'immunoglobulines G la moins abondante (<5%) et les mécanismes par lesquels elles induisent ces pathologies restent peu connus (260). Les IgG4 s'élèvent dans certains phénomènes allergiques liés aux IgE. Les LyTh2 et les Ly Treg peuvent induire la sécrétion d'IgG4 (261, 262). Toutefois la causalité des IgG4 dans l'induction d'AAA inflammatoires reste à démontrer clairement.

3.3.5.3.3 – Activation des monocytes/macrophages

Les monocytes/macrophages sont recrutés dans la paroi anévrysmale suite à la dégradation de la MEC et à la sécrétion de plusieurs chémokines (la monocyte chemoattractant protein-1 MCP-1, l'IL-8, IFN- γ et la TNF- α). Les monocytes/macrophages produisent également la monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), qui dirige le flux des cellules immunitaires (263). Ils sécrètent aussi en retour plusieurs cytokines dont, le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-1 β . En fait, les macrophages exhibent 2 phénotypes distincts : M1 et M2. Le phénotype M1 est pro-inflammatoire et protéolytique tandis que M2 est anti-inflammatoire et promeut la réparation matricielle. Dans les AAA, il existe un déséquilibre entre M1 et M2 en liaison avec leur croissance (243).

3.3.5.3.4 – Activation des mastocytes

Les mastocytes sont des cellules régulatrices de l'inflammation et de l'immunité. Leur contenu granulaire inclut de l'héparine, de l'histamine et plusieurs enzymes (tryptase, chymase, carboxypeptidase, et cathepsine G) (264). Ils sécrètent également de nombreuses cytokines et chémokines. Chez l'homme, les mastocytes sont principalement situés dans la média et l'adventice des AAAs (211, 265). Ils sont la source principale de cathépsine G, participent à l'activation du système rénine-angiotensine, à la néovascularisation, à l'inflammation et à l'athérosclérose. Des données expérimentales confirment que l'inhibition ou le déficit en mastocytes freinent voire empêchent le développement des AAAs expérimentaux (266).

En effet, l'histamine promeut l'expression de c-Jun et de la c-Jun N-terminal kinase (JNK), qui accélèrent la dégradation de la MEC par les protéases. La JNK supprime l'expression des gènes des lysyl-hydroxylase, lysyl-oxydase, et prolyl-4-hydrolase, qui sont cruciales dans la synthèse et la maturation du collagène et de l'élastine (267). C'est ainsi que l'inhibition de la c-Jun N-terminal kinase permet la régression des AAAs expérimentaux chez la souris (268). Il s'agit à ce jour du seul traitement expérimental permettant la régression d'AAAs expérimentaux. Également, Il a bien été montré sur le modèle d'AAA par perfusion d'angiotensine II chez la souris Apo E^{-/-} que des IgE activaient macrophages, mastocytes et LyT CD4⁺ pour leur faire sécréter de l'IL-6, cytokine pro-inflammatoire. Cette augmentation de l'IL-6 est retrouvée chez les patients atteints d'AAA (269). Elle stimule notamment l'expression monocyttaire du CD14, impliqué dans l'immunité innée.

3.3.5.3.5 – Implication d'autres composants cellulaires

D'autres cellules de la paroi aortique, comme les cellules endothéliales, les fibroblastes, les CMLv pourraient être impliquées dans le cadre de mécanismes auto-immuns, notamment via la sécrétion/libération de MCP-1 (263, 270).

3.3.5.3.6 – Possible rôle d'un auto-antigène

Les antigènes responsables de l'immunité adaptative pourraient provenir de l'ILT et/ou de la MEC protéolysée. Récemment, plusieurs auto-antigènes étaient suspectés comme initiateurs potentiels du processus anévrysmal (233, 271-273), sans pouvoir identifier précisément l'antigène responsable (258). Des auteurs (271, 274) isolaient des IgG à partir de parois d'AAA et retrouvaient une immunoréactivité avec une protéine microfibrillaire de 80 kDa du tissu aortique, qui pourrait être un homologue humain de la glycoprotéine-36 bovine associée aux microfibrilles (272). Ces IgG réagissaient aussi avec la tenascine, une molécule de la MEC. D'intérêt, les IgG sériques de patients porteurs d'AAA ne réagissaient pas avec cette protéine. Dans des expérimentations ultérieures, la protéine microfibrillaire de 80 kDa était utilisée pour produire une protéine d'environ 40 kDa, l'aortic aneurysm-associated protein 40 (AAP-40) qui présente des homologies avec le fibrinogène, la vitronectine et la glycoprotéine-36 bovine associée aux microfibrilles (273). Le même groupe démontrait ensuite que des anticorps anti-vitronectine et anti-fibrinogène allaient se localiser dans les domaines fibrillaires de l'adventice aortique et réagissaient aussi avec une protéine de 40 kDa de la paroi (275). Zhou et al. induisaient des AAA chez la souris avec une IgG naturelle liant le fibrinogène et déposée sur des tissus perfusés à l'élastase (229). L'anhydrase carbonique, notamment l'anhydrase carbonique-1 (*carbonic anhydrase 1*, CA-1) est également évoquée comme auto-antigène (276). Des auto-anticorps anti-CA-1 étaient retrouvés plus fréquemment dans les sérums de patients AAA en comparaison aux témoins. La littérature reste finalement assez pauvre sur ce point.

PROBLEMATIQUE

L'AAA reste donc une pathologie complexe et imparfaitement comprise. Les modèles expérimentaux d'AAA ont été développés dans le but premier d'explorer les mécanismes impliqués dans la genèse et la croissance des AAAs. Dans ce travail, nous explorons le rôle des modèles expérimentaux d'AAA dans la compréhension du remodelage vasculaire observé dans cette pathologie. Dans une première partie, une revue de la littérature sur les modèles expérimentaux d'AAA était réalisée afin d'appréhender les forces, les faiblesses et les inconnues associées aux différents modèles. Dans une seconde partie, nous explorons l'origine et le rôle des calcifications pariétales observées dans les AAA expérimentaux en partant de l'observation d'une co-localisation de calcifications avec de l'ADN libre extracellulaire dans un modèle de xéno greffe aortique décellularisée associé à des injections de germes faiblement pathogènes. Dans une troisième partie, le modèle de xéno greffe aortique décellularisée était utilisé pour étudier le rôle de l'immunité adaptative dans la rupture des AAAs expérimentaux et identifier les groupes d'auto-antigènes potentiellement responsables.

PARTIE 1

ETAT DES CONNAISSANCES CONCERNANT LES MODELES EXPERIMENTAUX D'ANEVRYSME

PARTIE 1

ETAT DES CONNAISSANCES CONCERNANT LES MODELES EXPERIMENTAUX D'ANEVRYSME

1 – Méthodes

Dans un premier temps, nous avons réalisé une revue extensive de la littérature concernant les modèles expérimentaux d'AAA. Cette revue a été réalisée via Medline/Pubmed en se basant sur la littérature de langue anglaise sur ce sujet. Pour notre recherche, nous utilisons les mots « aneurysm », « abdominal aortic aneurysm », « experimental models », « experimental approach », « dissecting aneurysm », « elastase model », « xenograft model », « intraluminal thrombus », « calcium chloride model », « angiotensin II model », « β -aminopropionitrile » et « saccular aneurysm model ». Les articles liés (*related articles*) étaient également examinés. Cette revue a été actualisée pour la dernière fois en Décembre 2016 et acceptée pour publication dans le journal international à comité de lecture « Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology » (Impact factor 2015 : 5,97). L'article publié est présenté à la fin de cette partie.

2 – Principaux modèles expérimentaux d'AAA

Après un bref rappel concernant les AAA en pathologie humaines, nous présentons un à un les principaux modèles d'AAA disponibles. Nous notons que les AAA expérimentaux étaient schématiquement induits par deux types de mécanismes : une dilatation endoluminale (modèle non disséquant d'AAA) ou une rupture intramurale (modèle disséquant d'AAA). Egalement, nous isolons les modèles d'AAA sur rongeurs et ceux concernant le gros animal. En effet, au delà des logistiques et gestuelles différentes nécessaires pour induire ces modèles, leurs finalités sont également distinctes. Les modèles sur rongeurs sont généralement utilisés pour la

compréhension des mécanismes physiopathologiques et le test de traitements pharmacologiques, tandis que les modèles sur gros animal permettent l'évaluation préclinique de systèmes implantables destinés à l'usage humain et les approches biomécaniques des AAA.

Les principaux modèles d'AAA non-disséquants incluaient :

- Des modèles sur rongeurs :
 - Perfusion intra-aortique d'élastase chez le rat Wistar
 - Xénogreffe aortique decellularisée de Cobaye sur rat Lewis
 - Application adventitielle de chlorure de calcium chez la souris
 - Anévrisme sacculaire par suture d'une poche latérale sur l'aorte chez le rat
- Des modèles sur le gros animal (généralement sur le chien, la brebis ou le cochon) :
 - Suture d'un patch ou d'un greffon aortique
 - Perfusion intra-aortique d'élastase

Les principaux modèles d'AAA disséquants incluaient :

- Des modèles sur rongeurs :
 - Perfusion sous-cutanée d'angiotensine II chez la souris double knock out pour l'apolipoprotéine E ou le récepteur aux LDL
 - Induction d'une dysfonction de la lysyl-oxydase chez la souris
 - L'administration d'agonistes du récepteur aux minéralocorticoïdes associé à la prise de sel chez la souris C57BL/6
- Des modèles sur le gros animal (généralement sur le chien ou la brebis) via des manipulations chirurgicales de l'aorte thoracique

3 – Limites des modèles actuels

Il est apparu que chacun de ces modèles permettait d'étudier une partie de la physiopathologie des AAA décrite plus haut mais qu'aucun de ces modèles ne mimait la pathologie humaine dans sa globalité. En particulier, les AAA expérimentaux sur rongeurs sont caractérisés par une cicatrisation de la lésion aortique survenant entre 2 et 6 semaines après l'induction de l'AAA. Cette cicatrisation semble liée à la non persistance de l'agression aortique initiale du fait des caractéristiques des modèles eux-mêmes, et donc de l'absence d'infiltration neutrophilaire pérenne dans la paroi aortique. Ainsi, les publications récentes ont fait état de tentatives de maintien d'un certain degré d'inflammation dans la paroi aortique, et notamment l'ILT, via des injections répétées de germes faiblement pathogènes comme *Porphyromonas Gingivalis* ou *Chlamydia Pneumoniae* (Figure 8). Ces expériences ont été généralement efficaces avec l'induction d'AAAs à croissance persistante, avec un ILT plus important et plus proche de la pathologie humaine, et avec certaines caractéristiques des AAAs humains qui n'étaient généralement pas retrouvées dans les AAAs expérimentaux, comme par exemple l'existence de calcifications.



Figure 8 : Modèle d'AAA par perfusion d'élastase et injections répétées de Porphyromonas Gingivalis chez le rat Wistar. Noter la similarité du thrombus anévrysmal avec la pathologie humaine. D'après Delbosc et al. (217)

ANNEXE A LA PARTIE 1

ARTICLE

“Translational relevance and recent advance of animal models of abdominal aortic aneurysm”

Cet article n'est pas reproduit ici pour des questions de droits.

PARTIE 2

ETUDE EXPERIMENTALE DES CALCIFICATIONS OBSERVEES DANS LES MODELES D'ANEVRYSME AORTIQUE

PARTIE 2

ETUDE EXPERIMENTALE DES CALCIFICATIONS OBSERVEES DANS LES MODELES D'ANEVRYSME AORTIQUE

1 – Etat des connaissances sur la physiopathologie des calcifications artérielles

La paroi artérielle est fréquemment la cible d'un processus de calcification, notamment dans le cadre de pathologies vasculaires comme la maladie occlusive ou l'AAA (277), mais aussi le vieillissement (278), l'insuffisance rénale chronique (279), le diabète (280), la dyslipidémie (281), l'hypertension (282) et certaines maladies génétiques rares (283). Si plusieurs mécanismes sont invoqués, la physiopathologie précise des précipitations phosphocalciques artérielles reste imparfaitement comprise, notamment aux stades initiaux. Plusieurs contributions récentes résument les mécanismes connus (277, 284-289).

La calcification artérielle se caractérise par l'accumulation pathologique de cristaux phosphate de calcium sous la forme d'hydroxyapatite (HA) dans la MEC des parois artérielles. La genèse de l'HA débute par la formation d'un dépôt phosphocalcique amorphe (CaHPO_4). Cette réaction est réversible, si bien qu'une fois formés, ces précipités sont capables de relarguer du calcium et du phosphate dans le microenvironnement vasculaire. Avec le temps, ce dépôt se transforme spontanément en apatite, cristalline et insoluble. Cette réaction est irréversible. En conditions physiologiques, les concentrations sériques de calcium et de phosphate sont proches de la saturation, ce qui favorise la formation de CaHPO_4 . Pourtant, la minéralisation ne prend place que dans les tissus spécialisés tels que les dents et les os, indiquant que la formation de l'HA est hautement régulée. Cette régulation fine est le résultat de l'action d'inhibiteurs circulants. Parmi eux, le pyrophosphate (PPi) et

la Matrix Gla Protein (MGP) se lie à l'HA pour empêcher l'accroissement du cristal. La fétuine A quant à elle prévient la précipitation phosphocalcique spontanée en complexant les ions calcium et phosphate sous forme des particules solubles appelées calciprotein particles (CPPs). La formation de ces CPPs inhibe la croissance et l'agrégation du cristal, réduit son potentiel inflammatoire et apoptotique et facilite sa clairance.

1.1 – Les calcifications artérielles : un déséquilibre entre mécanismes initiateurs et inhibiteurs

La formation des calcifications vasculaires est maintenant de plus en plus perçue comme un phénomène dynamique complexe résultant d'un déséquilibre entre les phénomènes initiateurs/favorisants et phénomènes inhibiteurs (Figure 9). Les mécanismes impliqués ne sont pas mutuellement exclusifs mais présentent des intrications nombreuses (289).

1.2 – Predisposition génétique

Jusque 50% des cas de calcifications coronaires sont attribuables à la génétique (290). Plusieurs loci ont été associés aux calcifications coronaires, tels 6p21.3, 6p24, 10q21.3 et 9p21 (291-293). Les gènes des cyclines, dont certains sont situés à proximité du loci 9p21, ont été évoqués comme également responsables. Ils seraient liés à l'inflammation et à la senescence cellulaire (283). Les gènes EMPP1 et NT5E sont impliqués respectivement dans les calcifications vasculaires infantiles et idiopathiques. Le premier encode une protéine qui transforme l'ATP en adénosine et en pyrophosphate (PPi, inhibiteur des calcifications) tandis que le second converti l'AMP en adénosine et en phosphate inorganique (Pi, accélérateur de minéralisation). Des mutations de ces gènes sont à l'origine de phénotypes associés aux calcifications vasculaires (277). Des mutations du gène ABCC6, qui encode un

transporteur sensible aux nucléosides, ont également été associées aux calcifications héréditaires. Ce gène est aussi associé à une diminution de la production hépatique de la Matrix Gla protéine (MGP), inhibitrice des calcifications.

1.3 – La cellule musculaire lisse vasculaire au cœur du phénomène

1.3.1 – La transdifférenciation ostéoblastique

Un phénomène clef de la formation des calcifications vasculaires est le changement de phénotype des CMLv en cellules osteoblastes-like (289, 294). Plus précisément, il semble que les CMLv se dédifférencient en cellules moins matures puis subissent une redifférenciation ostéochondrogénique, ou bien se transdifférencient directement de CMLv en cellules ostéochondrogéniques (295). Des mécanismes similaires ont été décrits avec les péricytes (296) et les cellules endothéliales (297, 298). Le phosphate pourrait jouer un rôle majeur dans cette différenciation des CMLv, notamment dans le cadre de l'insuffisance rénale chronique (299, 300). En effet, lorsque la concentration extracellulaire de phosphate augmente, sa concentration intracellulaire augmente également sous l'impulsion de Pit-1, un co-transporteur du phosphate dépendant du sodium (301). Il a bien été montré que cette augmentation du phosphate intracellulaire favorisait le changement phénotypique des CMLv (302). La protéine Cfba1/Runx2 (core-binding factor subunit 1 α /runt-related transcription factor 2) est un régulateur transcriptionnel spécifique et indispensable de cette modification phénotypique, dont l'expression est augmentée par l'augmentation de la concentration intracellulaire de phosphate (302).

1.3.2 – La sécrétion de vésicules matricielles

Ces cellules de nouveau phénotype expriment la phosphatase alcaline, secrètent des protéines associées aux os (comme l'ostéopontine (303), le collagène de type I, l'ostéoprotégérine, la protéine morphogénétique osseuse-2 ou *bone morphogenic*

protein-2 et l'ostéocalcine (300, 304)) et relarguent des vésicules matricielles compétente en minéralisation dans la MEC (299, 300, 305). Il faut noter que ces vésicules sont déjà relarguées par les CMLv en situation physiologique mais sont protégées de la minéralisation par la présence d'inhibiteurs des calcifications (306).

1.3.3 – L'apoptose des cellules musculaires lisses

L'apoptose des CMLv est également induite de manière par l'augmentation du phosphate intracellulaire, qui pourrait causer une altération du métabolisme des mitochondries (307). Plusieurs études suggèrent ainsi que l'apoptose cellulaire conduit à la formation de calcifications (308-311). Les vésicules matricielles, qui ont la capacité de concentrer et cristalliser le calcium, pourraient demeurer sous la forme de résidus malgré l'apoptose cellulaire et participer alors d'avantage au processus de calcification (307).

1.3.4 – Le rôle potentiel des cellules souches

Plus récemment, une théorie quelque peu différente a émergé selon laquelle les cellules ostéoblastes-like provenaient de cellules souches plutôt que des CMLv. Dans cette théorie, le rôle actif de cellules souches circulantes provenant par exemple de la moelle osseuse (312) ou de niches vasculaires situées dans l'adventice (313) a été évoqué. Ces cellules possèderaient des capacités de différenciations ostéoblastiques mais aussi ostéoclastiques (312). Sous l'influence de chémo-attractants provenant par exemple de l'endothélium endommagé, ces cellules pourraient aller se loger au sein de parois vasculaires altérées pour connaître une différenciation ostéogénique (314). Une théorie voisine porte sur les capacités de différenciation en cellules ostéoblastes-like des cellules souches vasculaires multipotentes de la paroi artérielle (315).

1.4 – Diminution de l'activité ostéoclastique

Des monocytes et des macrophages présents dans la paroi artérielle calcifiée peuvent se différencier en cellules ostéoclastes-like et contrer l'action des CMLv devenues ostéoblastes-like. L'hyperphosphatémie pourraient atténuer les cellules ostéoclastes-like en inhibant la voie de signalisation induite par le ligand de RANK (316).

1.5 – Modification de l'activité des voies de signalisation pro- et anti-calcifiantes

1.5.1 – Voie de signalisation de la protéine morphogénétique osseuse (*bone morphogenetic protein, BMP*)

Les BMP sont un sous-groupe de la superfamille des facteurs de croissance TGF- β , essentielles dans le remodelage vasculaire (317, 318). Plusieurs BMPs sont des puissants activateurs de la différenciation ostéogénique (319). L'activation des BMPs est associée à l'athérosclérose, aux effets vasculaires du diabète, à la MRC et à l'élévation du phosphate. Comme évoqué plus haut, la BMP-2 semble avoir un rôle prépondérant dans la promotion des calcifications médiales, en agissant via Cfb1/Runx2 et les microRNA-30b et 30c (320, 321). La BMP4 augmente les calcifications vasculaires en agissant sur l'endothélium (322) via une augmentation de l'inflammation et de la transition épithélio-mésenchymateuse (Endothelial-Mesenchymal-Transition, EndMT) (323). La BMP-7 aurait des effets inverses en protégeant contre les calcifications dans le cadre de la maladie rénale chronique (MRC) (324).

Les voies de signalisation des BMPs sont inhibées par la matrix Gla protein (MGP) qui est considérée comme un puissant inhibiteur des calcifications vasculaires. Cela a été démontré expérimentalement chez la souris (325) et corrobore les observations faites en pathologie humaine dans le cadre du syndrome de Keutel (déficit congénital

en MGP) (326). La MGP prévient la EndMT (322) et la transdifférenciation ostéoblastique des CMLv (295). L'augmentation de son expression limite les calcifications vasculaires chez la souris (327, 328). La MGP régule les BMP par interactions protéiques directes et lie le calcium via les résidus glutamate gamma-carboxylés (329). Elle protège également de la nucléation minérale sur les fibres d'élastine en liant les cristaux minéraux (329, 330).

La maturation de la MGP est assez complexe (331). Elle doit subir deux processus post-transcriptionnels pour être activée : la phosphorylation de trois résidus sérine sur 5 et la gamma-carboxylation de 5 résidus glutamate sur 9. Si la phosphorylation reste mal comprise, la gamma-carboxylation ne peut se faire qu'en présence de vitamine K en quantité suffisante (332). C'est ainsi que le déficit en vitamine K (comme par exemple dans le cas de la MRC) ou la prise de médicaments anti-vitamine K diminue l'activité de la MGP et augmente la probabilité de calcifications (333).

1.5.2 – Voie de signalisation Wnt

La voie de signalisation Wnt joue un rôle important sur le développement des calcifications selon son activation ou son inhibition (334). Elle est très complexe et ne sera pas détaillée ici. Le LRP6, un récepteur de Wnt, limite la différenciation ostéochondrogénique des CMLv (335). Il en est de même pour l'axe Wnt7b/Msx2 (336) A l'inverse, Dkk1, un antagoniste de Wnt, augmente les EndMTs et les calcifications des cellules endothéliales (336).

1.5.3 – Métabolisme du phosphate

La régulation du phosphate est fondamentale dans la genèse des calcifications vasculaire. En effet, le phosphate PO_4^{3-} constitue une plateforme anionique idéale pour la précipitation de calcium Ca^{2+} sous la forme d'apatite biologique. Son rôle est

direct mais aussi indirect. Ainsi, l'hyperphosphatémie, retrouvée notamment dans la MRC dans laquelle la sécrétion rénale du phosphate est altérée, est un puissant facteur pro-calcifiant (279). Le *fibroblast growth factor 23* (FGF-23), aidé de son co-facteur Klotho, promeut l'excrétion de phosphate par le rein (337, 338). Ainsi un déficit en FGF-23 ou en Klotho, comme on peut l'observer dans la MRC terminale, est associé aux calcifications vasculaires (284, 339). Les mécanismes par lesquels l'hyperphosphatémie induit des calcifications vasculaires sont multiples, directs et indirects. Les effets directs de l'hyperphosphatémie sont: (1) des perturbations majeures des CMLv, notamment le déclenchement de la transdifférenciation ostéoblastique de plusieurs façons (dont des modifications épigénétiques dépendantes des microARN), la libération des vésicules matricielles par les CMLv et l'induction de l'apoptose des CMLv, (2) la fabrication de DRO par les cellules endothéliales (3) la minéralisation des peptides dérivés de l'élastine et (4) l'inhibition de la différenciation ostéoclastique des monocytes/macrophages. Parmi les effets indirects, on retient notamment (1) la sécrétion de parathormone (PTH) et l'hyperparathyroïdie secondaire, et (2) le métabolisme de la vitamine D.

1.5.4 – Voies de signalisation impliquées dans l'hyperglycémie et le diabète

L'hyperglycémie et le diabète sont pro-calcifiants. Les voies de signalisation du BMP sont altérées dans ce contexte. Le récepteur des produits terminaux de glycation (*receptor for advanced glycation endproducts*, RAGE) a été impliqué dans les calcifications diabétiques (340, 341). Il agit via les protéines S100 et ses ligands en induisant un stress oxydant (340, 341). Plusieurs études retrouvaient d'ailleurs une augmentation des niveaux sériques de S100/calgranuline dans les maladies vasculaires (342, 343). Il a aussi été suggéré que la galectine 3 et RAGE modulaient

l'ostéogénèse vasculaire pour partie via la voie de signalisation Wnt/ β -cathénine (344).

1.5.5 – Voies de signalisation du récepteur sensible au calcium

Le récepteur sensible au calcium (*calcium-sensing receptor*, CaSR) est une protéine G couplée à un récepteur de surface cellulaire, sensible au calcium extracellulaire. Il contrôle la sécrétion d'hormone parathyroïdienne (*para-thyroid hormone*, PTH) et de calcitonine. Il a bien été montré qu'une diminution de l'expression de CaSR dans le système vasculaire est directement impliquée dans le développement des calcifications vasculaires (345, 346). D'ailleurs, les calcimimétiques qui visent sélectivement le CaSR diminuent les calcifications en contrôlant localement l'expression du CaSR dans les CMLv (347, 348).

1.5.6 – Voies de signalisation régulant l'activité ostéoclastique

Il existe également des systèmes de régulation de l'activité ostéoclastique, notamment l'axe ostéoprotégérine – receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK)/RANK ligand (RANKL). L'ostéoprotégérine (OPG) limite les calcifications vasculaires tandis que RANKL les favorise. La délétion du gène de l'OPG induit des calcifications sévères et une ostéoporose chez l'animal (349). Il persiste tout de même des controverses sur le rôle de cet axe régulateur (286, 350, 351).

1.5.7 – Autres stress chroniques

Le stress oxydant au sein des CMLv généré en particulier par l'hyperlipidémie et les lipoprotéines oxydées (352) cause l'expression de Cfba1/Runx2 (353), d'osterix (osteoblast-specific transcription factor) et active la voie de signalisation Wnt (354) conduisant à une différenciation ostéogénique.

Les cytokines inflammatoires comme le TNF α peuvent également induire des calcifications via la voie de signalisation Msx2/Wnt/ β -cathénine (355). D'ailleurs, les

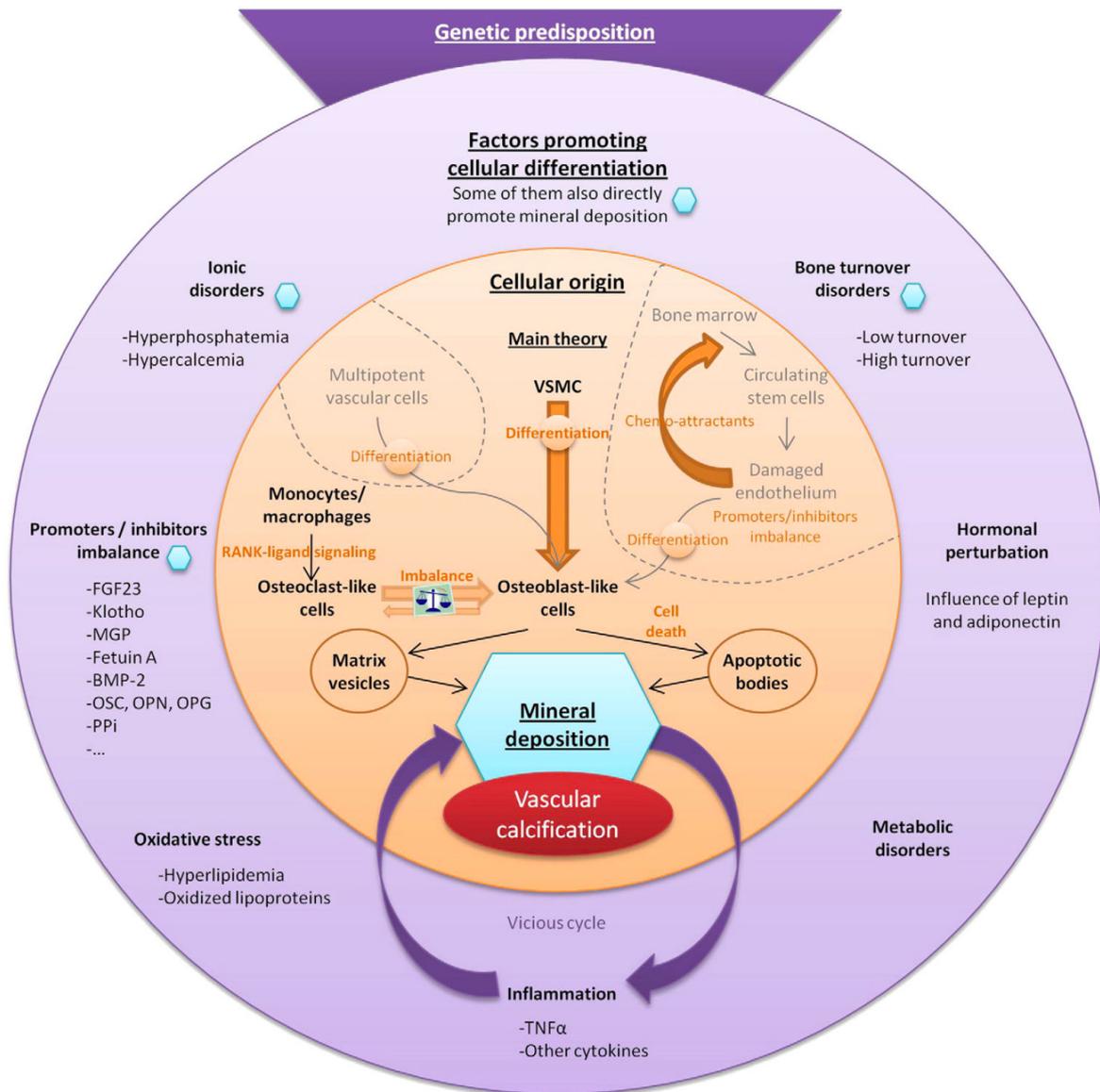


Figure 9: Mécanismes généraux des calcifications artérielles. Noter la multiplicité des mécanismes impliqués aboutissant au dépôt minéral. D'après Evrard et al. (284)

dépôts calciques co-localisent avec les cellules inflammatoires *in vitro* (356) et *in vivo* (357).

De plus, il a également été suggéré que les cristaux minéraux pouvaient être pro-inflammatoires par eux-mêmes (358-361).

Des hormones ont des actions pléiotropes sur les calcifications vasculaires. Par exemple, la leptine promeut les calcifications vasculaires *in vitro* (362) et *in vivo* (363). La PTH favorise d'une manière générale l'ostéolyse et donc le relargage calcique dans la circulation sanguine. Il a bien été montré que des niveaux élevés de PTH étaient associés à des calcifications vasculaires (364, 365), notamment dans le cadre de la maladie rénale chronique (366). A l'inverse, l'os est certes le réservoir principal du calcium et du phosphore mais pourrait aussi avoir un rôle de tampon. Plusieurs papiers ont démontré que le niveau de calcifications vasculaires est associé à une diminution de la masse osseuse globale (367, 368), du volume d'os trabéculé et de l'épaisseur des travées osseuses (369) mais aussi à une diminution du remodelage osseux (370, 371).

2 – Revue des causes et conséquences des dépôts calciques dans les AAA

L'existence de calcifications au sein des AAA est fréquemment notée et connue de longue date. Chez l'humain, les données concernant la signification et l'impact de ces calcifications sont contradictoires. Dans certaines études, les AAA possédant davantage de calcifications évoluaient plus lentement et étaient moins susceptibles de rompre (372, 373). Pour d'autres, le volume des calcifications n'aurait pas d'effet sur la croissance et la rupture des AAA (374). Enfin, une augmentation du degré de calcification était noté dans les AAA symptomatiques ou rompus (375). D'intérêt, il était noté que les calcifications présentes dans les AAA étaient différentes (plus fines et moins étendues) en comparaison aux aortes non-anévrysmales (376) pour des scores calciques non différents.

Contrairement à une idée répandue, le diabète protège contre les AAA, non pas du fait de calcifications, mais à cause d'autres mécanismes renforçant la MEC. Ces

mécanismes, déjà détaillés plus haut, sont notamment la glycation des protéines précurseurs de la MEC conduisant à une augmentation de la formation de produits terminaux de glycation (advanced glycation end products, AGEs) (91, 127). Les AGEs permettent des liaisons covalentes qui induisent une rigidification de la MEC et diminuent sa susceptibilité à la rupture (129, 130).

Des études biomécaniques ont examiné l'impact des calcifications au sein des AAA. Pour Li et al (377), la présence de calcifications au sein d'un AAA augmente le stress pariétal. Globalement, la résistance du tissu anévrysmal serait altérée par la présence de calcifications (378). En fait, le risque de rupture serait maximal aux extrémités des dépôts calciques du fait des différences de compliance entre le tissu calcifié et la MEC alentour (stress de Von Mises) (379). Ces éléments expliquent les hémorragies retrouvées en périphérie des calcifications qui participent de l'entretien du phénomène pathologique (380).

Les données expérimentales concernant les calcifications des AAA sont minces. Le modèle d'AAA par application adventitielle de chlorure de calcium représente un modèle d'AAA calcifié par nature (381). Dans ce modèle, le calcium ionisé soluble appliqué sur la paroi externe de l'aorte de rat pénètre le tissu par conduction intercellulaire. Il est ensuite transformé en phosphate de calcium CaPO_4 par la phosphatase alcaline des CMLv en utilisant le phosphate environnant comme substrat. Le calcium est connu pour avoir une haute affinité pour l'élastine (382). Le CaPO_4 ainsi véhiculé précipite sur le réseau d'élastine de la MEC aortique pour induire la fragmentation des fibres élastiques du fait des différences de propriétés mécaniques entre les fibres souples d'élastine et les cristaux rigides d'HA.

Lorsque des AAA expérimentaux étaient induits par perfusion intra-aortique d'élastase (240) ou xélogreffe aortique décellularisée (217) en association avec des

injections répétées du germe faiblement pathogène anaérobie *Porphyromonas Gingivalis*, les diamètres anévrysmaux, le volume d'ILT et les calcifications étaient plus importants en comparaison aux témoins. Ceci était lié à une augmentation du recrutement des neutrophiles au sein de l'ILT. Il était par ailleurs constaté que les calcifications co-localisaient avec l'ADN libre qui provenait probablement en partie de la pyroptose des polynucléaires neutrophiles et des bactéries faiblement pathogènes.

Partant de l'observation de cette co-localisation entre ADN libre et calcifications, et connaissant l'importance du phosphate dans la composition de l'ADN, nous formulons l'hypothèse que l'ADN libre pourrait constituer une plateforme anionique phosphate permettant la précipitation du cation divalent calcium au sein de la paroi des AAAs. Nous explorons donc ici (1) la répétition de cette co-localisation dans différentes calcifications artérielles chez l'humain et le rat en pathologie anévrysmale et athéromateuse, (2) la capacité de l'ADN libre à induire des calcifications sur modèle expérimental murin et (3) l'influence des calcifications sur le développement des AAA sur la base d'un modèle expérimental d'AAA calcifié.

3 – Méthodes et Résultats

3.1 – Origine des calcifications observées dans les AAA expérimentaux

L'étude ci-dessous fait l'objet d'un article accepté dans le journal anglophone à comité de lecture *Atherosclerosis* (Impact Factor 2015 : 3,94). Cet article est présenté en Annexe à la fin de cette partie.

L'étude consistait en (1) des observations histologiques sur plaques calcifiées initiales humaines, plaques calcifiées évoluées humaines et AAAs expérimentaux calcifiés, afin de mettre en évidence une co-localisation entre de l'ADN libre et des

calcifications et (2) la création d'un modèle expérimental de calcifications basé sur la perfusion intra-aortique d'ADN libre chez le rat. Les calcifications retrouvées dans les faisceaux l'objet d'études qualitative par spectrométrie infrarouge avec transformée de Fourier (*mFourier Transform Infrared Spectroscopy*, mFTIR) et microscopie électronique à balayage (*Scanning Electron Microscopy*, SEM).

Nos études histologiques sur coupes sériées confirmaient une co-localisation entre ADN libre et calcifications sur les différentes observations. Les calcifications étaient mises en évidence histologiquement via une coloration au rouge d'alizarine tandis que l'ADN libre était visualisé en fluorescence par des colorants Hoechst, par immunomarquage de l'ADN (ab27156, Abcam) et par TUNEL (ADN fragmenté, Roche). Devant les difficultés liées à la section et à la visualisation de coupes calcifiées sans traitement préalable, nous avons utilisé une incubation à l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) car l'EDTA est un chélateur du phosphate de calcium qui permet d'éliminer les précipités phosphocalciques et ainsi d'observer les dépôts co-localisant avec les calcifications.

Notre modèle de calcifications par perfusion intra-aortique d'ADN libre chez le rat Wistar s'avérait également concluant. Le sacrifice précoce, à la 12^{ème} heure, de rats ayant reçu une perfusion intra-aortique d'ADN libre marqué au Hoechst démontrait la bonne diffusion de l'ADN dans la paroi aortique. L'examen en microscanner Quantum FX (PerkinElmer, plateforme d'imagerie de l'équipe EA 2496) des aortes des rats ayant reçu une perfusion intra-aortique d'ADN libre démontrait un volume relatif plus élevé de calcifications aortiques que les rats témoins à 21 jours, significatif lorsque la diffusion de l'ADN était favorisée par une courte perfusion préalable d'élastase.

Les études qualitative par spectrométrie infrarouge avec transformée de Fourier (*mFourier Transform Infrared Spectroscopy*, mFTIR) et microscopie électronique à balayage (*Scanning Electron Microscopy*, SEM) que les calcifications humaines étaient principalement caractérisée par la présence d'ACCP, et dans une moindre mesure par du CA. Concernant les calcifications développées suite au modèle de perfusion intra-aortique, on notait principalement la présence de CA et bien moins d'ACCP. L'ACCP étant considéré comme un précurseur du CA, cela évoque l'observation d'un phénomène dynamique chez l'humain. A l'inverse, l'observation quasi-exclusive de CA chez le rat pourrait s'expliquer par la réalisation d'une perfusion unique initiale d'ADN libre sans poursuite de l'agression menant à la constitution de précipités phosphocalciques lors des 3 semaines suivantes.

3.2 – Conséquences des calcifications observées dans les AAA expérimentaux

Dans un second temps, l'influence des calcifications sur la croissance des AAA était évaluée expérimentalement. Cette étude n'a pas encore fait l'objet d'une publication et sera donc détaillée davantage.

Vingt rats Wistar mâles âgés de 6 semaines (laboratoires Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) étaient divisés en deux groupes. Un premier groupe (groupe « EC » pour élastase-calcifié, n=10) était soumis à un régime pro-calcifiant en péri-opératoire d'un modèle d'AAA par perfusion intra-aortique d'élastase. Un second groupe (groupe « E » pour élastase, n=10) recevait le régime d'alimentation habituel de notre laboratoire (SAFE, A04, calcium 0,83%, phosphore 0,59 %) en péri-opératoire d'un modèle d'AAA par perfusion d'élastase. Le régime pro-calcifiant (SSNIFF, Allemagne) contenait du calcium (1,59%), de la vitamine D3 (75 000 UI/Kg), et de la warfarine (3 mg/g d'alimentation) et de la vitamine K1 (1,5 mg/g

d'alimentation) comme préalablement décrit (383). L'étude était réalisée conformément aux principes formulés par la National Society for Medical Research (agrément: n° B75-18-03, autorisation d'expérimenter n° 75-101), et cette étude était réalisée après décision favorable du comité d'éthique animal, avec déclaration ministérielle (n° 5743).

Après une semaine de régime et d'acclimatation, le modèle d'AAA par perfusion d'élastase était réalisé comme préalablement décrit (384). Les rats étaient sacrifiés 15 jours après l'intervention après euthanasie au pentobarbital intra-péritonéal. Les diamètres maximaux des AAA étaient mesurés. Les aortes abdominales étaient prélevées et séparées en deux parties. La première était fixée dans le paraformaldéhyde 3,7% pour analyse histologique (hématoxyline-éosine, trichrome de Masson, rouge d'Alizarine, Orcéine, Hoechst en fluorescence, immunomarquage de l'ADN (ab27156, Abcam) avant et après decalcification à l'EDTA) tandis que la seconde partie était immergée en milieux conditionnés (milieu de culture Roswell Park Memorial Institute medium, RPMI) et de analyse en microscanner. Des prélèvements de sérums et plasmas étaient également réalisés pour mesure des paramètres biochimiques.

Les concentrations d'ADN libre et de MPO étaient mesurées dans les plasmas et les milieux conditionnés avec le réactif Quant-iT picogreen dsDNA (Molecular Probes) et un kit ELISA de dosage de la MPO (Hycult Biotechnology), respectivement. Les activités MMP-2 et MMP-9, étaient également mesurées dans les plasmas et les milieux conditionnés par zymographie à la gélatine. Une quantification était réalisée avec le logiciel ImageJ v.1.46. Une quantification des calcifications était réalisée comme décrit ci-dessus par évaluation du score calcique en microscanner avec un logiciel dédié (CTAn, Sky Scan).

Nos mesures des paramètres biochimiques retrouvaient une augmentation significative du taux de calcium sérique dans le groupe EC au sacrifice en comparaison au taux basal ($2,80 \pm 0,03$ mM vs. $3,43 \pm 0,07$ mM; $p < 0,001$). Ce n'était pas le cas dans le groupe E ($2,85 \pm 0,03$ mM vs sacrifice: $2,91 \pm 0,06$ mM; $p = \text{NS}$). Il existait une différence significative concernant le calcium sérique dans le groupe EC en comparaison au groupe E au sacrifice ($p < 0,01$).

Nous retrouvions des AAA de diamètre significativement plus petits dans le groupe EC en comparaison au groupe E ($3,1 \pm 0,4$ mm vs. $4,2 \pm 0,2$ mm; $p = 0,01$). L'analyse des aortes en microscanner retrouvait une augmentation significative du score calcique dans le groupe EC en comparaison au groupe E ($0,186 \pm 0,060$ vs. $0,054 \pm 0,029$ %; $p = 0,02$). Ces résultats sont résumés au niveau de la Figure 10.

L'analyse des milieux conditionnés retrouvait un taux significativement plus élevé d'ADN libre (14503 ± 1599 vs. 9699 ± 949 ng/mL; $p = 0,009$) et de MPO (7269 ± 1397 vs. 3667 ± 452 ng/mL; $p = 0,01$) dans les milieux conditionnés des AAAs du groupe EC (Figure 11). Cette différence n'était pas retrouvée dans les plasmas.

Egalement, la forme active de la MMP-9 était significativement plus élevée dans les milieux conditionnés du groupe EC comparée au groupe E (791 ± 187 vs. 361 ± 75 ; $p = 0,004$). Il en était de même pour le ratio de MMP-9 active (MMP-9 active/MMP-9 active+pro MMP-9) ($5,87 \pm 0,85$ vs. $3,50 \pm 0,57$; $p = 0,0163$). Il n'était retrouvé de différence concernant la MMP-2, qu'il s'agisse de la MMP-2 active (18973 ± 2035 dans le groupe EC vs. 15650 ± 1280 dans le groupe E; $p = 0,15$) ou du ratio de MMP-2 active ($60,05 \pm 2,65$ dans le groupe EC vs. $58,46 \pm 1,15$ dans le groupe E; $p = 0,24$). Nous retrouvions des résultats de même profil dans les plasmas. Il existait une augmentation significative de la forme active de la MMP-9 dans le groupe EC (4167 ± 830 vs. 2362 ± 446 ; $p = 0,025$) ainsi que du ratio de MMP-9 active ($24,29 \pm 2,29$

vs. $17,24 \pm 2,17$; $p=0,019$). Aucune différence significative n'était observée pour la MMP-2 active (7240 ± 2758 dans le groupe EC vs. 3885 ± 778 dans le groupe E; $p=0,17$) ni le ratio de MMP-2 active ($47,6 \pm 13,7$ dans le groupe EC vs. $27,89 \pm 2,31$ dans le groupe E; $p=0,39$) dans les plasmas. Ces résultats sont résumés au niveau des Figures 12 et 13.

Les analyses histologiques et immunomarquages confirmaient la co-localisation des calcifications avec des dépôts d'ADN libres. Il existait également des infiltrats neutrophilaires au contact des calcifications, en lien avec l'augmentation des taux de MPO et de MMP-9 dans les milieux conditionnés (Figure 14).

Ce travail retrouvait donc un ralentissement de la croissance des AAA lorsque ceux-ci étaient calcifiés mais une augmentation des paramètres d'activation neutrophilaire.

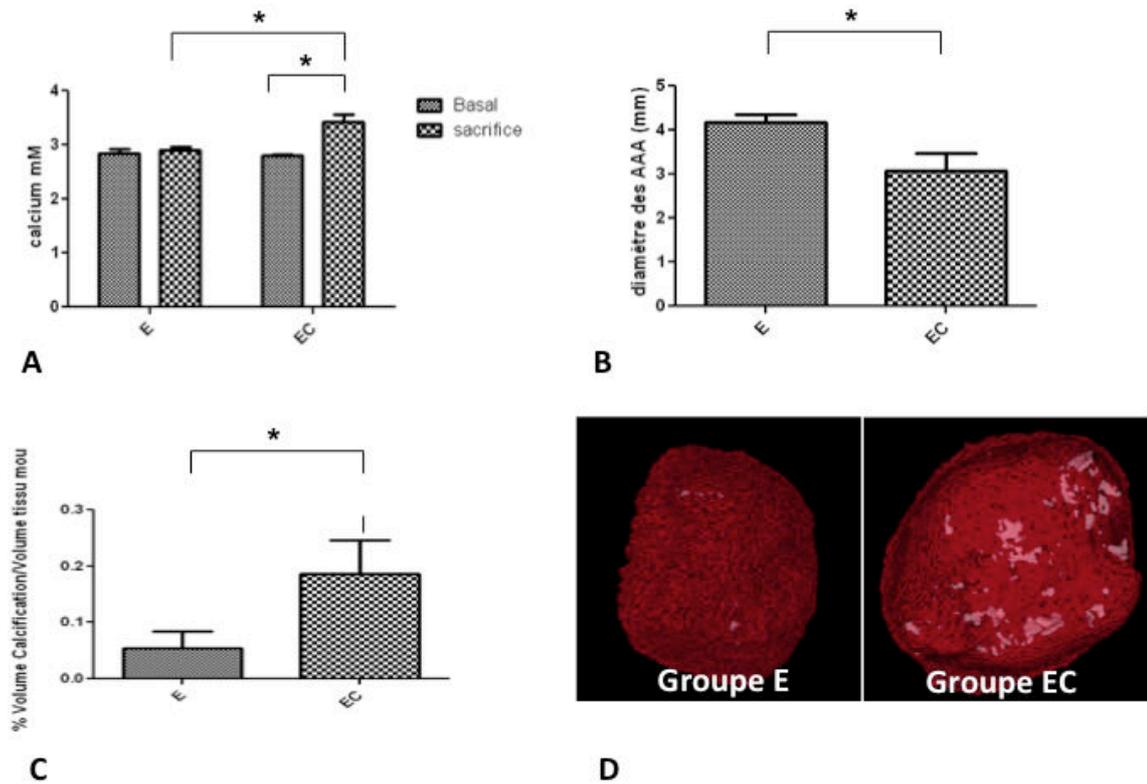


Figure 10: Le régime pro-calcifiant conduisait effectivement à une augmentation de la calcémie dans le groupe EC en comparaison au groupe E (A). Au sacrifice, les diamètres des AAA étaient significativement inférieurs dans le groupe EC (B) qui s'avérait également démontrer un score calcique plus élevé (C) à l'analyse en microscanner (D). Les * indiquent des différences statistiquement significatives.

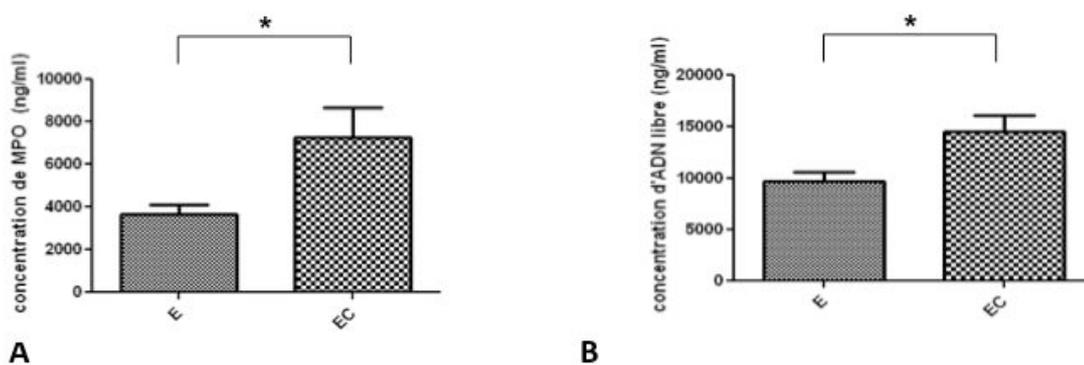


Figure 11: Les taux de MPO (A) et d'ADN libre (B) étaient significativement plus élevés dans le groupe EC en comparaison au groupe E. Les * indiquent des différences statistiquement significatives.

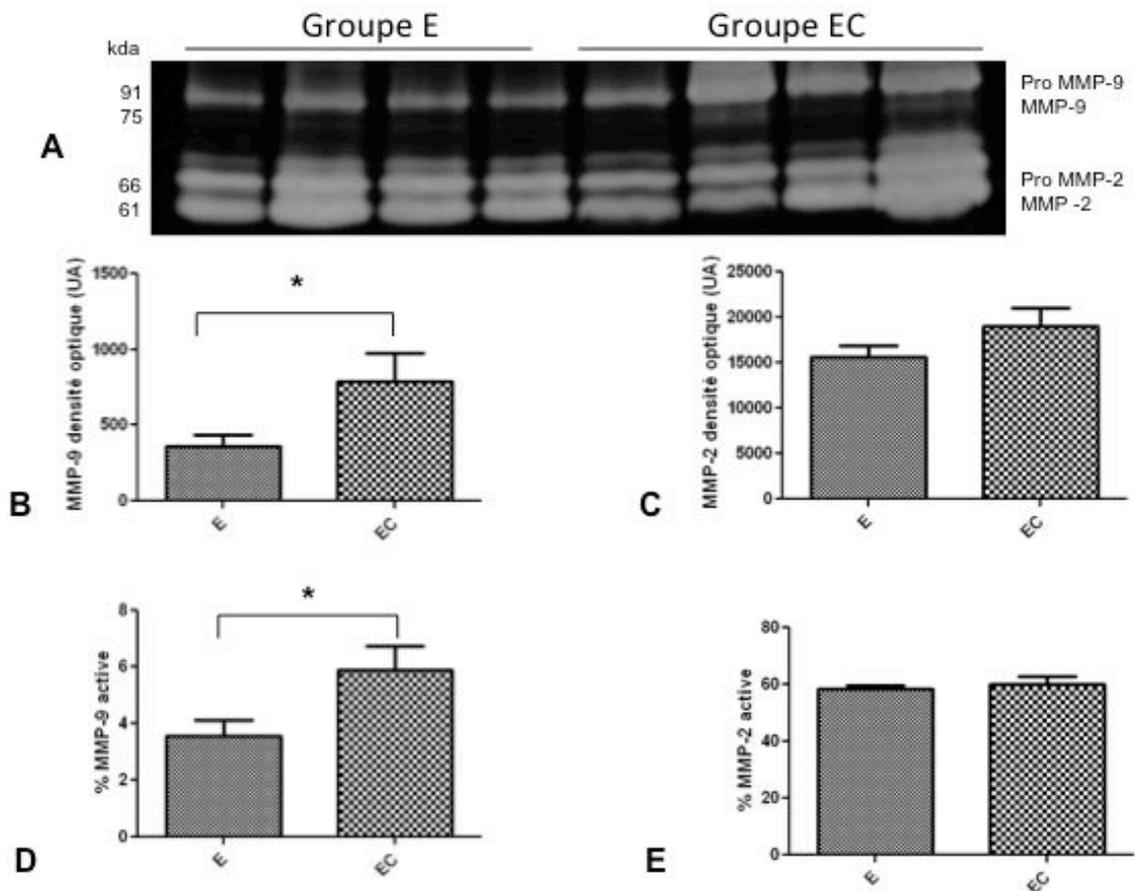


Figure 12: Activités des MMP-9 et MMP-2 dans les milieux conditionnés des AAAs dans les 2 groupes évaluée par zymographie (A). Comparaison des quantifications des activités (B, C) et des ratios (D, E) MMP-9 et MMP-2. La densité optique représente la surface des pics en pixels. Les * indiquent des différences statistiquement significatives.

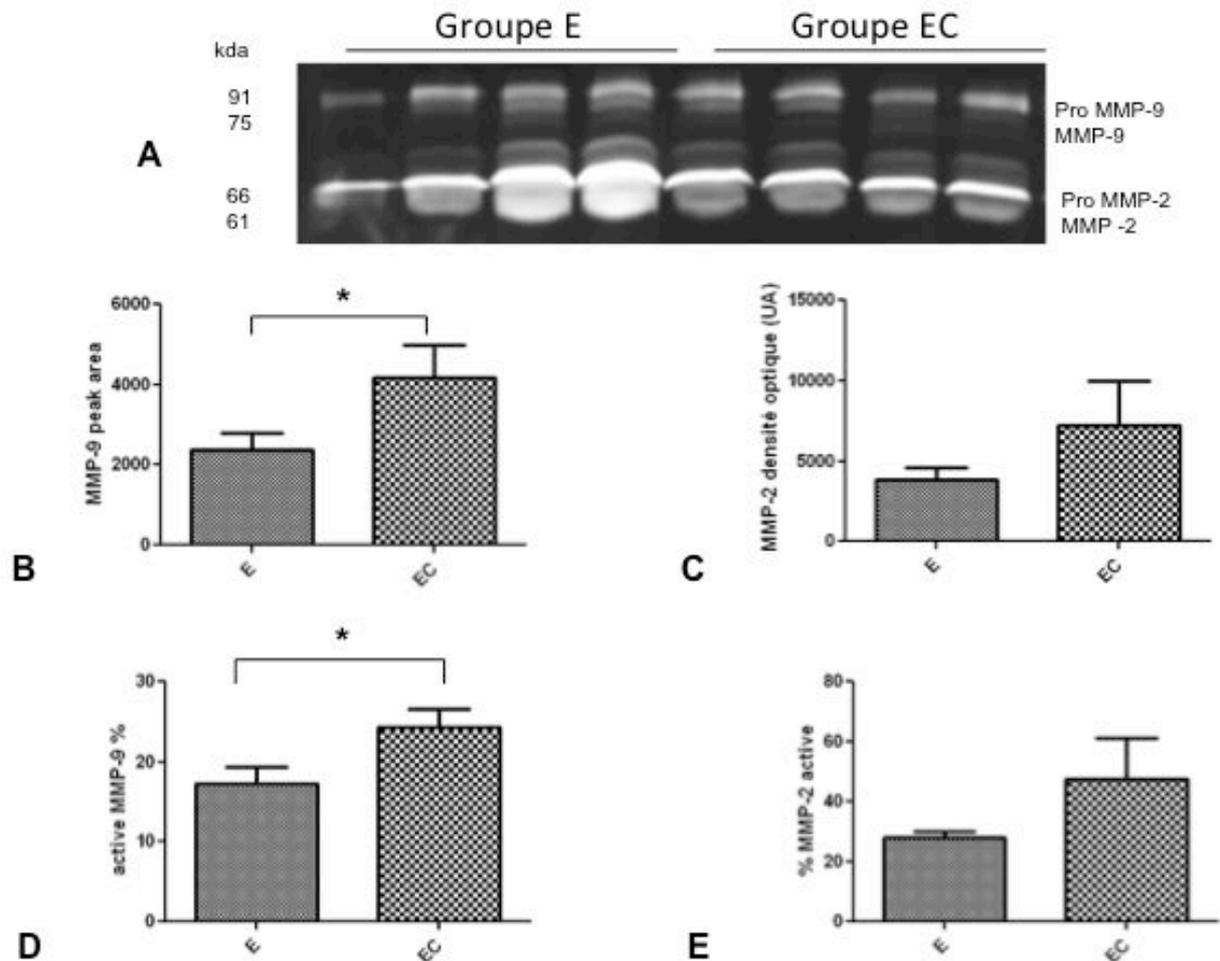


Figure 13: Activités des MMP-9 et MMP-2 dans les plasmas des AAAs dans les 2 groupes évaluée par zymographie (A). Comparaison des quantifications des activités (B, C) et des ratios (D, E) MMP-9 et MMP-2. La densité optique représente la surface des pics en pixels. Les * indiquent des différences statistiquement significatives.

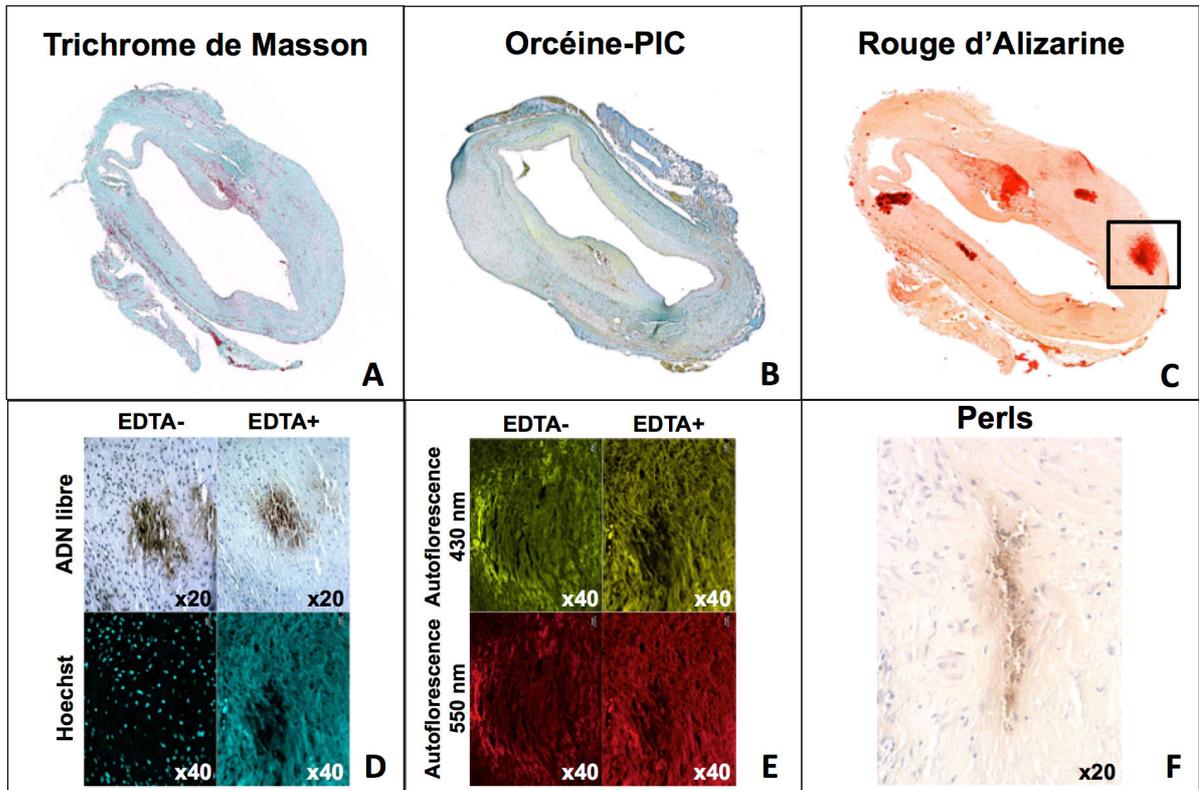


Figure 14: Coupes d'anévrysmes expérimentaux calcifiés. Vues globales en nanozoomer après colorations au trichrome de Masson (A), à l'orcéine-PIC (B) et au rouge d'Alizarine (C). Noter la faible densité de fibres d'élastine (B, en marron) et les nombreuses calcifications (C, en rouge vif). L'immunomarquage de l'ADN et le Hoechst sont positifs en regard des calcifications, même avant EDTA (D). Il existe une autofluorescence de l'hémoglobine (550 nm) en périphérie des calcifications confirmant l'existence de résidus de globules rouges à proximité (E). Le Perls de voisinage est également positif (F), confirmant l'existence de Fer et donc également la rupture de globules rouges au contact.

ANNEXE A LA PARTIE 2

ARTICLE

**“Free DNA Precipitates Calcium Phosphate Apatite
Crystals In The Arterial Wall *in Vivo*”**

Cet article n'est pas reproduit ici pour des questions de droits.

PARTIE 3

MODELISATION EXPERIMENTALE DU ROLE DE L'IMMUNITE ADAPTATIVE DANS LA RUPTURE D'ANEVRYSME AORTIQUE

PARTIE 3

MODELISATION EXPERIMENTALE DU ROLE DE L'IMMUNITE ADAPTATIVE DANS LA RUPTURE D'ANEVRYSME AORTIQUE

1 – Rupture et immunité adaptative

Dans cette troisième partie, nous examinons la capacité de l'immunité adaptative à induire la rupture d'AAA en utilisant le modèle de xéno greffe aortique décellularisée.

L'étude ci-dessous fait l'objet d'un article finalisé présenté à la fin de cette partie.

Comme souligné dans notre revue de la littérature, la capacité à rompre reste une limite importante des AAA expérimentaux, notamment chez le rat. La rupture peut être observée précocement avec le modèle par perfusion intra-aortique d'élastase par rupture massive des fibres élastiques secondaire à la perfusion. Egalement, les modèles d'AAA sacculaires peuvent rompre lorsque des xéno greffes aortiques décellularisées sont utilisées (385). Enfin, chez la souris, le modèle d'AAA disséquant par perfusion sous-cutanée d'angiotensine II chez les souris Apo E -/- rompt assez fréquemment (20% des cas) (386) et presque toujours en cas de pré-conditionnement par le β -Aminopropionitrile (387). Les modèles de xéno greffe aortique décellularisée et d'application adventitielle de chlorure de calcium ne rompent pas.

Chez l'homme, la réaction inflammatoire et immune représente une part importante de la physiopathologie des AAA (Cf introduction). Notamment, la réaction immunitaire adaptative se déclenche vraisemblablement par exposition des cellules immunitaires à des antigènes dérivés provenant de l'oxydation ou de la dégradation de la MEC ou des éléments de l'ILT. Cependant, la capacité de cette immunité adaptative à induire la rupture et les mécanismes impliqués sont peu élucidés.

2 – Méthodes et résultats

Dans un premier temps, nous pré-sensibilisons des rats Lewis contre les xéno-antigènes de la MEC de Cobaye avant implantation d'une xéno greffe décellularisée. Cette immunisation était efficace comme démontré par méthode ELISA. L'immunisation globale contre la MEC conduisait à la rupture des AAA expérimentaux dans la quasi-totalité des cas entre J4 et J14. Aucune rupture n'était notée chez les rats témoins non pré-sensibilisés. Les ruptures semblaient secondaires à des dépôts majeurs et précoces d'immunoglobulines dans la paroi des aortes xéno greffées. Cela était démontré par immunomarquage au STAR72 et en immunofluorescence. Il existait aussi de très importants dépôts de C3 dans les parois des aortes pré-sensibilisées en immunofluorescence. Les immunoglobulines activaient les neutrophiles et les voies du complément comme démontré par la co-localisation des immunoglobulines et du C3 en immunofluorescence, ainsi que l'augmentation des activités élastase, MPO et C3 dans les milieux conditionnés des aortes xéno greffées. On observait également une forte augmentation de l'activité MMP-9 mais pas de l'activité MMP-2.

Dans un second temps, une pré-sensibilisation différentielle contre les grandes classes de composants de la MEC était réalisée. Cette immunisation était également efficace comme démontré par méthode ELISA. Nous constatons que la pré-sensibilisation contre les glycoprotéines de structure et les protéoglycanes induisait généralement la rupture après xéno greffe tandis que la pré-sensibilisation contre le collagène ou les glycoprotéines associées à l'élastine induisait la thrombose et que la pré-sensibilisation contre l'élastine conduisait à dilatations aortiques importantes avec peu de ruptures.

Au total, l'immunité adaptative contre les xéno-antigènes provenant des glycoprotéines de structure et des protéoglycanes de la MEC peut induire une rupture aortique. Les protéines antigéniques précisément responsables restent toutefois à déterminer dans des études futures.

ANNEXE A LA PARTIE 3

ARTICLE

**“Exploring adaptive immunity against aortic
extracellular matrix components in experimental
aortic aneurysms”**

Exploring Adaptive Immunity Against Aortic Extracellular Matrix Components In Experimental Aortic Aneurysms

Raphaël Coscas^{1,2,3,4}, Sebastien Dupont¹, Sacha Mussot⁵, Liliane Louedec¹, Harry Etienne¹, Marion Morvan¹, Gilles Chiocchia², Ziad Massy^{4,6}, Marie-Paule Jacob¹, Jean-Baptiste Michel¹

¹ UMR 1148, Inserm-Paris7 - Denis Diderot University, Xavier Bichat Hospital, 75018 Paris, France.

² UMR 1173, Inserm-Paris11 - Faculty of Health Sciences Simone Veil, Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines University, Paris-Saclay University, 78180 Montigny-le-Bretonneux.

³ Department of Vascular Surgery, Ambroise Paré University Hospital, AP-HP, 92104 Boulogne-Billancourt, France.

⁴ UMR 1018, Inserm-Paris11 - CESP, Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines University, Paris-Saclay University, Paul Brousse Hospital, 94807 Villejuif.

⁵ Department of Thoracic Surgery, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis Robinson, France

⁶ Department of Nephrology, Ambroise Paré University Hospital, AP-HP, 92104 Boulogne-Billancourt, France.

Running Title: Adaptive immunity against aortic extracellular matrix

Word count:

Abstract: 350 words

Manuscript (without references): 4009 words

Corresponding author:

Raphaël Coscas, MD

Department of Vascular Surgery

Ambroise Paré University Hospital, AP-HP

9, avenue Charles de Gaulle

92104 Boulogne-Billancourt, France

Phone: 33 1 49 09 55 85

e-mail: rcoscas@gmail.com

ABSTRACT

Background: There is now body of proof that adaptive immunity develops during abdominal aortic aneurysm (AAA) evolution. Uncertainties remain regarding antigens implicated and their role in inducing rupture. Since antigens from the extracellular matrix (ECM) have been suspected, aim of this experimental work was to characterize the role of adaptive immunity directed against antigens from the aortic ECM.

Methods: During a first step, an experimental model of AAA rupture based on adaptive immunity against the ECM was developed and characterized. Forty 4-weeks Lewis rats were divided in two groups. In the “ECM” group (n=20), rats were presensitized against the guinea pig aortic ECM before a decellularized aortic xenograft (DAX) implantation. In the “Control” group (n=20), rats were not presensitized before the DAX implantation. In each group, half rats were sacrificed at day 3 to analyse early mechanisms involved following DAX implantation. During a second step, we aimed to assess which ECM compound was the more susceptible to induce rupture. For this purpose, the non-fibrillar and fibrillar compounds of the ECM were sequentially extracted from the guinea pig arterial wall. Forty Lewis rats were then divided in four groups. Each group was presensitized against one ECM compound (structural glycoproteins and proteoglycans, collagen, elastin alone and glycoproteins associated to elastin) before DAX implantation. Apart from those who experienced rupture, rats were sacrificed at day 21. Xenografts were harvested for histological, immunofluorescence and conditioned media analysis.

Results: In total, early aortic rupture occurred in 80% cases in the « ECM » group versus 0% in the « Control » group ($p<0,001$). In the « ECM » group, major circumferential immunoglobulin deposits were observed in combination with C3 complement fraction, without cell infiltration. Conditioned media analysis revealed that MatrixMetalloproteinase-9, Myeloperoxidase levels and Elastase activities were significantly increased in this group, highlighting neutrophils activation. Following differential presensitization, it appeared that rats presensitized against structural glycoproteins and proteoglycans were significantly more susceptible to experience rupture following DAX implantation.

Conclusion: Stimulating adaptive immunity against the aortic ECM, especially structural glycoproteins and proteoglycans, triggers rupture following DAX implantation. Further studies are needed to assess the precise proteins involved.

MANUSCRIPT

INTRODUCTION

The pathogenesis of Abdominal Aortic Aneurysms (AAA) is complex but characterized by a destructive remodeling of the extracellular matrix (ECM) due to an excessive proteolytic activity (1). Precise mechanisms leading to ECM proteolysis and subsequent arterial rupture remain to be completely understood (2). Secretion of collagenases, other Matrixmetalloproteinases (MMPs) and elastase (3, 4) by abnormal leukocytes activation (5) in the setting of innate or adaptive immunity (6, 7) represents one of the implicated mechanisms. While cell-mediated innate and adaptive immunity involving neutrophils (3), phagocytes (8), T lymphocytes (especially CD4+) (9) and mast cells (10) has been well explored these last years, the role of humoral adaptive immunity remains less clear (11). In fact, tissue infiltrating mononuclear (12), polynuclear cells (13), systemic and local antibodies leading to complement activation (14, 15) may all play a role.

Observations of lymphoid follicles containing dendritic cells (11) and activated endothelium in AAAs (16), namely ATLOs (Adventitial Tertiary Lymphoid Organs), highlight a possible adventitial lymphoid neogenesis in response to one or several neo-antigens (17) with subsequent immunoglobulin production (18). Inflammatory cell retention and lymphoid neogenesis are linked to capillary development in the adventitia in AAA (19). Since physiological extracellular signaling in the aortic wall mainly occurs by orthogonal hydraulic conductance from the lumen to the adventitia (20), neo-antigens involved in AAAs may originate from the intraluminal thrombus or the degraded ECM (1, 21). Therefore, aim of this experimental work was to explore and characterize the role of adaptive immunity directed against xeno-antigens from the ECM in an experimental model in rats, in order to try to define the nature of the potential antigens generated by the ECM in AAAs.

METHODS

Experiments were divided in two steps. During the first step, an experimental model of AAA rupture based on adaptive immunity against the ECM was developed. During a second step, we used this model to precise which ECM antigens were the most susceptible to be involved in rupture.

Presensitization against the aortic xenograft extracellular matrix

This first step consisted in developing an experimental model of AAA rupture based on auto-immunity against the ECM.

Experimental approach

Forty 4-weeks Lewis rats were divided in two groups. The first group (“ECM” group; n = 20) was presensitized against the guinea pig extracellular matrix prior to a decellularized aortic xenograft (DAX) implantation while the second group (“Control” group; n = 20) was not presensitized.

Presensitization

The thoracic aorta from 10 guinea pigs was harvested following sacrifice. Thoracic explants were decellularized using SDS 0.1% during 48 hours at 37° C. Aortas were then rinsed during 72 hours with PBS at 37° C under agitation.

Thoracic aortas were cryopreserved in liquid nitrogen at -80° C. Before use, aortas were pulverized and the subsequent aortic powder was diluted in a PBS solution.

Rats from the “ECM” group were immunized using a standard protocol of 3 intraperitoneal injections at day 0, 15 and 21, with 200 µg, 400 µg and 800 µg of aortic powder, respectively. Complete Freund’s adjuvant was added to aortic powder in PBS (1:1) for the first injection; incomplete Freund’s adjuvant was used for the second and the third injections.

Rats from the “Control” group received intraperitoneal injections of complete Freund’s adjuvant on day 0 and incomplete Freund’s adjuvant on day 15 and day 21, without aortic powder.

Blood samples were obtained from all rats through jugular vein catheterization one week (day 28) after the third injection and before DAX implantation.

Xenograft implantation

Guinea pig DAX were implanted in both groups as previously described (22, 23) in infrarenal aortic position, one week after the third injection (day 28). In each group, 10 rats were sacrificed three days after DAX implantation whereas the 10 other rats were sacrificed three weeks later. Sacrifices were performed using an intraperitoneal injection of pentobarbital. In case of earlier rupture, the aorta was harvested.

Apart from the rats that died before sacrifice from rupture, plasmas and aortas were harvested for further analysis. The aneurysmal wall was fixed in paraformaldehyde (3.7%) for histology or incubated to obtain conditioned medium. To do so, pieces of aorta were weighed and incubated for 24 h in serum-free RPMI culture medium containing 1% L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin (1mL per gram of tissue) at 37 °C (5% CO₂). Conditioned medium from control and AAA aorta of rats were collected and stored at - 80°C until further analysis.

Histology and Immunohistochemistry

Aortas were fixed in paraformaldehyde (3.7%), embedded in paraffin, and sectioned at 6 mm.

The sections were deparaffinized in toluene and hydrated in a graded series of ethanol before staining. Masson trichrome, Alizarin red, Orcein and Sirius red stains were performed on aortic sections. Mouse anti-rat monoclonal antibodies were used to detect antigens: ED1-CD68 for monocytes and macrophages, CD4 for T lymphocytes CD4+, monocytes and macrophages, CD8 for T lymphocytes CD8+, RECA-1 for endothelial cells and STAR 72 for immunoglobulins G (IgG) (AbD serotec, France). Control sections were generated by omission of the primary antibody and with a naive primary antibody.

Immunofluorescence

Slides were deparaffinized, rehydrated and incubated in universal antigen retrieval reagent (R&D, CTS015) 3x5min in a microwave. After blocking in 5% Bovine Albumine Serum (BSA, Jackson ImmunoResearch, 001-000-162), 0.1% fish gelatin (Sigma), 100mM glycine (VWR), primary antibodies (rabbit anti human CD3 1/50, dako A0452 ; mouse anti rat CD19 1/33, R&D MAB7489 ; biotinylated rabbit anti rat Immunoglobulins 1/200, dako E0468) diluted in 2.5% BSA, 0.05% fish gelatin were then added on cross-sections overnight at 4°C.

Following 2x5min washes, secondary antibodies and streptavidin diluted in the same buffer were added for 1h at RT (streptavidin-A647 1/1000, Life Technologies ; anti rat IgM-Rhod 1/200, Jackson ImmunoResearch; anti rat IgG-A488 1/400, Jackson ImmunoResearch ; anti-rabbit-DyLight649 1/400, Jackson ImmunoResearch; anti mouse-Rhodamine 1/200, Jackson ImmunoResearch).

After 3 washes, nuclei were stained with Hoechst 33342 1/1000 (Molecular Probes) and slides were cover-mounted with prolong gold antifade reagent (Life Technologies). The fluorescence was detected with a Zeiss Axio Observer.Z1 microscope equipped with an ORCA-R2 C10600 digital CCD camera (Hamamatsu) and analyzed with the Zen 2012 image capture software (Zeiss).

Anti-ECM antibodies detection

Serums were centrifugated and an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to evaluate the degree of immunization against the guinea pig ECM. Coating was performed with 50 µl of guinea pig aortic powder solution (20 µg/mL) hydrolyzed by elastase in 96-well plates for 1 hour at 37°C. After washing in PBS 0.1 % Tween-20 (PBS-T), a 3% BSA solution was used as a blocking agent to prevent non-specific binding to the well. Seven serum dilutions (1/10 to 1/7290) were incubated in the ECM coated wells (2 hours, 37°C). After washing, the polyclonal rabbit anti-rat immunoglobulins labeled with horseradish peroxidase (HRP, 1/3500, Southern Biotech, Birmingham, USA) was added for 1 hour at

37°C. The HRP enzymatic activity was revealed using TMB (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and optical density (OD) was read at 450 nm.

MMP-9, MMP-2 and Elastase Activity

MMP-9, MMP-2 activity and elastase activity in control and AAA conditioned media of rats were performed by gelatin zymography. Briefly, 15µl Samples were separated electrophoretically onto sodium dodecyl sulfate_10% polyacrylamide gels containing 1 mg/ml of type 1 gelatin (for MMP activity) or both 1 mg/ml of type 1 gelatin and fucoidan (for elastase activity) under nonreducing conditions. After electrophoresis, the gels were rinsed in a 2.5% Triton X-100 solution (2 x 30 min) to remove the SDS, followed by incubation in the developing buffer for 20 hours at 37 °C, containing 50 mM Tris, 150mM NaCl and 10mM Ca²⁺. After staining with Coomassie Blue R-250 and destaining with 10 % methanol/ 5 % acetic acid, activity was evident by clear bands against a dark blue background. The gels were then scanned and the intensity of each band was quantified by gel densitometry using ImageJ v.1.46 software. The results were expressed as peak area, corresponding the degree to which the gelatin in the gel had been degraded (area of enzyme digestion) and percentage of active MMPs [active form/(active form + proform)].

MPO Activity

The concentration of MPO secondary to neutrophils activation in control and AAA conditioned media was determined with the rat MPO enzyme-linked immunosorbent assay kit from Hycult Biotechnology (Uden, The Netherlands).

Differential molecular targeting against aortic xenograft extracellular matrix components

In a second step, we aimed to assess which ECM component was more precisely involved in aortic rupture. For this purpose, the non-fibrillar and fibrillar compounds of the ECM were sequentially extracted from the guinea pig arterial wall and used to presensitize rats before DAX implantation.

Experimental approach

Forty 4-weeks Lewis rats were divided in 4 groups of 10 rats and presensitized against ECM structural glycoproteins and proteoglycans (“Struct-GP” group, n=10), collagen (“Col” group, n=10), elastin alone (“Ela” group, n=10) and glycoproteins associated to elastin (“Ela-GP” group, n=10).

Differential presensitization against aortic xenograft extracellular matrix components

This process is summarized in supplemental Figure 1. The thoracic aorta from 30 Guinea Pigs was harvested and decellularized as described above. Aortas were then rinsed five times in an

isotonic saline solution with gentle agitation. Lipids were extracted from the decellularized aortas by incubation in chloroform / methanol (2/1) at +4°C during 16 hours.

Twenty delipidated decellularized aortas were then extracted with 5M guanidium chloride in 0.1M Tris-HCl, pH 7.5 (+4°C, 3x24 hours under agitation). The guanidium extracts were exhaustively dialyzed against distilled water and lyophilized. The resulting extract mainly contained structural glycoproteins and proteoglycans. After washing with water, collagen of the residual insoluble material was solubilized with collagenase (1% of *Clostridium histolyticum* collagenase CLSPA 5905 U/mg, Worthington) in 0.1M Tris-HCl, pH 7.0, 0.01M CaCl₂, 0.02% NaN₃ (two incubations at +37°C during 24 hours). The supernatants that contain collagen fragments were discarded. The remaining insoluble material contains elastic fibers, that is elastin and associated microfibrillar glycoproteins. The elastin-associated glycoproteins were extracted in 5M guanidium chloride, 0.05 M DTT in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5 (+4°C, 3x24 hours under agitation). The remaining insoluble material, elastin, was washed in water prior to drying.

Ten other delipidated decellularized aortas were used for ECM collagen extraction. These aortas were extracted with 0.5M acetic acid (+4°C, 24 hours). The residue was then treated with pepsin (1% pepsin A, 2950 U/mg, Worthington biochemical corporation, in 0.5M acetic acid, 24 hours at +4°C). The solution containing pepsin-solubilized collagen was neutralized before centrifugation. The collagen was then precipitated by addition of an isotonic saline solution to the supernatant until reaching the final concentration of 1.2M. After centrifugation, the precipitated collagen was solubilized in 0.5M acetic acid previously to a second precipitation with 1.2M of an isotonic saline solution. The collagen was then solubilized in acetic acid 0.5M before dialysis against distilled water.

Presensitization

Rats from the “ECM” group were immunized using a standard protocol of 3 intraperitoneal injections at day 0, 15 and 21, with 200 µg, 400 µg and 800 µg of antigen in suspension in 0.5 mL of NaCl 0.15M emulsified in 0.5 mL of adjuvant (complete Freund’s adjuvant for the first injection and incomplete Freund’s adjuvant for the second and the third injections).

Effectiveness of immunization and xenograft implantation

Blood samples were obtained from all rats through jugular vein puncture one week (day 28) after the third injection and before DAX implantation. Guinea pigs aortic DAXs were implanted in infrarenal aortic position in the four groups as described above, one week after the third injection (day 28). Rats were sacrificed three weeks later using an intraperitoneal injection of pentobarbital. In case of earlier rupture, the aorta was harvested.

Anti-ECM compounds antibodies detection

Serums were centrifugated and an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to evaluate the degree of immunization against the guinea pig extra-cellular matrix antigens. Microtater plates were coated with the aortic antigens (100µg:100 µl/well). Since the PG+GP antigen precipitates during dialysis, a fraction of the 5M guanidium extract was used for coating without dialysis. The insoluble elastin antigen was solubilized by elastase (1% of pancreatic elastase 3.5 UI/mg, Sigma, in 0.05 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.02% NaN₃ during 24 hours at 37°C under agitation). Sera were serially diluted (1/10 to 1/16000), incubated one hour at +37°C and hydrolyzed by elastase in 96-well plates for 1 hour at 37°C. After washing in PBS 0.1 % Tween-20 (PBS-T), 3% Bovine Serum Albumin (BSA) was used as a blocking agent to prevent non-specific binding to the well. Seven serum dilutions were assessed by adding PBS to serums (1/10 to 1/7290). After washing, the polyclonal rabbit anti-rat immunoglobulins horseradish peroxidase (HRP, 1/3500, Southern Biotech, Birmingham, USA) was added for 1 hour at 37°C and served as secondary antibody. The HRP enzymatic activity was revealed using TMB (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and optical density (OD) was read at 450 nm.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the StatView software v5.0 (SAS Institute Inc, Cary, NC). Continuous variables were described as median with interquartile range, and categorical variables as number (%). Medians were compared using the Kruskal-Wallis (several groups) and the Mann-Whitney (two groups) tests, whereas percentages were compared with the Fisher's exact test. The Kaplan-Meier method was used to estimate rat survival and comparison were performed using the Log-rank test. A *p* value <0.05 was considered significant.

RESULTS

Presensitization against the aortic xenograft extracellular matrix

Presensitization effectiveness

In the presensitized group ("ECM" group), the anti-ECM antibody titer significantly increased after presensitization, from 5.17 (4.08-6.32) to 18.73 (11.98-22.78) (*p*<0.01). In contrast, no significant variation was observed in the "Control" group (4.83 (3.79-5.82) versus 5.29 (4.12-5.66) (*p*=0.43). Presensitization resulted in a significantly higher anti-ECM antibody titer before xenografting in presensitized rats compared to controls (*p*<0.01).

Aortic aneurysm rupture

Following DAX implantation, 8 rats (80%) died of DAX rupture in “ECM” group at the 7th postoperative day (range, 4-14) whereas no rupture (0%) was observed in the “Control” group (80% vs. 0%; $p=0.0007$; Figure 1). Upon sacrifice, the two presensitized rats from the “ECM” group who did not rupture were found to have an asymptomatic occluded DAX, with important aortic collaterality.

Histology and Immunohistochemistry

Immunohistological analysis demonstrated a substantial increase in IgG (STAR72 immunostaining) in the aortic media of the “ECM” group compared to the “Control” group three days after DAX implantation (Figure 2) suggesting binding of anti-ECM antibodies to DAXs. Early red blood cells adhesion to the aortic wall was noted in the “ECM” group whereas it was not in the “Control” group. Immunofluorescence study displayed a substantial increase in total immunoglobulins in the aortic wall of the “ECM” group compared to “Control” group (Figure 2). It also demonstrated diffuse C3 deposition in the aortic wall. In contrast, immunostaining using RECA-1, CD 68 ED-1, CD 8 and CD 4 did not differ between the two groups (data not shown).

MMP-9 and MMP-2 Activities

MMP-9 activity and the percentage of active MMP-9 were significantly higher in conditioned media of “ECM” group compared to the “Control” group (Figure 3). This difference was not significant in the plasmas. In contrast, there were no significant differences between the pro MMP-9, pro MMP-2, and the percentage of active MMP-2 activities in conditioned media of the two groups. No differences were found between these concentrations in the plasmas.

Elastase and MPO Activities

The elastase and MPO activities were significantly higher in conditioned media of the “ECM” group compared to the “Control” group (Figure 4) highlighting a more important neutrophils activation following xenografting in presensitized rats. No differences were found between these concentrations in the plasmas.

Complement fraction levels

The C3 fraction level was significantly higher in conditioned media of “early ECM” group compared to the “early Control” group (Figure 4). In contrast, C4 fraction levels were undetectable in both groups. Plasmatic concentrations of C3 and C4 did not differ before and after xenografting in each groups and when comparing both groups. Of note, C3 presence colocalized with IgG deposition (Figure 2).

Differential molecular targeting against aortic xenograft extracellular matrix components

Presensitization effectiveness

Before xenografting, it appears that each group displayed a different presensitization profile directed against the targeted ECM component (Figure 5). In particular, all groups appeared well presensitized against the targeted antigen, apart from the “Ela” group. In fact, we could not demonstrate any presensitization against the elastin in any group. Of note, the “Ela-GP” group also displayed some presensibilization against ECM structural glycoproteins and proteoglycans, and against the ECM collagen.

Aortic aneurysm enlargement, rupture and thrombosis

Following DAX implantation, we noted three possible evolutions at the aortic level: enlargement, rupture and thrombosis. Table 1 provides outcomes of each group 21 days following DAX implantation. Targeted presensitization against the ECM structural glycoproteins and proteoglycans in the “Struct-GP” group led to early AAA rupture between postoperative day 4 and day 14 in 70% cases. This rupture rate was significantly increased compared to the three other groups ($p=0.02$; $p=0.003$ and $p=0.04$ when compared with the “Col”, “Ela-GP” and the “Ela” groups, respectively). Presensitization against the ECM glycoproteins associated to elastin in the “Ela-GP” group or against collagen in the “Col” group mainly induced aortic thrombosis. Of note, these thromboses were all asymptomatic and only noted when sacrificing animals. Harvesting these DAXs we noted collateral network around the aorta, highlighting a progressive thrombosis onset. Finally, presensitization against elastin in the “Ela” group was more susceptible to induce large AAAs ($4.6\pm 0.9\text{mm}$ versus $2.1\pm 0.8\text{mm}$ in other groups) although this presensitization could not be demonstrated through ELISA assessment.

DISCUSSION

This experimental study demonstrates that stimulating adaptive immunity against some xenogenic ECM antigens can lead to aortic rupture. The aortic ECM can be considered as made of 4 main components: (1) proteoglycans and structural glycoproteins (mainly, fibronectin, laminin, thrombospondin, nidogen, tenascin and osteopontin) (2) collagens (mainly, collagen I and III but also IV, VI, XII and XIV) (3) glycoproteins associated to elastin in elastic fibers (mainly, fibrillins and microfibril-associated glycoprotein, MAGP) and

(4) elastin. Studying the immunogenicity of each of these four components separately, we conclude that (1) developing an adaptive immunity against proteoglycans and associated glycoproteins was more prone to trigger rupture, while (2) adaptive immunity against collagens or glycoproteins associated to elastin generally led to thrombosis, and (3) adaptive immunity against elastin allowed larger AAA without rupture, emphasizing the well-known function of elastin in aortic distensibility (24)

Most experimental AAA models are characterized by initial aortic dilatation followed by progressive aortic wall healing (25) with no evolution toward rupture. In particular, with the elastase-induced and the calcium chloride application models, cessation of the initial aortic stimulus leads to progressive loss of the inflammatory aortic component and colonization of the aneurysmal wall by mesenchymal cells. The DAX model is based on vascular smooth muscle cells suppression and interspecies ECM immunogenicity (22, 23). However, tolerance develops over time and AAA healing also occurs (25). In the present experiments, presensitization of Lewis rats against the Guinea Pig ECM, especially proteoglycans and associated glycoproteins, triggered rupture between postoperative day 4 and 14. Although such presensibilization has been previously used to examine the effects of anti-serine-protease (TIMP-1) (26), this report is the first to provide a thorough description of this model and the mechanisms involved. It renders it reproducible by other teams and provides a useful tool to examine and study therapies against aortic rupture.

Our observations allow us to build a hypothesis on the mechanisms leading to rupture with our model of presensitization against the Guinea pig ECM. Histological and biochemical analyses highlighted a potent implication of humoral immunity. Immunohistochemistry and immunofluorescence showed aortic immunoglobulins and C3 deposition following DAX implantation in presensitized rats. Conditioned media analysis demonstrated an important neutrophils activation in these rats, as underlined by increased elastase, MPO and MMP-9 activities. Therefore, we hypothesize that adaptive immunity is stimulated by presensitization against the Guinea pig ECM, leading to immunoglobulins synthesis by B-lymphocytes (Figure 1) (18). Following DAX implantation, immunoglobulins recognize the aortic ECM, probably through their Fab fragments (27) in a usual manner. Their Fc fragments activate complement system locally (18) (Figure 2) but may also bind neutrophils that directly phagocyte ECM (28). Complement deposition also participates to neutrophils recruitment and activation (29) as illustrated by increased elastase and MPO activities (Figure 4). Finally, active MMP-9 is degranulated by neutrophils (Figure 3) to degrade ECM and induce rupture.

This experimental study reinforces the possibility of the involvement of an autoimmune component directed against some ECM proteoglycans or associated glycoproteins in AAA rupture. Characterization of leukocytes (11), identification of immunoglobulins (30), specific cytokines and proteases (31) in AAA walls implicate activation of host innate and adaptive immune responses. Previous studies highlighted that these antigens may derive from the aortic ECM or from circulating blood components following degradation (20) or oxidation (32). An 80 kDa microfibrillar aortic wall protein and its derivatives have been previously described (14, 33). Homologies with tenascin, a structural glycoprotein involved in the regulation of cells-ECM interactions (34), have been noted (33). Further researches demonstrated that such 80kDa protein could in fact lead to production of “aortic aneurysm associated protein-40” (35), a protein that has homologies with fibrinogen, vitronectin, and bovine microfibril-associated glycoprotein-36. Of note, vitronectin is also an ECM structural glycoprotein (34). Antibodies binding fibrinogen (36) and carbonic anhydrase (37) have been further found in AAA walls. These elements converge with our results since we also found that adaptive immunity against ECM structural glycoproteins and proteoglycans can trigger rupture.

An unexpected finding of the present study was the occurrence of aortic thrombosis following presensitization against ECM collagens, but also glycoproteins associated to elastin. Collagen is known to be thrombogenic by itself since it induces platelet activation (38) but to our knowledge antibodies against the aortic ECM collagen have not been linked to thrombosis. In fact, antibodies against type IV collagens have been implicated in autoimmune pancreatitis and diabetic vascular complications, with observations of obliterative vasculitis (39). Type I and III fibrillar collagens predominate in the aortic ECM but type IV collagen is also present as a non-fibrillar collagen (34). Whether presensitization against aortic ECM collagens lead to thrombosis via antibodies directed against type IV collagen remains to be elucidated in further study.

The high rate of thrombosis in the group presensitized against glycoproteins associated to elastin also remains to be elucidated. One could have expected a high rate of rupture in this group since a deficiency in fibrillin, a protein that is generally associated to elastin, is implicated in Marfan syndrome with a high incidence of aortic dissection and rupture (40). We noted a similar immunity against collagens in this group (Figure 5) compared to the “Col” group. Of note, the “Struct-GP” group also displayed some immunity against collagens (Figure 5). Since non-fibrillar aortic collagens (type IV, VI, XII and XIV) are less insoluble than fibrillar collagens (type I and III) (34), we cannot exclude that guanidium chloride

extraction led to non-fibrillar aortic collagen content in supernatants used to prepare structural glycoproteins and proteoglycans, and glycoproteins associated to elastin (Supplemental Figure 1).

No group, even the “Ela” group, was found to display a substantial immunity against elastin following presensitization by ELISA assessment (Figure 5). There may be several explanations for these findings. First, in contrast to other ECM proteins (including collagens), elastin is not glycosylated. Therefore, its immunogenicity power may be weak. Second, elastin is totally insoluble (34). This may render immunization against this ECM component and/or assessment of immunization against elastin more challenging than for other components. Treatment of elastin with elastase before its use may be beneficial in such settings.

We here highlight the possible involvement of an autoimmune humoral component in aortic rupture. However, assumption that rupture is directly related to the humoral component requires more investigations. In the future, passive transfer of presensitized Lewis rats sera to non presensitized Lewis rats who received a DAX implantation, or inhibition of B-lymphocytes in presensitized and non presensitized rats may represent study designs to answer such questions. Also, precise antigens implicated in different outcomes remain to be determined. Until these experiments are performed, this study describes a reproducible model of aortic rupture based on adaptive immunity that may be used in further studies.

CONCLUSION

Stimulating adaptive immunity against the aortic ECM, especially structural glycoproteins and proteoglycans, triggers rupture following DAX implantation. Further studies are needed to assess the precise proteins involved.

Financial support: Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Fondation Cœur et Artère

Author contributions: Conception and Design: RC, MPJ, JBM; Experimentation: RC, SD, SM, LL, HE, MM, MPJ, JBM. Data interpretation: RC, SM, GC, ZM, MPJ, JBM; Writing the article: RC, SM, MPJ, JBM; Critical revision of the article: RC, SM, HE, GC, ZM, MPJ, JBM; Statistical Analysis: RC, SD, MPJ; Final Approval: RC, SD, SM, LL, HE, MM, GC, ZM, MPJ, JBM.

Acknowledgments: The authors thank Mary Pellegrin for providing English editing.

REFERENCES

1. Michel JB, Martin-Ventura JL, Egido J, Sakalihasan N, Treska V, Lindholt J, et al. Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans. *Cardiovasc Res.* 2011;90(1):18-27.
2. Nordon IM, Hinchliffe RJ, Loftus IM, Thompson MM. Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol.* 2011;8(2):92-102.
3. Fontaine V, Touat Z, Mtairag el M, Vranckx R, Louedec L, Houard X, et al. Role of leukocyte elastase in preventing cellular re-colonization of the mural thrombus. *Am J Pathol.* 2004;164(6):2077-87.
4. Fontaine V, Jacob MP, Houard X, Rossignol P, Plissonnier D, Angles-Cano E, et al. Involvement of the mural thrombus as a site of protease release and activation in human aortic aneurysms. *Am J Pathol.* 2002;161(5):1701-10.
5. Dale MA, Ruhlman MK, Baxter BT. Inflammatory cell phenotypes in AAAs: their role and potential as targets for therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(8):1746-55.
6. Lu S, White JV, Lin WL, Zhang X, Solomides C, Evans K, et al. Aneurysmal lesions of patients with abdominal aortic aneurysm contain clonally expanded T cells. *J Immunol.* 2014;192(10):4897-912.
7. Caligiuri G, Rossignol P, Julia P, Groyer E, Mouradian D, Urbain D, et al. Reduced immunoregulatory CD31+ T cells in patients with atherosclerotic abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(3):618-23.
8. Potteaux S, Tedgui A. Monocytes, Macrophages and Other Inflammatory Mediators of Abdominal Aortic Aneurysm. *Curr Pharm Des.* 2015;21(28):4007-15.
9. Kroon AM, Taanman JW. Clonal expansion of T cells in abdominal aortic aneurysm: a role for doxycycline as drug of choice? *Int J Mol Sci.* 2015;16(5):11178-95.

10. Swedenborg J, Mayranpaa MI, Kovanen PT. Mast cells: important players in the orchestrated pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(4):734-40.
11. Koch AE, Haines GK, Rizzo RJ, Radosevich JA, Pope RM, Robinson PG, et al. Human abdominal aortic aneurysms. Immunophenotypic analysis suggesting an immune-mediated response. *Am J Pathol.* 1990;137(5):1199-213.
12. Beckman EN. Plasma cell infiltrates in atherosclerotic abdominal aortic aneurysms. *Am J Clin Pathol.* 1986;85(1):21-4.
13. Ait-Oufella H, Wang Y, Herbin O, Bourcier S, Potteaux S, Joffre J, et al. Natural regulatory T cells limit angiotensin II-induced aneurysm formation and rupture in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(10):2374-9.
14. Gregory AK, Yin NX, Capella J, Xia S, Newman KM, Tilson MD. Features of autoimmunity in the abdominal aortic aneurysm. *Arch Surg.* 1996;131(1):85-8.
15. Capella JF, Paik DC, Yin NX, Gervasoni JE, Tilson MD. Complement activation and subclassification of tissue immunoglobulin G in the abdominal aortic aneurysm. *J Surg Res.* 1996;65(1):31-3.
16. Holmes DR, Liao S, Parks WC, Thompson RW. Medial neovascularization in abdominal aortic aneurysms: a histopathologic marker of aneurysmal degeneration with pathophysiologic implications. *J Vasc Surg.* 1995;21(5):761-71; discussion 71-2.
17. Bobryshev YV, Lord RS. Vascular-associated lymphoid tissue (VALT) involvement in aortic aneurysm. *Atherosclerosis.* 2001;154(1):15-21.
18. Zhang L, Wang Y. B lymphocytes in abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis.* 2015;242(1):311-7.
19. Satta J, Soini Y, Mosorin M, Juvonen T. Angiogenesis is associated with mononuclear inflammatory cells in abdominal aortic aneurysms. *Ann Chir Gynaecol.* 1998;87(1):40-2.
20. Hance KA, Tataria M, Ziporin SJ, Lee JK, Thompson RW. Monocyte chemotactic activity in human abdominal aortic aneurysms: role of elastin degradation peptides and the 67-kD cell surface elastin receptor. *J Vasc Surg.* 2002;35(2):254-61.
21. Chang TW, Gracon AS, Murphy MP, Wilkes DS. Exploring autoimmunity in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015;309(5):H719-27.
22. Allaire E, Mandet C, Bruneval P, Bensenane S, Becquemin JP, Michel JB. Cell and extracellular matrix rejection in arterial concordant and discordant xenografts in the rat. *Transplantation.* 1996;62(6):794-803.

23. Allaire E, Guettier C, Bruneval P, Plissonnier D, Michel JB. Cell-free arterial grafts: morphologic characteristics of aortic isografts, allografts, and xenografts in rats. *J Vasc Surg.* 1994;19(3):446-56.
24. Dobrin PB, Schwarcz TH, Mrkvicka R. Longitudinal retractive force in pressurized dog and human arteries. *J Surg Res.* 1990;48(2):116-20.
25. Senemaud J, Caligiuri G, Etienne H, Delbosc S, Michel JB, Coscas R. Translational Relevance and Recent Advances of Animal Models of Abdominal Aortic Aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017.
26. Allaire E, Forough R, Clowes M, Starcher B, Clowes AW. Local overexpression of TIMP-1 prevents aortic aneurysm degeneration and rupture in a rat model. *J Clin Invest.* 1998;102(7):1413-20.
27. Ma H, O'Kennedy R. The Structure of Natural and Recombinant Antibodies. *Methods Mol Biol.* 2015;1348:7-11.
28. Futosi K, Fodor S, Mocsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol.* 2013;17(3):638-50.
29. Pagano MB, Zhou HF, Ennis TL, Wu X, Lambris JD, Atkinson JP, et al. Complement-dependent neutrophil recruitment is critical for the development of elastase-induced abdominal aortic aneurysm. *Circulation.* 2009;119(13):1805-13.
30. Brophy CM, Reilly JM, Smith GJ, Tilson MD. The role of inflammation in nonspecific abdominal aortic aneurysm disease. *Ann Vasc Surg.* 1991;5(3):229-33.
31. Qin Y, Cao X, Yang Y, Shi GP. Cysteine protease cathepsins and matrix metalloproteinases in the development of abdominal aortic aneurysms. *Future Cardiol.* 2013;9(1):89-103.
32. Burillo E, Jorge I, Martinez-Lopez D, Camafeita E, Blanco-Colio LM, Trevisan-Herraz M, et al. Quantitative HDL Proteomics Identifies Peroxiredoxin-6 as a Biomarker of Human Abdominal Aortic Aneurysm. *Sci Rep.* 2016;6:38477.
33. Chew DK, Knoetgen J, Xia S, Tilson MD. The role of a putative microfibrillar protein (80 kDa) in abdominal aortic aneurysm disease. *J Surg Res.* 2003;114(1):25-9.
34. Mecham RP. Overview of extracellular matrix. *Curr Protoc Cell Biol.* 2012;Chapter 10:Unit 10 1.
35. Xia S, Ozsvath K, Hirose H, Tilson MD. Partial amino acid sequence of a novel 40-kDa human aortic protein, with vitronectin-like, fibrinogen-like, and calcium binding domains: aortic aneurysm-associated protein-40 (AAAP-40) [human MAGP-3, proposed]. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;219(1):36-9.

36. Zhou HF, Yan H, Bertram P, Hu Y, Springer LE, Thompson RW, et al. Fibrinogen-specific antibody induces abdominal aortic aneurysm in mice through complement lectin pathway activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(46):E4335-44.
37. Ando T, Iizuka N, Sato T, Chikada M, Kurokawa MS, Arito M, et al. Autoantigenicity of carbonic anhydrase 1 in patients with abdominal aortic aneurysm, revealed by proteomic surveillance. *Hum Immunol*. 2013;74(7):852-7.
38. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(12):2341-9.
39. Liu QC, Dong F, Pan JF, Zhuang ZH, Gao F, Liu GZ, et al. Antibodies to Type IV Collagen Induce Type 1 Autoimmune Pancreatitis. *Inflammation*. 2016;39(2):592-600.
40. Jondeau G, Michel JB, Boileau C. The translational science of Marfan syndrome. *Heart*. 2011;97(15):1206-14.

Outcome	“Struct-GP” group (n = 10)	“Col” group (n = 10)	“Ela-GP” group (n = 10)	“Ela” group (n = 10)
Rupture	7 *	1	0	2
Aneurysm	1	1	1	5
Thrombosis	2	8 **	9 **	3

Table 1: Clinical outcomes of the four groups following differential presensitization against aortic xenograft extracellular matrix components. “Struct-GP” group indicates rats that were presensitized against structural glycoproteins and proteoglycans. “Col” group indicates rats that were presensitized against collagens. “Ela-GP” group indicates rats that were presensitized against glycoproteins associated to elastin. “Ela” group indicates rats that were presensitized against elastin. The “Struct-GP” group displayed significantly more ruptures whereas the “Col” and the “Ela-GP” groups displayed significantly more thrombosis compared to other groups. * indicates a statistically significant difference regarding this outcome (rupture) compared to other groups. ** indicates a statistically significant difference regarding this outcome (thrombosis) for the “Col” and the “Ela-GP” groups compared to the “Struct-GP” and the “Ela” group.

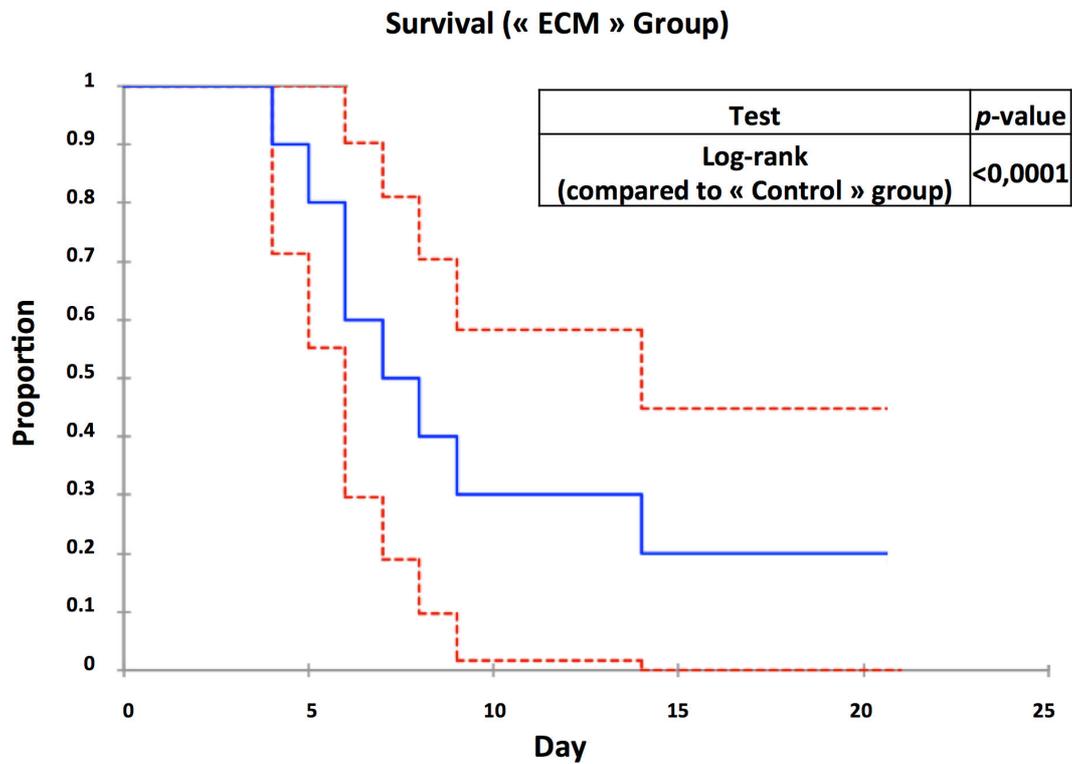


Figure 1: Survival curve of the rats from the “ECM” group. This curve includes the 10 rats from the “ECM” group that were planned to be sacrificed at day 21. Eight rats (80%) died between postoperative day 4 and 14. The two remaining rats were found to have an asymptomatic aortic thrombosis. In contrast, no rat died in the “Control” group.

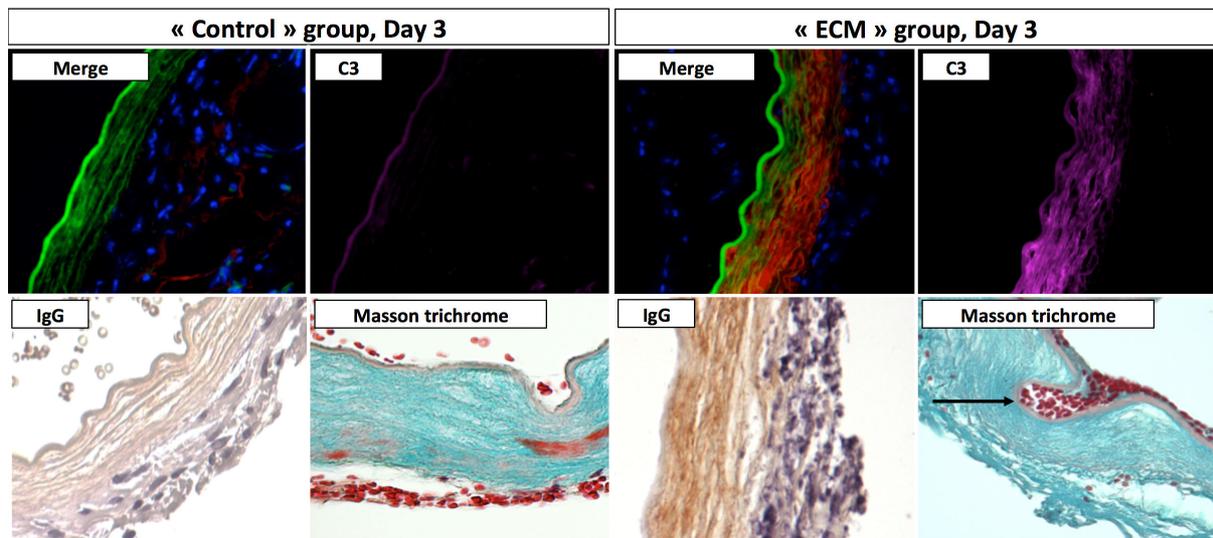


Figure 2: Histological and Immunofluorescence analysis of the aorta from rats that were sacrificed at day 3 (x20). Rats from the “ECM” group displayed diffuse immunoglobulin (immunofluorescence, in red), especially IgG (STAR72 immunostaining), and diffuse C3 depositions in their aortas (immunofluorescence, in violet). Important red blood cells adhesion to the aortic wall was noted on Masson trichrome. In contrast “Control” rats showed little immunoglobulin deposition and no C3 deposition in their aortic walls. No red blood cells adhesion was observed.

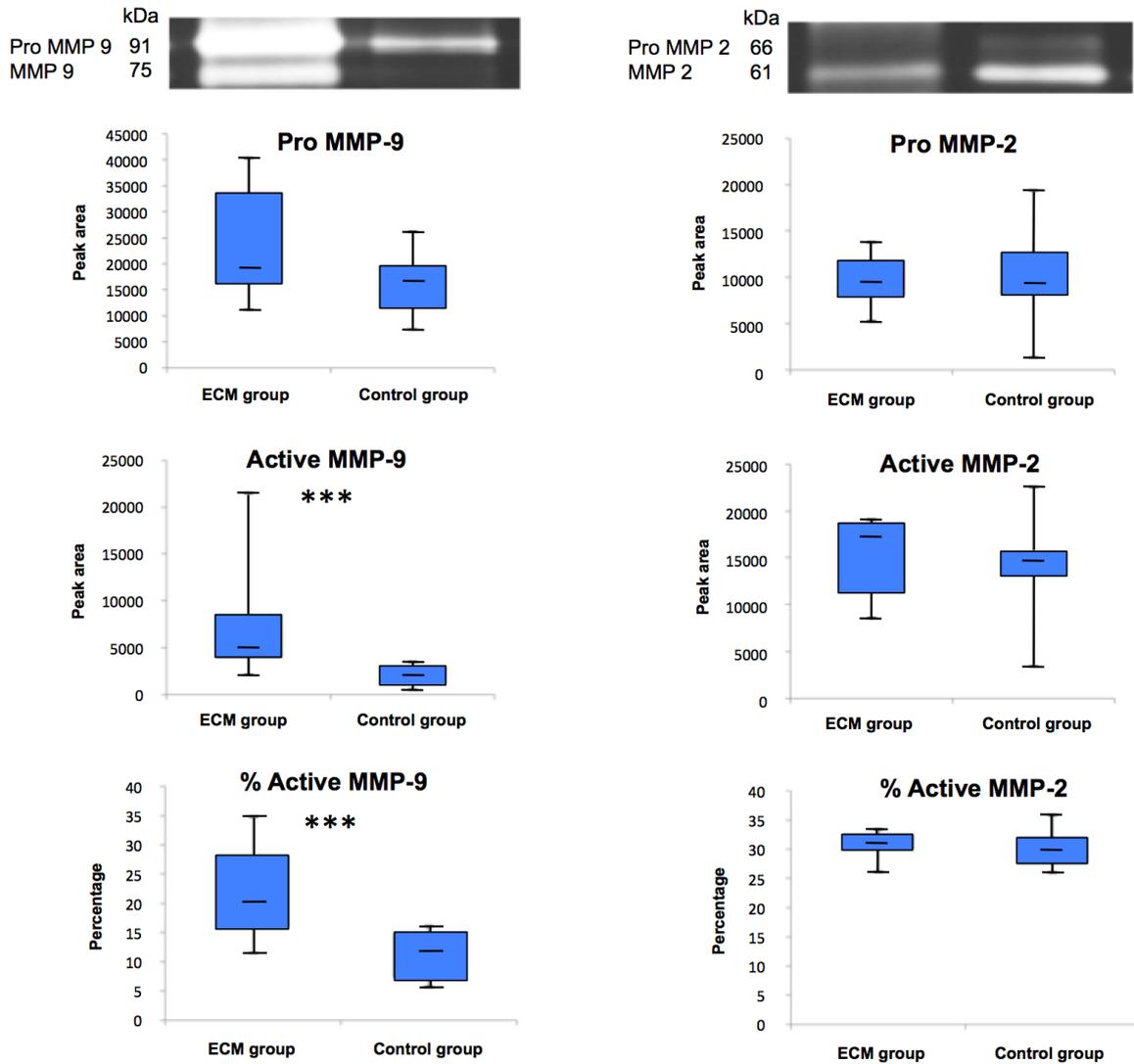


Figure 3: Comparison of MMP-2 and MMP-9 concentrations in conditioned media of the "ECM" and the "Control" groups. The level of active form of the MMP-9 appeared significantly higher in the ECM group. No differences were found regarding MMP-2 levels. *** indicates a statistically significant difference.

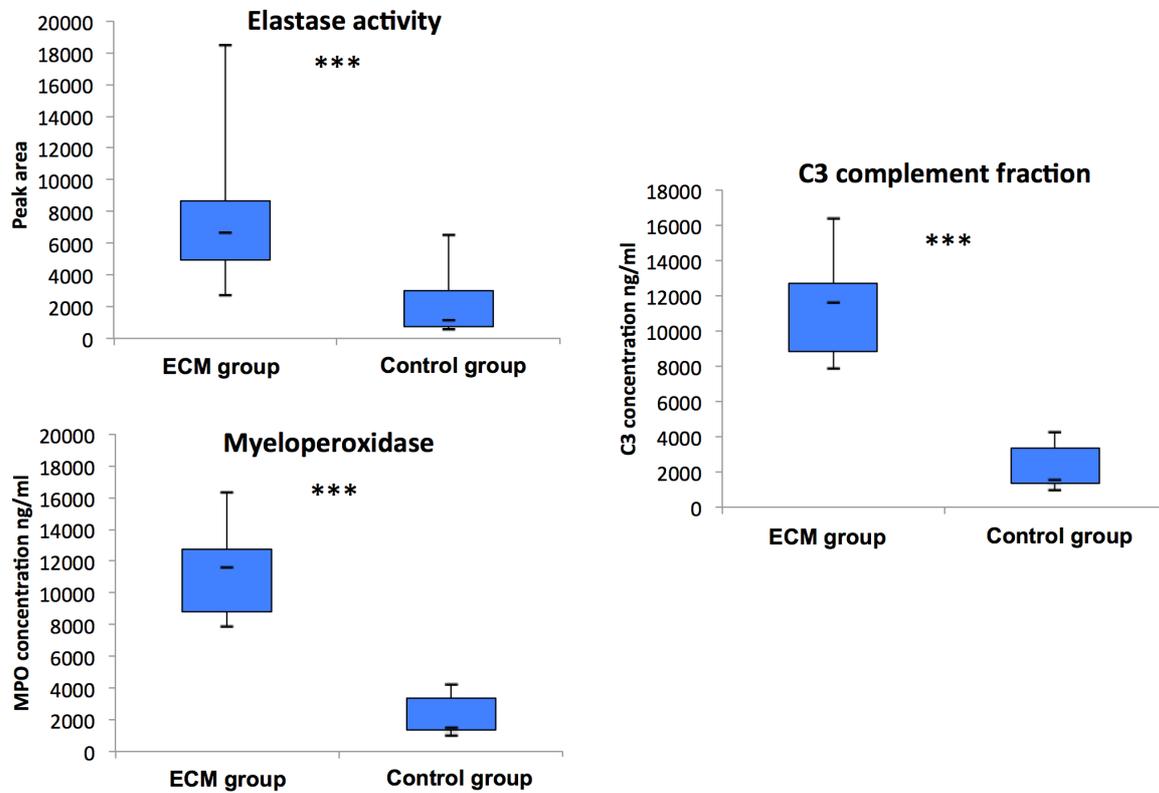


Figure 4: Comparison of Elastase activities, Myeloperoxidase (MPO) levels and C3 levels in conditioned media of the “ECM” and the “Control” groups. Elastase activities and MPO levels were significantly higher in the “ECM” group compared to the “Control” group, highlighting a higher degree of neutrophil activation. The C3 fraction from the complement system was significantly higher in the “ECM” group compared to the “Control” group. *** indicates a statistically significant difference.

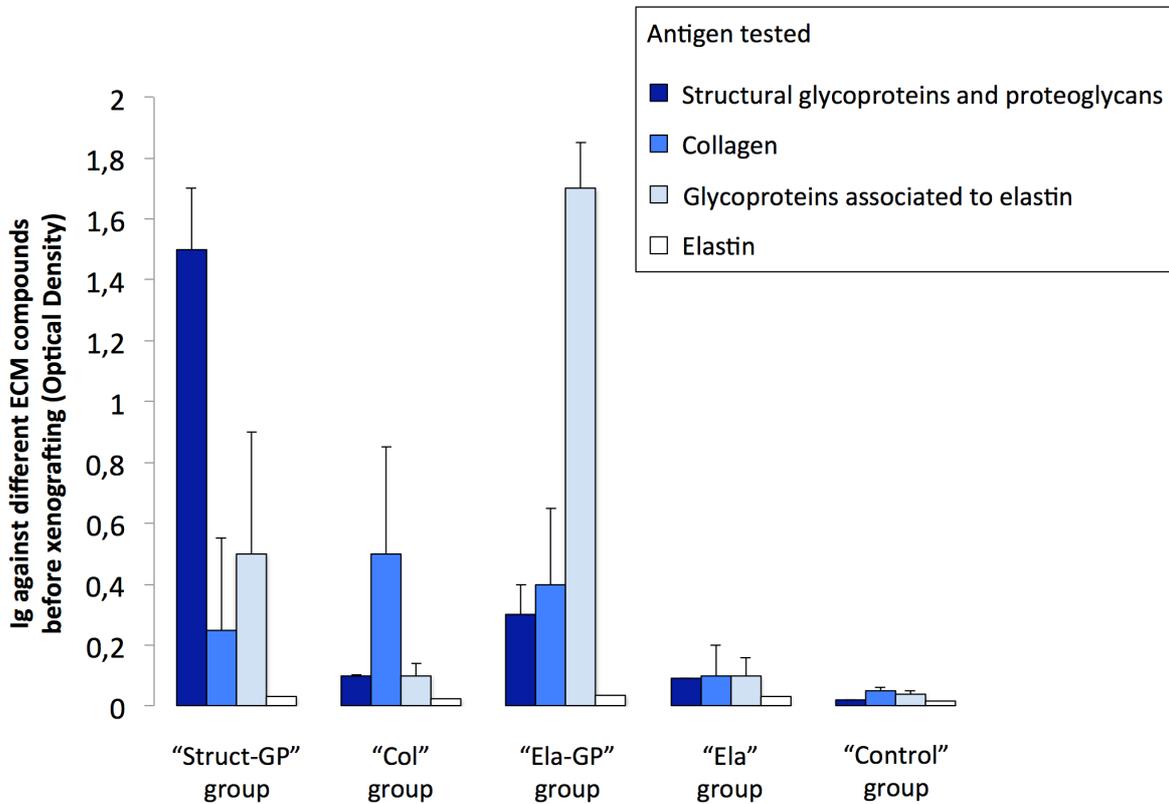
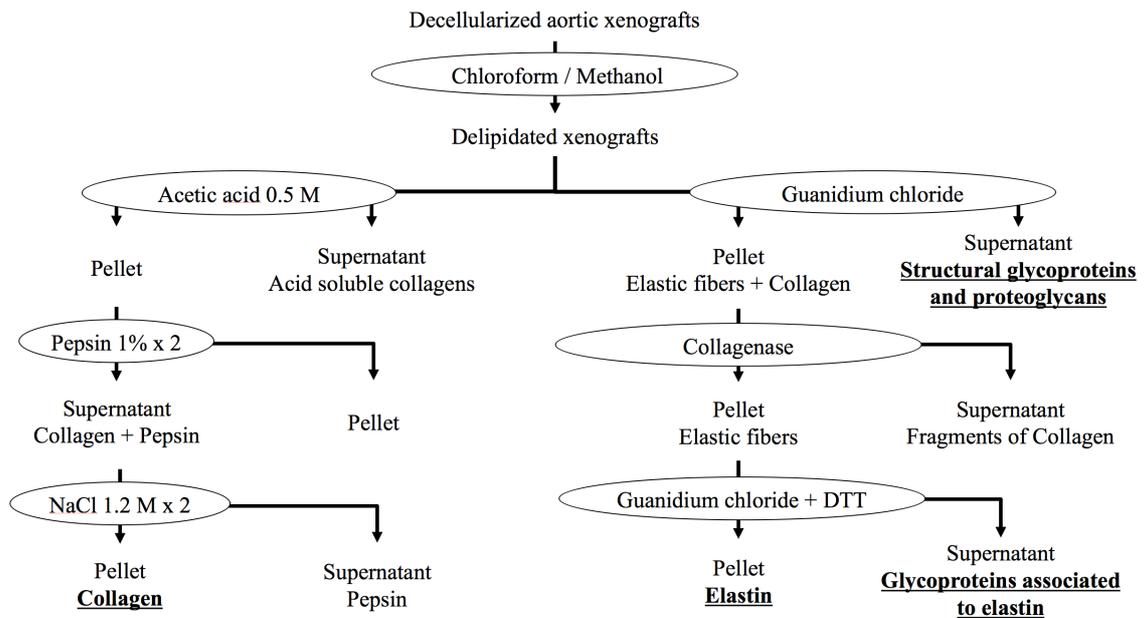


Figure 5: Immunization of the different groups of rats against the targeted antigens by ELISA. Apart from the “Ela” group, rats were mainly presensitized against targeted antigens. A certain degree of cross-reactivity between the groups is noted. For example, rats from the “Struct-GP” group display some immunity against glycoproteins associated to elastin and rats from the “Ela-GP” group display some immunity against structural glycoproteins and proteoglycans. Of note, rats from these two groups also display some immunity against the collagen.



Supplementary Material

Figure 1: Method used for differential extraction of the four main extracellular matrix components. Final components used for presensitization are indicated in bold. M: Molar. DTT: Dithiothreitol.

DISCUSSION
ET
CONCLUSION

DISCUSSION

Dans ce travail, nous utilisons les modèles expérimentaux murins d'AAA pour améliorer notre compréhension du remodelage vasculaire observé en pathologie humaine.

Notre travail bibliographique préliminaire mettait en évidence l'absence de trame physiopathologique claire dans le développement et la croissance des AAA. Si les AAA sont souvent présentés dans les ouvrages pédagogiques comme relevant d'un mécanisme essentiellement biomécanique, nous notions que d'autres mécanismes biologiques entrent en jeu à des degrés divers. Parmi ces mécanismes, trois nous semblent critiques : (1) la protéolyse matricielle médiale par des protéases, (2) le stress oxydant, notamment au sein du thrombus endoluminal, et (3) la réaction immune innée et adaptative, cette dernière prenant source dans l'adventice.

Notre revue de la littérature sur les modèles expérimentaux d'AAA soulignait l'absence de modèle expérimental « idéal », c'est à dire démontrant l'ensemble des caractéristiques des AAA humains. Dans notre opinion, ces caractéristiques sont (1) une atteinte préférentielle de l'aorte sous-rénale, (2) une croissance continue de l'AAA menant à la rupture, (3) un thrombus endoluminal ayant un contact avec les éléments du sang circulant, (4) des phénomènes d'athérosclérose dont des calcifications, (5) une protéolyse médiale et (6) un infiltrat inflammatoire leucocytaire dans la paroi. En fait, chaque modèle permet d'étudier préférentiellement un ou deux des mécanismes physiopathologiques mis en cause. Cela devrait être perçu comme un avantage sur le plan de la compréhension physiopathologique des AAA. En effet, chaque modèle permet de d'étudier de manière plutôt « pure » un mécanisme d'intérêt. C'est ainsi que nous décidions d'utiliser le modèle de xéno greffe aortique décellularisée pour étudier les mécanismes pouvant conduire à la rupture suite à

l'activation de l'immunité adaptative des AAA. En effet, ce modèle est basé sur le rejet chronique des composants matriciels sur à la xéno greffe décellularisée.

Egalement, c'est après la constatation de calcifications importantes après injections de *Porphyromonas Gingivalis* dans les modèles d'AAA par perfusion d'élastase et de xéno greffes aortiques décellularisées, que nous notions une co-localisation des calcifications avec des dépôts d'ADN libre (217, 240). Si nous avons par la suite utilisé des modèles de perfusion intra-aortique d'ADN libre et d'élastase associés à un régime pro-calcifiant pour étudier les calcifications anévrysmales expérimentales, une étude complémentaire sur le modèle d'AAA au chlorure de calcium pourrait être d'intérêt car il s'agit d'un modèle basé sur les interactions du calcium avec l'élastine (381). Ce point pourrait faire l'objet d'études futures.

L'étude des calcifications et de leur co-localisation avec l'ADN libre présentait certaines difficultés. Les plus grandes étaient liées à l'étude histologique de tissus calcifiés. En effet, la section de tissus calcifiés rendait difficile l'obtention de coupes sériées parfaitement nettes et planes pour l'histologie. Egalement, l'existence de calcifications nuisait à l'étude de l'arrière-plan des calcifications et notamment au démasquage de l'ADN libre associé. Cela était particulièrement vrai pour l'étude en immunomarquage de l'ADN ainsi que pour le Hoechst en fluorescence. Pour cette raison, nous avons utilisé l'EDTA, un chélateur des cations, afin d'éliminer le plan calcifié et analyser au mieux l'ADN libre en arrière plan. Cette stratégie originale s'est avérée efficace et pourrait être utilisée dans de nouvelles analyses sur tissus calcifiés.

Nos expérimentations plus récentes révélaient qu'il était possible d'induire des AAA calcifiés en alimentant des rats Wistar avec un régime pro-calcifiant en péri-opératoire d'une perfusion d'élastase. Avec ce modèle, nous retrouvions aussi une

co-localisation des calcifications avec l'ADN libre. D'intérêt, les calcifications étaient quasi-exclusivement présentes dans le segment qui avait reçu une perfusion d'élastase. Ceci pourrait être lié à une mise à nu des fibres d'élastine suite à la perfusion d'élastase, sachant qu'il existe une forte affinité entre élastine et calcium (382). Egalement, la perfusion d'élastase a pu causer la mort des CMLv et le déversement de leur contenu intracellulaire, notamment l'ADN libre, dans la paroi aortique et faciliter ainsi la précipitation du calcium administré par régime avec le phosphate issu de l'ADN libre.

Dans ce même modèle, nous notons des AAA significativement moins larges dans le groupe calcifié en comparaison au groupe témoin. Ces données sont en accord avec certaines données de la littérature concernant les calcifications dans les AAA humains (372, 373), mais pas d'autres (374, 375). Nous notons par ailleurs une augmentation significative de certains paramètres d'activation neutrophilaire (MMP-9, MPO) dans ce groupe en comparaison au groupe témoin. Ceci dit, il faut noter que la MMP-9 n'est sécrétée exclusivement par les neutrophiles (163). Ces données sont contradictoires avec de précédents résultats qui font état de plus larges AAA en cas d'activation neutrophilaire, et notamment de sécrétion de MMP-9 (165, 166). A l'inverse, plusieurs rapports font état d'une élévation des MMP, notamment de la MMP-9, mais aussi de la MPO cas de calcifications (388-392). Notre hypothèse est que les calcifications artérielles induisent dans leurs zones contiguës des hémorragies pariétales favorisant l'attraction neutrophilaire. Ceci est évoqué par l'autofluorescence de l'hémoglobine retrouvée dans la périphérie des calcifications (Figure 11) ainsi que par la positivité de la coloration de Perls. Toutefois, l'immunomarquage des neutrophiles, en attente, est indispensable pour confirmer cette théorie. Egalement, l'expression des MMPs pourrait faciliter la transition

ostéoblastique des CMLv et activer certaines voies de signalisation propices aux calcifications (comme *Wnt* et la BMP-2) (388-390). Ces éléments relativisent quelque peu la pertinence des paramètres d'évaluation de l'activation neutrophilaire suscités dans les AAA puisque ces paramètres s'élèvent dans d'autres circonstances athéromateuses non anévrysmales (388-392). Des investigations complémentaires sont donc nécessaires pour comprendre les mécanismes précis mis en jeu dans ce modèle. La calcification est un phénomène vasculaire ambigu cause et/ou conséquence d'une activation neutrophilaire locale mais également possédant des effets stabilisateurs sur la paroi artérielle, notamment anévrysmale.

Enfin, nous investiguons l'immunogénicité de xéno-antigènes de la MEC dans l'induction de la rupture d'AAA en nous basant sur le modèle de xéno greffe aortique décellularisée. L'utilisation de la MEC comme antigène pour immunisation posait des problèmes importants liés au caractère insoluble de la MEC (33). Il était donc initialement extrêmement difficile de répartir la MEC de manière homogène et obtenir des doses fiables. C'est pourquoi nous congelions les aortes décellularisées dans l'azote liquide à -80°C pour ensuite les pulvériser. Ceci permettait de les diluer dans une solution de PBS avant d'homogénéiser la solution globale. Egalement, la démonstration de l'immunisation posait des problèmes techniques. Lors de nos manipulations préliminaires (données non présentées), nos immunisations semblaient inefficaces en ELISA malgré des ruptures après xéno greffe. Notre explication était un « lavage » du coating lors des rinçages des plaques, lié au caractère insoluble de la MEC. Pour cette raison, dans les expérimentations, nous avons ensuite préalablement hydrolysé la MEC à l'élastase afin de permettre un coating homogène dans les plaques.

Nous démontrions que le renforcement de l'immunité adaptative contre les xéno-antigènes de la MEC, principalement les protéoglycanes et glycoprotéines de structure, conduisait à la rupture aortique. Certaines protéines des protéoglycanes et glycoprotéines de structure ont déjà été impliquées dans l'immunité adaptative des AAA (233, 271-273). De prochaines expérimentations utilisant notre modèle devraient s'attacher à déterminer plus précisément la ou les protéines impliquées.

Le fait que l'immunisation contre d'autres composants (comme le collagène) conduisait à la thrombose n'exclut pas leur rôle comme antigène cible de l'immunité adaptative conduisant à la rupture. En effet, il est par exemple bien connu que le collagène résiste à la rupture (393, 394). Le syndrome d'Ehlers Danlos de type IV (dit, « vasculaire »), conséquence d'une mutation du collagène de type III, en est un excellent exemple en pratique clinique (395). En sus des éléments évoqués dans l'article joint en Annexe à la partie 3, il est possible que l'état inflammatoire majeur après pré-sensibilisation ait conduit à une thrombose relativement rapide après xénogreffe, protégeant l'aorte contre la rupture.

En perspective, ce travail appelle l'étude du développement des AAA dans des situations pathologiques où la calcémie et/ou l'état d'inflammation sont modulés. L'insuffisance rénale chronique en représente un exemple. Il s'agit d'un facteur de risque cardiovasculaire majeur (396, 397), puissant contributeur au développement d'athérosclérose et de calcifications artérielles (398, 399). Mais il était aussi observé que la concentration tissulaire de MMP-2 était augmentée au sein du tissu aortique anévrysmal des patients atteints d'insuffisance rénale chronique (400), ce qui pourrait promouvoir la croissance des AAA. A l'inverse, les calcifications induites par l'IRC pourraient engendrer une stabilisation de la paroi aortique et réduire le risque d'AAA, comme illustré par notre modèle développé en Partie 2. Puisque

l'insuffisance rénale chronique présente des caractéristiques pouvant favoriser mais aussi freiner le développement des AAA. L'études modèles expérimentaux murins associant maladie rénale chronique (401) et AAA représente une perspective d'intérêt.

Ce travail nous permettait d'établir une théorie physiopathologique sur la formation et la croissance des AAA. Sur un terrain aortique appauvri en élastine (lié à l'âge, la localisation sous-rénale et éventuellement la génétique), une agression initiale généralement liée au tabac se produit au niveau de la paroi aortique. Celle-ci est indiscutablement aggravée par l'hémodynamique locale. Ceci génère une cascade d'évènements dont un stress oxydant et une réaction inflammatoire pariétale impliquant les neutrophiles. Ces éléments conduisent à une protéolyse matricielle majeure en lien avec la sécrétion de protéases. Cette protéolyse génère des peptides immunogènes reconnus par les lymphocytes T qui initient la réaction immunitaire adaptative et stimulent la création d'ATLO dans l'adventice. Le stress hémodynamique lié l'écoulement du sang entretient le mécanisme anévrysmal en favorisant la croissance de l'AAA par perte de la capacité de l'aorte à contenir la pression artérielle. La dilatation débute et l'AAA s'organise progressivement sur le plan spatial en lien avec les mécanismes de conduction axiale. La création du thrombus en lien avec les turbulences de flux et l'adhésion des éléments sanguins à la paroi artérielle altérée (globules rouges, plaquettes) participe à la dégradation des éléments circulants par des mécanismes d'oxydation et de protéolyse renforcés par l'activation des neutrophiles au sein du thrombus. Lors de ces phénomènes inflammatoires, la lyse cellulaire expose le contenu du noyau et notamment l'ADN libre dans le thrombus qui participe à la formation de calcifications dans les anévrysmes les plus actifs. La réaction fibrosante de l'adventice vient contrer les

mécanismes d'expansion et de rupture en renforçant la capacité de la paroi artérielle à résister à la pression systémique. Ce dernier élément pourrait expliquer pourquoi certains anévrysmes atteignent de très importants diamètres avant de rompre.

Les modèles expérimentaux actuels ont donc plusieurs avantages mais ils ne permettent pas de prendre en compte l'ensemble des mécanismes décrits ci-dessus.

Ces éléments participent entre autres de la critique de l'expérimentation animale à notre époque dans les pays occidentaux. Dans ce contexte, une autre direction de recherche pourrait être la détection précoce des AAAs spontanés chez certaines espèces animales concernées. Des AAAs spontanés ont été largement décrits chez la Dinde (402, 403). Elles présentent une hypertension artérielle et de l'athérome. Comme chez l'humain, la dilatation survient le plus souvent au niveau de l'aorte sous-rénale mais ces anévrysmes sont secondaires à une dissection aortique et de une dégénérescence cystique de la média. En ce sens, il existe probablement des similitudes physiopathologiques avec le modèle d'AAA par perfusion d'angiotensine II. Egalement, des AAAs spontanés ont été retrouvés chez certains mammifères. Un intérêt particulier devrait être donné aux primates non humains du fait de leurs similarités avec l'humain. Strickland et al. (404) rapportaient une série autopsique d'AAA disséquant, fusiformes et sacciformes chez 11 Singes-écureuils (*Saimiri Sciureus*) sur 730 (1,5%). Ils notaient que les AAAs fusiformes et sacciformes étaient uniquement retrouvés chez les singes qui recevaient un régime pro-athéromateux. Baer et al. (405) trouvaient des AAAs disséquants et sacciformes chez 22 singes de nuit (*Aotus spp*). Un peu plus éloigné de l'AAA humain, des dilatations de l'anneau aortique et des ruptures étaient également retrouvés chez les étalons dans le cadre d'une dégénérescence médiale (406). D'autres espèces présentaient encore des anévrysmes aortiques mais généralement thoraciques et/ou disséquants comme le

Chien (407), le Chat (408), le Poney (409), l'Autruche (410), le Coyote (411) et même la Panthère de Floride (412). En conséquence, des stratégies cliniques, biologiques et/ou d'imagerie permettant de diagnostiquer des AAAs spontanés chez l'animal pourraient représenter une perspective intéressante et une alternative aux modèles expérimentaux.

CONCLUSION

Les modèles expérimentaux permettent l'étude de plusieurs mécanismes impliqués dans la genèse, la croissance et la rupture des AAA. Le modèle d'AAA par perfusion aortique d'élastase et ses modifications nous permettaient de démontrer le rôle de l'ADN libre dans la constitution de calcifications anévrysmales. Toutefois, les calcifications ralentissaient la progression des AAA expérimentaux, peut être en renforçant la résistance de la paroi vasculaire. Les calcifications étaient associées à une activation locale des neutrophiles, peut-être en lien avec des hémorragies en périphérie des calcifications. Le modèle de xélogreffe aortique décellularisé permettait l'étude de l'immunité adaptative contre des antigènes matriciels modifiés. Il démontrait la possible induction de la rupture aortique suite à des dépôts d'immunoglobulines dirigés contre certains composants de la MEC entraînant l'activation des neutrophiles et du système du complément. Les modèles expérimentaux constituent donc des outils majeurs pour l'étude sélective des différents mécanismes impliqués dans le remodelage vasculaire en pathologie anévrysmale aortique.

REFERENCES

1. Dejana E, Corada M, Lampugnani MG. Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J.* 1995;9(10):910-8.
2. Dejana E, Tournier-Lasserre E, Weinstein BM. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev Cell.* 2009;16(2):209-21.
3. Schnittler HJ. Structural and functional aspects of intercellular junctions in vascular endothelium. *Basic Res Cardiol.* 1998;93 Suppl 3:30-9.
4. Fuh GM, Bensch K, Karasek MA, Kramer RH. Synthesis of basement membrane-specific macromolecules by cultured human microvascular endothelial cells isolated from skin of diabetic and nondiabetic subjects. *Microvasc Res.* 1986;32(3):359-70.
5. Oohira A, Wight TN, Bornstein P. Sulfated proteoglycans synthesized by vascular endothelial cells in culture. *J Biol Chem.* 1983;258(3):2014-21.
6. Jaffe EA, Mosher DF. Synthesis of fibronectin by cultured human endothelial cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1978;312:122-31.
7. Gospodarowicz D, Greenburg G, Foidart JM, Savion N. The production and localization of laminin in cultured vascular and corneal endothelial cells. *J Cell Physiol.* 1981;107(2):171-83.
8. Mecham RP, Madaras J, McDonald JA, Ryan U. Elastin production by cultured calf pulmonary artery endothelial cells. *J Cell Physiol.* 1983;116(3):282-8.
9. Jacob MP, Badier-Commander C, Fontaine V, Benazzoug Y, Feldman L, Michel JB. Extracellular matrix remodeling in the vascular wall. *Pathol Biol (Paris).* 2001;49(4):326-32.

10. Katoh Y, Periasamy M. Growth and differentiation of smooth muscle cells during vascular development. *Trends Cardiovasc Med*. 1996;6(3):100-6.
11. Wolinsky H, Glagov S. A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals. *Circ Res*. 1967;20(1):99-111.
12. K. AK. Etude de l'implication des cellules musculaires lisses vasculaires dans la distensibilité et le phénotype thrombotique dans des modèles murins Université de Lorraine; 2012.
13. Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1996;12:463-518.
14. Small JV, Gimona M. The cytoskeleton of the vertebrate smooth muscle cell. *Acta Physiol Scand*. 1998;164(4):341-8.
15. Reho JJ, Zheng X, Fisher SA. Smooth muscle contractile diversity in the control of regional circulations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014;306(2):H163-72.
16. Michel JB, De Roux N, Plissonnier D, Anidjar S, Salzmann JL, Levy B. Pathophysiological role of the vascular smooth muscle cell. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1990;16 Suppl 1:S4-11.
17. Llorens S, Jordan J, Nava E. The nitric oxide pathway in the cardiovascular system. *J Physiol Biochem*. 2002;58(3):179-88.
18. Kukovetz EM, Bratschitsch G, Hofer HP, Egger G, Schaur RJ. Influence of age on the release of reactive oxygen species by phagocytes as measured by a whole blood chemiluminescence assay. *Free Radic Biol Med*. 1997;22(3):433-8.
19. Lacolley P, Regnault V, Nicoletti A, Li Z, Michel JB. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc Res*. 2012;95(2):194-204.

20. Shaw A, Xu Q. Biomechanical stress-induced signaling in smooth muscle cells: an update. *Curr Vasc Pharmacol*. 2003;1(1):41-58.
21. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev*. 2004;84(3):767-801.
22. Byon CH, Heath JM, Chen Y. Redox signaling in cardiovascular pathophysiology: A focus on hydrogen peroxide and vascular smooth muscle cells. *Redox Biol*. 2016;9:244-53.
23. Ramadan A, Al-Omran M, Verma S. The putative role of autophagy in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis*. 2017;257:288-96.
24. Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):692-702.
25. Bennett MR, Boyle JJ. Apoptosis of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1998;138(1):3-9.
26. Michel JB, Martin-Ventura JL, Egido J, Sakalihasan N, Treska V, Lindholt J, et al. Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans. *Cardiovasc Res*. 2011;90(1):18-27.
27. Marx SO, Totary-Jain H, Marks AR. Vascular smooth muscle cell proliferation in restenosis. *Circ Cardiovasc Interv*. 2011;4(1):104-11.
28. Lannoy M, Slove S, Jacob MP. The function of elastic fibers in the arteries: beyond elasticity. *Pathol Biol (Paris)*. 2014;62(2):79-83.
29. Vrhovski B, Weiss AS. Biochemistry of tropoelastin. *Eur J Biochem*. 1998;258(1):1-18.
30. Ross R, Fialkow RJ, Altman LK. The morphogenesis of elastic fibers. *Adv Exp Med Biol*. 1977;79:7-17.

31. van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J*. 1991;5(13):2814-23.
32. Prockop DJ, Sieron AL, Li SW. Procollagen N-proteinase and procollagen C-proteinase. Two unusual metalloproteinases that are essential for procollagen processing probably have important roles in development and cell signaling. *Matrix Biol*. 1998;16(7):399-408.
33. Mecham RP. Overview of extracellular matrix. *Curr Protoc Cell Biol*. 2012;Chapter 10:Unit 10 1.
34. Ruoslahti E. Structure and biology of proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol*. 1988;4:229-55.
35. Lannoy M. Mécanismes de régulation de la synthèse des fibres élastiques artérielles. Paris: Université Paris Diderot (Paris 7); 2013.
36. Wight TN. Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr Opin Cell Biol*. 2002;14(5):617-23.
37. Wight TN, Lara S, Riessen R, Le Baron R, Isner J. Selective deposits of versican in the extracellular matrix of restenotic lesions from human peripheral arteries. *Am J Pathol*. 1997;151(4):963-73.
38. Riessen R, Wight TN, Pastore C, Henley C, Isner JM. Distribution of hyaluronan during extracellular matrix remodeling in human restenotic arteries and balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation*. 1996;93(6):1141-7.
39. Halper J, Kjaer M. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Adv Exp Med Biol*. 2014;802:31-47.
40. Schwarzbauer JE, DeSimone DW. Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(7).

41. Obara M, Kang MS, Yamada KM. Site-directed mutagenesis of the cell-binding domain of human fibronectin: separable, synergistic sites mediate adhesive function. *Cell*. 1988;53(4):649-57.
42. Timpl R. Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol*. 1996;8(5):618-24.
43. Timpl R, Brown JC. Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays*. 1996;18(2):123-32.
44. Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, et al. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell*. 1998;93(7):1159-70.
45. Kyriakides TR, Leach KJ, Hoffman AS, Ratner BD, Bornstein P. Mice that lack the angiogenesis inhibitor, thrombospondin 2, mount an altered foreign body reaction characterized by increased vascularity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(8):4449-54.
46. Streit M, Riccardi L, Velasco P, Brown LF, Hawighorst T, Bornstein P, et al. Thrombospondin-2: a potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(26):14888-93.
47. Miosge N, Holzhausen S, Zelent C, Sprysch P, Herken R. Nidogen-1 and nidogen-2 are found in basement membranes during human embryonic development. *Histochem J*. 2001;33(9-10):523-30.
48. Murshed M, Smyth N, Miosge N, Karolat J, Krieg T, Paulsson M, et al. The absence of nidogen 1 does not affect murine basement membrane formation. *Mol Cell Biol*. 2000;20(18):7007-12.

49. Jones FS, Jones PL. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn*. 2000;218(2):235-59.
50. Giachelli CM, Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol*. 2000;19(7):615-22.
51. Bayless KJ, Meininger GA, Scholtz JM, Davis GE. Osteopontin is a ligand for the alpha4beta1 integrin. *J Cell Sci*. 1998;111 (Pt 9):1165-74.
52. Denda S, Reichardt LF, Muller U. Identification of osteopontin as a novel ligand for the integrin alpha8 beta1 and potential roles for this integrin-ligand interaction in kidney morphogenesis. *Mol Biol Cell*. 1998;9(6):1425-35.
53. Michel JB, Thauinat O, Houard X, Meilhac O, Caligiuri G, Nicoletti A. Topological determinants and consequences of adventitial responses to arterial wall injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(6):1259-68.
54. Mulligan-Kehoe MJ, Simons M. Vasa vasorum in normal and diseased arteries. *Circulation*. 2014;129(24):2557-66.
55. Klink A, Hyafil F, Rudd J, Faries P, Fuster V, Mallat Z, et al. Diagnostic and therapeutic strategies for small abdominal aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8(6):338-47.
56. Nordon IM, Hinchliffe RJ, Loftus IM, Thompson MM. Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8(2):92-102.
57. Golledge J, Muller J, Daugherty A, Norman P. Abdominal aortic aneurysm: pathogenesis and implications for management. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(12):2605-13.
58. McGregor JC, Pollock JG, Anton HC. The value of ultrasonography in the diagnosis of abdominal aortic aneurysm. *Scott Med J*. 1975;20(3):133-7.

59. Johnston KW, Rutherford RB, Tilson MD, Shah DM, Hollier L, Stanley JC. 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.* 1991;13(3):452-8.
60. Brewster DC, Cronenwett JL, Hallett JW, Jr., Johnston KW, Krupski WC, Matsumura JS, et al. 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.* 2003;37(5):1106-17.
61. Nevitt MP, Ballard DJ, Hallett JW, Jr. Prognosis of abdominal aortic aneurysms. A population-based study. *N Engl J Med.* 1989;321(15):1009-14.
62. Jones A, Cahill D, Gardham R. Outcome in patients with a large abdominal aortic aneurysm considered unfit for surgery. *Br J Surg.* 1998;85(10):1382-4.
63. Halloran BG, Davis VA, McManus BM, Lynch TG, Baxter BT. Localization of aortic disease is associated with intrinsic differences in aortic structure. *J Surg Res.* 1995;59(1):17-22.
64. Bown MJ, Sutton AJ, Bell PR, Sayers RD. A meta-analysis of 50 years of ruptured abdominal aortic aneurysm repair. *Br J Surg.* 2002;89(6):714-30.
65. Sweeting MJ, Balm R, Desgranges P, Ulug P, Powell JT, Ruptured Aneurysm T. Individual-patient meta-analysis of three randomized trials comparing endovascular versus open repair for ruptured abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg.* 2015;102(10):1229-39.

66. Sweeting MJ, Ulug P, Powell JT, Desgranges P, Balm R, Ruptured Aneurysm T. Ruptured Aneurysm Trials: The Importance of Longer-term Outcomes and Meta-analysis for 1-year Mortality. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2015;50(3):297-302.
67. Stather PW, Sidloff DA, Rhema IA, Choke E, Bown MJ, Sayers RD. A review of current reporting of abdominal aortic aneurysm mortality and prevalence in the literature. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2014;47(3):240-2.
68. Karthikesalingam A, Vidal-Diez A, Holt PJ, Loftus IM, Schermerhorn ML, Soden PA, et al. Thresholds for Abdominal Aortic Aneurysm Repair in England and the United States. *N Engl J Med.* 2016;375(21):2051-9.
69. Hemminki K, Li X, Johansson SE, Sundquist K, Sundquist J. Familial risks of aortic aneurysms among siblings in a nationwide Swedish study. *Genet Med.* 2006;8(1):43-9.
70. Wahlgren CM, Larsson E, Magnusson PK, Hultgren R, Swedenborg J. Genetic and environmental contributions to abdominal aortic aneurysm development in a twin population. *J Vasc Surg.* 2010;51(1):3-7; discussion
71. Davis FM, Rateri DL, Daugherty A. Abdominal aortic aneurysm: novel mechanisms and therapies. *Curr Opin Cardiol.* 2015;30(6):566-73.
72. Gretarsdottir S, Baas AF, Thorleifsson G, Holm H, den Heijer M, de Vries JP, et al. Genome-wide association study identifies a sequence variant within the DAB2IP gene conferring susceptibility to abdominal aortic aneurysm. *Nat Genet.* 2010;42(8):692-7.
73. Elmore JR, Obmann MA, Kuivaniemi H, Tromp G, Gerhard GS, Franklin DP, et al. Identification of a genetic variant associated with abdominal aortic aneurysms on chromosome 3p12.3 by genome wide association. *J Vasc Surg.* 2009;49(6):1525-31.

74. Bown MJ, Jones GT, Harrison SC, Wright BJ, Bumpstead S, Baas AF, et al. Abdominal aortic aneurysm is associated with a variant in low-density lipoprotein receptor-related protein 1. *Am J Hum Genet.* 2011;89(5):619-27.
75. Bradley DT, Hughes AE, Badger SA, Jones GT, Harrison SC, Wright BJ, et al. A variant in LDLR is associated with abdominal aortic aneurysm. *Circ Cardiovasc Genet.* 2013;6(5):498-504.
76. Morris DR, Biros E, Cronin O, Kuivaniemi H, Golledge J. The association of genetic variants of matrix metalloproteinases with abdominal aortic aneurysm: a systematic review and meta-analysis. *Heart.* 2014;100(4):295-302.
77. Jones GT, Bown MJ, Gretarsdottir S, Romaine SP, Helgadottir A, Yu G, et al. A sequence variant associated with sortilin-1 (SORT1) on 1p13.3 is independently associated with abdominal aortic aneurysm. *Hum Mol Genet.* 2013;22(14):2941-7.
78. Biros E, Norman PE, Jones GT, van Rij AM, Yu G, Moxon JV, et al. Meta-analysis of the association between single nucleotide polymorphisms in TGF-beta receptor genes and abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis.* 2011;219(1):218-23.
79. Toghiani BJ, Saratzis A, Harrison SC, Verissimo AR, Mallon EB, Bown MJ. The potential role of DNA methylation in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis.* 2015;241(1):121-9.
80. Raffort J, Lareyre F, Clement M, Mallat Z. Micro-RNAs in abdominal aortic aneurysms: insights from animal models and relevance to human disease. *Cardiovasc Res.* 2016;110(2):165-77.
81. Sawabe M. Vascular aging: from molecular mechanism to clinical significance. *Geriatr Gerontol Int.* 2010;10 Suppl 1:S213-20.

82. Spina M, Garbisa S, Hinnie J, Hunter JC, Serafini-Fracassini A. Age-related changes in composition and mechanical properties of the tunica media of the upper thoracic human aorta. *Arteriosclerosis*. 1983;3(1):64-76.
83. Semba RD, Najjar SS, Sun K, Lakatta EG, Ferrucci L. Serum carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product, is associated with increased aortic pulse wave velocity in adults. *Am J Hypertens*. 2009;22(1):74-9.
84. Blanchard JF. Epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Epidemiol Rev*. 1999;21(2):207-21.
85. Grootenboer N, Bosch JL, Hendriks JM, van Sambeek MR. Epidemiology, aetiology, risk of rupture and treatment of abdominal aortic aneurysms: does sex matter? *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2009;38(3):278-84.
86. Ailawadi G, Eliason JL, Roelofs KJ, Sinha I, Hannawa KK, Kaldjian EP, et al. Gender differences in experimental aortic aneurysm formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(11):2116-22.
87. Woodrum DT, Ford JW, Ailawadi G, Pearce CG, Sinha I, Eagleton MJ, et al. Gender differences in rat aortic smooth muscle cell matrix metalloproteinase-9. *J Am Coll Surg*. 2005;201(3):398-404.
88. Norman PE, Curci JA. Understanding the effects of tobacco smoke on the pathogenesis of aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(7):1473-7.
89. Svensjo S, Bjorck M, Gurtelschmid M, Djavani Gidlund K, Hellberg A, Wanhainen A. Low prevalence of abdominal aortic aneurysm among 65-year-old Swedish men indicates a change in the epidemiology of the disease. *Circulation*. 2011;124(10):1118-23.

90. Kent KC, Zwolak RM, Egorova NN, Riles TS, Manganaro A, Moskowitz AJ, et al. Analysis of risk factors for abdominal aortic aneurysm in a cohort of more than 3 million individuals. *J Vasc Surg.* 2010;52(3):539-48.
91. Sweeting MJ, Thompson SG, Brown LC, Powell JT, collaborators R. Meta-analysis of individual patient data to examine factors affecting growth and rupture of small abdominal aortic aneurysms. *Br J Surg.* 2012;99(5):655-65.
92. Lindholt JS, Jorgensen B, Shi GP, Henneberg EW. Relationships between activators and inhibitors of plasminogen, and the progression of small abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2003;25(6):546-51.
93. Barua RS, Ambrose JA, Saha DC, Eales-Reynolds LJ. Smoking is associated with altered endothelial-derived fibrinolytic and antithrombotic factors: an in vitro demonstration. *Circulation.* 2002;106(8):905-8.
94. Murphy EA, Danna-Lopes D, Sarfati I, Rao SK, Cohen JR. Nicotine-stimulated elastase activity release by neutrophils in patients with abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg.* 1998;12(1):41-5.
95. Lemaitre V, Dabo AJ, D'Armiento J. Cigarette smoke components induce matrix metalloproteinase-1 in aortic endothelial cells through inhibition of mTOR signaling. *Toxicol Sci.* 2011;123(2):542-9.
96. Stolle K, Berges A, Lietz M, Lebrun S, Wallerath T. Cigarette smoke enhances abdominal aortic aneurysm formation in angiotensin II-treated apolipoprotein E-deficient mice. *Toxicol Lett.* 2010;199(3):403-9.
97. Raveendran M, Senthil D, Utama B, Shen Y, Dudley D, Wang J, et al. Cigarette suppresses the expression of P4Halpa and vascular collagen production. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;323(2):592-8.

98. Krishna SM, Dear AE, Norman PE, Golledge J. Genetic and epigenetic mechanisms and their possible role in abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis*. 2010;212(1):16-29.
99. Jin J, Arif B, Garcia-Fernandez F, Ennis TL, Davis EC, Thompson RW, et al. Novel mechanism of aortic aneurysm development in mice associated with smoking and leukocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(12):2901-9.
100. Li ZZ, Dai QY. Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms: role of nicotine and nicotinic acetylcholine receptors. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:103120.
101. Expert Panel on D. An International Atherosclerosis Society position paper: global recommendations for the management of dyslipidemia: executive summary. *Atherosclerosis*. 2014;232(2):410-3.
102. Golledge J, van Bockxmeer F, Jamrozik K, McCann M, Norman PE. Association between serum lipoproteins and abdominal aortic aneurysm. *Am J Cardiol*. 2010;105(10):1480-4.
103. Torsney E, Pirianov G, Charolidi N, Shoreim A, Gaze D, Petrova S, et al. Elevation of plasma high-density lipoproteins inhibits development of experimental abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(11):2678-86.
104. Krishna SM, Seto SW, Moxon JV, Rush C, Walker PJ, Norman PE, et al. Fenofibrate increases high-density lipoprotein and sphingosine 1 phosphate concentrations limiting abdominal aortic aneurysm progression in a mouse model. *Am J Pathol*. 2012;181(2):706-18.
105. Camont L, Chapman MJ, Kontush A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends Mol Med*. 2011;17(10):594-603.

106. de Haas CJ, Poppelier MJ, van Kessel KP, van Strijp JA. Serum amyloid P component prevents high-density lipoprotein-mediated neutralization of lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 2000;68(9):4954-60.
107. Tran-Dinh A, Diallo D, Delbosc S, Varela-Perez LM, Dang QB, Lapergue B, et al. HDL and endothelial protection. *Br J Pharmacol*. 2013;169(3):493-511.
108. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, et al. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(4):542-7.
109. Burillo E, Jorge I, Martinez-Lopez D, Camafeita E, Blanco-Colio LM, Trevisan-Herraz M, et al. Quantitative HDL Proteomics Identifies Peroxiredoxin-6 as a Biomarker of Human Abdominal Aortic Aneurysm. *Sci Rep*. 2016;6:38477.
110. Delbosc S, Diallo D, Dejouvencel T, Lamiral Z, Louedec L, Martin-Ventura JL, et al. Impaired high-density lipoprotein anti-oxidant capacity in human abdominal aortic aneurysm. *Cardiovasc Res*. 2013;100(2):307-15.
111. Burillo E, Lindholt JS, Molina-Sanchez P, Jorge I, Martinez-Pinna R, Blanco-Colio LM, et al. ApoA-I/HDL-C levels are inversely associated with abdominal aortic aneurysm progression. *Thromb Haemost*. 2015;113(6):1335-46.
112. Ortiz-Munoz G, Houard X, Martin-Ventura JL, Ishida BY, Loyau S, Rossignol P, et al. HDL antielastase activity prevents smooth muscle cell anoikis, a potential new antiatherogenic property. *FASEB J*. 2009;23(9):3129-39.
113. Murphy AJ, Woollard KJ, Hoang A, Mukhamedova N, Stirzaker RA, McCormick SP, et al. High-density lipoprotein reduces the human monocyte inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(11):2071-7.

114. Steinmetz EF, Buckley C, Shames ML, Ennis TL, Vanvickle-Chavez SJ, Mao D, et al. Treatment with simvastatin suppresses the development of experimental abdominal aortic aneurysms in normal and hypercholesterolemic mice. *Ann Surg.* 2005;241(1):92-101.
115. Wemmelund H, Hogh A, Hundborg HH, Thomsen RW, Johnsen SP, Lindholt JS. Statin use and rupture of abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg.* 2014;101(8):966-75.
116. Dunne JA, Bailey MA, Griffin KJ, Sohrabi S, Coughlin PA, Scott DJ. Statins: the holy grail of Abdominal Aortic Aneurysm (AAA) growth attenuation? A systematic review of the literature. *Curr Vasc Pharmacol.* 2014;12(1):168-72.
117. Wanhainen A, Bergqvist D, Boman K, Nilsson TK, Rutegard J, Bjorck M. Risk factors associated with abdominal aortic aneurysm: a population-based study with historical and current data. *J Vasc Surg.* 2005;41(3):390-6.
118. Cornuz J, Sidoti Pinto C, Tevaearai H, Egger M. Risk factors for asymptomatic abdominal aortic aneurysm: systematic review and meta-analysis of population-based screening studies. *Eur J Public Health.* 2004;14(4):343-9.
119. Forsdahl SH, Singh K, Solberg S, Jacobsen BK. Risk factors for abdominal aortic aneurysms: a 7-year prospective study: the Tromso Study, 1994-2001. *Circulation.* 2009;119(16):2202-8.
120. Brown LC, Powell JT. Risk factors for aneurysm rupture in patients kept under ultrasound surveillance. UK Small Aneurysm Trial Participants. *Ann Surg.* 1999;230(3):289-96; discussion 96-7.
121. Gadowski GR, Ricci MA, Hendley ED, Pilcher DB. Hypertension accelerates the growth of experimental aortic aneurysms. *J Surg Res.* 1993;54(5):431-6.

122. Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, Chute EP, Littooy FN, Bandyk D, et al. Prevalence and associations of abdominal aortic aneurysm detected through screening. Aneurysm Detection and Management (ADAM) Veterans Affairs Cooperative Study Group. *Ann Intern Med.* 1997;126(6):441-9.
123. Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, Chute EP, Hye RJ, Makaroun MS, et al. The aneurysm detection and management study screening program: validation cohort and final results. Aneurysm Detection and Management Veterans Affairs Cooperative Study Investigators. *Arch Intern Med.* 2000;160(10):1425-30.
124. Diehm N, Baumgartner I. Determinants of aneurysmal aortic disease. *Circulation.* 2009;119(16):2134-5.
125. De Rango P, Farchioni L, Fiorucci B, Lenti M. Diabetes and abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2014;47(3):243-61.
126. Shantikumar S, Ajjan R, Porter KE, Scott DJ. Diabetes and the abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2010;39(2):200-7.
127. Golledge J, Karan M, Moran CS, Muller J, Clancy P, Dear AE, et al. Reduced expansion rate of abdominal aortic aneurysms in patients with diabetes may be related to aberrant monocyte-matrix interactions. *Eur Heart J.* 2008;29(5):665-72.
128. Sakata N, Meng J, Takebayashi S. Effects of advanced glycation end products on the proliferation and fibronectin production of smooth muscle cells. *J Atheroscler Thromb.* 2000;7(3):169-76.
129. Aronson D. Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffening of aging and diabetes. *J Hypertens.* 2003;21(1):3-12.
130. Gao L, Kang L, Chen Q, Chen C, Xu B, Jiang S. Advanced glycation end products inhibit production and activity of matrix metalloproteinase-2 in human umbilical vein endothelial cells. *J Int Med Res.* 2007;35(5):709-15.

131. Dua MM, Miyama N, Azuma J, Schultz GM, Sho M, Morser J, et al. Hyperglycemia modulates plasminogen activator inhibitor-1 expression and aortic diameter in experimental aortic aneurysm disease. *Surgery*. 2010;148(2):429-35.
132. Portik-Dobos V, Anstadt MP, Hutchinson J, Bannan M, Ergul A. Evidence for a matrix metalloproteinase induction/activation system in arterial vasculature and decreased synthesis and activity in diabetes. *Diabetes*. 2002;51(10):3063-8.
133. Lindholt JS, Bjorck M, Michel JB. Anti-platelet treatment of middle-sized abdominal aortic aneurysms. *Curr Vasc Pharmacol*. 2013;11(3):305-13.
134. Brandes RP, Kreuzer J. Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc Res*. 2005;65(1):16-27.
135. Caro CG, Lever MJ. Factors influencing arterial wall mass transport. *Biorheology*. 1984;21(1-2):197-205.
136. Slaiby JM, Ricci MA, Gadowski GR, Hendley ED, Pilcher DB. Expansion of aortic aneurysms is reduced by propranolol in a hypertensive rat model. *J Vasc Surg*. 1994;20(2):178-83.
137. Caro CG. Discovery of the role of wall shear in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(2):158-61.
138. Mohamied Y, Rowland EM, Bailey EL, Sherwin SJ, Schwartz MA, Weinberg PD. Change of direction in the biomechanics of atherosclerosis. *Ann Biomed Eng*. 2015;43(1):16-25.
139. Vollmar JF, Paes E, Pauschinger P, Henze E, Friesch A. Aortic aneurysms as late sequelae of above-knee amputation. *Lancet*. 1989;2(8667):834-5.
140. Adolph R, Vorp DA, Steed DL, Webster MW, Kameneva MV, Watkins SC. Cellular content and permeability of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 1997;25(5):916-26.

141. Houard X, Rouzet F, Touat Z, Philippe M, Dominguez M, Fontaine V, et al. Topology of the fibrinolytic system within the mural thrombus of human abdominal aortic aneurysms. *J Pathol.* 2007;212(1):20-8.
142. Fontaine V, Jacob MP, Houard X, Rossignol P, Plissonnier D, Angles-Cano E, et al. Involvement of the mural thrombus as a site of protease release and activation in human aortic aneurysms. *Am J Pathol.* 2002;161(5):1701-10.
143. McCormick ML, Gavrilu D, Weintraub NL. Role of oxidative stress in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(3):461-9.
144. Dejouvencel T, Feron D, Rossignol P, Sapoval M, Kauffmann C, Piot JM, et al. Hemorphin 7 reflects hemoglobin proteolysis in abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(2):269-75.
145. Fontaine V, Touat Z, Mtairag el M, Vranckx R, Louedec L, Houard X, et al. Role of leukocyte elastase in preventing cellular re-colonization of the mural thrombus. *Am J Pathol.* 2004;164(6):2077-87.
146. Wolf YG, Thomas WS, Brennan FJ, Goff WG, Sise MJ, Bernstein EF. Computed tomography scanning findings associated with rapid expansion of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 1994;20(4):529-35; discussion 35-8.
147. Vorp DA, Lee PC, Wang DH, Makaroun MS, Nemoto EM, Ogawa S, et al. Association of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm with local hypoxia and wall weakening. *J Vasc Surg.* 2001;34(2):291-9.
148. Kazi M, Thyberg J, Religa P, Roy J, Eriksson P, Hedin U, et al. Influence of intraluminal thrombus on structural and cellular composition of abdominal aortic aneurysm wall. *J Vasc Surg.* 2003;38(6):1283-92.

149. Holmes DR, Liao S, Parks WC, Thompson RW. Medial neovascularization in abdominal aortic aneurysms: a histopathologic marker of aneurysmal degeneration with pathophysiologic implications. *J Vasc Surg.* 1995;21(5):761-71; discussion 71-2.
150. Thompson RW, Parks WC. Role of matrix metalloproteinases in abdominal aortic aneurysms. *Ann N Y Acad Sci.* 1996;800:157-74.
151. Hsiai TK. Mechanosignal transduction coupling between endothelial and smooth muscle cells: role of hemodynamic forces. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008;294(3):C659-61.
152. Resnick N, Yahav H, Schubert S, Wolfowitz E, Shay A. Signalling pathways in vascular endothelium activated by shear stress: relevance to atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2000;11(2):167-77.
153. Dua MM, Dalman RL. Hemodynamic influences on abdominal aortic aneurysm disease: Application of biomechanics to aneurysm pathophysiology. *Vascul Pharmacol.* 2010;53(1-2):11-21.
154. Yeung JJ, Kim HJ, Abbruzzese TA, Vignon-Clementel IE, Draney-Blomme MT, Yeung KK, et al. Aortoiliac hemodynamic and morphologic adaptation to chronic spinal cord injury. *J Vasc Surg.* 2006;44(6):1254-65.
155. van den Bosch MA, van der Graaf Y, Eikelboom BC, Algra A, Mali WP, Disease SSGSMoA. Distal aortic diameter and peripheral arterial occlusive disease. *J Vasc Surg.* 2001;34(6):1085-9.
156. Hishikawa K, Oemar BS, Yang Z, Luscher TF. Pulsatile stretch stimulates superoxide production and activates nuclear factor-kappa B in human coronary smooth muscle. *Circ Res.* 1997;81(5):797-803.
157. Grote K, Flach I, Luchtefeld M, Akin E, Holland SM, Drexler H, et al. Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix

metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Circ Res.* 2003;92(11):e80-6.

158. Hoshina K, Sho E, Sho M, Nakahashi TK, Dalman RL. Wall shear stress and strain modulate experimental aneurysm cellularity. *J Vasc Surg.* 2003;37(5):1067-74.

159. Sho E, Sho M, Hoshina K, Kimura H, Nakahashi TK, Dalman RL. Hemodynamic forces regulate mural macrophage infiltration in experimental aortic aneurysms. *Exp Mol Pathol.* 2004;76(2):108-16.

160. Sho E, Sho M, Nanjo H, Kawamura K, Masuda H, Dalman RL. Hemodynamic regulation of CD34+ cell localization and differentiation in experimental aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(10):1916-21.

161. Annambhotla S, Bourgeois S, Wang X, Lin PH, Yao Q, Chen C. Recent advances in molecular mechanisms of abdominal aortic aneurysm formation. *World J Surg.* 2008;32(6):976-86.

162. Qin Y, Cao X, Yang Y, Shi GP. Cysteine protease cathepsins and matrix metalloproteinases in the development of abdominal aortic aneurysms. *Future Cardiol.* 2013;9(1):89-103.

163. Pearce WH, Shively VP. Abdominal aortic aneurysm as a complex multifactorial disease: interactions of polymorphisms of inflammatory genes, features of autoimmunity, and current status of MMPs. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1085:117-32.

164. Rizas KD, Ippagunta N, Tilson MD, 3rd. Immune cells and molecular mediators in the pathogenesis of the abdominal aortic aneurysm. *Cardiol Rev.* 2009;17(5):201-10.

165. Hovsepian DM, Ziporin SJ, Sakurai MK, Lee JK, Curci JA, Thompson RW. Elevated plasma levels of matrix metalloproteinase-9 in patients with abdominal

aortic aneurysms: a circulating marker of degenerative aneurysm disease. *J Vasc Interv Radiol.* 2000;11(10):1345-52.

166. McMillan WD, Pearce WH. Increased plasma levels of metalloproteinase-9 are associated with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 1999;29(1):122-7; discussion 7-9.

167. Hellenthal FA, Ten Bosch JA, Pulinx B, Wodzig WK, de Haan MW, Prins MH, et al. Plasma levels of matrix metalloproteinase-9: a possible diagnostic marker of successful endovascular aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2012;43(2):171-2.

168. Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 2008;75(2):346-59.

169. Wilson WR, Schwalbe EC, Jones JL, Bell PR, Thompson MM. Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase) in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg.* 2005;92(7):828-33.

170. 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;105(11):1641-9.

171. 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;110(5):625-32.

172. Dodd BR, Spence RA. Doxycycline inhibition of abdominal aortic aneurysm growth: a systematic review of the literature. *Curr Vasc Pharmacol.* 2011;9(4):471-8.

173. Zhang Y, Naggar JC, Welzig CM, Beasley D, Moulton KS, Park HJ, et al. Simvastatin inhibits angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in

apolipoprotein E-knockout mice: possible role of ERK. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(11):1764-71.

174. Silence J, Collen D, Lijnen HR. Reduced atherosclerotic plaque but enhanced aneurysm formation in mice with inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene. *Circ Res.* 2002;90(8):897-903.

175. Busuttill RW, Abou-Zamzam AM, Machleder HI. Collagenase activity of the human aorta. A comparison of patients with and without abdominal aortic aneurysms. *Arch Surg.* 1980;115(11):1373-8.

176. Sukhova GK, Shi GP. Do cathepsins play a role in abdominal aortic aneurysm pathogenesis? *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1085:161-9.

177. Wang Y, Tang C, Qin Y. Cathepsins: a new culprit behind abdominal aortic aneurysm. *Regen Med Res.* 2013;1(1):5.

178. Shi GP, Sukhova GK, Grubb A, Ducharme A, Rhode LH, Lee RT, et al. Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms. *J Clin Invest.* 1999;104(9):1191-7.

179. Lindholt JS, Erlandsen EJ, Henneberg EW. Cystatin C deficiency is associated with the progression of small abdominal aortic aneurysms. *Br J Surg.* 2001;88(11):1472-5.

180. Abdul-Hussien H, Soekhoe RG, Weber E, von der Thusen JH, Kleemann R, Mulder A, et al. Collagen degradation in the abdominal aneurysm: a conspiracy of matrix metalloproteinase and cysteine collagenases. *Am J Pathol.* 2007;170(3):809-17.

181. Lopez-Candales A, Holmes DR, Liao S, Scott MJ, Wickline SA, Thompson RW. Decreased vascular smooth muscle cell density in medial degeneration of human abdominal aortic aneurysms. *Am J Pathol.* 1997;150(3):993-1007.

182. Henderson EL, Geng YJ, Sukhova GK, Whitemore AD, Knox J, Libby P. Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms. *Circulation*. 1999;99(1):96-104.
183. Satta J, Mennander A, Soini Y. 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*. 2002;16(4):462-6.
184. Liao S, Curci JA, Kelley BJ, Sicard GA, Thompson RW. Accelerated replicative senescence of medial smooth muscle cells derived from abdominal aortic aneurysms compared to the adjacent inferior mesenteric artery. *J Surg Res*. 2000;92(1):85-95.
185. Michel JB. Anoikis in the cardiovascular system: known and unknown extracellular mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(12):2146-54.
186. Meilhac O, Ho-Tin-Noe B, Houard X, Philippe M, Michel JB, Angles-Cano E. Pericellular plasmin induces smooth muscle cell anoikis. *FASEB J*. 2003;17(10):1301-3.
187. Rossignol P, Bouton MC, Jandrot-Perrus M, Bryckaert M, Jacob MP, Bezeaud A, et al. A paradoxical pro-apoptotic effect of thrombin on smooth muscle cells. *Exp Cell Res*. 2004;299(2):279-85.
188. Miller FJ, Jr., Sharp WJ, Fang X, Oberley LW, Oberley TD, Weintraub NL. Oxidative stress in human abdominal aortic aneurysms: a potential mediator of aneurysmal remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(4):560-5.
189. Ejiri J, Inoue N, Tsukube T, Munezane T, Hino Y, Kobayashi S, et al. Oxidative stress in the pathogenesis of thoracic aortic aneurysm: protective role of statin and angiotensin II type 1 receptor blocker. *Cardiovasc Res*. 2003;59(4):988-96.

190. Yajima N, Masuda M, Miyazaki M, Nakajima N, Chien S, Shyy JY. 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.* 2002;36(2):379-85.
191. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1994;74(6):1141-8.
192. Morita T, Imai T, Yamaguchi T, Sugiyama T, Katayama S, Yoshino G. Induction of heme oxygenase-1 in monocytes suppresses angiotensin II-elicited chemotactic activity through inhibition of CCR2: role of bilirubin and carbon monoxide generated by the enzyme. *Antioxid Redox Signal.* 2003;5(4):439-47.
193. Thomas M, Gavrila D, McCormick ML, Miller FJ, Jr., Daugherty A, Cassis LA, et al. Deletion of p47phox attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 2006;114(5):404-13.
194. Marumo T, Schini-Kerth VB, Fisslthaler B, Busse R. Platelet-derived growth factor-stimulated superoxide anion production modulates activation of transcription factor NF-kappaB and expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human aortic smooth muscle cells. *Circulation.* 1997;96(7):2361-7.
195. Satriano JA, Shuldiner M, Hora K, Xing Y, Shan Z, Schlondorff D. Oxygen radicals as second messengers for expression of the monocyte chemoattractant protein, JE/MCP-1, and the monocyte colony-stimulating factor, CSF-1, in response to tumor necrosis factor-alpha and immunoglobulin G. Evidence for involvement of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent oxidase. *J Clin Invest.* 1993;92(3):1564-71.

196. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest.* 1996;98(11):2572-9.
197. Lassegue B, Griendling KK. Reactive oxygen species in hypertension; An update. *Am J Hypertens.* 2004;17(9):852-60.
198. Li WG, Miller FJ, Jr., Zhang HJ, Spitz DR, Oberley LW, Weintraub NL. H₂O₂-induced O₂ production by a non-phagocytic NAD(P)H oxidase causes oxidant injury. *J Biol Chem.* 2001;276(31):29251-6.
199. Li WG, Stoll LL, Rice JB, Xu SP, Miller FJ, Jr., Chatterjee P, et al. Activation of NAD(P)H oxidase by lipid hydroperoxides: mechanism of oxidant-mediated smooth muscle cytotoxicity. *Free Radic Biol Med.* 2003;34(7):937-46.
200. Walford G, Loscalzo J. Nitric oxide in vascular biology. *J Thromb Haemost.* 2003;1(10):2112-8.
201. Dimmeler S, Zeiher AM. Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensin II and pro-atherosclerotic factors. *Regul Pept.* 2000;90(1-3):19-25.
202. Curci JA, Liao S, Huffman MD, Shapiro SD, Thompson RW. Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest.* 1998;102(11):1900-10.
203. Galle C, Schandene L, Stordeur P, Peignoys Y, Ferreira J, Wautrecht JC, et al. Predominance of type 1 CD4⁺ T cells in human abdominal aortic aneurysm. *Clin Exp Immunol.* 2005;142(3):519-27.

204. Koch AE, Haines GK, Rizzo RJ, Radosevich JA, Pope RM, Robinson PG, et al. Human abdominal aortic aneurysms. Immunophenotypic analysis suggesting an immune-mediated response. *Am J Pathol.* 1990;137(5):1199-213.
205. Tsuruda T, Kato J, Hatakeyama K, Kojima K, Yano M, Yano Y, et al. Adventitial mast cells contribute to pathogenesis in the progression of abdominal aortic aneurysm. *Circ Res.* 2008;102(11):1368-77.
206. Ocana E, Bohorquez JC, Perez-Requena J, Brieva JA, Rodriguez C. Characterisation of T and B lymphocytes infiltrating abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis.* 2003;170(1):39-48.
207. Brophy CM, Reilly JM, Smith GJ, Tilson MD. The role of inflammation in nonspecific abdominal aortic aneurysm disease. *Ann Vasc Surg.* 1991;5(3):229-33.
208. Chan WL, Pejnovic N, Hamilton H, Liew TV, Popadic D, Poggi A, et al. Atherosclerotic abdominal aortic aneurysm and the interaction between autologous human plaque-derived vascular smooth muscle cells, type 1 NKT, and helper T cells. *Circ Res.* 2005;96(6):675-83.
209. Sharma AK, Lu G, Jester A, Johnston WF, Zhao Y, Hajzus VA, et al. Experimental abdominal aortic aneurysm formation is mediated by IL-17 and attenuated by mesenchymal stem cell treatment. *Circulation.* 2012;126(11 Suppl 1):S38-45.
210. Wang J, Lindholt JS, Sukhova GK, Shi MA, Xia M, Chen H, et al. IgE actions on CD4+ T cells, mast cells, and macrophages participate in the pathogenesis of experimental abdominal aortic aneurysms. *EMBO Mol Med.* 2014;6(7):952-69.
211. Forester ND, Cruickshank SM, Scott DJ, Carding SR. Functional characterization of T cells in abdominal aortic aneurysms. *Immunology.* 2005;115(2):262-70.

212. Travis J. Origins. On the origin of the immune system. *Science*. 2009;324(5927):580-2.
213. Eliason JL, Hannawa KK, Ailawadi G, Sinha I, Ford JW, Deogracias MP, et al. Neutrophil depletion inhibits experimental abdominal aortic aneurysm formation. *Circulation*. 2005;112(2):232-40.
214. Hannawa KK, Eliason JL, Woodrum DT, Pearce CG, Roelofs KJ, Grigoryants V, et al. L-selectin-mediated neutrophil recruitment in experimental rodent aneurysm formation. *Circulation*. 2005;112(2):241-7.
215. Pagano MB, Bartoli MA, Ennis TL, Mao D, Simmons PM, Thompson RW, et al. Critical role of dipeptidyl peptidase I in neutrophil recruitment during the development of experimental abdominal aortic aneurysms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(8):2855-60.
216. Ramos-Mozo P, Madrigal-Matute J, Martinez-Pinna R, Blanco-Colio LM, Lopez JA, Camafeita E, et al. Proteomic analysis of polymorphonuclear neutrophils identifies catalase as a novel biomarker of abdominal aortic aneurysm: potential implication of oxidative stress in abdominal aortic aneurysm progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(12):3011-9.
217. Delbosc S, Alsac JM, Journe C, Louedec L, Castier Y, Bonnaure-Mallet M, et al. *Porphyromonas gingivalis* participates in pathogenesis of human abdominal aortic aneurysm by neutrophil activation. Proof of concept in rats. *PLoS One*. 2011;6(4):e18679.
218. Coutard M, Touat Z, Houard X, Leclercq A, Michel JB. Thrombus versus wall biological activities in experimental aortic aneurysms. *J Vasc Res*. 2010;47(4):355-66.

219. Houard X, Touat Z, Ollivier V, Louedec L, Philippe M, Sebbag U, et al. Mediators of neutrophil recruitment in human abdominal aortic aneurysms. *Cardiovasc Res.* 2009;82(3):532-41.
220. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest.* 2000;80(5):617-53.
221. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood.* 1997;89(10):3503-21.
222. Touat Z, Ollivier V, Dai J, Huisse MG, Bezeaud A, Sebbag U, et al. Renewal of mural thrombus releases plasma markers and is involved in aortic abdominal aneurysm evolution. *Am J Pathol.* 2006;168(3):1022-30.
223. Sakalihasan N, Delvenne P, Nussgens BV, Limet R, Lapiere CM. Activated forms of MMP2 and MMP9 in abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 1996;24(1):127-33.
224. Folkesson M, Kazi M, Zhu C, Silveira A, Hemdahl AL, Hamsten A, et al. Presence of NGAL/MMP-9 complexes in human abdominal aortic aneurysms. *Thromb Haemost.* 2007;98(2):427-33.
225. Hinterseher I, Erdman R, Donoso LA, Vrabec TR, Schworer CM, Lillvis JH, et al. Role of complement cascade in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(7):1653-60.
226. Martinez-Pinna R, Madrigal-Matute J, Tarin C, Burillo E, Esteban-Salan M, Pastor-Vargas C, et al. Proteomic analysis of intraluminal thrombus highlights complement activation in human abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(8):2013-20.

227. Pagano MB, Zhou HF, Ennis TL, Wu X, Lambris JD, Atkinson JP, et al. Complement-dependent neutrophil recruitment is critical for the development of elastase-induced abdominal aortic aneurysm. *Circulation*. 2009;119(13):1805-13.
228. Zhou HF, Yan H, Stover CM, Fernandez TM, Rodriguez de Cordoba S, Song WC, et al. 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*. 2012;109(7):E415-22.
229. Zhou HF, Yan H, Bertram P, Hu Y, Springer LE, Thompson RW, et al. Fibrinogen-specific antibody induces abdominal aortic aneurysm in mice through complement lectin pathway activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(46):E4335-44.
230. Juvonen J, Juvonen T, Laurila A, Alakarppa H, Lounatmaa K, Surcel HM, et al. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in the walls of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 1997;25(3):499-505.
231. Lindholt JS, Stovring J, Ostergaard L, Urbonavicius S, Henneberg EW, Honore B, et al. Serum antibodies against *Chlamydia pneumoniae* outer membrane protein cross-react with the heavy chain of immunoglobulin in the wall of abdominal aortic aneurysms. *Circulation*. 2004;109(17):2097-102.
232. Halme S, Juvonen T, Laurila A, Juvonen J, Mosorin M, Saikku P, et al. *Chlamydia pneumoniae* reactive T lymphocytes in the walls of abdominal aortic aneurysms. *Eur J Clin Invest*. 1999;29(6):546-52.
233. Ozsvath KJ, Hirose H, Xia S, Tilson MD. Molecular mimicry in human aortic aneurysmal diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 1996;800:288-93.

234. Kurihara N, Inoue Y, Iwai T, Umeda M, Huang Y, Ishikawa I. Detection and localization of periodontopathic bacteria in abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2004;28(5):553-8.
235. Suzuki J, Aoyama N, Aoki M, Tada Y, Wakayama K, Akazawa H, et al. Incidence of periodontitis in Japanese patients with cardiovascular diseases: a comparison between abdominal aortic aneurysm and arrhythmia. *Heart Vessels.* 2015;30(4):498-502.
236. Suzuki J, Imai Y, Aoki M, Fujita D, Aoyama N, Tada Y, et al. High incidence and severity of periodontitis in patients with Marfan syndrome in Japan. *Heart Vessels.* 2015;30(5):692-5.
237. Suzuki J, Aoyama N, Aoki M, Tada Y, Wakayama K, Akazawa H, et al. High incidence of periodontitis in Japanese patients with abdominal aortic aneurysm. *Int Heart J.* 2014;55(3):268-70.
238. Ding F, Lyu Y, Han X, Zhang H, Liu D, Hei W, et al. Detection of periodontal pathogens in the patients with aortic aneurysm. *Chin Med J (Engl).* 2014;127(23):4114-8.
239. Wada K, Kamisaki Y. Roles of oral bacteria in cardiovascular diseases--from molecular mechanisms to clinical cases: Involvement of *Porphyromonas gingivalis* in the development of human aortic aneurysm. *J Pharmacol Sci.* 2010;113(2):115-9.
240. Delbosc S, Rouer M, Alsac JM, Louedec L, Philippe M, Meilhac O, et al. Elastase inhibitor AZD9668 treatment prevented progression of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2016;63(2):486-92 e1.
241. Xiong W, Zhao Y, Prall A, Greiner TC, Baxter BT. Key roles of CD4⁺ T cells and IFN-gamma in the development of abdominal aortic aneurysms in a murine model. *J Immunol.* 2004;172(4):2607-12.

242. Wijdeven RH, Bakker JM, Paul P, Neefjes J. Exploring genome-wide datasets of MHC class II antigen presentation. *Mol Immunol*. 2013;55(2):172-4.
243. Dale MA, Ruhlman MK, Baxter BT. Inflammatory cell phenotypes in AAAs: their role and potential as targets for therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(8):1746-55.
244. Lu S, White JV, Lin WL, Zhang X, Solomides C, Evans K, et al. Aneurysmal lesions of patients with abdominal aortic aneurysm contain clonally expanded T cells. *J Immunol*. 2014;192(10):4897-912.
245. Fietta P, Delsante G. The effector T helper cell triade. *Riv Biol*. 2009;102(1):61-74.
246. Singh VK, Mehrotra S, Agarwal SS. The paradigm of Th1 and Th2 cytokines: its relevance to autoimmunity and allergy. *Immunol Res*. 1999;20(2):147-61.
247. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008;112(5):1557-69.
248. Schonbeck U, Sukhova GK, Gerdes N, Libby P. T(H)2 predominant immune responses prevail in human abdominal aortic aneurysm. *Am J Pathol*. 2002;161(2):499-506.
249. Chan WL, Pejnovic N, Liew TV, Hamilton H. Predominance of Th2 response in human abdominal aortic aneurysm: mistaken identity for IL-4-producing NK and NKT cells? *Cell Immunol*. 2005;233(2):109-14.
250. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*. 2006;24(6):677-88.
251. Wei Z, Wang Y, Zhang K, Liao Y, Ye P, Wu J, et al. Inhibiting the Th17/IL-17A-related inflammatory responses with digoxin confers protection against experimental abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(11):2429-38.

252. Romain M, Taleb S, Dalloz M, Ponnuswamy P, Esposito B, Perez N, et al. 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.* 2013;33(3):581-4.
253. 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;120(2):422-32.
254. Yin M, Zhang J, Wang Y, Wang S, Bockler D, Duan Z, et al. Deficient CD4+CD25+ T regulatory cell function in patients with abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(9):1825-31.
255. Marelli-Berg FM, Clement M, Mauro C, Caligiuri G. An immunologist's guide to CD31 function in T-cells. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 11):2343-52.
256. Caligiuri G, Rossignol P, Julia P, Groyer E, Mouradian D, Urbain D, et al. Reduced immunoregulatory CD31+ T cells in patients with atherosclerotic abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(3):618-23.
257. Bobryshev YV, Lord RS. Vascular-associated lymphoid tissue (VALT) involvement in aortic aneurysm. *Atherosclerosis.* 2001;154(1):15-21.
258. Chang TW, Gracon AS, Murphy MP, Wilkes DS. Exploring autoimmunity in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015;309(5):H719-27.
259. Takahashi H, Yamamoto M, Tabeya T, Suzuki C, Naishiro Y, Shinomura Y, et al. The immunobiology and clinical characteristics of IgG4 related diseases. *J Autoimmun.* 2012;39(1-2):93-6.
260. Tajima M, Nagai R, Hiroi Y. IgG4-related cardiovascular disorders. *Int Heart J.* 2014;55(4):287-95.

261. Jeannin P, Delneste Y, Lecoanet-Henchoz S, Gretener D, Bonnefoy JY. Interleukin-7 (IL-7) enhances class switching to IgE and IgG4 in the presence of T cells via IL-9 and sCD23. *Blood*. 1998;91(4):1355-61.
262. Meiler F, Klunker S, Zimmermann M, Akdis CA, Akdis M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy*. 2008;63(11):1455-63.
263. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*. 2009;29(6):313-26.
264. Krishnaswamy G, Ajitawi O, Chi DS. The human mast cell: an overview. *Methods Mol Biol*. 2006;315:13-34.
265. Mayranpaa MI, Trosien JA, Fontaine V, Folkesson M, Kazi M, Eriksson P, et al. Mast cells associate with neovessels in the media and adventitia of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 2009;50(2):388-95; discussion 95-6.
266. Sun J, Sukhova GK, Yang M, Wolters PJ, MacFarlane LA, Libby P, et al. Mast cells modulate the pathogenesis of elastase-induced abdominal aortic aneurysms in mice. *J Clin Invest*. 2007;117(11):3359-68.
267. Swedenborg J, Mayranpaa MI, Kovanen PT. Mast cells: important players in the orchestrated pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(4):734-40.
268. Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Fujii K, Akiyama N, Furutani A, et al. Regression of abdominal aortic aneurysm by inhibition of c-Jun N-terminal kinase. *Nat Med*. 2005;11(12):1330-8.
269. Takagi H, Watanabe T, Mizuno Y, Kawai N, Umemoto T, All-Literature Investigation of Cardiovascular Evidence G. Circulating interleukin-6 levels are

associated with abdominal aortic aneurysm presence: a meta-analysis and meta-regression of case-control studies. *Ann Vasc Surg.* 2014;28(8):1913-22.

270. Tieu BC, Ju X, Lee C, Sun H, Lejeune W, Recinos A, 3rd, et al. Aortic adventitial fibroblasts participate in angiotensin-induced vascular wall inflammation and remodeling. *J Vasc Res.* 2011;48(3):261-72.

271. Gregory AK, Yin NX, Capella J, Xia S, Newman KM, Tilson MD. Features of autoimmunity in the abdominal aortic aneurysm. *Arch Surg.* 1996;131(1):85-8.

272. Tilson MD. Similarities of an autoantigen in aneurysmal disease of the human abdominal aorta to a 36-kDa microfibril-associated bovine aortic glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;213(1):40-3.

273. Xia S, Ozsvath K, Hirose H, Tilson MD. Partial amino acid sequence of a novel 40-kDa human aortic protein, with vitronectin-like, fibrinogen-like, and calcium binding domains: aortic aneurysm-associated protein-40 (AAAP-40) [human MAGP-3, proposed]. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;219(1):36-9.

274. Chew DK, Knoetgen J, Xia S, Tilson MD. The role of a putative microfibrillar protein (80 kDa) in abdominal aortic aneurysm disease. *J Surg Res.* 2003;114(1):25-9.

275. Hirose H, Ozsvath KJ, Xia S, Gaetz HP, Tilson MD. Immunoreactivity of adventitial matrix fibrils of normal and aneurysmal abdominal aorta with antibodies against vitronectin and fibrinogen. *Pathobiology.* 1998;66(1):1-4.

276. Ando T, Iizuka N, Sato T, Chikada M, Kurokawa MS, Arito M, et al. Autoantigenicity of carbonic anhydrase 1 in patients with abdominal aortic aneurysm, revealed by proteomic surveillance. *Hum Immunol.* 2013;74(7):852-7.

277. Ladich E, Yahagi K, Romero ME, Virmani R. Vascular diseases: aortitis, aortic aneurysms, and vascular calcification. *Cardiovasc Pathol.* 2016;25(5):432-41.

278. Lehto S, Niskanen L, Suhonen M, Ronnema T, Laakso M. Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16(8):978-83.
279. Gross P, Six I, Kamel S, Massy ZA. Vascular toxicity of phosphate in chronic kidney disease: beyond vascular calcification. *Circ J.* 2014;78(10):2339-46.
280. Chistiakov DA, Sobenin IA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Mechanisms of medial arterial calcification in diabetes. *Curr Pharm Des.* 2014;20(37):5870-83.
281. Fantus D, Awan Z, Seidah NG, Genest J. Aortic calcification: Novel insights from familial hypercholesterolemia and potential role for the low-density lipoprotein receptor. *Atherosclerosis.* 2013;226(1):9-15.
282. Mallikethi-Reddy S, Rubenfire M, Jackson LA, Brook RD. Coronary artery calcium in hypertension: a review. *J Am Soc Hypertens.* 2015;9(12):993-1000.
283. Hofmann Bowman MA, McNally EM. Genetic pathways of vascular calcification. *Trends Cardiovasc Med.* 2012;22(4):93-8.
284. Evrard S, Delanaye P, Kamel S, Cristol JP, Cavalier E, calcifications SSjwgov. Vascular calcification: from pathophysiology to biomarkers. *Clin Chim Acta.* 2015;438:401-14.
285. Henaut L, Mentaverri R, Liabeuf S, Bargnoux AS, Delanaye P, Cavalier E, et al. [Pathophysiological mechanisms of vascular calcification]. *Ann Biol Clin (Paris).* 2015;73(3):271-87.
286. Bostrom KI. Where do we stand on vascular calcification? *Vascul Pharmacol.* 2016;84:8-14.
287. Demer LL, Tintut Y. Inflammatory, metabolic, and genetic mechanisms of vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(4):715-23.

288. Speer MY, Giachelli CM. Regulation of cardiovascular calcification. *Cardiovasc Pathol*. 2004;13(2):63-70.
289. Giachelli CM. Vascular calcification mechanisms. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(12):2959-64.
290. Rutsch F, Nitschke Y, Terkeltaub R. Genetics in arterial calcification: pieces of a puzzle and cogs in a wheel. *Circ Res*. 2011;109(5):578-92.
291. Assimes TL, Knowles JW, Basu A, Iribarren C, Southwick A, Tang H, et al. Susceptibility locus for clinical and subclinical coronary artery disease at chromosome 9p21 in the multi-ethnic ADVANCE study. *Hum Mol Genet*. 2008;17(15):2320-8.
292. Lange LA, Lange EM, Bielak LF, Langefeld CD, Kardina SL, Royston P, et al. Autosomal genome-wide scan for coronary artery calcification loci in sibships at high risk for hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(3):418-23.
293. O'Donnell CJ, Kavousi M, Smith AV, Kardina SL, Feitosa MF, Hwang SJ, et al. Genome-wide association study for coronary artery calcification with follow-up in myocardial infarction. *Circulation*. 2011;124(25):2855-64.
294. Moe SM, Duan D, Doehle BP, O'Neill KD, Chen NX. Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels. *Kidney Int*. 2003;63(3):1003-11.
295. Speer MY, Yang HY, Brabb T, Leaf E, Look A, Lin WL, et al. Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries. *Circ Res*. 2009;104(6):733-41.
296. Collett GD, Canfield AE. Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification. *Circ Res*. 2005;96(9):930-8.

297. Wirrig EE, Yutzey KE. Conserved transcriptional regulatory mechanisms in aortic valve development and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(4):737-41.
298. Yao J, Guihard PJ, Blazquez-Medela AM, Guo Y, Moon JH, Jumabay M, et al. Serine Protease Activation Essential for Endothelial-Mesenchymal Transition in Vascular Calcification. *Circ Res.* 2015;117(9):758-69.
299. Giachelli CM. Vascular calcification: in vitro evidence for the role of inorganic phosphate. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(9 Suppl 4):S300-4.
300. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, et al. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res.* 2000;87(7):E10-7.
301. Li X, Yang HY, Giachelli CM. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res.* 2006;98(7):905-12.
302. Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebbersold R, et al. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res.* 2001;89(12):1147-54.
303. Giachelli CM, Bae N, Almeida M, Denhardt DT, Alpers CE, Schwartz SM. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1993;92(4):1686-96.
304. Levy RJ, Schoen FJ, Levy JT, Nelson AC, Howard SL, Oshry LJ. Biologic determinants of dystrophic calcification and osteocalcin deposition in glutaraldehyde-preserved porcine aortic valve leaflets implanted subcutaneously in rats. *Am J Pathol.* 1983;113(2):143-55.

305. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, et al. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(11):2857-67.
306. Kapustin AN, Shanahan CM. Calcium regulation of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles. *Trends Cardiovasc Med*. 2012;22(5):133-7.
307. Kendrick J, Chonchol M. The role of phosphorus in the development and progression of vascular calcification. *Am J Kidney Dis*. 2011;58(5):826-34.
308. Giachelli CM, Speer MY, Li X, Rajachar RM, Yang H. Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin. *Circ Res*. 2005;96(7):717-22.
309. Kim KM. Apoptosis and calcification. *Scanning Microsc*. 1995;9(4):1137-75; discussion 75-8.
310. Kockx MM, De Meyer GR, Muhring J, Jacob W, Bult H, Herman AG. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 1998;97(23):2307-15.
311. Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM, Weissberg PL. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res*. 2000;87(11):1055-62.
312. Cho HJ, Cho HJ, Lee HJ, Song MK, Seo JY, Bae YH, et al. Vascular calcifying progenitor cells possess bidirectional differentiation potentials. *PLoS Biol*. 2013;11(4):e1001534.
313. Psaltis PJ, Simari RD. Vascular wall progenitor cells in health and disease. *Circ Res*. 2015;116(8):1392-412.

314. Pal SN, Golledge J. Osteo-progenitors in vascular calcification: a circulating cell theory. *J Atheroscler Thromb*. 2011;18(7):551-9.
315. Tang Z, Wang A, Yuan F, Yan Z, Liu B, Chu JS, et al. Differentiation of multipotent vascular stem cells contributes to vascular diseases. *Nat Commun*. 2012;3:875.
316. Mozar A, Haren N, Chasseraud M, Louvet L, Maziere C, Wattel A, et al. High extracellular inorganic phosphate concentration inhibits RANK-RANKL signaling in osteoclast-like cells. *J Cell Physiol*. 2008;215(1):47-54.
317. Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009;20(5-6):343-55.
318. Umulis D, O'Connor MB, Blair SS. The extracellular regulation of bone morphogenetic protein signaling. *Development*. 2009;136(22):3715-28.
319. Bostrom K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1993;91(4):1800-9.
320. Li X, Yang HY, Giachelli CM. BMP-2 promotes phosphate uptake, phenotypic modulation, and calcification of human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2008;199(2):271-7.
321. Balderman JA, Lee HY, Mahoney CE, Handy DE, White K, Annis S, et al. Bone morphogenetic protein-2 decreases microRNA-30b and microRNA-30c to promote vascular smooth muscle cell calcification. *J Am Heart Assoc*. 2012;1(6):e003905.
322. Yao Y, Jumabay M, Ly A, Radparvar M, Cubberly MR, Bostrom KI. A role for the endothelium in vascular calcification. *Circ Res*. 2013;113(5):495-504.

323. Jo H, Song H, Mowbray A. Role of NADPH oxidases in disturbed flow- and BMP4- induced inflammation and atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(9-10):1609-19.
324. Li T, Surendran K, Zawaideh MA, Mathew S, Hruska KA. Bone morphogenetic protein 7: a novel treatment for chronic renal and bone disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2004;13(4):417-22.
325. Luo G, Ducky P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*. 1997;386(6620):78-81.
326. Rashdan NA, Rutsch F, Kempf H, Varadi A, Leftheriotis G, MacRae VE. New perspectives on rare connective tissue calcifying diseases. *Curr Opin Pharmacol*. 2016;28:14-23.
327. Yao Y, Bennett BJ, Wang X, Rosenfeld ME, Giachelli C, Lusis AJ, et al. Inhibition of bone morphogenetic proteins protects against atherosclerosis and vascular calcification. *Circ Res*. 2010;107(4):485-94.
328. Bostrom KI, Jumabay M, Matveyenko A, Nicholas SB, Yao Y. Activation of vascular bone morphogenetic protein signaling in diabetes mellitus. *Circ Res*. 2011;108(4):446-57.
329. Yao Y, Shahbazian A, Bostrom KI. Proline and gamma-carboxylated glutamate residues in matrix Gla protein are critical for binding of bone morphogenetic protein-4. *Circ Res*. 2008;102(9):1065-74.
330. Khavandgar Z, Roman H, Li J, Lee S, Vali H, Brinckmann J, et al. Elastin haploinsufficiency impedes the progression of arterial calcification in MGP-deficient mice. *J Bone Miner Res*. 2014;29(2):327-37.

331. Delanaye P, Liabeuf S, Bouquegneau A, Cavalier E, Massy ZA. [The matrix-gla protein awakening may lead to the demise of vascular calcification]. *Nephrol Ther.* 2015;11(4):191-200.
332. Schurgers LJ, Cranenburg EC, Vermeer C. Matrix Gla-protein: the calcification inhibitor in need of vitamin K. *Thromb Haemost.* 2008;100(4):593-603.
333. Schurgers LJ. Vitamin K: key vitamin in controlling vascular calcification in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2013;83(5):782-4.
334. Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(12):767-79.
335. Cheng SL, Ramachandran B, Behrmann A, Shao JS, Mead M, Smith C, et al. Vascular smooth muscle LRP6 limits arteriosclerotic calcification in diabetic LDLR^{-/-} mice by restraining noncanonical Wnt signals. *Circ Res.* 2015;117(2):142-56.
336. Cheng SL, Shao JS, Behrmann A, Krchma K, Towler DA. Dkk1 and MSX2-Wnt7b signaling reciprocally regulate the endothelial-mesenchymal transition in aortic endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(7):1679-89.
337. Olauson H, Vervloet MG, Cozzolino M, Massy ZA, Urena Torres P, Larsson TE. New insights into the FGF23-Klotho axis. *Semin Nephrol.* 2014;34(6):586-97.
338. Yamada S, Giachelli CM. Vascular calcification in CKD-MBD: Roles for phosphate, FGF23, and Klotho. *Bone.* 2016.
339. Lim K, Lu TS, Molostvov G, Lee C, Lam FT, Zehnder D, et al. Vascular Klotho deficiency potentiates the development of human artery calcification and mediates resistance to fibroblast growth factor 23. *Circulation.* 2012;125(18):2243-55.
340. Towler DA. Vascular calcification: it's all the RAGE! *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(2):237-9.

341. Hofmann Bowman MA, Gawdzik J, Bukhari U, Husain AN, Toth PT, Kim G, et al. S100A12 in vascular smooth muscle accelerates vascular calcification in apolipoprotein E-null mice by activating an osteogenic gene regulatory program. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(2):337-44.
342. Hofmann Bowman MA, Schmidt AM. S100/calgranulins EN-RAGEing the blood vessels: implications for inflammatory responses and atherosclerosis. *Am J Cardiovasc Dis.* 2011;1(1):92-100.
343. Averill MM, Kerkhoff C, Bornfeldt KE. S100A8 and S100A9 in cardiovascular biology and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(2):223-9.
344. Menini S, Iacobini C, Ricci C, Blasetti Fantauzzi C, Salvi L, Pesce CM, et al. The galectin-3/RAGE dyad modulates vascular osteogenesis in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2013;100(3):472-80.
345. Caudrillier A, Mentaverri R, Brazier M, Kamel S, Massy ZA. Calcium-sensing receptor as a potential modulator of vascular calcification in chronic kidney disease. *J Nephrol.* 2010;23(1):17-22.
346. Alam MU, Kirton JP, Wilkinson FL, Towers E, Sinha S, Rouhi M, et al. Calcification is associated with loss of functional calcium-sensing receptor in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 2009;81(2):260-8.
347. Ivanovski O, Nikolov IG, Joki N, Caudrillier A, Phan O, Mentaverri R, et al. The calcimimetic R-568 retards uremia-enhanced vascular calcification and atherosclerosis in apolipoprotein E deficient (apoE^{-/-}) mice. *Atherosclerosis.* 2009;205(1):55-62.
348. Henaut L, Boudot C, Massy ZA, Lopez-Fernandez I, Dupont S, Mary A, et al. Calcimimetics increase CaSR expression and reduce mineralization in vascular smooth muscle cells: mechanisms of action. *Cardiovasc Res.* 2014;101(2):256-65.

349. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998;12(9):1260-8.
350. Morena M, Dupuy AM, Jaussent I, Vernhet H, Gahide G, Klouche K, et al. A cut-off value of plasma osteoprotegerin level may predict the presence of coronary artery calcifications in chronic kidney disease patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(11):3389-97.
351. Collin-Osdoby P, Rothe L, Bekker S, Anderson F, Huang Y, Osdoby P. Basic fibroblast growth factor stimulates osteoclast recruitment, development, and bone pit resorption in association with angiogenesis in vivo on the chick chorioallantoic membrane and activates isolated avian osteoclast resorption in vitro. *J Bone Miner Res.* 2002;17(10):1859-71.
352. Sutra T, Morena M, Bargnoux AS, Caporiccio B, Canaud B, Cristol JP. Superoxide production: a procalcifying cell signalling event in osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells exposed to calcification media. *Free Radic Res.* 2008;42(9):789-97.
353. Byon CH, Javed A, Dai Q, Kappes JC, Clemens TL, Darley-Usmar VM, et al. Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *J Biol Chem.* 2008;283(22):15319-27.
354. Shao JS, Cheng SL, Pingsterhaus JM, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *J Clin Invest.* 2005;115(5):1210-20.
355. Lee HL, Woo KM, Ryoo HM, Baek JH. Tumor necrosis factor-alpha increases alkaline phosphatase expression in vascular smooth muscle cells via MSX2 induction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;391(1):1087-92.

356. Tintut Y, Patel J, Parhami F, Demer LL. Tumor necrosis factor- α promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. *Circulation*. 2000;102(21):2636-42.
357. Aikawa E, Nahrendorf M, Figueiredo JL, Swirski FK, Shtatland T, Kohler RH, et al. Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation*. 2007;116(24):2841-50.
358. Shanahan CM. Inflammation ushers in calcification: a cycle of damage and protection? *Circulation*. 2007;116(24):2782-5.
359. Smith ER, Ford ML, Tomlinson LA, Rajkumar C, McMahon LP, Holt SG. Phosphorylated fetuin-A-containing calciprotein particles are associated with aortic stiffness and a procalcific milieu in patients with pre-dialysis CKD. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(5):1957-66.
360. Nadra I, Mason JC, Philippidis P, Florey O, Smythe CD, McCarthy GM, et al. Proinflammatory activation of macrophages by basic calcium phosphate crystals via protein kinase C and MAP kinase pathways: a vicious cycle of inflammation and arterial calcification? *Circ Res*. 2005;96(12):1248-56.
361. Sage AP, Lu J, Tintut Y, Demer LL. Hyperphosphatemia-induced nanocrystals upregulate the expression of bone morphogenetic protein-2 and osteopontin genes in mouse smooth muscle cells in vitro. *Kidney Int*. 2011;79(4):414-22.
362. Parhami F, Tintut Y, Ballard A, Fogelman AM, Demer LL. Leptin enhances the calcification of vascular cells: artery wall as a target of leptin. *Circ Res*. 2001;88(9):954-60.
363. Zeadin M, Butcher M, Werstuck G, Khan M, Yee CK, Shaughnessy SG. Effect of leptin on vascular calcification in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(12):2069-75.

364. Coen G, Manni M, Mantella D, Pierantozzi A, Balducci A, Condo S, et al. Are PTH serum levels predictive of coronary calcifications in haemodialysis patients? *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22(11):3262-7.
365. Coen G. Calcimimetics, parathyroid hormone, and vascular calcification in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2008;74(10):1229-31.
366. Neves KR, Graciolli FG, dos Reis LM, Graciolli RG, Neves CL, Magalhaes AO, et al. Vascular calcification: contribution of parathyroid hormone in renal failure. *Kidney Int*. 2007;71(12):1262-70.
367. Braun J, Oldendorf M, Moshage W, Heidler R, Zeitler E, Luft FC. Electron beam computed tomography in the evaluation of cardiac calcification in chronic dialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 1996;27(3):394-401.
368. Adragao T, Herberth J, Monier-Faugere MC, Branscum AJ, Ferreira A, Frazao JM, et al. Low bone volume--a risk factor for coronary calcifications in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(2):450-5.
369. Barreto DV, Barreto FC, Carvalho AB, Cuppari L, Cendoroglo M, Draibe SA, et al. Coronary calcification in hemodialysis patients: the contribution of traditional and uremia-related risk factors. *Kidney Int*. 2005;67(4):1576-82.
370. London GM, Marty C, Marchais SJ, Guerin AP, Metivier F, de Vernejoul MC. Arterial calcifications and bone histomorphometry in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(7):1943-51.
371. London GM, Marchais SJ, Guerin AP, Boutouyrie P, Metivier F, de Vernejoul MC. Association of bone activity, calcium load, aortic stiffness, and calcifications in ESRD. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(9):1827-35.
372. Lindholt JS. Aneurysmal wall calcification predicts natural history of small abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis*. 2008;197(2):673-8.

373. Nakayama A, Morita H, Hayashi N, Nomura Y, Hoshina K, Shigematsu K, et al. Inverse Correlation Between Calcium Accumulation and the Expansion Rate of Abdominal Aortic Aneurysms. *Circ J*. 2016;80(2):332-9.
374. Hendy K, Gunnarsson R, Cronin O, Golledge J. Infra-renal abdominal aortic calcification volume does not predict small abdominal aortic aneurysm growth. *Atherosclerosis*. 2015;243(1):334-8.
375. Buijs RV, Willems TP, Tio RA, Boersma HH, Tielliu IF, Slart RH, et al. Calcification as a risk factor for rupture of abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2013;46(5):542-8.
376. Heilmaier C, Koester A, Moysidis T, Weishaupt D, Kroger K. Abdominal aortic calcification and its distribution in normal-sized and aneurysmatic abdominal aortas. *Vasa*. 2014;43(2):132-40.
377. Li ZY, J UK-I, Tang TY, Soh E, See TC, Gillard JH. Impact of calcification and intraluminal thrombus on the computed wall stresses of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 2008;47(5):928-35.
378. Volokh KY, Aboudi J. Aneurysm strength can decrease under calcification. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2016;57:164-74.
379. O'Leary SA, Mulvihill JJ, Barrett HE, Kavanagh EG, Walsh MT, McGloughlin TM, et al. Determining the influence of calcification on the failure properties of abdominal aortic aneurysm (AAA) tissue. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2015;42:154-67.
380. Terzian Z, Gasser TC, Blackwell F, Hyafil F, Louedec L, Deschildre C, et al. Peristrut microhemorrhages: a possible cause of in-stent neoatherosclerosis? *Cardiovasc Pathol*. 2017;26:30-8.

381. Wang Y, Krishna S, Golledge J. The calcium chloride-induced rodent model of abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis*. 2013;226(1):29-39.
382. Yu SY, Blumenthal HT. The Calcification of Elastic Fiber. 4. Epinephrine and Beta-Aminopropionitrile-Induced Calcification in Animal Aortas. *J Atheroscler Res*. 1965;5(2):159-73.
383. Schurgers LJ, Spronk HM, Soute BA, Schiffrers PM, DeMey JG, Vermeer C. Regression of warfarin-induced medial elastocalcinosis by high intake of vitamin K in rats. *Blood*. 2007;109(7):2823-31.
384. Anidjar S, Salzman JL, Gentric D, Lagneau P, Camilleri JP, Michel JB. Elastase-induced experimental aneurysms in rats. *Circulation*. 1990;82(3):973-81.
385. Marbacher S, Marjamaa J, Bradacova K, von Gunten M, Honkanen P, Abo-Ramadan U, et al. Loss of mural cells leads to wall degeneration, aneurysm growth, and eventual rupture in a rat aneurysm model. *Stroke*. 2014;45(1):248-54.
386. Trachet B, Fraga-Silva RA, Jacquet PA, Stergiopoulos N, Segers P. Incidence, severity, mortality, and confounding factors for dissecting AAA detection in angiotensin II-infused mice: a meta-analysis. *Cardiovasc Res*. 2015;108(1):159-70.
387. Kurihara T, Shimizu-Hirota R, Shimoda M, Adachi T, Shimizu H, Weiss SJ, et al. Neutrophil-derived matrix metalloproteinase 9 triggers acute aortic dissection. *Circulation*. 2012;126(25):3070-80.
388. Freise C, Kretzschmar N, Querfeld U. Wnt signaling contributes to vascular calcification by induction of matrix metalloproteinases. *BMC Cardiovasc Disord*. 2016;16(1):185.
389. Zhao YG, Meng FX, Li BW, Sheng YM, Liu MM, Wang B, et al. Gelatinases promote calcification of vascular smooth muscle cells by up-regulating bone morphogenetic protein-2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;470(2):287-93.

390. Hecht E, Freise C, Websky KV, Nasser H, Kretzschmar N, Stawowy P, et al. The matrix metalloproteinases 2 and 9 initiate uraemic vascular calcifications. *Nephrol Dial Transplant*. 2016;31(5):789-97.
391. Krasniak A, Drozd M, Pasowicz M, Chmiel G, Michalek M, Szumilak D, et al. Factors involved in vascular calcification and atherosclerosis in maintenance haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22(2):515-21.
392. Wong ND, Gransar H, Narula J, Shaw L, Moon JH, Miranda-Peats R, et al. Myeloperoxidase, subclinical atherosclerosis, and cardiovascular disease events. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2009;2(9):1093-9.
393. Dobrin PB, Schwarcz TH, Baker WH. Mechanisms of arterial and aneurysmal tortuosity. *Surgery*. 1988;104(3):568-71.
394. Dobrin PB, Canfield TR. Elastase, collagenase, and the biaxial elastic properties of dog carotid artery. *Am J Physiol*. 1984;247(1 Pt 2):H124-31.
395. Beridze N, Frishman WH. Vascular Ehlers-Danlos syndrome: pathophysiology, diagnosis, and prevention and treatment of its complications. *Cardiol Rev*. 2012;20(1):4-7.
396. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med*. 2004;351(13):1296-305.
397. Romero JM, Bover J, Fite J, Bellmunt S, Dilme JF, Camacho M, et al. The Modification of Diet in Renal Disease 4-calculated glomerular filtration rate is a better prognostic factor of cardiovascular events than classical cardiovascular risk factors in patients with peripheral arterial disease. *J Vasc Surg*. 2012;56(5):1324-30.
398. Goodman WG, London G, Amann K, Block GA, Giachelli C, Hruska KA, et al. Vascular calcification in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis*. 2004;43(3):572-9.

399. Shobeiri N, Adams MA, Holden RM. Vascular calcification in animal models of CKD: A review. *Am J Nephrol*. 2010;31(6):471-81.
400. Dilme JF, Bellmunt S, Camacho M, Sola-Villa D, Romero JM, Escudero JR, et al. Influence of cardiovascular risk factors on levels of matrix metalloproteinases 2 and 9 in human abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2014;48(4):374-81.
401. Ejerblad S, Eriksson I, Johansson H. Uraemic arterial disease. An experimental study with special reference to the effect of parathyroidectomy. *Scand J Urol Nephrol*. 1979;13(2):161-9.
402. Simpson CF, Boucek RJ. The B-aminopropionitrile-fed turkey: a model for detecting potential drug action on arterial tissue. *Cardiovasc Res*. 1983;17(1):26-32.
403. Boucek RJ, Gunja-Smith Z, Noble NL, Simpson CF. Modulation by propranolol of the lysyl cross-links in aortic elastin and collagen of the aneurysm-prone turkey. *Biochem Pharmacol*. 1983;32(2):275-80.
404. Strickland HL, Bond MG. Aneurysms in a large colony of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Lab Anim Sci*. 1983;33(6):589-92.
405. Baer JF, Gibson SV, Weller RE, Buschbom RL, Leathers CW. Naturally occurring aortic aneurysms in owl monkeys (*Aotus spp.*). *Lab Anim Sci*. 1992;42(5):463-6.
406. Sleeper MM, Durando MM, Miller M, Habecker PL, Reef VB. Aortic root disease in four horses. *J Am Vet Med Assoc*. 2001;219(4):491-6, 59.
407. Boulineau TM, Andrews-Jones L, Van Alstine W. Spontaneous aortic dissecting hematoma in two dogs. *J Vet Diagn Invest*. 2005;17(5):492-7.
408. Lourenco ML, Vailati MC, Luis junior AM, Jr., Sequeira JL, Peres JA, Gimenes SM. Dissecting aortic aneurysm in a cat. *Can Vet J*. 2002;43(9):720-1.

409. Simoens P, Vercruysse J, De Jonghe S, Ducatelle R. Thoracoabdominal aortic aneurysm in two ponies. *Vet Rec.* 1999;145(23):675-6.
410. Ferreras MC, Gonzalez J, Perez V, Reyes LE, Gomez N, Perez C, et al. Proximal aortic dissection (dissecting aortic aneurysm) in a mature ostrich. *Avian Dis.* 2001;45(1):251-6.
411. Miller DL, Schrecengost J, Kilgo J, Ray HS, Miller KV. Ruptured aortic aneurysm in a coyote (*Canis latrans*) from South Carolina. *J Zoo Wildl Med.* 2007;38(3):492-4.
412. Rotstein DS, Taylor SK, Bossart GD, Miller D. Dissecting thoracoabdominal aortic aneurysm in a free-ranging Florida panther (*felis concolor coryi*). *J Zoo Wildl Med.* 2000;31(2):208-10.