



**HAL**  
open science

# Exploration et modulation du récepteur TREM-1 dans le développement de l'anévrisme de l'aorte abdominale expérimental

Marie Vandestienne

► **To cite this version:**

Marie Vandestienne. Exploration et modulation du récepteur TREM-1 dans le développement de l'anévrisme de l'aorte abdominale expérimental. Physiologie [q-bio.TO]. Université Paris Cité, 2020. Français. NNT : 2020UNIP5070 . tel-04097493

**HAL Id: tel-04097493**

**<https://theses.hal.science/tel-04097493v1>**

Submitted on 15 May 2023

**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.



Université de Paris

École Doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (BioSPC-ED562)

**EXPLORATION ET MODULATION DU RÉCEPTEUR  
TREM-1 DANS LE DÉVELOPPEMENT DE L'ANÉVRISME  
DE L'AORTE ABDOMINALE EXPÉRIMENTAL**

**Par Marie Vandestienne**

Thèse de doctorat de Physiologie et Physiopathologie  
Dirigée par : **Pr Hafid Ait-Oufella**

Présentée et soutenue publiquement le 16 septembre 2020

Devant un jury composé de :

Pr Giulia Chinetti, PU-PH, Université de Nice - Sophia Antipolis, Rapporteur

Dr Patrick Lacolley, DR, Université de Lorraine, Rapporteur

Pr Patrick Bruneval, PU-PH, Université de Paris, Examineur

Dr Alexandre Boissonnas, CR-HDR, Sorbonne Université, Examineur

Pr Yves Castier, PU-PH, Université de Paris, Examineur

Pr Hafid Ait-Oufella, PU-PH, Sorbonne Université, Directeur de thèse



Except where otherwise noted, this is work licensed under  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Ce projet de thèse a été financé par le D.H.U. « Pathologies artérielles rares et communes », dirigé par le Pr Philippe Menasché, à l'Hôpital Européen Georges Pompidou. Il a été réalisé au sein de l'équipe 5 « Mécanismes immuno-métaboliques des maladies cardiovasculaires », dirigée par le Pr Hafid Ait-Oufella et le Pr Ziad Mallat, au Paris Centre de Recherche Cardiovasculaire (PARCC), INSERM U970.

# REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, les Pr **Giulia Chinetti** et Dr **Patrick Lacolley** pour avoir relu et apporté leurs remarques constructives sur mon manuscrit de thèse, les Pr **Patrick Bruneval** et **Yves Castier** et le Dr **Alexandre Boissonnas** pour avoir accepté de faire partie de ce jury et de juger ce travail de thèse.

Je remercie les Dr **Alain Tedgui** et **Ziad Mallat**, pour m'avoir il y a longtemps maintenant accueillie dans l'équipe 5. Alain, merci pour votre rayonnement positif sur l'ensemble du PARCC, pour votre gentillesse, votre bienveillance et l'intérêt que vous portez à nos projets de recherche. Alain, Ziad, pouvoir profiter de votre expérience et de vos opinions scientifiques est une vraie chance pour les futurs chercheurs que nous, les étudiants en thèse, aspirons à devenir.

A mon directeur de thèse, le Pr **Hafid Ait-Oufella**, un immense MERCI. Après toutes ces années, difficile de savoir par où commencer... Merci d'avoir cru en moi, d'avoir su me réconcilier avec mes aspirations de toujours et de m'avoir offert la possibilité de les réaliser. J'ai énormément grandi et appris à tes côtés, avec la volonté d'être à la hauteur de ton exigence, de ton optimisme et de ton dynamisme sans faille (c'est chaud, c'est chaud, c'est chaud !!). Je me suis enrichie de nos différences, je crois que notre complémentarité a été une vraie force dans l'aboutissement de ce projet, merci de m'avoir montré tous les jours qu'il faut profiter et apprendre de tout, dans les bons comme dans les moins bons moments. Merci aussi pour toutes ces parenthèses « off-science » que tu as partagées avec nous, merci de m'avoir permis de participer à tous ces congrès, de m'avoir fait découvrir San Francisco, ces moments resteront précieux pour moi. Merci d'avoir été aussi présent et à l'écoute, ton désir de transmettre et nos nombreuses discussions contribuent jour après jour à l'épanouissement de mon esprit critique et à l'affirmation de mes idées, et grâce à toi je me sens maintenant prête à affronter la suite. Comme tu le dis toujours, la vie est faite de chemins qui se rencontrent, et je suis tellement contente que les nôtres se soient croisés, ma vie n'aurait assurément pas été la même sinon...Je te souhaite le meilleur, dans tout ce que tu entreprendras !

J'aimerais remercier tous les membres de mon équipe de recherche. Au Dr **Soraya Taleb**, merci d'avoir donné sa chance à la jeune diplômée sans expérience que j'étais il y a 6 ans, je n'ai jamais été aussi contente d'avoir obtenu une mention au bac ! Merci au Dr **Stéphane Potteaux**, pour son humour (grandement apprécié !) et pour son calme sans faille, je te souhaite beaucoup de bonheur dans ta nouvelle vie. Je vous remercie toutes les deux pour vos conseils et nos discussions enrichissantes sur ce projet, durant les labmeetings ou au labo.

A celle avec qui j'ai traversé toutes les étapes de la thèse main dans la main, **Yujiao Zhang** (ou devrais-je dire Dr Zhang !), merci pour ton amitié, pour ton soutien, pour ta patience quand tu as répondu 50 fois à la même question que je te posais quand je perdais la mienne devant tel ou tel document administratif à remplir, pour tous ces moments que l'on a partagés, jusqu'au plus beau qui était d'apprendre que tu allais devenir maman. Je suis heureuse d'avoir vécu tout cela avec toi, puis en trio avec l'arrivée de notre crazy espagnole préférée, **Icia Santos Zas**. Les filles, c'était un vrai bonheur de travailler tous les jours avec vous, dans notre bulle, une belle alchimie que je ne suis pas prête d'oublier et qui va énormément me manquer ! Icia, 3 ans et pourtant j'ai l'impression que l'on se connaît depuis toujours. Merci d'avoir été pour moi d'un soutien inconditionnel ces dernières années, d'avoir toujours fait l'effort de comprendre, d'anticiper et d'essayer de m'expliquer ce par quoi j'allais passer, ce qui m'a considérablement aidée à aller au-devant des nombreux aléas de la thèse. Merci pour toutes ces expressions bien à toi qui nous ont tellement fait rire (spleCnocytes, filantro, until here, and a lot of things that I cannot write here...), je garde en mémoire tous ces supers moments que l'on a partagés en dehors du labo, notre escapade à Vienne toutes les 3, notre colocation à Biarritz, notre journée à Roland et tous les autres... Merci d'être telle que tu es, entière, intelligente et tellement drôle, ne change rien, jamais !!!

**Rida Al-Rifai**, Clash-Rifai, Blase-Rifai ou encore Joke-Rifai, merci pour ton aide durant toute cette dernière année, pour ta gentillesse et cette belle ouverture d'esprit qui te caractérise, je suis contente de t'avoir rencontrée. Je te souhaite plein de courage pour finir tout ce que nous avons commencé ensemble au labo, et plein de bonheur en dehors, et surtout continue de poursuivre tes rêves ! Merci à **Jean-Rémi Lavillegrand**, pour ton amitié depuis toutes ces années, je te souhaite le meilleur dans tout ce qui t'attend, la médecine, la recherche et surtout dans ton nouveau rôle de papa. Tous les deux vous êtes la relève de la team HAO, je compte sur vous pour prendre soin de la famille ! Merci **Bruno Esposito**, de m'avoir transmis ton savoir expérimental, ça a été un vrai plaisir de te côtoyer au labo pendant toutes ces années, nos petites prises de bec vont me manquer. J'ai une pensée pour les étudiants que j'ai pu encadrer au cours de ma thèse et qui m'ont chacun appris quelque chose, **Stéphanie Depinay**, **Gaspard de Moustier**, et bien sûr **Manon Marault**, Madame Marault, mon lab baby, je suis tellement contente d'avoir pu partager quelques mois au labo avec toi, et tellement fière de ta réussite depuis, ce n'est que le début !! Enfin je remercie tous les membres de l'équipe 5 que j'ai côtoyés pendant toutes ces années, **Nada Joe Melhem**, bonne chance pour la soutenance et pour l'avenir, **Ludivine Laurans**, **Mouna Chajadine**, **Dima Kharrat**, **Nadine Suffee**, **Rhita Lamtahri**, **Florent Happe**, **Nathalie Fournier**, je vous souhaite le meilleur pour la suite.

**Jose Vilar**, tu as ma reconnaissance infinie !! Merci pour ton aide pour absolument tous les problèmes que j'ai pu rencontrer au labo, pour les problèmes techniques que tu m'as aidée à résoudre, pour toutes nos discussions scientifiques qui m'ont ouvert les yeux et l'esprit, pour tes précieux conseils sur l'avenir,

j'ai de la chance de t'avoir eu à mes côtés mais ne crois pas que tu vas te débarrasser de moi comme ça, j'aurais toujours besoin de tes précieux conseils, peu importe où et quand !

A mes amis du BDE, **Stephane Mazlan** et **Shruti Shatterjee**, merci d'avoir été invariablement présents, vous avez rendu ces dernières années de thèse bien plus belles, vous êtes drôles, intelligents et merveilleusement humains. Steph, j'espère que tu penseras toujours à moi quand tu mangeras des oignons et Shrut's, continue de chanter Marie Madeleine, ça te va tellement bien. Ici, Steph, Shruti, Cici, à qui j'associe également Michael et Ran, je me sens tellement chanceuse de vous avoir rencontrés et d'avoir pu m'enrichir de notre diversité au quotidien dans notre BDE et en dehors, on a vécu tellement de choses tous ensemble que je peux difficilement n'en citer que quelques-uns. Votre venue jusqu'au bout du monde dans ma Bretagne natale restera un de mes meilleurs souvenirs. I love you guys, BDE squad forever !

Je voudrais aussi remercier les anciens membres des différentes équipes du PARCC, qui pour la plupart sont devenus de vrais amis. **Ivana Zlatanova**, mon petit chou, quel bonheur de t'avoir dans ma vie, tu m'as manqué tous les jours ici depuis que tu es partie ! Merci pour ton soutien, ton amitié et ta bonne humeur qui me fait toujours tellement de bien ! Je t'aime. Un immense merci à **Andréas Giraud**, de m'avoir tout appris ou presque de l'anévrisme, d'avoir été un super voisin de bureau, et d'être aujourd'hui un ami fidèle, avec qui on passe toujours de supers moments. **Jérémy Joffre**, merci pour ton soutien et ta bienveillance depuis toujours, tes coups de pouce dès que tu le pouvais, et pour tous ces moments que l'on a partagés depuis ton départ en dehors du labo. **Yacine Haddad**, pour ta gentillesse infinie et ton incroyable esprit de solidarité. **Anna Chipont**, pour ton aide, ton esprit d'initiative, ta motivation et ton dynamisme sans faille, c'était un plaisir de travailler à tes côtés. Merci à toutes les personnes avec qui j'ai partagé un bout de chemin au PARCC, **Lynda Zeboudj**, **Johanne Poisson**, **Marouane Kheloufi**, **Adel Hammoutene**, **Mélanie Montabard**, **Wared Nour-Eldine**, **Jérémy Lemarié**, **Martin Steinmetz**, **Safa Mellak**, **Bamba Gaye**, **Raphaël Cohen**, **Juliette Lasselin**, **Dominique Charue**.

Un grand merci à tous les PI du PARCC qui ont à un moment ou à un autre apporté leurs conseils et leur regard bienveillant sur ce projet, **Jean-Sébastien Silvestre**, **Eric Camerer**, **Pierre-Louis Tharaux**, **Nabila Bouatia-Naji**, et bien sûr **Xavier Loyer**, merci pour tous tes conseils et ton soutien, pour les manips et pour le reste, même si tu as souvent pris un malin plaisir à venir m'embêter, je suis très contente de t'avoir rencontré.

Un immense merci à l'ensemble des membres de l'animalerie, sans qui tout ce travail chez l'animal n'aurait pas pu être possible, **Nicolas Perez**, pour ta gentillesse, ta bonne gestion et ta capacité à toujours trouver des solutions arrangeantes pour tout le monde, **Aziz Taouri**, pour ta disponibilité, ton amour du

travail bien fait et ta gentillesse, **Françoise Ruelle**, pour ta patience et ton dévouement pour nos animaux et la bonne réussite de nos expériences, c'était un vrai plaisir de travailler avec vous tous les jours. Merci également à tous les autres membres de l'animalerie, **Gwendoline Luqué** pour ton sourire, **Angélique Fournet**, **Guillaume Gueguin** et **Dominique Mace**, pour son travail avec les animaux au départ et pour la gestion de l'entretien du PARCC par la suite ! Je voudrais remercier chaleureusement **Stéphanie Lamoureux**, pour son sourire, son incroyable travail ainsi que sa gestion rigoureuse du magasin et de la laverie, merci de ton aide tout au long de ma thèse. Merci aux responsables des plateformes du PARCC que j'ai pu côtoyer et qui m'ont apporté leur aide dans ce travail, **Corinne Lesaffre**, **Camille Brunaud**, et **Camille Knosp**. Un immense merci à tous les membres de l'administration, **Véronique Oberweis**, merci d'avoir toujours réglé nos petits (ou plus gros) soucis de commande, merci pour ton amitié, pour ta générosité, ta réactivité et ton amour du travail bien fait, je te souhaite plein de bonheur pour la suite. Merci à **Muriel Delacroix** pour ta gentillesse et ton sourire, à **Annette De Rueda** pour ta bonne humeur, à **Bruno Pillard**, **Cyrille Mahieux**, **Philippe Coudol**, et **Martine Jolibis** pour tous les colis gentiment réceptionnés.

Je remercie tous les collaborateurs qui ont participé à ce projet ou avec qui j'ai eu la chance de travailler sur d'autres projets, **Coralie Guerin** et **Léa Guyonnet**, pour leur expertise et leur aide pour l'obtention des données de Cytof, **Alexandre Boissonnas** et **Marie Laviron** pour les essais de microscopie intravitale, **Juliette Raffort** pour les dosages de sTREM-1 chez l'homme, **Tristan Mirault**, pour toutes les séances d'échos ainsi que pour sa gentillesse et sa bonne humeur, **Irmine Ferreira**, pour sa gentillesse et sa disponibilité, **Patrick Bruneval** pour la qualité des immunomarquages humains et pour sa gentillesse.

A mes amis, ceux de toujours qui m'accompagnent depuis la Bretagne, et ceux que j'ai rencontrés dans ma vie parisienne. **Justine**, **Nolwenn** et **Margaux**, mes poulettes, vous avoir toujours à mes côtés après toutes ces années (et mon mauvais caractère) est une vraie chance, je vous aime infiniment. Je suis tellement heureuse de vous voir évoluer pour le meilleur dans vos vies, accompagnées de vos hommes **Arthur**, **Glenn** et **Jessy**. **Laura** et **Tristan**, merci pour votre amitié sans faille pendant toutes ces années, votre soutien, et pour le réconfort que m'apporte chaque visite. **Marylou**, avec qui j'ai partagé quasiment toutes les grandes étapes de ma vie, merci d'être toujours là. **Marie**, **Maxou** et **Toinou**, merci pour toutes ces pauses à Tournan ou à Joinville, tellement appréciées dans l'emploi du temps de fou qui a été le mien ces dernières années. Merci à tous ceux que je ne peux citer ici mais qui ont été présents à un moment ou à un autre, vous avez chacun participé à votre façon au chemin qui m'a menée jusqu'ici.

A ma famille, Maman, Papa, merci pour votre amour, pour m'avoir laissée suivre ma voie et pour m'avoir toujours soutenue, merci pour l'éducation que vous m'avez donnée, je me rends compte aujourd'hui que c'est certainement ma plus belle arme dans la vie. A Théo et Juliette, mes complices de

toujours, je suis tellement fière de vous. A Malo et Titouan, j'adore vous voir grandir et devenir les merveilleux petits garçons que vous êtes, sous l'œil tendre et plein d'amour de Magali. A Lulu, qui fait maintenant partie de la famille. A mes grands-parents, Mamie, Papy, Bonne-Maman, Pépé, pour avoir été, chacun à votre façon, des modèles pour moi depuis toujours.

Enfin à Erwan, mon âme sœur, je ne pourrais jamais assez te remercier pour ta patience, pour ton indulgence, pour ton soutien ces dernières années. Merci de m'avoir fait rire tous les jours, d'avoir été pour moi cette bulle de bonheur qui m'a permis d'oublier les journées plus difficiles. Merci de me laisser vivre mes rêves, leur réalisation n'est que plus belle avec toi à mes côtés. J'ai tellement hâte de vivre toutes les nouvelles aventures qui nous attendent ensemble.

Tout est émotion sinon rien...

## Table des matières

I. INTRODUCTION.....	15
A. Généralités sur les maladies cardiovasculaires .....	15
1. Épidémiologie .....	15
2. Le système cardiovasculaire.....	15
a) Généralités.....	15
b) Les vaisseaux sanguins.....	17
B. L'aorte : Structure, composition, remodelage .....	18
1. Anatomie de l'aorte .....	18
2. Organisation structurale de la paroi artérielle .....	19
a) L' <i>intima</i> .....	19
b) La <i>media</i> .....	20
c) L' <i>adventice</i> .....	21
3. Structure de la matrice extracellulaire.....	22
a) L'élastine .....	22
b) Les collagènes .....	23
c) Les protéoglycanes .....	24
d) Les glycoprotéines de structure.....	24
4. Remaniement de la matrice extracellulaire .....	25
a) Les métalloprotéinases matricielles (MMPs).....	26
b) Autres protéases .....	29
c) Les inhibiteurs .....	30
C. L'Anévrisme de l'Aorte Abdominale (AAA) .....	31
1. Définition, épidémiologie et facteurs de risque .....	31
2. Diagnostic et Traitements.....	34
a) Dépistage et critères décisionnels pour le traitement chirurgical.....	34
b) La chirurgie conventionnelle.....	36

c)	Le traitement endovasculaire (EVAR).....	36
d)	À la recherche d'un traitement pharmacologique .....	37
e)	Identification de biomarqueurs associés à l'AAA.....	39
3.	Les modèles animaux d'AAA .....	39
a)	Infusion continue d'Angiotensine II .....	40
(1)	Le système rénine-angiotensine .....	40
(2)	Principaux effets de l'AngII sur la paroi vasculaire.....	42
(3)	Un modèle expérimental d'AAA .....	44
b)	Infusion continue d'Angiotensine II et neutralisation du TGF- $\beta$ .....	45
c)	Application péri-aortique de CaCl <sub>2</sub> .....	46
d)	Perfusion intra-luminale d'élastase .....	47
e)	Application péri-aortique d'élastase.....	48
f)	Application péri-aortique d'élastase et neutralisation du TGF- $\beta$ .....	49
4.	Autres pathologies aortiques et maladies syndromiques.....	50
a)	Anévrismes de l'aorte thoracique non-syndromiques et dissections aortiques....	50
b)	Maladies Syndromiques .....	52
(1)	Le syndrome de Marfan .....	52
(2)	Syndrome de Loeys-Dietz.....	54
(3)	Syndrome d'Ehler-Danlos vasculaire.....	55
D.	L'AAA, une pathologie inflammatoire chronique de la paroi aortique .....	56
1.	Infiltration inflammatoire .....	57
a)	Rôle de l'immunité innée .....	58
(1)	Les monocytes/macrophages.....	58
(2)	Les polynucléaires neutrophiles .....	60
(3)	Les mastocytes .....	61
(4)	Les cellules Natural Killers (NK).....	62
(5)	Les cellules dendritiques (DC).....	62

b)	Rôle de l'immunité adaptative .....	62
(1)	Les lymphocytes B .....	62
(2)	Les lymphocytes T .....	63
c)	Les cytokines .....	65
2.	Remodelage de la matrice extracellulaire .....	68
a)	Dégradation des composants de la MEC.....	68
b)	Rôle des MMPs .....	70
c)	Implication d'autres protéases.....	73
3.	Perte des CML et destruction de la <i>media</i> .....	75
4.	Participation du thrombus .....	77
E.	Les monocytes/macrophages.....	78
1.	Les monocytes.....	78
a)	Sous-populations monocytaires chez l'homme.....	79
b)	Sous-populations monocytaires chez la souris.....	81
c)	Développement des monocytes et trafic en conditions homéostatiques .....	82
d)	Trafic monocyttaire dans le contexte de l'AAA : mobilisation et recrutement dans la paroi aortique.....	84
(1)	Cinétique et origine de la mobilisation des monocytes.....	84
(2)	Axes chimiokine-chimiokine récepteur .....	86
(3)	Recrutement des monocytes : interaction avec l'endothélium.....	88
(a)	La capture et le <i>rolling</i> - Les sélectines.....	88
(b)	L'adhésion ferme et la transmigration – les intégrines .....	89
e)	Les macrophages .....	90
(1)	Origine des macrophages dans la paroi aortique.....	90
(2)	Hétérogénéité phénotypique des macrophages dans la paroi anévrismale ..	91
F.	TREM-1, un puissant régulateur de la réponse immune innée .....	94
1.	Généralités.....	94

2.	Activation et amplification de la réponse immune innée.....	95
a)	Engagement de TREM-1 et synergie avec la signalisation TLR.....	95
b)	TREM-1 et NLRs.....	98
c)	Identification du/des ligand(s) naturel(s) de TREM-1.....	98
d)	La modulation de la voie TREM-1.....	99
e)	Libération d'une forme soluble de TREM-1.....	100
3.	Implication en pathologie.....	101
a)	TREM-1 et pathologies septiques.....	101
b)	Implication dans de nombreuses pathologies inflammatoires stériles.....	103
II.	OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE.....	107
III.	ARTICLE.....	108
IV.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	153
V.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	159

## Liste des abréviations :

AAA : Anévrisme de l'aorte abdominale  
ACE : *Angiotensin-Converting Enzyme*  
ADAM : *A Disintegrin And Metalloproteinase*  
ADAM-TS : *A Disintegrin And Metalloproteinase with thrombospondin motifs*  
AngII : Angiotensine II  
ARAI : Antagonistes des récepteurs de l'angiotensine  
AT<sub>1</sub>R : *Angiotensin Type 1 Receptor*  
AT<sub>2</sub>R : *Angiotensin Type 2 Receptor*  
BAPN : Beta-aminopropionitrile  
CCL : *C-C motif Chemokine Ligand*  
CE : Cellule Endothéliale  
CD : *Cluster of Differentiation*  
CML : Cellule Musculaire Lisse  
CXCL : *C-X-C motif Chemokine Ligand*  
EDP : *Elastin-Derived Peptides*  
ERK : *Extracellular signal-Related Kinase*  
EVAR : *Endovascular repair*  
FAK : *Focal Adhesion Kinase*  
GAG : Glycosaminoglycane  
HMGB1 : *High-mobility group box 1*  
HSP70 : *Heat-Shock Protein 70*  
ICAM-1 : *Intercellular Adhesion Molecule-1*  
IECs : Inhibiteurs de l'enzyme de conversion  
Ig : Immunoglobuline  
IL : *Interleukin*  
IFN- $\gamma$  : Interferon gamma  
JNK : *c-Jun N terminal Kinase*  
LDL : *Low Density Lipoprotein*  
LFA : *Lymphocyte Function-associated Antigen*  
LOX : Lysyl-oxydase  
LPS : Lipopolysaccharide  
MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*  
MCP-1 : *Monocyte Chemoattractant Protein-1*  
MEC : Matrice extracellulaire  
MMP : *Matrix Metalloproteinase*  
MT-MMP : *Membrane-Type MMP*  
NF- $\kappa$ B : *Nuclear Factor-kappa B*  
NO : *Nitric Oxide*  
NOS : *Nitric Oxide Synthase*  
OSR : *Open Surgical Repair*  
PAI : *Plasminogen Activator Inhibitor*  
PG : Protéoglycane  
PGLYRP1 : *Peptidoglycan recognition protein 1*  
PI3K : *Phosphatidyl Inositol-3 Kinase*  
RANTES : *Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted*  
SMA : *Smooth Muscle Actin*

SM-MHC : *Smooth Muscle Myosin Heavy Chain*  
TGF- $\beta$  : *Tumor Growth Factor-beta*  
TIL : *Thrombus intra-luminal*  
TLR : *Toll-Like Receptor*  
TIMP : *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase*  
tPA : *Tissue Plasminogen Activator*  
TNF- $\alpha$  : *Tumor Necrosis Factor-alpha*  
TREM-1 : *Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1*  
TSP-1: *Thromspondin-1*  
uPA : *Urokinase-like Plasminogen Activator*  
VCAM-1 : *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*  
VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*  
VLA-4 : *Very Late Antigen-4*

# I. INTRODUCTION

## A. Généralités sur les maladies cardiovasculaires

### 1.Épidémiologie

Les maladies cardiovasculaires regroupent les affections aiguës ou chroniques du cœur et des vaisseaux et sont actuellement la première cause de mortalité dans le monde, représentant 17,8 millions de décès/an en 2017, soit 31% des causes de décès. Les principaux facteurs de risque associés aux maladies cardiovasculaires sont l'hypercholestérolémie, le tabagisme, l'hypertension artérielle, la sédentarité et l'âge. L'aspect multifactoriel et le caractère chronique de ces pathologies rendent leur prise en charge complexe et coûteuse. Malgré une diminution du taux de mortalité chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires d'environ 10% ces 10 dernières années, leur incidence continue d'augmenter, parallèlement à la croissance démographique et au vieillissement de la population, entraînant une augmentation du nombre total de décès dans le monde de 21,1% depuis 2007<sup>1</sup>. En France, les maladies cardiovasculaires sont la 1<sup>ère</sup> cause de décès chez les femmes, et la 2<sup>e</sup> cause de décès chez les hommes derrière les cancers et parmi ces maladies, l'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA), qui représente la 13<sup>e</sup> cause de mortalité dans les pays développés, est responsable d'environ 10 000 hospitalisations et 2000 décès/an en France d'après les données de l'Agence Nationale de Santé Publique française.

### 2.Le système cardiovasculaire

#### a) Généralités

Le système cardio-vasculaire est composé du cœur et des vaisseaux sanguins, qui forment un circuit fermé, permettant de distribuer le sang oxygéné et chargé en nutriments et hormones nécessaires au fonctionnement de tous les organes du corps dans un sens, et à éliminer les déchets métaboliques dans l'autre. Le sang est constitué d'une composante liquide, le plasma (eau, ions, glucides, lipides et protéines) dans lequel baignent les différents éléments figurés du sang comme les globules rouges ou érythrocytes (qui permettent *via* l'hémoglobine le transport des substances gazeuses), les globules blancs ou leucocytes (granulocytes, lymphocytes et monocytes) et les plaquettes ou thrombocytes qui jouent un rôle primordial dans la cascade de coagulation du sang. Le sang est donc non seulement vecteur de substances nécessaires au

fonctionnement de l'organisme, mais il constitue également une voie de passage pour le déplacement des cellules inflammatoires d'un compartiment à un autre.

Le cœur agit comme une pompe, qui permet la distribution du sang dans deux circuits complémentaires : la circulation systémique ou grande circulation, dans laquelle le sang oxygéné sort du cœur par le ventricule gauche et est conduit par le réseau artériel composé de l'artère aorte et de ses branches de division, pour irriguer l'ensemble des tissus du corps. Après passage dans les tissus, le sang appauvri en oxygène est acheminé jusqu'au cœur par le réseau veineux, et distribué dans la circulation pulmonaire ou petite circulation pour être enrichi en oxygène au niveau des alvéoles pulmonaires avant de repartir dans la circulation systémique [Figure 1].

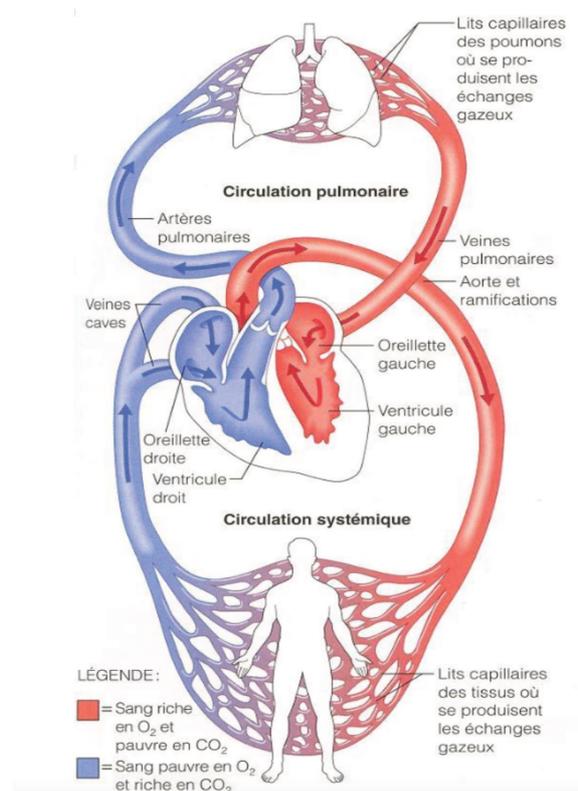


Figure 1 : Schéma du système cardiovasculaire

## b) Les vaisseaux sanguins

Le système vasculaire est un réseau ramifié complexe et constitué de vaisseaux de différents calibres et compositions, leur permettant d'assurer leurs fonctions en adéquation avec les conditions physiologiques et mécaniques dans lesquelles ils se trouvent. En effet, les **artères** de gros calibres donnent naissance à de nombreuses ramifications de plus petits calibres, les **artérioles**, qui amènent le sang jusqu'aux organes, à l'intérieur desquels elles se connectent aux **capillaires** sanguins, aux très petits calibres et aux parois fines, permettant la diffusion de l'oxygène et des nutriments aux organes. Après passage dans le tissu, le sang ressort par les capillaires pour se jeter dans les **veinules**, puis dans les **veines** qui vont le ramener jusqu'au cœur.

Les **artères de gros calibre**, dites élastiques, sont des artères de conduction, elles ont une paroi épaisse contenant une importante quantité d'élastine, organisée en un réseau lamellaire de plusieurs couches, qui leur permet de résister et de s'adapter à la pulsativité cardiaque et aux fortes contraintes de pression exercées par le sang à la sortie du cœur. Les **artères de moyen** ou **petit calibre**, dites musculaires, sont des vaisseaux de distribution. Elles sont plus petites, moins riches en élastine (10%), et principalement composées de cellules musculaires lisses leur permettant d'ajuster leur diamètre pour maintenir le débit sanguin. Les **artérioles** ont un diamètre inférieur à 0,5mm et une composition similaire à celle des artères musculaires, elles sont innervées par le système nerveux sympathique, et sont responsables du phénomène de résistance périphérique, contribuant à la régulation de la pression artérielle. La connexion entre le système artériel et le système veineux est réalisée par un réseau de **capillaires** au niveau des tissus. La finesse de leur paroi, inférieure à 10 $\mu$ m, composée d'une couche de cellules endothéliales et d'une lame basale, associée à la faible vitesse d'écoulement du sang dans ces vaisseaux de petit diamètre favorisent les échanges gazeux et métaboliques entre le sang et les tissus. Les **veines** ramènent le sang chargé en déchets gazeux et métaboliques jusqu'au cœur de façon passive. Elles n'ont pas de capacité de contraction mais sont capables de se dilater pour absorber l'effet d'une augmentation du volume sanguin sans affecter la pression artérielle. Leur paroi est soumise à une contrainte de pression beaucoup moins importante que celle des artères, elle est de ce fait plus mince, extensible et plus riche en tissu conjonctif. Le système veineux est équipé de valvules anti-reflux au niveau des membres inférieurs, n'autorisant la circulation du sang que dans un sens.

## B. L'aorte : Structure, composition, remodelage

### 1. Anatomie de l'aorte

L'aorte est l'artère la plus importante de l'organisme, tant au niveau de son diamètre que de sa fonction. C'est une artère élastique qui part du cœur, chemine dans la partie postérieure du thorax, traverse le diaphragme et descend dans l'abdomen, avant de donner naissance aux artères iliaques primitives, qui vont assurer la circulation du sang vers les membres inférieurs. L'aorte peut être divisée en 4 sections [Figure 2] :

L'**aorte thoracique ascendante** est la partie initiale de l'aorte, qui fait directement suite au ventricule gauche du cœur et s'étend sur environ 5 centimètres jusqu'à la crosse de l'aorte. Les sinus de Valsalva, situés à la base de l'aorte thoracique ascendante donnent naissance aux artères coronaires droite et gauche.

La **crosse aortique** présente une forme d'arche et assure la connexion entre l'aorte thoracique ascendante et l'aorte thoracique descendante. Elle donne naissance au tronc artériel brachio-céphalique, qui se divise en artère sous-clavière droite et artère carotide primitive droite, à l'artère carotide primitive gauche et à l'artère sous-clavière gauche, permettant l'irrigation du cerveau et des membres supérieurs.

L'**aorte thoracique descendante** sinue le long de la partie postérieure du thorax jusqu'au diaphragme, et permet au passage l'irrigation de la moelle épinière et des muscles thoraciques.

L'**aorte abdominale** commence à partir du diaphragme et descend dans la cavité abdominale jusqu'au pelvis. Sur son trajet elle donne successivement naissance au tronc cœliaque, à l'artère mésentérique supérieure, aux artères rénales droite et gauche, à l'artère mésentérique inférieure, et finalement aux deux artères iliaques. Elle permet donc l'irrigation de l'ensemble des organes abdominaux comme l'estomac, le foie, le pancréas, les reins, l'intestin grêle et le côlon.

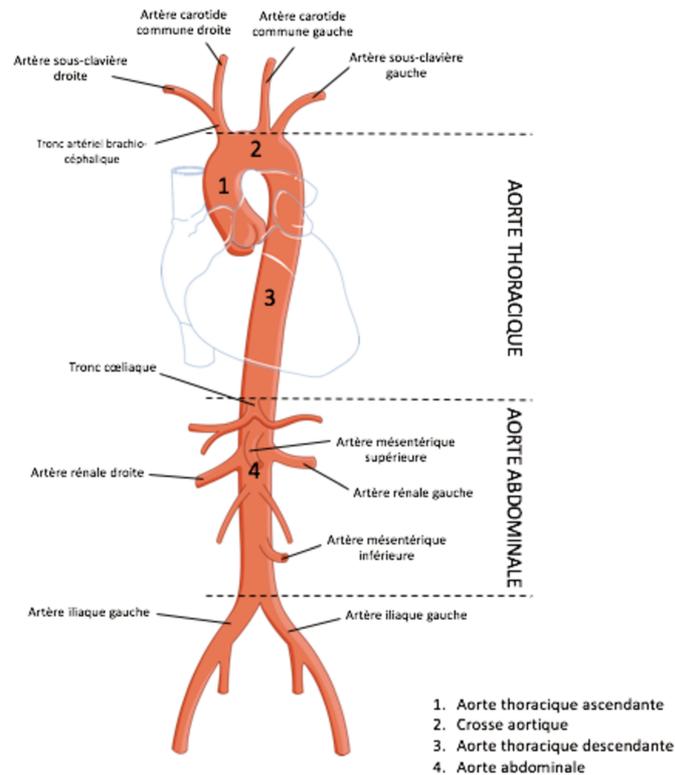


Figure 2 : Anatomie de l'aorte, différentes sections et collatérales

Le diamètre aortique varie avec la localisation, l'âge, le sexe, l'indice de masse corporelle et la technique d'imagerie utilisée pour le mesurer <sup>2</sup>.

## 2. Organisation structurale de la paroi artérielle

La paroi aortique est constituée de 3 couches histologiques distinctes, l'*intima*, la *media* et l'*adventice* disposées dans cet ordre de la lumière à la périphérie [Figure 3].

### a) L'*intima*

La tunique interne, ou *intima* est la couche la plus interne de l'aorte. Composée d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) reposant sur une lame basale constituée de collagène de type IV et de laminine, l'*intima* se situe directement en regard de la lumière aortique. L'endothélium est une interface dynamique entre les structures vasculaires et le sang, il est capable de percevoir et de réagir à de nombreux *stimuli* mécaniques et inflammatoires et ainsi participe activement à la régulation de nombreuses fonctions physiologiques comme le tonus et la perméabilité vasculaire, l'hémostase, la mobilisation et le recrutement des cellules inflammatoires. L'endothélium possède un rôle important dans la modulation de l'inflammation pariétale en conditions pathologiques <sup>3</sup>. En effet, l'endothélium activé exprime

des molécules d'adhésion et produit des médiateurs pro-inflammatoires ; la dysfonction endothéliale a d'ailleurs été impliquée dans la physiopathologie de nombreuses pathologies comme le diabète, l'hypertension, le sepsis ou encore l'athérosclérose<sup>4-6</sup>. Le flux sanguin est un des paramètres influençant de façon majeure l'état de « repos » ou d'activation de l'endothélium. Les différentes courbures de l'arbre aortique, ainsi que ses nombreuses zones de bifurcation ont pour conséquence l'existence de régions exposées à un flux sanguin perturbé, propices à l'activation de l'endothélium, et qui constituent un environnement privilégié pour l'inflammation, la coagulation et le développement de pathologies vasculaires comme l'athérosclérose ou les anévrismes de l'aorte<sup>3,5</sup>. L'endothélium participe à la régulation de la pression artérielle par la production de facteurs vasoactifs, comme le NO (Oxyde Nitrique), qui est un puissant vasodilatateur agissant sur les cellules musculaires lisses de la *media*, sous-jacentes à l'endothélium au sein de la paroi des artères de résistance<sup>7</sup>.

#### b) La *media*

La tunique moyenne ou *media* est épaisse et musculaire, et est composée de plusieurs couches concentriques et uniformément orientées de cellules musculaires lisses (CML) délimitées par des structures lamellaires d'élastine, les lames élastiques et de fibres de collagènes<sup>8</sup>. La *media* est séparée de l'*intima* par une limitante élastique interne et de l'*adventice* par une limitante élastique externe. Sa composition varie selon la localisation anatomique le long de l'aorte, et il existe une relation linéaire entre le nombre d'unités lamellaires de la *media* et les forces de tension appliquées à la paroi vasculaire. L'épaisseur de la *media* et le nombre d'unités lamellaires diminuent progressivement le long de l'aorte, parallèlement à l'augmentation du *ratio* collagène/élastine, ce qui permet au vaisseau de s'adapter aux changements de pressions mécaniques de son environnement<sup>9</sup>.

Les CML sont présentes dans un état contractile quiescent au sein de la paroi aortique en conditions physiologiques, mais on sait aujourd'hui qu'elles peuvent se différencier et adopter un profil non contractile mais sécrétoire, prolifératif et migratoire en conditions pathologiques, de réparation ou de régénération<sup>10,11</sup>. La présence de CML dans la *media* lui confère ses propriétés contractiles, c'est la seule couche de la paroi aortique capable de participer activement à la régulation du tonus vasculaire. Les CML participent également à la composition de la matrice extracellulaire (MEC), grâce à leurs propriétés sécrétrices, d'élastine majoritairement<sup>12</sup>.

### c) L'adventice

L'adventice est la couche la plus externe de la paroi aortique, elle est composée de matrice extracellulaire, principalement de collagène I et III et de quelques fibres d'élastine, et de cellules adventitielles résidentes, majoritairement représentées par des fibroblastes et quelques cellules immunitaires<sup>13</sup>. Chez l'homme, il existe des micro-vaisseaux, appelés *vasa-vasorum*, qui permettent l'irrigation sanguine de la paroi aortique, principalement au niveau de la partie thoracique de l'aorte où la paroi est plus épaisse<sup>8,14</sup>. L'épaisseur de l'adventice est constante au niveau de l'aorte thoracique ascendante et descendante, et prend plus d'importance dans la composition de la paroi au niveau de la partie abdominale de l'aorte<sup>9</sup>. De par sa composition riche en tissu conjonctif, l'adventice est majoritairement responsable des propriétés mécaniques passives de la paroi aortique, et possède également une activité de synthèse de la MEC, particulièrement de collagène qui est surtout produit par les fibroblastes adventitiels<sup>13</sup>.

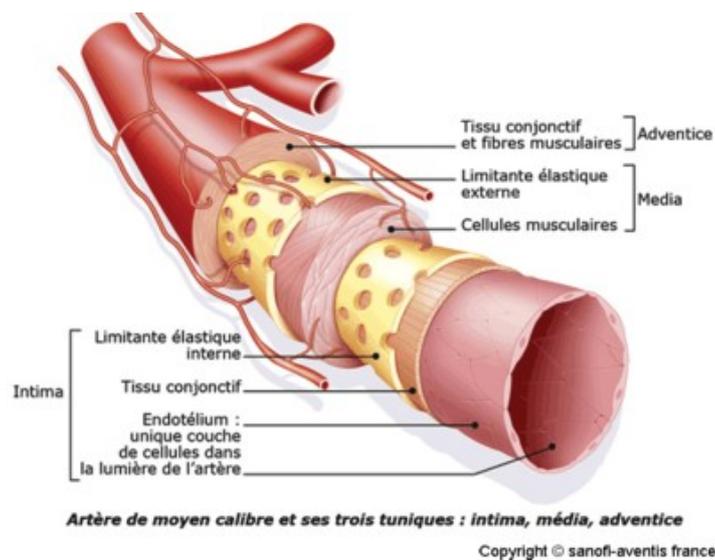


Figure 3 : Composition des différentes couches de la paroi aortique

### 3. Structure de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est l'entité acellulaire de la paroi vasculaire, elle joue un rôle majeur de soutien et de support au sein de la paroi aortique, lui permettant notamment de résister aux fortes contraintes de pression qui lui sont imposées par son environnement. La MEC est synthétisée par les CML et les fibroblastes de la paroi, elle est composée de fibres d'élastine et de collagènes incorporées dans un gel matriciel de protéoglycanes et de glycoprotéines. Les différents composants de la MEC sont retrouvés en proportions différentes dans les 3 tuniques de la paroi et en fonction de la localisation le long de l'arbre vasculaire, où ils régissent en partie les propriétés structurelles et mécaniques de l'aorte.

#### a) L'élastine

L'élastine est une protéine insoluble et hydrophobe composée d'unités monomériques de tropoélastine solubles sécrétées par les cellules de la paroi aortique et assemblées dans l'espace intercellulaire par la lysyl-oxydase (LOX), à l'aide de protéines comme la fibuline-4 et la fibuline-5, les *Microfibril associated glycoproteins* (MAGPs) ou encore l'*Elastin Microfibril Interface Located Protein-1* (EMILIN-1)<sup>15</sup>. Les agglomérats d'élastine s'associent ensuite avec les microfibrilles, à la structure plus complexe, majoritairement composées des fibrilline-1 et -2, pour former les lames élastiques<sup>16</sup>. Les microfibrilles vont former un échafaudage afin de faciliter l'assemblage et l'alignement de l'élastine.

La synthèse et l'assemblage de l'élastine sont réalisés presque exclusivement pendant la période embryonnaire et jusque quelques jours après la naissance. Le renouvellement de l'élastine est ensuite très lent, l'élastine possède une demi-vie de plusieurs dizaines d'années chez l'homme et la néo-synthèse est quasiment inexistante chez l'adulte<sup>17</sup>. De ce fait, la dégradation ou l'endommagement de l'élastine liée à l'âge ou à une pathologie a souvent pour conséquence une réparation imparfaite et désorganisée ou et/ou la mise en place de phénomènes de compensation par la production d'autres composants de la MEC, entraînant des altérations fonctionnelles souvent irréversibles de la paroi artérielle<sup>15,18</sup>. La fragmentation, la désorganisation et la dégradation du réseau élastique sont associées à des pathologies aortiques. En effet, des mutations affectant les protéines impliquées dans l'assemblage des fibres élastiques comme la Fibulin-4 ou la LOX, sont responsables du développement d'anévrisme<sup>19,20</sup> et une mutation du gène *ELN*, entraînant une importante diminution de la production de tropoélastine engendre le développement d'une sténose supra-valvulaire aortique seule ou associée à un syndrome de Williams-Beuren. Ces données suggèrent qu'en plus de son rôle

structurel, l'élastine serait également un régulateur important de la morphogenèse et de la prolifération des CML dans la paroi aortique<sup>21</sup>.

L'élastine confère aux artères de gros calibres comme l'aorte leur caractère extensible, leur permettant de s'adapter et d'encaisser la pulsativité exercée par le cycle cardiaque de façon réversible et d'assurer un débit constant dans les vaisseaux distributeurs en aval. En conditions physiologiques, les lames élastiques ont une apparence ondulée et dentelée, alors qu'en conditions de stress ou de tension mécanique, elles apparaissent lisses et distendues.

## b) Les collagènes

Les collagènes sont les protéines les plus abondamment retrouvées chez les mammifères. Ils forment une superfamille de 29 membres identifiés à ce jour et partagent une structure commune composée de trois chaînes polypeptidiques, appelées chaînes  $\alpha$ , organisées en domaine sous forme de triple hélice. Les collagènes se différencient par l'hétérogénéité de composition de leurs chaînes  $\alpha$ , de leurs structures supramoléculaires, de l'existence de différentes isoformes et par la participation de l'épissage alternatif au cours de leur production<sup>22</sup>. En se basant sur ces caractéristiques, les collagènes peuvent être répartis en 4 groupes, les collagènes fibrillaires, de type I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII, les collagènes constituant les membranes basales de type IV, VII et XXVIII, les collagènes à courte chaîne de type VI, VIII et X et le reste des collagènes<sup>23</sup>.

Les collagènes I et III sont les collagènes les plus abondamment retrouvés dans les 3 couches de la paroi aortique et représentent 60 et 30% des collagènes vasculaires respectivement. Les collagènes IV, V et VI sont retrouvés en plus faible quantité, au niveau des lames basales notamment<sup>24</sup>. Les molécules de collagène sont assemblées grâce à leur séquence répétée d'acides aminés Gly-X-Y par la LOX pour former des structures supramoléculaires plus résistantes, les fibrilles puis les fibres insolubles. Les collagènes de type I et III confèrent à la paroi aortique ses propriétés de résistance et d'élasticité respectivement<sup>25</sup>. Certaines formes de collagène, ou l'existence d'atteintes de leur structure moléculaire peuvent entraîner des défauts vasculaires importants. En effet, la forme homotrimérique du collagène de type I ou des défauts dans le collagène III sont associées à certaines formes du syndrome D'Elhers-Danlos, à une diminution de l'intégrité vasculaire et au développement d'anévrismes<sup>26</sup>.

### c) Les protéoglycanes

Les protéoglycanes (PGs) sont constitués d'une association covalente de protéines et de glycosaminoglycanes (GAGs), composés de chaînes linéaires de disaccharides, et possèdent donc une grande hétérogénéité structurale. Les GAGs et PGs retrouvés dans la paroi aortique sont l'acide hyaluronique, la chondroïtine sulfate, l'héparane sulfate, le versican, la décorine ou encore le syndécan<sup>24,27</sup>. Leur structure moléculaire présente de nombreuses charges négatives, ce qui leur confère des capacités de séquestration des molécules d'eau. La concentration en PGs a donc une influence importante sur la viscosité de la MEC, et peut de ce fait moduler la diffusion de substances (ions, molécules de faible poids moléculaire) et la mobilité cellulaire au sein de la MEC. En effet, l'acide hyaluronique, retrouvé principalement dans l'espace péri-cellulaire, peut faciliter ou entraver la migration et la prolifération des CML au sein de la matrice en fonction de sa concentration<sup>28,29</sup>. De par leur structure et leur diversité, les GAGs possèdent de fortes capacités d'interaction avec de nombreuses molécules matricielles ou cellulaires et ont des effets structurels et biologiques sur la fonction cellulaire. Ils ont par exemple été impliqués dans l'accumulation des lipides, la thrombose, la calcification, le contrôle de la biodisponibilité de certains facteurs de croissance et cytokines, comme le *Fibroblast Growth Factor* (FGF) et le *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β) ou encore l'adhésion monocytaire dans la paroi aortique<sup>10,29,30</sup>.

### d) Les glycoprotéines de structure

Les glycoprotéines sont des protéines sur lesquelles sont greffés des résidus glucidiques. Certaines sont exprimées de façon ubiquitaire, comme la fibronectine, et d'autres ont une expression spécifique de certains tissus, comme la laminine, retrouvée dans les lames basales, et associée notamment au collagène de type IV. La thrombospondine et les ténascines participent également à la composition de la MEC de la paroi aortique. Les glycoprotéines sont hétérogènes au niveau de leur taille, structure et distribution tissulaire, mais elles possèdent comme fonction commune de permettre l'organisation et la cohésion des composants de la MEC entre eux et avec les cellules du tissu conjonctif. En effet, les glycoprotéines peuvent se lier aux intégrines membranaires présentes à la surface des cellules, et peuvent de ce fait ancrer ces cellules au réseau matriciel.

De par ces capacités d'interactions directes avec les cellules, les glycoprotéines peuvent également moduler le comportement cellulaire. La thrombospondine-1 (TSP-1) stimule la prolifération cellulaire des CML, et est impliquée avec l'ostéonectine et la ténascine dans

l'interaction cellule-matrice pour faciliter la migration cellulaire au sein de la MEC<sup>31</sup>. TSP-1 régule de façon positive la biodisponibilité du TGF- $\beta$  tissulaire, et son inhibition promeut le développement de l'AAA dans un modèle expérimental d'infusion d'Angiotensine II chez la souris<sup>32</sup>. Son niveau d'expression plasmatique et aortique est augmenté chez les patients présentant une dissection de l'aorte<sup>33</sup>. Certaines études mettent en évidence un lien entre certaines glycoprotéines de structure et l'inflammation. En effet, la ténascine-C est capable d'activer la voie du *Toll-Like Receptor 4* (TLR4) et d'induire la production de cytokines pro-inflammatoires<sup>34</sup>. La ténascine-C est fortement exprimée dans des prélèvements de tissus anévrismaux chez l'homme où elle colocalise avec l'infiltrat leucocytaire<sup>35</sup>.

#### 4. Remaniement de la matrice extracellulaire

L'intégrité structurelle et fonctionnelle de la MEC est nécessaire pour qu'elle puisse assurer ses propriétés mécaniques et son rôle de soutien au sein de la paroi aortique. Pour s'adapter aux changements physiologiques, comme la croissance ou le vieillissement, ou pour réparer des altérations causées par des événements pathologiques (dépôt lipidique, stress oxydant, hypoxie), la MEC est soumise à un remaniement perpétuel, qui est le résultat d'une balance finement régulée entre dégradation et néo-synthèse des protéines matricielles par les cellules vasculaires, les CE intimaux, les CML médiales et les fibroblastes adventitiels.

La dégradation des composants de la MEC peut être réalisée par différents types de protéases : les métalloprotéinases matricielles (MMPs) certainement les plus étudiées, les métalloprotéinases de la famille *A disintegrin and metalloproteinase* (ADAM) et *A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs* (ADAM-TSs), ainsi que diverses protéases à sérine, à cystéine, ou à acide aspartique, comme les cathepsines<sup>36</sup>. L'activité protéasique en conditions physiologiques est faible dans la paroi vasculaire et est contrebalancée par la présence d'inhibiteurs endogènes, comme la famille des *Tissue inhibitors of metalloproteinase* (TIMPs). Une perturbation de l'homéostasie de la MEC, qui peut notamment être causée par une infiltration de cellules inflammatoires dans la paroi vasculaire, va entraîner une perte d'équilibre dans la balance protéases/inhibiteurs de protéases. La synthèse de protéases va dans ce cas dépasser l'activité des inhibiteurs de protéases, et entraîner un remodelage délétère du tissu aortique et l'apparition de pathologies vasculaires<sup>37</sup>.

### a) Les métalloprotéinases matricielles (MMPs)

Les MMPs sont des endopeptidases partageant des éléments structurels communs parmi lesquels un pro-domaine, un domaine métalloprotéinase à zinc catalytique, une région « hinge » et un domaine hémapexine. Il existe 23 MMPs chez l'homme, qui peuvent être classées en sous-groupes selon leur spécificité de substrat : les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, les matrilysines, les MMPs associées à la membrane et les autres MMPs<sup>38</sup> [Tableau 1].

Les **collagénases** (MMP-1, 8, 13 et 18) ont une forte affinité pour les collagènes interstitiels de type I, II et III. Elles vont cliver les fibrilles de collagène au niveau des domaines triple hélice, indépendamment de la nature de la chaîne  $\alpha$ , donnant des produits de digestion caractéristiques de l'action des collagénases.

Les **gélatinases** (MMP-2 et MMP-9) dégradent préférentiellement les collagènes dénaturés, sous forme de gélatine, et sont aussi capables de lier et de cliver le collagène de type IV et la laminine des lames basales. Elles font partie des 4 MMPs capables de dégrader les fibres d'élastine de la paroi aortique<sup>39</sup>.

Les **stromélysines** (MMP-3, -10 et -11). La MMP-3 ou stromélysine 1 peut, en plus de son activité protéolytique des composants de la MEC, activer certaines MMPs comme la MMP-1<sup>38</sup>.

Les **matrilysines** (MMP-7 et MMP-26) sont capables de digérer de nombreux composants de la MEC, les protéoglycanes et la fibronectine<sup>40</sup>. La MMP-7 est capable de cliver l'élastine et peut également participer à la biodisponibilité tissulaire du *Tumor necrosis factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ), par le clivage de son pro-domaine<sup>38,41</sup>.

Parmi les **MMPs associées à la membrane** (MMP-14, -15, -16, -17, -24 et -25), 4 sont des protéines transmembranaires (MMP-14, -15, -16 et -24), et 2 sont des protéines à ancre glycoposphatidylinositol (GPI) (MMP-17 et MMP-25). En plus de dégrader de nombreux composants de la MEC, ces MMPs sont toutes, sauf la MMP-17, capables d'activer la pro-MMP-2<sup>38</sup>.

Parmi les **autres MMPs**, la MMP-12 ou élastase macrophagique est synthétisée et sécrétée principalement par les macrophages, mais pas par les monocytes circulants. La MMP-12 est capable de digérer l'élastine de façon efficace<sup>42</sup>.

Activité enzymatique	Type de MMP
<b>Collagénases</b>	
Collagénase 1 ou Collagénase interstitielle	MMP-1
Collagénase 2 ou Collagénase neutrophilique	MMP-8
Collagénase 3	MMP-13
Collagénase 4	MMP-18
<b>Gélatinases</b>	
Gélatinase A	MMP-2
Gélatinase B	MMP-9
<b>Stromélysines</b>	
Stromélysine 1	MMP-3
Stromélysine 2	MMP-10
Stromélysine 3	MMP-11
<b>Matrilysines</b>	
Matrilysine 1	MMP-7
Matrilysine 2	MMP-26
<b>MMPs associées à la membrane</b>	
MT1-MMP	MMP-14
MT2-MMP	MMP-15
MT3-MMP	MMP-16
MT4-MMP	MMP-17
MT5-MMP	MMP-24
MT6-MMP	MMP-25
<b>Autres MMPs</b>	
Elastase macrophagique	MMP-12
Enamélysine	MMP-20
XMMP	MMP-21
CA-MMP	MMP-23
CMMP	MMP-27
Epilysine	MMP-28

Tableau 1 : Membres de la famille des MMPs

Les MMPs sont produites par de nombreux types cellulaires dans la paroi vasculaire, comme les fibroblastes, les CML et les leucocytes. Elles sont en général sécrétées sous une forme inactive, les pro-MMPs, constituées d'un pro-peptide, qui contient un résidu cystéine interagissant avec le site actif du domaine catalytique, pour garder la molécule sous la forme d'un zymogène inactif. Les MMPs sont activées par le clivage protéolytique de leur pro-domaine N-terminal, généralement par des protéases plasmatiques ou tissulaires, comme la plasmine, la thrombine, ou par d'autres MMPs activées, comme dans le cas de la MMP-2<sup>38</sup>. Les MMP-11, -23, -28 et les 6 *membrane-type* MMPs (MT-MMPs) possèdent un domaine de reconnaissance de la furine et peuvent subir une activation intracellulaire et finalement être sécrétées directement sous forme active.

Les MMPs peuvent à elles toutes dégrader tous les composants de la MEC, et leur activité protéasique est régulée à différents niveaux : par la modulation de l'expression génique et protéique, au niveau de leur activation par le clivage du pro-peptide, et par la régulation négative de leur activité par les inhibiteurs endogènes. En exerçant leur activité protéolytique sur les composants de la MEC, les MMPs ont non seulement un effet sur la structure et les propriétés mécaniques du vaisseau, mais peuvent également moduler les interactions cellule/cellule ou cellule/MEC, ou encore contrôler la biodisponibilité de certains facteurs de croissance et cytokines au sein de la matrice. Elles peuvent donc avoir une influence majeure sur l'homéostasie tissulaire en contrôlant la différenciation, la migration, la prolifération et la survie cellulaire au sein de la MEC. En effet, les MMPs jouent un rôle important dans la régulation de phénomènes physiologiques comme l'angiogenèse, l'embryogenèse ou encore la réparation tissulaire<sup>43</sup>.

A l'exception de la MMP-2, qui est exprimée par les cellules vasculaires (cellules endothéliales, CML et fibroblastes adventitiels) en conditions physiologiques, l'expression des MMPs est très faible dans la paroi aortique saine. En revanche, les MMP-1, -2, -3, -9, -12 et -13 sont exprimées de façon significative dans leur forme activée au sein de la paroi aortique en conditions pathologiques, comme dans le cas de l'athérosclérose ou de l'anévrisme de l'aorte abdominale<sup>40,44,45</sup>. L'activation et la stimulation de l'activité MMP a aussi été impliquée dans le développement d'autres pathologies comme l'arthrite rhumatoïde, l'invasion tumorale ou l'ostéoporose<sup>44</sup>.

L'inflammation est un puissant régulateur transcriptionnel de l'expression des MMPs. En effet, la production de MMP-9 par les macrophages peut être stimulée par des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  ou l'interleukine (IL)-1 *beta* (IL-1 $\beta$ ), ou par l'interaction avec les lymphocytes T activés *via* la liaison CD40/CD40L. À l'inverse, la production de MMP-9 peut être inhibée par des médiateurs anti-inflammatoires comme l'IL-4 et l'IL-10, contrairement à la MMP-1, dont la production macrophagique est augmentée suite à la stimulation par l'IL-4, suggérant que les MMPs peuvent être régulées de façon différentielle selon la nature du *stimulus*<sup>46-48</sup>. L'activité MMP peut également être régulée par des composants de la MEC, par d'autres MMPs et protéases ou par leurs inhibiteurs endogènes dont l'action est décrite ci-dessous.

## b) Autres protéases

Les protéases de la famille ADAM et ADAM-TS sont constituées d'un domaine riche en résidus cystéine, d'un domaine métalloprotéinase à zinc à activité protéolytique, et d'un domaine désintégrine qui peut lier certaines intégrines membranaires. Les ADAMs et ADAM-TSs n'ont pas d'activité élastolytique mais peuvent tout de même prendre part au remodelage de la MEC vasculaire dans la paroi aortique grâce à leur domaine catalytique à métalloprotéinase. En effet, ADAM10 a des propriétés similaires à celles des gélatinases et a la capacité de dégrader le collagène de type IV<sup>49</sup>. Les protéases ADAMs et ADAM-TSs sont aussi impliquées dans les interactions cellules-cellules et l'adhésion des cellules à la MEC, la protéolyse de protéines membranaires et l'activation de pro-cytokines. En effet, en plus de son activité protéasique sur les protéoglycanes et collagènes de la MEC, ADAM17 participe à l'activation et à la sécrétion du TNF- $\alpha$  soluble dans le milieu extracellulaire par le clivage à la membrane de son pro-peptide<sup>50</sup>.

Les cathepsines forment une famille de protéases à cystéine (cathepsines B, C, F, H, K, L, O, S, W et Z), à sérine (cathepsines A et G) et à acide aspartique (cathepsines D et E), initialement découvertes dans les lysosomes. Elles sont activées par hydrolyse de la partie N-terminale de leur précurseur inactif et peuvent être sécrétées avant ou après activation dans l'espace extracellulaire. Le pH et la présence d'inhibiteurs des cathepsines, comme la cystatine C, sont d'important régulateurs de leur activité. Les cathepsines peuvent être activées par un certain nombre de *stimuli* pro-inflammatoires et ont la capacité de dégrader plusieurs composants de la MEC, comme la fibronectine, la laminine, le collagène de type I, IV et l'élastine<sup>51</sup>.

Le système fibrinolytique est composé d'un pro-enzyme, le plasminogène, qui peut être converti en une enzyme active, la plasmine, sous l'effet d'activateurs du plasminogène, de type tissulaire (*Tissue plasminogen activator*, tPA) ou urokinase (*Urokinase-type plasminogen activator*, uPA). La plasmine est une peptidase qui a pour fonction principale la destruction des caillots de fibrine afin d'empêcher le phénomène de thrombose. Ce système peut être inhibé à différents niveaux, par les *plasminogen activator inhibitors* (PAIs), ou par des inhibiteurs de la plasmine ( $\alpha_2$ -antiplasmine). Les produits de dégradation de la plasmine, les D-dimères, peuvent être dosés afin d'estimer l'activité du système fibrinolytique. Le système fibrinolytique participe également au remodelage de la matrice extracellulaire. En effet, la plasmine est capable de dégrader la fibronectine et la laminine de la MEC vasculaire, et l'addition de

plasminogène à des cellules endothéliales ou à des macrophages alvéolaires *in vitro* augmente la capacité de dégradation du collagène et de l'élastine respectivement, *via* la régulation de l'activité des MMP-1 et -9 dans le deuxième cas<sup>52,53</sup>, affirmant un rôle de la plasmine dans l'activation d'autres protéases, comme les MMPs<sup>54</sup>.

### c) Les inhibiteurs

L'activité des métalloprotéinases dans la paroi aortique est principalement régulée au niveau local par la famille des inhibiteurs de métalloprotéinases, les TIMPs, qui comprend 4 membres, TIMP-1, -2, -3 et -4. Les TIMPs exercent leur activité inhibitrice *via* la création d'une liaison non-covalente entre leur domaine N-terminal et le domaine catalytique des protéases<sup>38,55</sup>. Les TIMPs sont capables à eux tous d'inhiber l'activité protéasique de toutes les MMPs, ADAMs et ADAM-TSs. TIMP-1 inhibe ADAM10 et toutes les MMPs à l'exception de la MMP-19 et des MT-MMPs<sup>56</sup>. TIMP-2 possède un rôle modulateur dans l'activation de la MMP-2<sup>57</sup>. TIMP-3, qui contrairement aux autres membres de la famille des TIMPs est associé à la MEC, est capable d'inhiber la plus large quantité de protéases, incluant la majorité des MMPs, des ADAMs et des ADAM-TS<sup>56</sup>. TIMP-4 est un inhibiteur des MMPs et de ADAM-28<sup>58</sup>. La production des TIMPs, comme celle des MMPs, peut elle aussi être fortement influencée et régulée par le contexte inflammatoire du microenvironnement cellulaire. Les *stimuli* qui favorisent la production des MMPs entraînent souvent une augmentation concomitante et compensatoire de la production des TIMPs. Mais certains médiateurs inflammatoires peuvent avoir des effets opposés sur ces deux systèmes, comme l'IL-10, qui inhibe la production des MMPs et stimule la production de TIMP-1 par les macrophages<sup>59</sup>.

D'autres protéines ont également la capacité d'inhiber l'activité des MMPs comme la  $\alpha$ 2-macroglobuline dans les fluides biologiques, le *tissue factor pathway inhibitor-2* (TFPI-2) qui présente des similarités de séquence avec les TIMPs et inhibe les MMP-1, -2, -9 et -13 ou encore le *procollagen C-terminal proteinase enhancer* (PCPE), qui inhibe l'activité MMP-2<sup>60</sup>. Du fait de leurs différences structurales, ces molécules exercent probablement leur action inhibitrice par un mécanisme d'action différent de celui des TIMPs, qui demeurent les régulateurs majeurs de l'activité des protéases de la MEC dans la paroi aortique<sup>55</sup>.

## C. L'Anévrisme de l'Aorte Abdominale (AAA)

### 1. Définition, épidémiologie et facteurs de risque

Un anévrisme correspond à une dilatation localisée et irréversible de la paroi vasculaire, associée à une perte de parallélisme de ces bords et impliquant ses 3 tuniques. Il peut se développer chez l'homme à différents endroits le long de l'arbre vasculaire. L'anévrisme de l'aorte abdominale dégénératif concerne la partie sous-diaphragmatique de l'aorte et représente la forme d'anévrisme la plus répandue<sup>61</sup> [Figure 4]. Chez l'homme, l'AAA est caractérisé par un remaniement important des composants de la MEC, une dégradation des lames élastiques, une perte des cellules musculaires lisses de la *media*, une infiltration de cellules inflammatoires et la formation d'un thrombus intra-luminal. Il se développe préférentiellement au niveau de la portion infra-rénale de l'aorte, de façon progressive et asymptomatique au cours du temps avec pour risque évolutif majeur la rupture, qui intervient quand la paroi n'est plus capable de résister à la pression exercée par le flux sanguin, entraînant une hémorragie et un risque important de décès<sup>62</sup>. Des anévrismes peuvent également se développer à d'autres endroits de façon isolée ou associés à un AAA, comme les anévrismes thoraciques ou les anévrismes périphériques, au niveau des artères poplitées et iliaques, ou encore les anévrismes cérébraux.

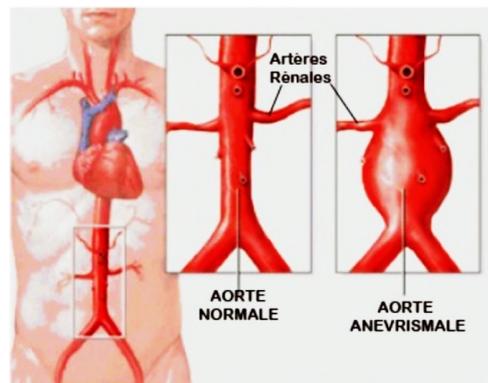


Figure 4 : Anévrisme de l'Aorte Abdominale chez l'homme (AAA)

Les anévrismes de l'aorte abdominale peuvent être classés selon leur morphologie [Figure 5] : les **anévrismes fusiformes** sont les plus courants, ils s'étendent de façon régulière dans l'axe du vaisseau et sur toute sa circonférence, les **anévrismes sacciformes** forment une excroissance latéralisée ou « sac anévrisimal » sur un côté du vaisseau, et les **anévrismes disséquants** ou pseudo-anévrismes, sont formés suite à une déchirure de l'*intima* et de la *media*, créant un faux chenal à l'intérieur de la paroi aortique, dans lequel le sang va pouvoir circuler, contenu par l'*adventice* en dehors.

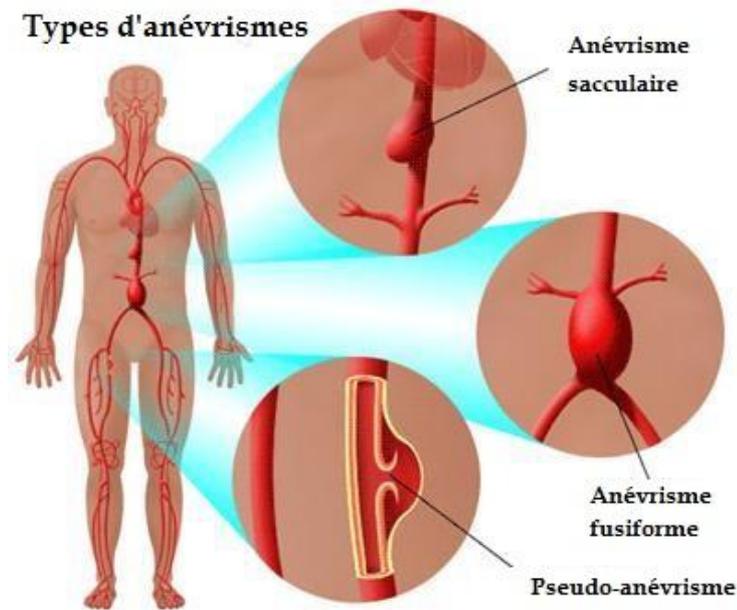


Figure 5 : Classification des anévrismes

L'AAA serait aujourd'hui responsable d'1 à 2% des décès dans les pays développés et représente la 10<sup>e</sup> cause de décès aux États-Unis, avec plus de 10 000 décès/an<sup>63</sup>. Il touche majoritairement les hommes de plus de 65 ans, avec une prévalence pouvant aller de 1 à 7% selon les populations<sup>64</sup> et une incidence qui augmente de 6% par décennie après 65 ans<sup>65</sup>. Néanmoins, les études permettant d'établir ces données épidémiologiques sont disponibles principalement dans les pays ayant mis en place des programmes de dépistage de l'AAA au sein de leur population, il est donc possible que la prévalence réelle de l'AAA dans le monde soit légèrement sous-estimée.

Même si le risque de mortalité dû à une rupture d'AAA a diminué d'environ 50% ces 20 dernières années dans les pays développés, comme les États-Unis, le Royaume-Uni ou la Suède, probablement en raison d'une diminution du tabagisme, de la mise en place de procédures de dépistage plus efficaces, de l'accès facilité aux interventions chirurgicales, d'un meilleur pronostic post-opératoire et d'une amélioration de la prise en charge globale des risques cardiovasculaires, la mortalité due à l'AAA continue d'augmenter dans d'autres régions du monde<sup>66-68</sup>.

L'AAA est une maladie multifactorielle, qui résulte de l'association de facteurs de risque génétiques et environnementaux. Les premières études épidémiologiques montrent qu'après l'âge, le tabagisme est le facteur de risque le plus fortement associé à la survenue d'un AAA. Cette association augmente avec le nombre d'années passées à fumer, et diminue avec le nombre d'années après l'arrêt du tabac. Les autres facteurs de risque associés à l'AAA sont l'âge, le fait d'être un homme, l'hypertension, des taux élevés de cholestérol, et l'existence d'une histoire familiale d'AAA<sup>65,69</sup>. Les femmes présentent en moyenne 1/5 du nombre d'AAAs détectés chez les hommes, avec 1 à 2% des femmes de plus de 65 ans touchées par cette maladie, qui sévit en particulier chez les fumeuses<sup>65</sup>. Même si l'AAA est souvent intimement associé à la présence d'athérosclérose, plusieurs études ont déterminé l'absence d'une relation causale entre les deux pathologies<sup>70-72</sup>. L'existence d'un diabète est négativement corrélée avec l'incidence et la croissance de l'AAA<sup>73-75</sup>. De nombreuses études ont mis en évidence la composante héritable participant au développement sporadique ou aux formes familiales d'AAA. Ces études soulignent que la présence de plusieurs allèles à risque pourrait constituer un terrain favorable au développement de l'AAA<sup>76</sup>. Parmi les déterminants génétiques pouvant influencer le développement sporadique de la maladie, des polymorphismes nucléotidiques des gènes codant pour l'enzyme de conversion de l'Angiotensine (*Angiotensin-converting enzyme*, ACE), le récepteur de l'Angiotensine II AT<sub>1</sub>R, l'IL-6, l'IL-10, la MMP3 ou encore le récepteur du TGF- $\beta$ , TGFBR2 ont été proposés<sup>77</sup>. L'association de ces *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) avec l'AAA a cependant souvent été mise en évidence dans des études incluant un faible nombre de sujets, et présentant une certaine variabilité entre elles<sup>78</sup>. Une récente méta-analyse de 6 études d'association génome entier (GWAS), a confirmé le lien entre 4 *loci* à risque sur les chromosomes 1 (SORT1 et IL6R), 9 (CDKN2BAS1), et 19 (LDLR) et a permis d'identifier 4 nouveaux *loci* sur les chromosomes 1 (SMYD2), 13 (LINC00540), 20 (PCIF1/MMP9/ZNF335) et 21 (ERG) possiblement associés au développement d'AAA<sup>79</sup>. De futures investigations sont nécessaires afin de mettre en évidence le rôle de ces variants génétiques dans la physiopathologie de cette maladie.

Le caractère asymptomatique de l'AAA permet son évolution silencieuse pendant plusieurs années, et bien souvent, il est soit découvert de manière fortuite au cours d'un examen médical pour le suivi d'une autre pathologie, soit il finit par se rompre et déclenche d'intenses douleurs abdominales et lombaires qui vont amener le patient à l'hôpital. Le taux de mortalité suite à la rupture d'un AAA est d'environ 65%, et il a été reporté un taux de mortalité de 50% avant l'arrivée à l'hôpital<sup>80,81</sup>. Il est donc primordial de pouvoir détecter la présence de l'anévrisme

avant la survenue de la rupture, pour assurer une prise en charge médicale optimale et minimiser le risque de décès.

## 2. Diagnostic et Traitements

### a) Dépistage et critères décisionnels pour le traitement chirurgical

Le diamètre aortique est le principal facteur prédictif de la rupture anévrismale<sup>82</sup> et constitue donc le paramètre décisionnel le plus important dans la prise en charge des patients quand une dilatation aortique est détectée au cours d'un examen échographique. Le diamètre de l'aorte infra-rénale chez l'homme de 65 ans se situe autour de 2cm. Sur la base de ces mesures et depuis près de 50 ans, on parle d'anévrisme quand le diamètre aortique est supérieur à 3cm, soit 1,5 fois le diamètre initial<sup>83</sup>. L'AAA peut être détecté chez des patients avec ou sans symptômes de façon non-invasive par les techniques d'imagerie à ultrasons.

Malgré quelques tentatives d'approches pharmacologiques, aucun traitement n'a jusqu'à aujourd'hui été capable de limiter le développement ou le risque de rupture de l'AAA. La seule approche thérapeutique efficace de nos jours reste la chirurgie, avec deux stratégies que sont la chirurgie conventionnelle (*Open surgical repair*, OSR) et le traitement endovasculaire (*Endovascular repair*, EVAR) [Figure 6]. La chirurgie est évidemment indispensable pour traiter dans l'urgence les anévrismes rompus, mais elle peut être également indiquée de manière préventive, sur la base d'un ensemble de critères décisionnels biologiques et relatifs à l'histoire du patient.

Plusieurs études décrivent une relation étroite entre l'importance de la dilatation anévrismale et le risque de rupture<sup>84-86</sup>. Ce risque est estimé à 1%/an pour les petits anévrismes, présentant un diamètre inférieur à 5,5cm. Le traitement chirurgical préventif de la rupture n'a pas montré d'effet d'amélioration de la survie dans le cas de petits anévrismes, pour lesquels un suivi régulier est donc prescrit<sup>87,88</sup>. En revanche, le risque de rupture passe à 5%/an pour les larges anévrismes présentant un diamètre supérieur à 5,5cm<sup>87,89</sup>, et dans ce cas, le patient devient éligible à l'intervention chirurgicale<sup>83</sup>.

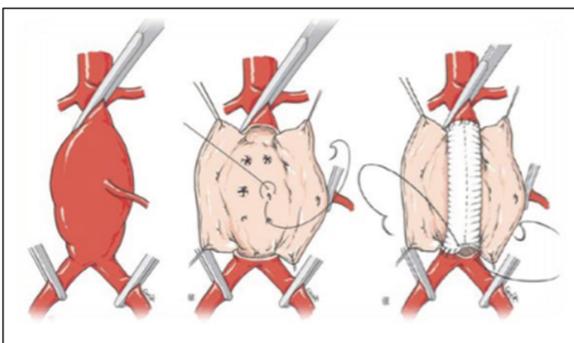
Le taux de croissance de l'AAA est également un paramètre important au cours de la prise en charge médicale. En effet, la croissance moyenne d'un AAA est estimée à 0,2cm/an, sans différence entre les hommes et les femmes<sup>74,90</sup>. Certains facteurs peuvent influencer ce taux de

croissance, comme le tabagisme qui l'augmente ou la présence d'un diabète qui le ralentit de 0,35mm/an et 0,5mm/an en moyenne respectivement<sup>74</sup>. De plus, un certain pourcentage de petits anévrismes peut montrer un taux d'expansion très rapide, alors que de larges anévrismes peuvent rester stables très longtemps, suggérant le fait que des processus de dégradation ou de réparation hautement dynamiques se produisent dans la paroi aortique anévrismale et rendant difficile la prédiction générique du taux de croissance anévrismale<sup>91</sup>. Le traitement chirurgical est donc également recommandé pour un anévrisme dont l'expansion avoisine les 1cm/an, indépendamment du diamètre aortique maximal<sup>83</sup>.

Enfin, certains facteurs semblent avoir un impact significatif sur le risque de rupture. Le fait d'être une femme, le tabagisme, l'hypertension artérielle ou une morphologie sacciforme de l'anévrisme sont associés à une augmentation du risque de rupture<sup>74,92</sup>. L'implication d'autres paramètres tels que le volume de l'anévrisme, l'*Aortic Size Index* (ASI), un index reliant la largeur de l'anévrisme et la surface corporelle de l'individu, ou encore le stress appliqué à la paroi aortique sont en cours d'investigation pour améliorer et compléter l'appréciation du risque de rupture.

La décision d'intervention chirurgicale est dépendante du risque de rupture, de l'estimation du risque de la procédure chirurgicale et de la durée de vie du patient. Elle sera envisagée pour des anévrismes symptomatiques, des anévrismes sacciformes, des anévrismes fusiformes présentant un diamètre supérieur à 5,5cm ou présentant un taux d'expansion rapide, ainsi que chez des patients avec une histoire familiale d'AAA, en fonction des risques et des bénéfices opératoires relatifs à l'individu<sup>93</sup>.

#### A. La chirurgie conventionnelle



#### B. Le traitement endovasculaire

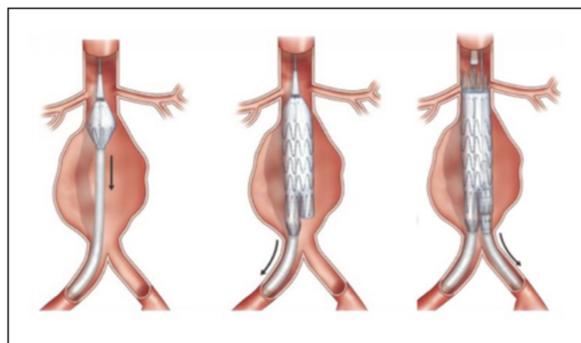


Figure 6 : Représentation schématique des deux stratégies chirurgicales utilisées dans le traitement de l'AAA

## b) La chirurgie conventionnelle

La 1<sup>ère</sup> résection aortique dans le traitement de l'anévrisme a été réalisée en France en 1951 par le Dr Dubost, positionnant la reconstruction chirurgicale comme traitement de référence de l'AAA, en l'absence de contre-indications<sup>94</sup>.

La chirurgie conventionnelle nécessite l'ouverture de l'abdomen et de la partie lésée de l'aorte afin d'y appliquer une prothèse synthétique qui va remplacer la partie anévrismale [Figure 6, A]. Cette technique historique est efficace et nécessite peu de suivi sur le long terme. Cependant, du fait des incisions importantes réalisées pour permettre l'accès à l'aorte abdominale et la nécessité de clamber l'aorte, la chirurgie conventionnelle présente des risques de complications plus importants à court terme. Elle continue d'être pratiquée dans le cas de patients présentant des contre-indications anatomiques à la réalisation du traitement endovasculaire, ou dans le cas d'endofuites ou de l'apparition d'un sac anévrisimal consécutifs à un traitement endovasculaire. Les facteurs influençant la réussite de la chirurgie conventionnelle sont le volume d'interventions réalisées au sein de l'hôpital chaque année, le caractère urgent de la procédure, l'âge du patient, la présence de comorbidités et l'extension proximale de l'anévrisme<sup>83</sup>. Les rapports de plusieurs centres hospitaliers font état d'une mortalité à 30 jours allant de 1 à 5%, de risques de rupture d'environ 1% sur le long terme et une étude récente a montré que près de 20% des patients traités par chirurgie conventionnelle ont besoin d'une deuxième intervention dans les 8 ans pour des complications associées à la laparotomie dans la majorité des cas<sup>91,95</sup>.

## c) Le traitement endovasculaire (EVAR)

La diminution de la mortalité due aux ruptures d'AAA ces 20 dernières années s'accompagne d'une augmentation des chirurgies électives réalisées dans le but de prévenir ce risque de rupture. Le traitement endovasculaire est réalisé depuis la fin des années 1980<sup>96</sup>, et consiste en l'introduction par les artères fémorales ou iliaques d'une endoprothèse (stent) recouverte d'un tissu synthétique, qui va s'amarrer à l'aorte en amont et en aval de la partie anévrismale et se déployer dans le vaisseau pour exclure le flux sanguin de l'anévrisme afin de réduire la pression exercée sur la paroi aortique. Cette procédure peut être réalisée de façon percutanée, sous anesthésie locale du patient, mais nécessite l'existence de critères anatomiques favorables au déploiement efficace de la prothèse<sup>62</sup>. De ce fait, le traitement endovasculaire est moins invasif et nécessite une hospitalisation plus courte que la chirurgie conventionnelle, mais il comporte tout de même ses propres risques de complications. Parmi les risques post-

opératoires, l'endofuite, caractérisée par un flux de sang persistant dans le sac anévrisimal, est la plus courante. Elle peut être présente au moment de l'intervention ou apparaître par la suite. Il a également été rapporté la possibilité d'un vieillissement mécanique ou d'une migration de la prothèse, mais ces complications sont plus rares. Malgré les récentes améliorations chirurgicales dans la pratique de cette technique, le traitement endovasculaire reste une procédure à risque non-négligeable de complications cardiovasculaires. Les risques péri-opératoires prennent en considération l'âge du patient, le sexe, le diamètre aortique maximal, les comorbidités comme l'existence d'une dysfonction rénale ou cardiaque, de maladies chroniques hépatiques ou pulmonaires, et le volume annuel de traitements endovasculaires réalisés au sein de l'hôpital<sup>97</sup>.

Plusieurs essais cliniques randomisés ont comparé les risques associés aux deux stratégies chirurgicales et ont montré que l'utilisation du traitement endovasculaire améliore la survie à court terme avec une mortalité à 30 jours d'environ 1%, mais que ce bénéfice vis-à-vis de la chirurgie conventionnelle disparaît au-delà des 3 premières années, avec plus de risques de complications liés à l'anévrisme, et un taux de rupture à long terme avoisinant les 5%. Le traitement endovasculaire impose un suivi régulier et tout le long de la vie du patient, et nécessite une réintervention dans 20 à 30% des cas dans les 6 ans suivant le traitement<sup>62,95</sup>.

#### d) À la recherche d'un traitement pharmacologique

Un des enjeux actuels du traitement de l'AAA est la prise en charge médicale des petits anévrismes asymptomatiques, ou des patients non-éligibles à l'intervention chirurgicale. En effet, un anévrisme non traité va inexorablement continuer de se dilater, augmentant dans le même temps le risque de rupture. Aucun traitement pharmacologique qui ne permette d'inhiber le développement, de ralentir l'expansion de l'anévrisme ou de limiter le risque de rupture n'existe à ce jour.

Plusieurs études se sont attelées à tester l'effet de traitements potentiels, souvent basés sur la réduction des facteurs de risque associés à l'AAA. Malgré leur effet bénéfique avéré sur les maladies cardiovasculaires en général et sur la prévention des accidents ischémiques en particulier, les données concernant l'effet des statines sur le développement de l'anévrisme sont contradictoires dans la littérature. Plusieurs études observationnelles suggèrent une association entre le traitement par statines et une réduction de l'expansion de l'AAA et du risque de rupture,

indépendamment de leur effet de réduction du taux de lipides plasmatiques, mais ces résultats n'ont pas été confirmés par des essais cliniques randomisés de grande ampleur<sup>70,98,99</sup>.

Malgré des effets prometteurs du traitement par le propranolol sur le développement anévrisimal chez l'animal<sup>100,101</sup>, aucun effet du blocage du récepteur  $\beta$ -adrénergique sur le développement et la croissance de l'AAA n'a été observé dans les essais cliniques conduits chez l'homme<sup>102</sup>.

L'activité locale des enzymes productrices d'Angiotensine II (AngII), à savoir l'enzyme de conversion de l'angiotensine et la chymase, est significativement plus élevée dans les aortes anévrismales que dans les aortes contrôles<sup>103,104</sup>. Le traitement par les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IECs) ou par le losartan, un inhibiteur du récepteur de l'Angiotensine II AT<sub>1</sub>R, limite la croissance anévrismale expérimentale chez la souris mais chez l'homme les résultats cliniques sont contradictoires. En effet, une large étude cas-témoin rapporte que le traitement par les IECs serait associé à un risque de rupture moins important, et que ce risque serait augmenté chez les patients ayant récemment arrêté leur traitement<sup>105-108</sup>. En revanche, une étude rétrospective rapporte que le traitement par les IECs serait associé à une croissance plus rapide des petits anévrismes<sup>109</sup>. Un essai clinique randomisé visant à évaluer l'effet d'un antagoniste d'AT<sub>1</sub>R, le telmisartan, sur le développement et les complications de l'AAA est actuellement en cours<sup>110</sup>.

D'autres études se sont également intéressées à l'effet de la doxycycline sur le développement anévrisimal. Malgré un effet inhibiteur de la doxycycline (100mg/j, 2 fois/j) sur l'expression de certaines MMPs, en particulier la MMP-9 dans le plasma et le tissu anévrisimal de patients atteints d'AAA<sup>111,112</sup>, le traitement avec une plus faible dose de doxycycline (100mg/j, 1 fois/j) n'a montré aucun effet sur la croissance de petits anévrismes au cours d'un essai clinique randomisé mené sur une période de 18 mois<sup>113</sup>. De manière générale, les traitements pharmacologiques ayant un effet d'inhibition de l'inflammation, comme la cyclosporine A<sup>114</sup>, la rapamycine<sup>115</sup>, ou l'inhibition de certaines voies de signalisation comme la voie Notch<sup>116</sup> ou encore les voies TLR2 et 4<sup>117,118</sup>, ont montré des effets protecteurs contre le développement de l'AAA dans des modèles expérimentaux. Des essais cliniques randomisés sont actuellement en cours pour évaluer l'effet de la cyclosporine A et d'une plus forte dose de doxycycline sur la croissance de l'AAA.

Enfin, des études expérimentales montrent que la thérapie cellulaire pourrait constituer une stratégie prometteuse dans le traitement de l'AAA. En effet, l'application endovasculaire locale

de cellules souches mésenchymateuses d'origine médullaire (*Bone marrow-derived mesenchymal stem cells*, BM-MSCs), de cellules musculaires lisses vasculaires, l'injection systémique de BM-MSCs, ou encore l'application péri-aortique de BM-MSCs ou de fibroblastes gingivaux ont un effet bénéfique sur le remodelage de la MEC *via* l'augmentation de la production de TIMP-1, l'inhibition de l'activité MMP dans la paroi aortique et le renouvellement des composants de la MEC, et finalement limitent la progression d'anévrismes développés chez l'animal<sup>119-122</sup>.

#### e) Identification de biomarqueurs associés à l'AAA

L'identification de biomarqueurs solubles associés à la présence, au développement ou au risque de rupture de l'AAA est aujourd'hui un champ actif d'investigations. En effet, l'identification de tels biomarqueurs pourrait permettre une meilleure compréhension de la physiopathologie de la maladie, compléter les mesures de diamètre aortique pour mieux adapter à chaque patient la prise en charge thérapeutique et chirurgicale et ouvrir la porte à de potentiels traitements pharmacologiques. Plusieurs études cas-témoin transversales ont révélé une association entre les taux de fibrinogène, de D-dimères, et d'IL-6 et la présence d'AAA et/ou le diamètre aortique<sup>68,123</sup>, mais aucune de ces molécules n'a été validée cliniquement comme prédictive du risque de rupture<sup>124</sup>.

### 3. Les modèles animaux d'AAA

La variabilité d'évolution de l'AAA, la complexité des traitements curatifs et les taux de mortalité et de morbidité qui leur sont associés soulignent le réel besoin de poursuivre les recherches afin de mieux comprendre la physiopathologie et les processus biologiques et mécaniques associés au développement, à la progression et à la rupture de l'AAA, pour *in fine* permettre d'identifier des biomarqueurs prédictifs du risque de rupture ainsi que des traitements pharmacologiques pouvant limiter la dilatation anévrismale et améliorer la prise en charge des patients.

Les tissus anévrismaux humains sont uniquement disponibles à des stades avancés de la maladie, et de ce fait ne donnent que peu d'information sur les mécanismes initiateurs de la pathologie anévrismale aortique. De plus, du fait de l'augmentation des traitements endovasculaires, la disponibilité des prélèvements anévrismaux humains s'amenuise. Dans le but d'étudier les mécanismes précoces sous-jacents au développement de l'AAA, de nombreux

modèles expérimentaux ont émergé ces 20 dernières années chez le petit animal, et notamment chez la souris. En effet, cette espèce animale est facile à élever, peu coûteuse, a une durée de gestation courte, et offre la possibilité de modifier le génome de façon assez simple.

### a) Infusion continue d'Angiotensine II

De par son implication dans la modulation de nombreux processus hémodynamiques et inflammatoires, le système rénine-angiotensine, et son principal effecteur, l'angiotensine II ont été largement étudiés dans le cadre des pathologies cardiovasculaires, mettant à jour un lien étroit entre ce système et le développement d'AAA.

#### (1) Le système rénine-angiotensine

Le système rénine-angiotensine a été découvert de façon progressive depuis plus de cent ans, et de nombreuses études s'attellent encore aujourd'hui à mettre la lumière sur ses acteurs et leurs nombreux effets tissulaires et cellulaires [Figure 7]. La rénine est une protéase produite principalement au niveau de l'appareil juxtaglomérulaire du rein, mais qui peut aussi être produite localement au niveau du cœur, des vaisseaux ou du cerveau, qui va cliver l'angiotensinogène produit par le foie en angiotensine I (AngI). L'AngI va ensuite elle-même être clivée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine pour générer l'AngII, un peptide de 8 acides aminés qui est l'effecteur majeur du système rénine-angiotensine. Bien que l'ACE soit la principale source de production de l'AngII, elle peut également être produite par d'autres voies, comme celle de la chymase dans le cœur<sup>125</sup>.

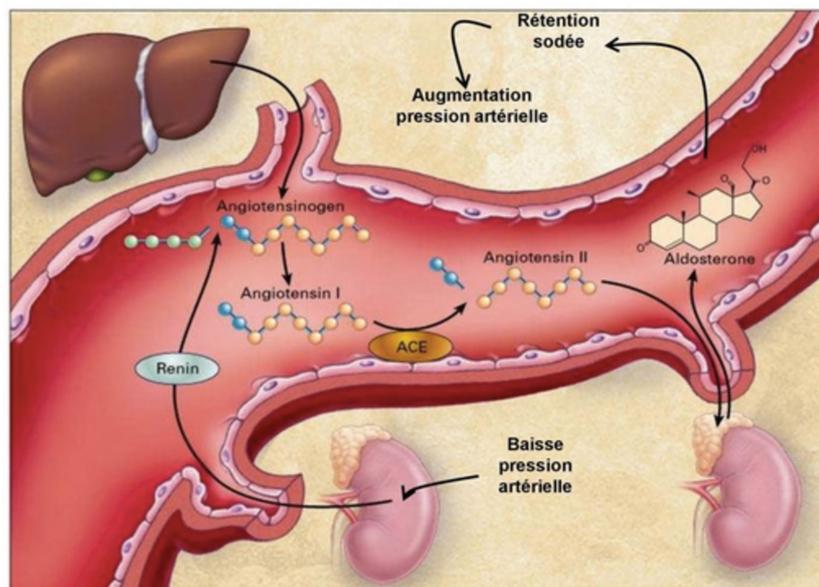


Figure 7 : Le système rénine-angiotensine

L'AngII signale principalement par 2 récepteurs, AT<sub>1</sub>R et AT<sub>2</sub>R, *via* lesquels elle peut induire des effets variés et souvent opposés<sup>126</sup>. AT<sub>1</sub>R et AT<sub>2</sub>R appartiennent tous deux à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). AT<sub>1</sub>R est exprimé de façon ubiquitaire et est exprimé dans les vaisseaux sanguins, le cœur, le cerveau, le foie le rein et les poumons. Dans le sang, il est exprimé par les polynucléaires neutrophiles, les monocytes, les lymphocytes B et dans une moindre mesure par les lymphocytes T<sup>127,128</sup>. Il existe deux sous-types de récepteurs de type AT<sub>1</sub> chez les mammifères, AT<sub>1A</sub>R et AT<sub>1B</sub>R<sup>129</sup>. La stimulation aiguë d'AT<sub>1</sub>R par l'AngII entraîne l'augmentation transitoire de son expression membranaire, puis le récepteur est rapidement internalisé, une petite partie du contingent est directement recyclé à la membrane et le reste est acheminé vers les lysosomes pour être dégradé, nécessitant la synthèse d'un nouveau pool de récepteurs. Plus la stimulation par l'AngII est prolongée dans le temps, plus le retour à l'état de base de la quantité de récepteurs à la membrane sera long<sup>130</sup>. De cette façon, la régulation d'AT<sub>1</sub>R est très finement contrôlée, et peut moduler la réponse vasculaire à l'AngII. Certaines études suggèrent qu'AT<sub>1</sub>R est impliqué dans la formation d'hétérodimères avec d'autres récepteurs, qui peuvent par ce moyen moduler la signalisation AngII, indépendamment de la liaison par leur ligand, en entraînant une activation ou une inhibition de la signalisation intracellulaire en aval d'AT<sub>1</sub>R ou en orientant la modalité de son recyclage<sup>131</sup>. Les effets de l'AngII sont multiples et peuvent résulter de l'activation de plusieurs voies de signalisation de façon directe ou indirecte comme la voie couplée aux protéines G et l'activation des phospholipases C, A2 et D, la voie des *Mitogen-activated protein* (MAP) kinases (*Extracellular signal-regulated kinase* (ERK)1/2, *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) et p38MAPK) ou la transactivation de voies en aval d'autres récepteurs, comme l'*Epidermal growth factor receptor* (EGFR), *via* des médiateurs comme les tyrosine kinases *Janus kinase 2* (JAK2), Src ou *Focal adhesion kinase* (FAK)<sup>132,133</sup>. Ces signaux vont aboutir aux effets hémodynamiques de l'AngII incluant la vasoconstriction, la stimulation de la sécrétion d'aldostérone par les glandes surrénales et la rétention d'eau et de sels, et à ces effets tissulaires, incluant la stimulation de la croissance cellulaire, l'augmentation de l'inflammation et du stress oxydatif, la stimulation de la synthèse de MEC et la thrombose<sup>134</sup>.

AT<sub>2</sub>R est fortement exprimé au cours du développement fœtal dans les vaisseaux sanguins, le tissu conjonctif, le système squelettique ou le cerveau. Son expression diminue après la naissance et est restreinte à certains tissus, comme le cœur et les vaisseaux, où elle peut être fortement induite en conditions pathologiques. Les effets de l'AngII médiés par AT<sub>2</sub>R sont beaucoup moins connus que ceux médiés par AT<sub>1</sub>R mais plusieurs études rapportent des effets

antagonistes de ces deux stimulations sur certains processus comme le remodelage ou le tonus vasculaire<sup>135</sup>. En effet, la stimulation d'AT<sub>2</sub>R entraînerait dans la majorité des cas une vasodilatation médiée par la production endothéliale de NO, même s'il semblerait que ces effets soient en partie dépendants du type de vaisseau et de l'espèce observée<sup>136</sup>. *In vitro*, la stimulation d'AT<sub>2</sub>R diminue la prolifération et la croissance des CML et augmente l'apoptose et la synthèse de MEC et aurait plutôt des effets anti-inflammatoires<sup>129,137</sup>. Du fait de leur ligand commun mais de la multiplicité de leurs effets opposés, l'inhibition de l'une de ces deux voies peut favoriser la stimulation de l'autre et vice-versa<sup>138</sup>.

Plusieurs stratégies ont été adoptées dans le but d'inhiber le système rénine-angiotensine. Les plus couramment utilisées sont les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IECs) qui empêchent la formation d'AngII à partir de l'AngI, comme le captopril, l'énalapril ou le lisinopril, et les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine (ARA-II), qui inhibent la signalisation de l'AngII médiée par AT<sub>1</sub>R, comme le losartan, le valsartan, l'irbesartan, l'éprosartan, le telmisartan, le candésartan ou l'olmesartan. Bien que ces médicaments aient été au départ introduits pour leur activité anti-hypertensive, on sait aujourd'hui qu'ils peuvent avoir d'autres effets, notamment sur l'inflammation, et ont montré leur efficacité dans le traitement de l'insuffisance cardiaque ou dans la prévention des événements cardiovasculaires post-infarctus du myocarde<sup>139,140</sup>.

## (2) Principaux effets de l'AngII sur la paroi vasculaire

Bien que ses effets sur les CML et sur l'endothélium aient été très largement décrits et rapportés dans la littérature depuis de nombreuses années, l'AngII peut agir de façon endocrine, paracrine ou autocrine sur tous les types cellulaires de la paroi vasculaire, à savoir les CE, les CML, les fibroblastes et les cellules inflammatoires résidentes ou infiltrantes et moduler localement de nombreux processus cellulaires et tissulaires.

Une des principaux effets de l'AngII sur la paroi vasculaire réside dans sa capacité à induire la **vasoconstriction**. L'AngII peut induire la contraction des CML *via* la stimulation des récepteurs de type AT<sub>1</sub>, qui va conduire à l'activation de l'appareil contractile de la CML par un mécanisme principalement dépendant de la mobilisation du calcium intracellulaire et sensible au pH<sup>141</sup>. En plus de l'effet d'autres agents vasotenseurs comme l'aldostérone et l'endothéline et de l'activation du système nerveux sympathique par l'AngII, une dérégulation de ce mécanisme de contraction/relaxation des CML dans la paroi vasculaire peut participer à l'augmentation de la pression et au développement de l'hypertension artérielle<sup>142</sup>.

La stimulation d'AT<sub>1</sub>R par l'AngII induit la production d'espèces réactives de l'oxygène *via* l'activation de la Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase membranaire et ainsi participe à l'augmentation du **stress oxydant**, en partie responsable de la dysfonction endothéliale au sein de la paroi vasculaire<sup>143,144</sup>. D'un autre côté, l'AngII augmente l'expression de la *Nitric oxyde synthase* endothéliale (eNOS) et la production de NO dans les cellules endothéliales, qui peut agir comme un mécanisme compensateur de la vasoconstriction directe induite par l'AngII sur les CML de la *media* sous-jacente, en induisant leur relaxation<sup>145</sup>.

De nombreuses études ont rapporté une participation importante de l'AngII à l'**inflammation vasculaire** locale. En effet, l'AngII stimule la production de TNF- $\alpha$  et de MMP-2 par les cellules endothéliales humaines *in vitro*<sup>146</sup>, et est capable d'induire l'expression de molécules d'adhésion, comme *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (VCAM-1), *Intercellular adhesion molecule* (ICAM-1) et E-sélectine, de cytokines et de chimiokines, comme *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), IL-6 et IL-1 $\beta$  *via* l'activation du facteur de transcription *Nuclear factor- $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B) dans les CML, les CE, les monocytes et macrophages<sup>147-149</sup>. Ces trois types de médiateurs inflammatoires sont requis pour l'infiltration des leucocytes au sein de la paroi vasculaire et en effet, il a été montré que l'AngII augmente l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales et favorise leur transmigration à travers l'endothélium<sup>150,151</sup>.

Il a également été rapporté un rôle de l'AngII dans l'**hypertrophie** et le **remodelage vasculaire** associé à la présence de fibrose tissulaire. En effet, il a été montré que la stimulation par l'AngII stimule la croissance cellulaire, par la production de facteurs de croissance comme le *basic fibroblast growth factor* (bFGF), le *Platelet-derived growth factor* (PDGF), le *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) ou le TGF- $\beta$ <sup>152</sup> et favorise la production de MMPs et de composants de la MEC par les cellules vasculaires<sup>153</sup>.

De par ces différents effets, la dysfonction du système rénine-angiotensine a été largement impliquée dans le développement de pathologies vasculaires et dans la physiopathologie des maladies athérotrombotiques en particulier<sup>153-155</sup>. En effet, l'administration d'IECs est associée à une diminution de la mortalité et de la morbidité cardiovasculaires et l'inhibition de la stimulation AngII par la voie AT<sub>1</sub>R diminue le développement de l'athérosclérose dans des modèles expérimentaux<sup>156-159</sup>. Au hasard de ces études expérimentales, le système rénine-

angiotensine a également été impliqué dans le développement de l'AAA<sup>155</sup>, aboutissant à la découverte d'un modèle expérimental reproductible d'induction d'anévrisme chez la souris.

### (3) Un modèle expérimental d'AAA

Au début des années 2000, Daugherty *et al.* ont découvert que l'infusion continue d'AngII sur une période de 28 jours dans deux modèles de souris génétiquement modifiées susceptibles au développement de l'athérosclérose (déficientes pour le *Low density lipoprotein receptor* (LDLr) sous régime riche en cholestérol, et déficientes pour l'*Apolipoprotein E* (ApoE)) aboutissait au développement d'AAA<sup>155,160</sup>. L'infusion d'AngII chez la souris hypercholestérolémique *ApoE*<sup>-/-</sup> a été très largement utilisée depuis, dans le but de comprendre les mécanismes impliqués dans l'initiation, le développement et les complications liés à l'AAA. Dans ce modèle, l'AngII est diffusée à une dose de 1000ng/kg/min par des mini-pompes osmotiques sous-cutanées chez des souris hypercholestérolémiques, et entraîne entre le 2<sup>e</sup> et le 4<sup>e</sup> jour une dissection de la paroi, associée à une infiltration de monocytes/macrophages au niveau des zones de destruction des lames élastique de la *media*, et dans l'adventice. Cette dissection médiale évolue dans 10% des cas vers la rupture dans les 7 premiers jours ou peut être contenue par l'adventice, entraînant la formation d'un thrombus intra-mural. C'est pendant cette période que la croissance anévrismale est la plus rapide en réponse à l'infusion d'AngII<sup>161</sup>. Ensuite, un processus inflammatoire chronique se met en place, avec une infiltration continue de monocytes/macrophages, mais aussi de lymphocytes T et un remodelage excessif de la paroi avec un dépôt important de protéines de la MEC, comme le collagène. On observe ensuite une maturation de l'anévrisme dans le temps, qui induit une croissance un peu moins rapide mais progressive, impliquant toutes les couches de la paroi. Pendant cette période on observe, en plus des évènements décrits précédemment, une ré-endothélialisation au niveau des zones de dissection, une néo-synthèse de fibres d'élastine frêles et désorganisées au niveau de la *media* et une néovascularisation du tissu anévrisimal au niveau de l'adventice<sup>162</sup>.

Une étude réalisée sur un large nombre d'animaux a permis de caractériser de façon plus précise l'incidence, l'évolution et le risque de complications liés au développement de la maladie anévrismale dans ce modèle. Cette étude rapporte que 63% des animaux vont développer un AAA sur la durée de l'expérience, 25% vont mourir d'une rupture aortique, principalement au cours de la première semaine et 37% ne développeront jamais d'anévrisme. L'infusion continue d'AngII peut également aboutir à la formation plus rare d'anévrismes thoraciques, particulièrement sensibles à la rupture au cours de la première semaine<sup>163</sup>.

L'infusion de doses d'AngII n'entraînant pas d'augmentation de la pression artérielle aboutit au développement d'AAA, et qu'à l'inverse, l'infusion de norépinephrine n'a aucun effet sur le développement d'AAA chez la souris hypercholestérolémique, suggérant que l'hypertension n'est pas le mécanisme initiateur du développement de l'AAA induit par l'AngII<sup>164</sup>. Il a également été montré que l'hyperlipidémie n'est pas nécessaire au développement anévrisimal, mais qu'elle augmente cependant considérablement l'incidence de la maladie<sup>165</sup>.

L'inhibition pharmacologique et la délétion génétique totale d'AT<sub>1</sub>R diminuent fortement l'incidence et la sévérité le développement d'AAA induit par l'AngII et une transplantation de moelle osseuse suggère que l'expression d'AT<sub>1</sub>R vasculaire jouerait un rôle prédominant dans le développement de l'AAA, alors que la délétion génétique d'AT<sub>2</sub>R n'a aucun effet sur l'incidence et la sévérité de la maladie anévrismale<sup>166,167</sup>.

Ce modèle d'induction d'AAA par infusion continue d'AngII, largement utilisé de nos jours, présente de nombreuses similitudes avec la pathologie humaine, comme le dimorphisme sexuel, avec une incidence plus élevée associée au sexe masculin, le caractère focal de la dilatation anévrismale, les caractéristiques histologiques majeures qui sont la fragmentation des lames élastiques, une inflammation pariétale importante et un remodelage excessif du tissu conjonctif. En revanche, la dilatation anévrismale se développe dans la partie supra-rénale de l'aorte abdominale chez la souris, ce qui peut en partie s'expliquer par une différence de conditions hémodynamiques entre les espèces dans cette partie de l'aorte. Ensuite, la rupture aortique peut survenir de façon précoce dans le développement de l'AAA chez la souris, résultant probablement d'une inflammation aigüe exagérée, alors qu'elle constitue plutôt un événement tardif chez l'homme. Enfin, l'absence de formation d'un thrombus intra-luminal, la présence d'une dissection précoce et d'un thrombus intra-mural sont également des éléments caractéristiques du développement de l'AAA expérimental induit par l'AngII<sup>168</sup>.

#### b) Infusion continue d'Angiotensine II et neutralisation du TGF- $\beta$

Le remodelage de la matrice extracellulaire de la paroi aortique est une des caractéristiques majeures du développement de l'AAA chez l'homme et chez l'animal, et l'expression tissulaire du TGF- $\beta$  est augmentée dans le modèle expérimental d'anévrisme induit par infusion d'AngII<sup>163</sup>. De plus, la surexpression de TGF- $\beta$ 1 stabilise la progression anévrismale de l'AAA chez le rat, suggérant que de par ses propriétés pro-fibrotiques, le TGF- $\beta$  pourrait jouer un rôle protecteur dans le développement de l'AAA<sup>169,170</sup>.

Notre équipe a démontré que l'administration répétée d'un anticorps neutralisant le TGF- $\beta$  abolit la résistance de la souris C57BL/6J normocholestérolémique au développement d'AAA induit par infusion continue d'AngII, avec une incidence de près de 90% et accroît dramatiquement le taux de rupture, qui atteint les 80%<sup>171</sup>. La neutralisation du TGF- $\beta$  induit la formation d'anévrismes complexes, avec l'apparition rapide d'un thrombus intra-luminal, une fragmentation de l'élastine, une perte des CML et une infiltration de macrophages et de lymphocytes T dans la paroi aortique et une dégradation importante du collagène présent dans l'adventice, expliquant en partie l'incidence élevée de ruptures aortiques. La déplétion en monocytes circulants par l'injection de liposomes de clodronate et la délétion génétique du gène codant pour la MMP-12 réduisent considérablement la sévérité et le risque de rupture dans ce modèle, suggérant que l'augmentation de la signalisation TGF- $\beta$  au cours du développement de l'AAA est un mécanisme compensateur permettant de préserver l'intégrité vasculaire, *via* un rôle de favorisation de la production du collagène adventiciel, de contrôle de l'activité des monocytes/macrophages et d'inhibition de l'activité métalloprotéasique<sup>171</sup>.

La neutralisation du TGF- $\beta$  associée à l'infusion continue d'AngII offre un modèle expérimental reproductible de croissance anévrismale rapide et de rupture, permettant d'étudier les mécanismes impliqués dans les complications liées au développement de l'AAA.

### c) Application péri-aortique de CaCl<sub>2</sub>

Ce modèle d'anévrisme a été initialement mis au point sur l'artère carotide de lapin, par l'application d'une compresse imbibée de CaCl<sub>2</sub> directement au contact de l'artère<sup>172</sup>, et a ensuite été adapté chez la souris pour le développement d'AAA. L'application péri-aortique de CaCl<sub>2</sub> concentré chez la souris au niveau de l'adventice de la partie infra-rénale de l'aorte abdominale induit la dégradation du réseau élastique par la précipitation des cristaux de calcium, ce qui entraîne une activation de la réponse inflammatoire et la production de protéases dans la *media* et conduit progressivement à une dilatation aortique dès la 2<sup>e</sup> semaine<sup>173,174</sup>. Ce modèle, techniquement aisément réalisable, permet l'induction de l'anévrisme au niveau de l'aorte infra-rénale, comme chez l'homme, et permet d'étudier les mécanismes associés à la dégradation des composants de la MEC par les protéases, cependant il n'est pas associé à la formation d'un thrombus, et n'aboutit pas à la rupture aortique, contrairement à la maladie humaine.

#### d) Perfusion intra-luminale d'élastase

Le modèle d'AAA par perfusion intra-luminale d'élastase pancréatique, historiquement décrit chez le rat<sup>175</sup>, puis adapté plus tard chez la souris<sup>176</sup>, consiste en l'isolement d'un segment de l'aorte abdominale infra-rénale, suivi de l'introduction d'un cathéter permettant l'injection sous pression (100 mmHg) d'une solution d'élastase pancréatique porcine dans la lumière de l'aorte sur une période de 5 min [Figure 8]. La perfusion d'élastase dans la lumière aortique entraîne un développement anévrisimal en 2 phases : une modeste dégradation des lames élastiques de la *media*, associée à l'effet mécanique de la perfusion, entraîne une dilatation modérée dans les 7 premiers jours, associée à une infiltration de monocytes/macrophages et de neutrophiles dans la *media* et l'adventice respectivement, qui vont ensuite participer activement au développement de l'AAA en produisant des protéases, et aboutir à la formation d'un anévrisme au bout de 14 jours.

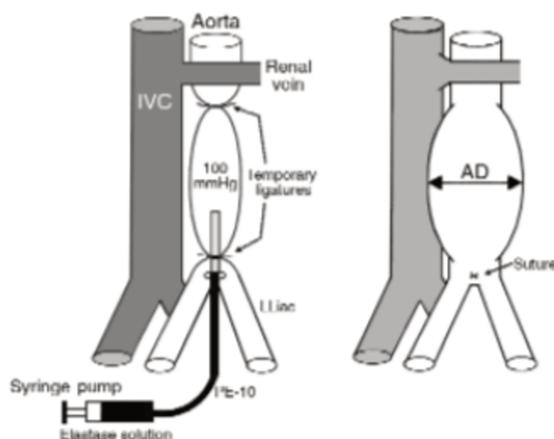


Figure 8 : Induction d'AAA par perfusion intra-luminale d'élastase pancréatique porcine  
(D'après Pyo *et al.*, 2000<sup>176</sup>)

Ce modèle combine contraintes mécaniques et dégradation enzymatique appliquée à la paroi aortique et souligne le fait que l'activité élastolytique joue un rôle majeur dans la physiopathologie de l'AAA. Il reproduit certaines caractéristiques de la maladie humaine, comme la localisation infra-rénale de l'anévrisme, la dégradation des lames élastiques, l'inflammation pariétale, l'induction d'une importante activité protéasique et le développement non-linéaire du diamètre anévrisimal. Cependant, il existe un certain nombre de différences avec l'AAA humain, la plus notable étant l'évolution rapide du diamètre aortique et le fait que l'anévrisme n'évolue que rarement vers la rupture. De plus, l'infiltration de neutrophiles est assez rare chez l'homme en dehors du thrombus. Enfin, ce modèle est techniquement délicat et

invasif, et nécessite une expérience technique qui garantisse la reproductibilité du geste chirurgical. Enfin, il a été montré que la variabilité des lots d'élastase peut entraîner une inconsistance dans le développement anévrismal<sup>177</sup>.

Ce modèle a cependant été assez largement utilisé et a notamment permis de confirmer le rôle de l'AngII endogène dans le développement de l'anévrisme. La déficience génétique en AT<sub>1</sub>R et l'inhibition pharmacologique d'AT<sub>1</sub>R par l'administration d'ARA-II diminue la sévérité de l'AAA chez la souris<sup>178,179</sup>, ainsi que l'administration d'IECs chez le rat, suggérant que même si l'AngII n'est pas impliquée dans l'initiation de la lésion, elle y contribue certainement dans un deuxième temps<sup>180</sup>.

#### e) Application péri-aortique d'élastase

Dans cet autre modèle, l'élastase est appliquée directement au contact de l'adventice au niveau de la partie infra-rénale de l'aorte abdominale<sup>181</sup> [Figure 9].

Un anévrisme fusiforme se développe au bout de 14 jours, associé à une dégradation des lames élastiques, une perte des CML de la *media*, une infiltration de macrophages et une production accrue de métalloprotéinases. Les avantages de ce modèle sont sa facilité de réalisation, le développement d'anévrismes anatomiquement semblables aux AAA observés chez l'homme. Cependant, l'incidence reste modérée (autour de 65%) et la variabilité due à l'utilisation de l'élastase nécessite un travail de mise au point préliminaire pour bien évaluer les doses et temps d'incubation nécessaires et suffisants pour une induction d'AAA efficace et reproductible. Contrairement aux anévrismes humains, les anévrismes qui se développent suite à l'application péri-aortique d'élastase ne sont pas associés à la présence de thrombus, d'athérosclérose et n'aboutissent que très rarement à la rupture<sup>182</sup>.

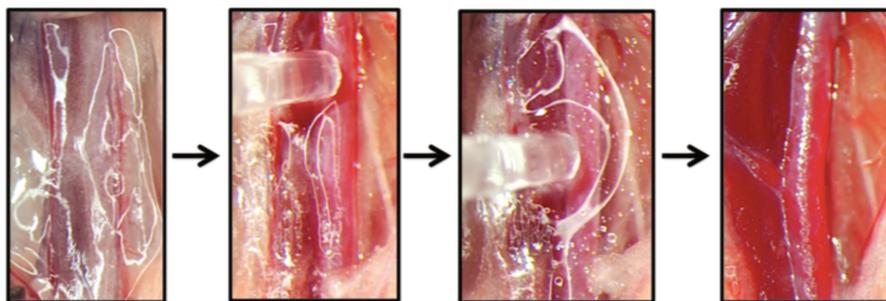


Figure 9 : Application péri-aortique d'élastase pancréatique

#### f) Application péri-aortique d'élastase et neutralisation du TGF- $\beta$

Lareyre *et al.* ont mis un point un modèle combinant l'application péri-aortique d'élastase et l'administration d'un anticorps neutralisant le TGF- $\beta$ , qui entraîne la formation d'un anévrisme en 14 jours partageant de nombreuses caractéristiques avec la maladie humaine : une dégénération médiale, la formation d'un thrombus intra-luminal, une infiltration inflammatoire évoluant dans la majorité des cas vers la rupture<sup>183</sup>.

Malgré le fait que ces modèles animaux partagent de nombreux points communs avec l'anatomie et la physiopathologie de l'AAA humain, aucun d'entre eux ne reproduit à ce jour tous les aspects de cette maladie chronique, multifactorielle, à l'évolution lente et progressive qui mène indubitablement vers la rupture. En plus de l'incidence relativement faible du développement anévrisimal et du manque de reproductibilité, une des limites majeures de ces modèles animaux est l'absence de progression à l'arrêt du stimulus utilisé pour provoquer la lésion, et l'évolution vers une résolution des lésions avec le temps. De nouveaux modèles publiés très récemment montrent que l'administration dans l'eau de boisson de 0,2% de  $\beta$ -aminopropionitrile (BAPN), un inhibiteur de la lysyl-oxydase, augmente l'incidence du développement des AAAs dans des modèles préexistants comme l'infusion continue d'AngII ou l'application péri-aortique d'élastase<sup>184</sup>. Dans ce dernier, le traitement au BAPN permet une progression de l'AAA qui persiste dans le temps vers des stades avancés de la maladie, associée à la formation d'un thrombus intra-luminal et à une évolution spontanée vers la rupture<sup>185</sup>.

Pour toutes ces raisons, les résultats expérimentaux obtenus chez le petit animal doivent être interprétés en fonction de l'hypothèse scientifique, de l'espèce, et de la spécificité du modèle utilisé.

#### 4. Autres pathologies aortiques et maladies syndromiques

L'AAA est la maladie anévrismale la plus répandue dans la population, mais l'aorte thoracique représente également une localisation privilégiée pour le développement anévrismal et l'apparition de dissections, et il arrive que les patients développent dans le même temps des anévrismes sur plusieurs portions de l'aorte. Bien que les anévrismes abdominaux et thoraciques partagent des caractéristiques histologiques similaires, ils présentent selon leur localisation des caractéristiques physiopathologiques et épidémiologies, des étiologies et des facteurs de risque distincts, suggérant que des mécanismes différents participent à leur développement<sup>186,187</sup>. Les anévrismes thoraciques et dissections constituent un ensemble de pathologies cliniquement hétérogènes, que l'on peut classer en deux grandes catégories, les formes syndromiques souvent causées par des mutations monogéniques et les formes non-syndromiques, se développant de façon sporadique ou associées à une histoire familiale.

##### a) Anévrismes de l'aorte thoracique non-syndromiques et dissections aortiques

Les anévrismes thoraciques peuvent affecter la partie supra-diaphragmatique de l'aorte dans tous ces segments, ils touchent l'aorte thoracique ascendante dans la majorité des cas, mais peuvent également toucher l'aorte thoracique descendante, plus rarement la crosse aortique, ou plusieurs de ces segments en même temps<sup>188</sup>. La dissection aortique résulte d'une déchirure médiale qui, sous l'effet du débit sanguin, va créer un faux chenal au sein même de la paroi aortique, par lequel le sang va pouvoir circuler. Ses complications majeures sont l'ischémie des organes en amont ou en aval de la dissection, l'insuffisance cardiaque et la rupture aortique. Il existe plusieurs méthodes de classification des dissections aortiques, qui se basent soit sur la position de la déchirure médiale et l'étendue de la surface disséquée, soit sur le fait que l'aorte ascendante soit incluse ou non dans la zone de dissection. Un certain nombre de dissections se produisent en l'absence d'un anévrisme préexistant, ce qui suggère que chez l'homme, ces deux pathologies impliquent des mécanismes physiopathologiques distincts<sup>189</sup>. Cependant, l'existence de ces deux pathologies peut être intimement liée. En effet, elles partagent une caractéristique histologique commune qui est la dégénération médiale, et il existe une évolution possible de l'une vers l'autre.

L'incidence des anévrismes thoraciques et des dissections aortiques est moins importante que celle des AAAs, leur histoire naturelle est moins bien documentée, rendant plus délicates

l'évaluation de la croissance anévrismale, l'estimation du risque de rupture qui lui est associé et l'établissement de critères décisionnels génériques pour la prise en charge thérapeutique. Cependant, le taux de mortalité dû à la rupture d'anévrismes thoraciques et de dissections rapporté dans la littérature est important, avec 40% de décès instantanés et un risque augmentant de 1% toutes les heures<sup>190</sup>.

Les anévrismes thoraciques et dissections non-associés à une maladie syndromique touchent 2,7 nouvelles personnes sur 100 000/an<sup>191</sup>. Leur développement peut être sporadique ou associé à des caractères héréditaires, sans association nécessaire avec des facteurs de risque cardiovasculaires. Les formes familiales représentent environ 20% des cas d'anévrismes thoraciques, touchent souvent des sujets plus jeunes et ont un taux de croissance anévrismale plus élevé<sup>192</sup>. Elles impliquent des mutations monogéniques qui se transmettent de façon autosomique dominante et présentent une pénétrance clinique variable<sup>193</sup>.

Plusieurs gènes sujets à mutations ont été associés au développement d'anévrismes thoraciques et dissections non-syndromiques, certains de ces gènes étant aussi associés au développement des anévrismes syndromiques. Ces gènes sont impliqués dans le fonctionnement de l'appareil contractile des CML, comme *MYH11*, codant pour une chaîne lourde de la myosine, *ACTA2*, codant pour l' $\alpha$ -actine, *MLCK* et *PRKG1*, codant pour des kinases régulant la phosphorylation des chaînes légères de la myosine, ou dans l'homéostasie de la MEC et la régulation de la signalisation du TGF- $\beta$ , comme *FBNI*, codant pour un composant des microfibrilles, *TGFBR1* et 2, codant pour des sous-unités du récepteur au TGF- $\beta$  ou *SMAD3*, codant pour un effecteur intracellulaire majeur de cette voie de signalisation<sup>194</sup>. L'ensemble des mutations décrites n'explique encore qu'une faible proportion des formes sporadiques ou familiales d'anévrismes thoraciques et dissections, suggérant que d'autres mutations restent à identifier.

Avec l'âge et le sexe, l'hypertension artérielle est un des facteurs de risque majeurs associé à la présence d'anévrismes thoraciques<sup>189</sup>. La pression artérielle doit donc être particulièrement contrôlée chez ces patients pour limiter le stress appliqué à la paroi aortique et éviter la rupture. En revanche, comme dans le cas de l'AAA, la seule stratégie curative efficace de nos jours est la réparation chirurgicale, qui consiste soit au remplacement intégral de la partie anévrismale par une prothèse, soit de la pose d'une endoprothèse quand celle-ci est possible. Compte tenu de l'anatomie de l'aorte et de la présence de nombreuses bifurcations et collatérales dans ces

régions, la réparation chirurgicale est particulièrement délicate, et présente un risque de mortalité et de complications péri-opératoires importants<sup>188</sup>.

La cinétique des événements systémiques ou locaux menant au développement des anévrismes thoraciques et dissections est encore largement incomprise, mais les analyses histologiques montrent que les tissus aortiques des patients atteints d'anévrismes thoraciques et dissections présentent une importante désorganisation de la matrice extracellulaire, principalement localisée au niveau de la *media* et caractérisée par une dégradation des lames élastiques, une accumulation de protéoglycanes, ainsi qu'une dysfonction des cellules musculaires lisses et une dérégulation de la signalisation TGF- $\beta$ <sup>192</sup>. Contrairement à l'AAA, la composante inflammatoire ne semble jouer qu'un rôle mineur dans le développement des anévrismes thoraciques et dissections.

En dehors des maladies syndromiques, un certain nombre de pathologies ont été associées au développement d'anévrismes thoraciques et dissections. La bicuspidie aortique est une malformation congénitale cardiaque affectant la valve aortique, qui n'est composée que de deux feuillets, au lieu des trois feuillets normalement présents. Elle affecte 1 à 2% de la population et est associée à risque important, pouvant aller de 7,5 à 70%, de développer un anévrisme ou une dissection au niveau de la racine aortique et de l'aorte ascendante<sup>195</sup>. La syphilis a longtemps été fortement associée au développement d'anévrismes thoraciques, qui pouvaient apparaître très tard dans l'histoire de la maladie, mais en raison du développement des traitements antibiotiques, cette association est devenue très rare de nos jours<sup>188</sup>. Enfin, la présence de pathologies inflammatoires, comme l'artérite à cellules géantes, l'artérite de Takayasu, ou la maladie de Beçhet peuvent aboutir à la formation d'anévrismes thoraciques<sup>190</sup>.

## b) Maladies Syndromiques

Environ 20% des anévrismes thoraciques font partie d'un tableau syndromique causé par une mutation monogénique au sein de gènes codant principalement pour des protéines fibrillaires de la MEC ou des protéines impliquées dans la signalisation du TGF- $\beta$ .

### (1) Le syndrome de Marfan

Le syndrome de Marfan est une maladie génétique héréditaire à caractère autosomique dominant qui touche en moyenne 1/5000 à 10 000 personnes et qui affecte le tissu conjonctif, entraînant des malformations majeures des systèmes oculaire, squelettique et cardiovasculaire. Les manifestations anatomiques du syndrome de Marfan peuvent être variables selon les

individus, et incluent généralement une grande taille, des extrémités allongées, une hyperlaxité articulaire, la présence de scoliose, d'ectopie du cristallin et d'une forte myopie. Le syndrome de Marfan est dramatiquement associé au développement d'anévrismes au niveau de la racine aortique et de l'aorte thoracique ascendante, la dissection aortique représentant la principale cause de mortalité chez les patients qui en sont atteints. Cette pathologie syndromique est causée par des mutations du gène *FBNI*, codant pour la fibrilline-1, un composant majeur des microfibrilles qui participent à l'assemblage des fibres d'élastine au sein du tissu conjonctif<sup>196</sup>. Les manifestations histologiques dans la paroi aortique anévrismale de patients atteints du syndrome de Marfan sont caractérisées par une diminution du contenu en élastine et une fragmentation des lames élastiques, une orientation phénotypique des CML vers un profil plutôt sécrétoire, un dépôt excessif d'autres composants de la MEC comme les protéoglycanes et le collagène, une production de protéases, et par une infiltration modérée de cellules inflammatoires<sup>197</sup>.

Les études physiopathologiques se sont d'abord focalisées sur l'effet de ces mutations « perte de fonction » sur le rôle structurel de la fibrilline-1 dans l'élastogénèse au cours du développement, mais les investigations ont rapidement révélé que la fibrilline-1 possédait également un rôle dans la régulation de l'homéostasie de la paroi aortique, dans le contrôle de la synthèse d'autres composants de la MEC, la modulation de la fonction cellulaire des CML vasculaires et la modulation de l'activité cytokinique dans la paroi aortique<sup>197</sup>. En particulier, il a été suggéré qu'elle pourrait avoir un rôle primordial dans la régulation de la signalisation TGF- $\beta$ , et qu'une perturbation de cette signalisation pourrait être responsable des modifications physiopathologiques retrouvées dans la pathogénèse de l'anévrisme de l'aorte thoracique<sup>16</sup>.

Mais les résultats des études s'étant portées sur cette hypothèse sont contradictoires et ont depuis des années soulevé le « paradoxe du TGF- $\beta$  », soulignant la complexité du rôle du TGF- $\beta$  dans la pathogénèse de l'anévrisme thoracique, qui dépend probablement d'un nombre important de facteurs, comme la localisation tissulaire, les types cellulaires engagés ou encore la cinétique des mécanismes physiopathologiques et met en jeu de nombreux phénomènes compensatoires. De plus, le caractère ubiquitaire et la multiplicité des processus cellulaires dans lesquels sont engagés le TGF- $\beta$ , incluant la prolifération l'apoptose, la différenciation et la migration cellulaires ou encore la synthèse de MEC accentuent la probabilité de réponses cellulaires différentielles à la modulation de sa signalisation.

Ces études ont cependant ouvert la voie à de possibles nouvelles stratégies thérapeutiques dans le syndrome de Marfan, qui se limitent jusqu'à aujourd'hui au suivi régulier de la croissance aortique par imagerie, au traitement par des bêtabloquants pour contrôler la pression artérielle et à la chirurgie préventive quand cela est nécessaire<sup>198</sup>.

Malgré des résultats prometteurs de l'inhibition de la signalisation AT<sub>1</sub> sur le développement des dilatations thoraciques chez les patients atteints du syndrome de Marfan dans quelques études modestes, un essai clinique de plus grande envergure n'a rapporté aucun effet bénéfique du traitement par le losartan en comparaison au traitement par l'aténolol sur une période de 3 ans<sup>199,200</sup>. Des hypothèses ont été soulevées pour essayer d'expliquer ces résultats décevants, et de futures investigations sont nécessaires pour mieux évaluer l'effet-dose et la méthode d'administration pour un effet optimal du traitement, l'influence du stade de développement de la maladie aortique sur l'efficacité du traitement, ou encore l'efficacité différentielle d'autres inhibiteurs de la famille des « sartans » dans le ralentissement de la croissance anévrismale<sup>201</sup>.

## (2) Syndrome de Loeys-Dietz

Le syndrome de Loeys-Dietz est une maladie associée à des mutations affectant les gènes codant pour les récepteurs de type I et II du TGF- $\beta$ , *TGFBR1* et *TGFBR2* dans ses formes les plus courantes. Dans certains cas, des mutations dans d'autres gènes de la signalisation TGF- $\beta$  ont aussi été impliquées, comme *SMAD3*, *TGFB2* ou *TGFB3*. Le syndrome de Loeys-Dietz partage certaines caractéristiques phénotypiques du syndrome de Marfan, mais se distingue notamment par la présence d'un hypertélorisme, d'une fente palatine et/ou d'une lèvre bifide et d'une tortuosité artérielle<sup>202</sup>. Le phénotype vasculaire est particulièrement sévère chez ces patients, qui présentent un risque important de développer des anévrismes et dissections thoraciques très jeunes, avec une dilatation de la racine aortique dans la majorité des cas, évoluant inexorablement vers la dissection, la moyenne du premier événement cardiovasculaire se situant entre 25 et 30 ans<sup>203</sup>.

Malgré la présence de mutations faux-sens à l'état hétérozygote dans les séquences codant pour les sous-unités du récepteur au TGF- $\beta$ , les analyses histologiques font état d'une augmentation de la signalisation TGF- $\beta$  dans le tissu, associée à une fragmentation des lames élastiques et à une augmentation de la quantité de collagène, soulevant une fois de plus la question du rôle paradoxal du TGF- $\beta$  dans les pathologies aortiques<sup>202</sup>.

### (3) Syndrome d'Ehler-Danlos vasculaire

Le syndrome d'Ehler-Danlos est une maladie cliniquement et génétiquement hétérogène causée par des mutations dans les gènes codant pour des protéines de la MEC, et principalement pour les molécules de collagène, entraînant une fragilité extrême du tissu conjonctif. Parmi toutes ces manifestations, le syndrome d'Ehler-Danlos vasculaire de type IV, causé par une mutation dans le gène *COL3A1*, codant pour le collagène de type III, présente le tableau clinique le plus sévère, avec un risque de ruptures gastro-intestinales et artérielles spontanées. La durée de vie moyenne est de 48 ans et près de 80% des patients présentent des ruptures ou dissections de l'aorte avant 40 ans<sup>204</sup>. La réparation chirurgicale est compliquée chez ces patients, du fait de la fragilité tissulaire, du risque important d'hémorragie et de la faible capacité de réparation tissulaire. L'administration de celiprolol, de la famille des bêtabloquants, diminue l'incidence de rupture et améliore la survie chez ces patients<sup>205</sup>.

## D. L'AAA, une pathologie inflammatoire chronique de la paroi aortique

L'AAA est le résultat d'un processus physiopathologique complexe et dynamique, au cours duquel toutes les couches constitutives de la paroi aortique sont concernées par le remodelage. Bien que les modifications morphologiques et histologiques de l'anévrisme aortique aient été bien décrites et documentées, les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans sa physiopathologie sont encore incomplètement compris.

Au sein des lésions anévrismales, on observe un infiltrat important de cellules inflammatoires dans la *media* et l'adventice, préférentiellement localisé autour des zones de cassure du réseau élastique, associé à une diminution de la quantité de CML dans la *media* et à l'apparition de néo-vaisseaux<sup>206</sup>. La mobilisation et le recrutement de cellules inflammatoires, associés au stress hémodynamique appliqué sur la paroi aortique favorisent la production locale de protéases et la dégradation des lames élastiques de la *media* dans un système qui s'auto-amplifie. Sous l'influence de la réponse inflammatoire locale qui s'instaure et par l'intermédiaire de ces nombreux médiateurs, la paroi va subir un remodelage structurel important, combinant apoptose et modification du phénotype des cellules vasculaires résidentes et en particulier des CML, ainsi que dégradation et néo-synthèse des composants de la MEC<sup>207</sup>. La formation d'un thrombus intra-luminal présentant une activité protéasique est également observée au cours du développement de l'AAA chez l'homme. Ce remaniement structurel va fortement impacter les propriétés mécaniques de la paroi vasculaire, qui va perdre sa capacité de résistance aux forces de pression exercées par le flux sanguin, et va progressivement se fragiliser et se dilater, jusqu'à aboutir à la rupture [Figure 10].

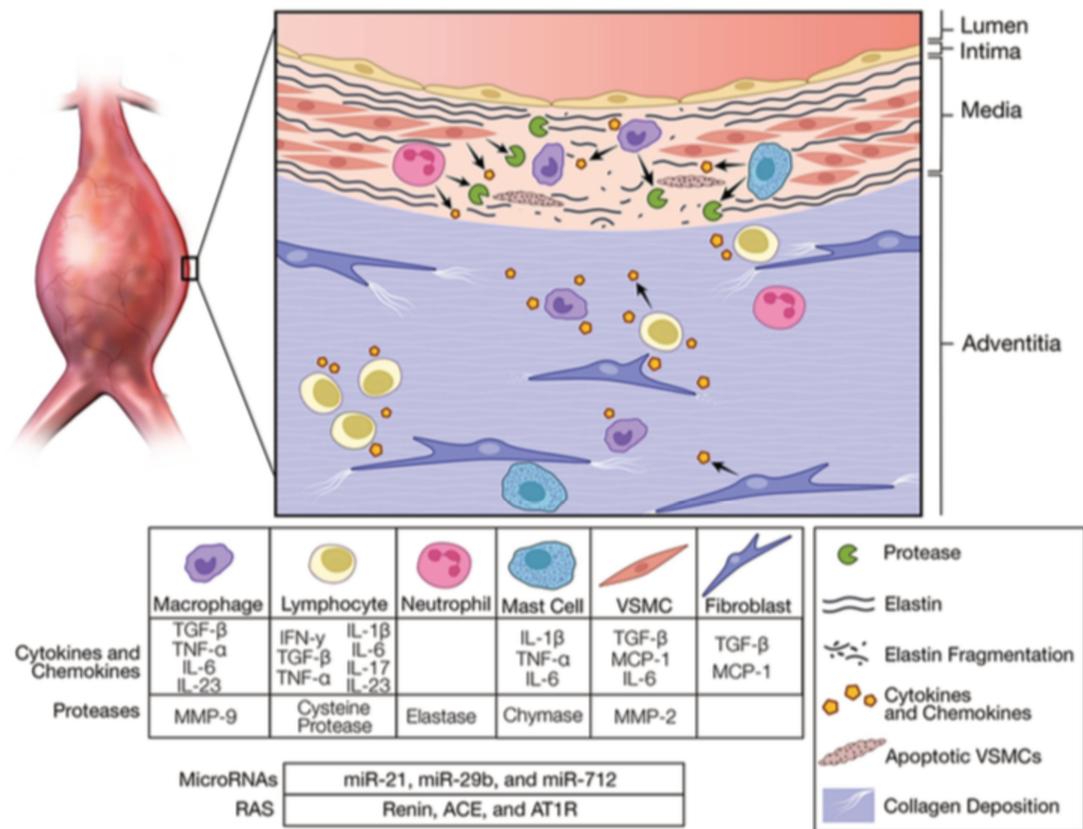


Figure 10 : Représentation schématique des mécanismes associés à la physiopathologie de l'AAA  
(D'après Davis *et al.*, 2014<sup>207</sup>)

## 1. Infiltration inflammatoire

Les résultats de nombreuses études cliniques et expérimentales ont depuis longtemps identifié l'inflammation comme un acteur majeur dans la pathogenèse de l'AAA, qui est de ce fait considéré comme une pathologie inflammatoire chronique de la paroi vasculaire. L'analyse histologique et génomique de tissus anévrismaux humains et issus de modèles expérimentaux révèle la présence de cellules de l'immunité innée (monocytes, macrophages, mastocytes, cellules dendritiques, Natural Killers (NK) et neutrophiles) et de l'immunité adaptative (lymphocytes B et T)<sup>208</sup>, ainsi que la surexpression de gènes associés aux cellules hématopoïétiques ou impliqués dans des processus inflammatoires, comme l'interaction cytokine-récepteurs de cytokine, ou la migration trans-endothéliale<sup>209,210</sup>. De plus, la caractéristique histologique la plus associée à l'augmentation du diamètre anévrismal est la densité de cellules inflammatoires dans l'adventice<sup>211</sup>, et l'inhibition de l'infiltration leucocytaire par l'administration d'un anticorps anti-CD18 dans un modèle d'AAA limite la dilatation anévrismale chez le rat<sup>212</sup>.

Le recrutement des cellules inflammatoires dans la paroi aortique est un évènement précoce déterminant dans le développement de l'AAA. Il est favorisé par les fragments de dégradation des protéines de la MEC et les chimiokines produites par les cellules vasculaires résidentes et les cellules inflammatoires elles-mêmes<sup>213,214</sup>.

La réaction inflammatoire en réponse à un dommage tissulaire est normalement organisée et contrôlée en une phase d'intervention aiguë suivie par une phase de résolution et de réparation du tissu. Dans le cas de l'AAA, l'accumulation massive de cellules inflammatoires produisant des cytokines, chimiokines, espèces réactives de l'oxygène et protéases, va entraîner l'amplification de la réponse inflammatoire pariétale et influencer l'évolution et la stabilité de l'AAA. L'absence de régulation locale et l'instauration d'une réponse inflammatoire chronique dans la paroi aortique entraînent progressivement d'importants dommages tissulaires et favorisent la progression anévrismale.

#### a) Rôle de l'immunité innée

##### (1) Les monocytes/macrophages

Les monocytes et macrophages sont des cellules phagocytaires qui jouent un rôle majeur dans le développement, l'homéostasie tissulaire et la réponse immune innée. Les macrophages font partie des cellules retrouvées en majorité dans les aortes anévrismales chez l'homme, avec les lymphocytes T et les lymphocytes B<sup>162,208,215</sup>. De nombreuses études expérimentales montrent que l'accumulation de monocytes/macrophages est observée dans toutes les couches de la paroi aortique mais principalement dans l'adventice au cours de l'initiation de l'AAA et qu'elle persiste dans le temps. En effet, la présence de monocytes/macrophages est détectée dans la paroi anévrismale entre 1 et 4 jours suivant l'infusion d'AngII chez la souris *ApoE*<sup>-/-</sup>, précédant l'apparition de dissection ou la formation d'un thrombus intra-mural<sup>162</sup>. L'infiltration des monocytes/macrophages continue d'augmenter jusqu'à 56 jours en réponse à la stimulation d'AngII<sup>216</sup>.

Les données expérimentales issues de transplantation de moelle osseuse ont montré que la majorité des macrophages détectés dans la paroi anévrismale dérivent de monocytes circulants. Il existe d'ailleurs une corrélation positive entre le nombre de monocytes circulants et le nombre de macrophages dans l'aorte abdominale<sup>217</sup>. La déplétion des monocytes circulants par l'administration de liposomes de clodronate limite l'infiltration de macrophages et de

lymphocytes dans la paroi, préserve le réseau élastique de la *media* et réduit de façon importante la sévérité de l'AAA et l'incidence de la rupture anévrismale dans les modèles d'infusion d'AngII et d'application péri-aortique d'élastase, associés à la neutralisation du TGF- $\beta$ <sup>171,183</sup>. Ces résultats suggèrent que l'infiltration de monocytes et leur différenciation en macrophages constituent des événements majeurs dans l'initiation et la progression de l'AAA.

Les macrophages jouent un rôle critique dans l'inflammation pariétale et le remodelage de la MEC, directement, en produisant des protéases ou des médiateurs inflammatoires, ou indirectement, *via* une action paracrine sur les cellules présentes dans la paroi. L'analyse immunohistochimique de tissus anévrismaux aortiques montre que l'expression tissulaire des MMPs et des cathepsines colocalise avec la présence de macrophages<sup>218,219</sup>. Les macrophages sont la source principale de MMPs dans la paroi anévrismale, et principalement de MMP-9<sup>39,174</sup>. La production de MMP-1 et -3 par les CML *in vitro* est stimulée par la co-culture avec des monocytes ou par l'exposition à des cytokines produites par les macrophages dans la paroi, comme l'IL-1 $\beta$  ou le TNF- $\alpha$ <sup>220</sup>. Les monocytes et macrophages sont également une source importante de facteurs chimiotactiques, qui vont concourir à l'amplification du recrutement leucocytaire et de l'inflammation pariétale. A l'inverse, et dans certaines conditions, les macrophages peuvent aussi jouer un rôle bénéfique dans le remodelage du tissu lors de la réparation tissulaire, notamment grâce à leur activité de phagocytose, qui leur permet de nettoyer le tissu de produits toxiques, de débris apoptotiques ou de résidus extracellulaires d'hémoglobine en cas de dissection.

Les monocytes et les macrophages sont des cellules plastiques, dont le phénotype peut être fortement influencé par l'environnement cellulaire et cytokinique. Sur la base de critères morphologiques, fonctionnels et sur l'expression de marqueurs de surface, les monocytes et macrophages ont été classés en différents sous-types, qui possèdent différentes fonctions et qui semblent jouer des rôles différents dans la pathogenèse de l'AAA<sup>221</sup>. Les facteurs influençant la mobilisation et le recrutement des monocytes, leur différenciation tissulaire et le rôle des différents sous-types de macrophages au cours du développement de l'AAA seront détaillés dans le chapitre suivant.

## (2) Les polynucléaires neutrophiles

L'analyse immunohistochimique de coupes d'AAAs humains révèle une faible infiltration de neutrophiles au niveau de l'anévrisme, principalement localisée au niveau de la face luminale du thrombus<sup>222</sup>. Les neutrophiles circulants provenant de patients avec un AAA produisent plus d'élastase neutrophilique que ceux de patients contrôles ou de patients ayant une maladie athéro-thrombotique sténosante de l'aorte<sup>223</sup>.

Dans le modèle d'AAA par perfusion intra-luminale d'élastase chez le lapin, la déplétion des neutrophiles circulants, par injection répétée d'un anticorps anti-PMN, limite la dilatation anévrismale<sup>224</sup>. Une autre étude chez la souris montre que l'injection d'un anticorps anti-Gr1, qui induit la déplétion des neutrophiles, mais également des monocytes classiques, atténue l'incidence et la sévérité de la maladie anévrismale. Dans cette même étude, le transfert adoptif de neutrophiles compétents reverse la protection des souris déficientes pour la *dipeptidyl peptidase I*, DPPI<sup>-/-</sup>, qui sont déficientes en protéases à sérine, contre le développement de l'AAA. Cette étude suggère que les neutrophiles participent aux événements précoces aboutissant au développement anévrisimal, en produisant des sérine protéases et en amplifiant le signal chimiotactique de la réponse inflammatoire par la production de *Chemokine C-X-C motif ligand 2 CXCL2*<sup>225</sup>.

Dans certaines conditions, les neutrophiles peuvent libérer un réseau constitué de filaments d'ADN et du contenu de leurs granules azurophiles, en particulier des protéases, appelé *Neutrophil Extracellular Trap* (NET). Une étude récente met en évidence la présence de NETs dans la paroi anévrismale chez l'homme, et chez la souris 3 jours après la perfusion intra-luminale d'élastase. Le traitement par un inhibiteur de la formation de NETs, la Cl-amidine, limite le développement de l'anévrisme. L'IL-1 $\beta$  est capable d'induire la formation de NETs à partir de neutrophiles humains *in vitro*, et chez la souris, le transfert adoptif de neutrophiles abroge la protection conférée par la déficience génétique en IL-1 $\beta$  sur le développement de l'AAA, suggérant un rôle combiné de l'IL-1 $\beta$  produite par les neutrophiles et de la formation de NETs dans les phases précoces du développement de l'AAA<sup>226</sup>.

### (3) Les mastocytes

Les mastocytes sont des cellules inflammatoires qui jouent un rôle important dans les réactions allergiques aiguës et chroniques. Ils sont capables de produire des protéases, comme la chymase, qui catalyse la formation de l'AngII et l'activation des MMPs, et comme les cathepsines, et de nombreuses cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Les mastocytes sont présents dans les lésions anévrismales de l'aorte abdominale chez l'homme, une partie d'entre eux sous forme dégranulée. De façon intéressante, il a été rapporté que la formation d'AngII dans la paroi aortique anévrismale était majoritairement dépendante de l'activité chymase, et que cette activité est augmentée dans les tissus extraits d'AAA comparés à des tissus aortiques sains<sup>227</sup>.

Dans un modèle expérimental d'AAA induit par perfusion intra-luminale d'élastase, l'analyse histologique révèle une infiltration de mastocytes dans la paroi aortique anévrismale au cours du temps. La souris Kit<sup>W-sh</sup>/ Kit<sup>W-sh</sup> déficiente en mastocytes est complètement protégée du développement d'anévrisme dans ce modèle, et montre une préservation du réseau élastique, une diminution de l'infiltration des leucocytes dans la paroi et de l'apoptose des CML dans la *media*. L'injection de mastocytes sauvages et déficients pour le TNF- $\alpha$  abolit la protection de ces souris contre le développement anévrisimal après 14 jours, mais pas l'injection de mastocytes déficients pour l'IL-6, l'IFN- $\gamma$  ou pour la chymase mMCP4, suggérant la participation de ces molécules dans le rôle des mastocytes au cours du développement de l'AAA<sup>228</sup>. La même équipe montre que la chymase mMCP4 régule l'expression des cathepsines B, S, K, L produites par les mastocytes, et que la délétion génétique de mMCP4 dans les mastocytes est associée à une protection significative du réseau élastique après 14 jours de perfusion intra-luminale d'élastase<sup>229</sup>. Une autre étude montre que la déficience en mastocytes chez le rat et la souris limite la dilatation anévrismale induite par l'application de CaCl<sub>2</sub> et l'infusion d'AngII respectivement, et que la co-culture de mastocytes et de macrophages humains *in vitro* augmente la production de MMP-9 par les macrophages<sup>230</sup>. L'ensemble de ces résultats expérimentaux soulignent une contribution des mastocytes à la physiopathologie de l'AAA.

Cependant, l'administration de 3 doses différentes de Pemirolast, un stabilisateur des mastocytes, sur une durée d'un an dans le cadre d'un essai clinique randomisé, n'a montré

aucun effet sur la croissance d'anévrismes de taille moyenne (de 3,9 à 4,9 cm), par rapport à l'administration d'un placebo<sup>231</sup>.

#### (4) Les cellules Natural Killers (NK)

Sur la base d'analyses immunohistologiques, plusieurs études ont démontré la présence de NK dans la paroi aortique anévrismale chez l'homme<sup>232,233</sup>. Il a également été décrit un nombre plus important de cellules NK circulantes chez les patients atteints d'AAA, comparé à des patients contrôles ou présentant une maladie vasculaire périphérique, associé à une augmentation de la cytotoxicité de ces cellules circulantes, ces deux caractéristiques persistant après l'intervention chirurgicale dans le traitement de l'anévrisme<sup>234</sup>. Cependant, aucune étude ne fait état du rôle fonctionnel des NK dans le développement de l'AAA dans la littérature.

#### (5) Les cellules dendritiques (DC)

Une étude publiée en 1998 suggère la présence de cellules dendritiques (*Dendritic cells*, DC) colocalisées avec des lymphocytes T et B au sein de l'infiltrat inflammatoire dans la paroi anévrismale aortique chez l'homme<sup>235</sup>, mais aucune étude n'a décrit depuis le rôle fonctionnel des cellules dendritiques dans la physiopathologie de l'AAA.

### b) Rôle de l'immunité adaptative

L'analyse immunohistologique de coupes de tissus aortiques de patients atteints d'AAA révèle que les lymphocytes T et B infiltrent le tissu anévrismal, les lymphocytes T CD3+ étant le type cellulaire le plus représenté à un stade avancé, avec un nombre plus important de lymphocytes CD4+ que de lymphocytes CD8+, suivi des lymphocytes B et des macrophages<sup>208</sup>. Cet infiltrat lymphocytaire a également été observé dans les modèles expérimentaux d'induction d'AAA chez la souris, suggérant leur rôle dans la physiopathologie de la maladie<sup>162,236</sup>.

#### (1) Les lymphocytes B

Un infiltrat de lymphocytes B et un dépôt d'Immunoglobulines G (IgGs) a été décrit dans la paroi anévrismale aortique chez l'homme<sup>237,238</sup>. Cet infiltrat de lymphocytes B est également retrouvé à partir du 7<sup>e</sup> jour au cours du développement de l'AAA chez la souris<sup>238,239</sup>. Différents sous-types de lymphocytes B ont été décrits dans la littérature, les lymphocytes B1 ayant plutôt un rôle athéroprotecteur, *via* la production d'Immunoglobulines M (IgM)<sup>240</sup>, et les lymphocytes

de type B2 ayant plutôt un effet athérogène<sup>241</sup>, mais leur rôle dans la physiopathologie de l'AAA reste cependant controversé.

D'un côté, la déficience permanente en lymphocytes B matures (souris  $\mu$ MT) n'a pas d'effet sur le diamètre aortique dans les modèles de perfusion et d'application péri-aortique d'élastase, mais le transfert adoptif de lymphocytes B2 de rate chez la souris  $\mu$ MT, associé à une augmentation systémique des lymphocytes T régulateurs, limite le développement de l'AAA<sup>239</sup>. De l'autre côté, la déficience permanente en lymphocytes B matures chez la même souris  $\mu$ MT limite la dilatation anévrismale dans le modèle d'application péri-aortique de  $\text{CaCl}_2$ , et cet effet est réversé par l'injection d'IgGs exogènes, suggérant un effet pathogène des lymphocytes B médié par les IgGs<sup>238</sup>. La déplétion des lymphocytes B par l'administration d'un anticorps anti-CD20 diminue de façon significative les diamètres aortiques 14 jours après la perfusion intraluminaire d'élastase<sup>242</sup>. La participation des différents sous-types de lymphocytes B dans la physiopathologie de l'AAA reste donc encore à élucider.

## (2) Les lymphocytes T

Alors que certaines études n'ont montré aucun effet de la déficience combinée de l'ensemble des lymphocytes T et B matures chez la souris  $\text{Rag1}^{-/-}$  sur le développement de l'AAA induit par l'AngII<sup>243</sup>, la souris  $\text{CD4}^{-/-}$  est protégée contre le développement de l'AAA induit par application de  $\text{CaCl}_2$ . Malgré une infiltration massive de lymphocytes T  $\text{CD4}^+$  détectée dans le tissu anévrismal à des stades avancés chez l'homme, les données sont cependant contradictoires quant au rôle des différents sous-types de lymphocytes T  $\text{CD4}^+$  dans le développement de l'AAA. En effet, les lymphocytes T  $\text{CD4}^+$  peuvent évoluer vers différents phénotypes cellulaires, principalement les lymphocytes T helper (Th1, Th2 et Th17), les lymphocytes T régulateurs (Treg) et les lymphocytes T helper folliculaires (Thf), en fonction de l'environnement inflammatoire dans lequel ils sont activés. Ces différents sous-types de populations lymphocytaires présentent des profils cytokiniques différents, qui vont leur permettre de moduler la réponse inflammatoire de façon spécifique.

Certaines études rapportent que les cytokines principalement exprimées dans le tissu anévrismal chez l'homme sont plutôt de type Th2, avec une production accrue d'IL-4, IL-5 et IL-10 et une diminution d'IFN- $\gamma$  et de son récepteur<sup>244</sup> et que le blocage de la signalisation Th1 et l'orientation consécutive vers une polarisation Th2, principalement médiée par l'IL-4 sont pathogènes et entraînent le développement d'anévrisme dans un modèle d'allogreffe chez la

souris<sup>245</sup>. D'autres études font état de données contradictoires, rapportant par exemple une expression importante d'IFN- $\gamma$  au sein de l'AAA chez l'homme<sup>246</sup>. Dans une étude expérimentale, l'injection d'IFN- $\gamma$  est capable d'induire la progression anévrismale chez des souris CD4<sup>-/-</sup> en restaurant l'activité des MMP-9 et -2. Dans l'autre sens, l'injection de splénocytes compétents, mais pas de splénocytes CD4<sup>-/-</sup> reverse la protection conférée par la déficience totale en INF $\gamma$ , suggérant un rôle des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> médié par l'IFN- $\gamma$  dans le développement de l'AAA<sup>247</sup>.

Chez l'homme, le nombre de lymphocytes Treg, caractérisés par l'expression de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, qui sont une source importante d'IL-10 et de TGF- $\beta$  et qui ont un rôle majeur dans la tolérance immunologique et le contrôle de la réponse inflammatoire, est diminué dans le sang circulant de patients atteints d'AAA, comparé à ceux issus de patients contrôles ou en présence d'athérosclérose. De plus, la capacité immunosuppressive de ces lymphocytes, mesurée par leur habilité à inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, est altérée chez les patients atteints d'AAA<sup>248</sup>. Chez la souris, le nombre de cellules Foxp3<sup>+</sup> dans le tissu anévrismal est inversement corrélé au diamètre aortique après infusion d'AngII, et la dilatation anévrismale est limitée de façon dose-dépendante par le transfert adoptif de Treg compétents, qui diminue localement la production de cytokines, chimiokines pro-inflammatoires et de MMP-2 et -9, mais pas de Treg déficients pour l'IL10<sup>249,250</sup>. Notre équipe a montré que la déficience génétique en Treg ou la déplétion induite par injection d'un anticorps anti-CD25 augmente l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> effecteurs et aggrave la dilatation aortique et l'incidence de rupture dans le modèle d'infusion d'AngII chez la souris C57BL/6J. Les effets vasculoprotecteurs des Treg sur le développement de l'AAA sont abolis lorsqu'ils sont déficients en IL-10<sup>251</sup>. Enfin, l'expansion *in vivo* de la population Treg par injection du complexe IL-2/anti-IL-2 limite le développement de la dilatation anévrismale et réduit le risque de rupture suivant l'infusion d'AngII<sup>252</sup>. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les T régulateurs ont un rôle protecteur dans le développement de l'AAA *via* un effet local suppresseur de l'inflammation.

Les études qui se sont intéressées au rôle des lymphocytes Th17, qui sont une source majeure de production d'IL-17 et d'IL-23, dans le développement de l'AAA font état de résultats contradictoires. Sharma *et al.* montrent que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> produisant de l'IL-17 participent au développement anévrismal, et que la déficience génétique en IL-17 limite la

réponse inflammatoire et la sévérité de l'AAA<sup>253</sup>. L'IL-17A est exprimée dans le tissu anévrisimal aortique chez l'homme et l'inhibition de la différenciation des lymphocytes Th17 par la digoxine, associée à une diminution de la production d'IL-17, atténuée de façon dose-dépendante l'incidence de l'AAA dans deux modèles expérimentaux d'AAA en diminuant la réponse inflammatoire<sup>254</sup>. Notre équipe a montré que la surexpression du *Suppressor of Cytokine Signaling 3* (SOCS3) spécifiquement dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> entraîne une diminution de la production d'IL-17 et accroît la susceptibilité de souris C57BL/6J au développement anévrisimal après infusion d'AngII et neutralisation du TGF- $\beta$ <sup>255</sup>. L'ensemble de ces résultats contradictoires laissent planer le doute sur le rôle de la réponse Th17, et ne permettent pas pour le moment d'établir une relation causale entre l'IL-17 et le développement de l'AAA.

Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ont été détectés au sein des lésions anévrismales, mais il existe très peu de données dans la littérature quant à leur rôle dans le développement de l'AAA. Une étude suggère que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> pourraient promouvoir le développement anévrisimal *via* un mécanisme médié par la production d'IFN- $\gamma$ , mais ces résultats nécessitent d'être confirmés<sup>208,237,256</sup>.

### c) Les cytokines

Les cytokines sont des molécules de signalisation, qui favorisent la communication intercellulaire. Elles orchestrent l'activité cellulaire en réponse à l'inflammation locale et systémique au cours du développement de l'AAA, en régulant l'expression génique et l'activité protéique, de façon autocrine ou paracrine principalement. Certaines cytokines peuvent avoir des effets redondants, cumulatifs ou compensateurs entre elles et une même cytokine peut induire des effets différents selon le type cellulaire sur lequel elle agit. Une quantité importante de cytokines, ayant des activités pro- et anti-inflammatoires, est associée à l'infiltrat inflammatoire dans le tissu anévrisimal aortique et va participer à l'inflammation locale et au remodelage de la MEC, en régulant la production de chimiokines, de MMPs, de protéases à sérine et de cathepsines.

De nombreuses études rapportent de façon constante l'augmentation des taux plasmatiques et tissulaires d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  chez les patients atteints d'AAA comparé à des contrôles sains ou à des patients présentant une maladie athéromatose<sup>123,124,209,257</sup>,

suggérant que ces cytokines sont impliquées dans la pathogenèse de l'AAA. Certaines études rapportent des tendances d'expression différentes selon le diamètre anévrismal ou l'existence de symptômes. L'IL-1 $\beta$  est produite principalement par les macrophages, mais elle peut aussi être produite par les CE et les CML, en réponse à la stimulation par l'IL-1 $\beta$  elle-même, dans une boucle de régulation positive ou par d'autres cytokines pro-inflammatoires<sup>258</sup>. L'IL-1 $\beta$  stimule l'expression de gènes impliqués dans le *turn-over* du collagène et dans la production des MMPs par les CML et les macrophages *in vitro*, et l'induction de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales, facilitant la transmigration des leucocytes<sup>259-261</sup>. Dans un modèle expérimental d'AAA induit par l'application péri-aortique de CaCl<sub>2</sub>, les taux tissulaires d'IL-1 $\beta$  augmentent fortement dès le 3<sup>ème</sup> jour, l'expression protéique dans la paroi anévrismale colocalise avec la présence des CML dans la *media* et des macrophages dans l'adventice. La délétion génétique en IL-1 $\beta$  limite le développement de l'AAA dans le modèle de perfusion d'élastase et protège complètement de la rupture dans le modèle associant application péri-aortique d'élastase et neutralisation du TGF- $\beta$ <sup>183,262</sup>. En revanche, l'IL-1 $\beta$  semble avoir un rôle limité dans la progression d'un AAA déjà établi, puisque son inhibition pharmacologique n'a aucun effet sur l'incidence de la rupture anévrismale quand elle est débutée une semaine après l'initiation de l'anévrisme<sup>183</sup> et le Canakinumab, un anticorps monoclonal dirigé contre l'IL-1 $\beta$ , n'a pas montré d'effet protecteur sur l'expansion d'anévrismes de 4 à 5 cm dans un essai clinique randomisé (clinicaltrials.gov, NCT02007252). Cependant, le nombre de patients inclus dans cette étude était limité, et la compliance au traitement n'était pas optimale.

L'IL-6 est produite par les macrophages, les lymphocytes T, les fibroblastes, les CML et les CE, et stimule la prolifération des CML, des lymphocytes et la production d'anticorps par les lymphocytes B<sup>263</sup>. Bien que de nombreuses études rapportent l'augmentation des taux circulants et tissulaires d'IL-6 dans l'AAA, son rôle dans le développement de la maladie est encore largement incompris. Un variant fonctionnel responsable d'une diminution de l'activité du récepteur à l'IL-6 (IL-6R) a été associé avec un risque moins important de développer un AAA<sup>264</sup>. L'activation de la voie de signalisation de l'IL-6 nécessite la dimérisation de l'IL-6R avec son corécepteur, le gp130, exprimé de façon ubiquitaire. L'IL-6R existe sous deux formes, sous une forme liée à la membrane (mIL-6R), exprimée par un nombre limité de types cellulaires, ou sous forme soluble (sIL-6R). Ces deux formes constituent deux voies possibles d'activation de la signalisation IL-6, la voie classique, par la liaison de l'IL-6 au mIL-6R, ou la voie de « trans-signaling », par la liaison au sIL-6R et sa dimérisation subséquente avec le gp130 membranaire. La délétion génétique de l'IL-6 n'a pas d'effet sur la dilatation

anévrismale dans un modèle d'application péri-aortique d'élastase chez la souris<sup>265</sup> et l'inhibition pharmacologique de l'IL-6R n'a qu'un effet limité sur la dilatation anévrismale dans le modèle d'application péri-aortique de CaCl<sub>2</sub>, malgré un effet d'inhibition sur la production de MCP-1<sup>266</sup>. Une autre étude a rapporté que l'inhibition pharmacologique de l'IL-6R empêche l'augmentation de la pression artérielle dans le modèle AngII + neutralisation du TGF-β, mais ne protège pas de la rupture anévrismale. En revanche, l'inhibition pharmacologique de la voie de « trans-signaling » de l'IL-6, avant initiation de l'AAA par application péri-aortique d'élastase et neutralisation du TGF-β, améliore la survie des animaux, suggérant un rôle différent et potentiellement compensateur des deux voies d'activation de la signalisation IL-6 l'une envers l'autre dans le développement de l'AAA<sup>267</sup>. Le TNF-α stimule de façon dose-dépendante la production des MMP-2 et -9 par les CML et les macrophages *in vitro*, et la délétion génétique ou l'inhibition pharmacologique du TNF-α limite le développement de l'AAA expérimental<sup>268</sup>.

Le TGF-β est impliqué dans de nombreux processus biologiques participant au développement de l'AAA, comme le remodelage de la MEC, la survie et la prolifération des CML et l'activation de la réponse inflammatoire. Le TGF-β inhibe la production et l'activité des MMPs produites par les macrophages humains stimulés<sup>269</sup>, et stimule la production de collagène par les CML et les fibroblastes *in vitro*<sup>270,271</sup>. Comme dans le cas des anévrismes de l'aorte thoracique, le rôle du TGF-β dans le développement de l'AAA est controversé, mais la majorité des données expérimentales s'oriente en faveur d'un rôle protecteur. En effet, la délétion génétique post-natale du récepteur au TGF-β, TGFβRII augmente la susceptibilité au développement d'anévrismes de l'aorte abdominale et thoracique<sup>272</sup>. Chez le rat, la surexpression locale de TGF-β stabilise les AAA déjà formés<sup>170</sup>, et l'augmentation du TGF-β participe à la protection conférée par le traitement par la cyclosporine A, actuellement en essai clinique de phase II, contre le développement de l'AAA<sup>170</sup>. De plus, la neutralisation du TGF-β est à elle seule capable d'augmenter fortement ou d'induire l'incidence des ruptures anévrismales dans les modèles expérimentaux d'infusion continue d'AngII<sup>171</sup> et d'application péri-aortique d'élastase respectivement<sup>183</sup>, soulignant l'importance du TGF-β dans l'évolution et les complications liées au développement anévrismal.

Comme discuté précédemment, les résultats cliniques et expérimentaux sont contradictoires dans la littérature concernant le rôle des cytokines de type Th1, comme l'IFN-γ ou l'IL-2 qui

ont été impliquées dans le développement de l'athérosclérose, et de type Th2, comme l'IL-10 et l'IL-4 dans le développement de l'AAA<sup>123,244,245,247,257</sup>. Les cytokines de type Th1 et Th2 peuvent induire ou inhiber la production de MMPs, selon les conditions expérimentales et le type cellulaire sur lequel elles agissent<sup>273</sup>. Alors que les effets de régulation positive de la réponse inflammatoire par l'IFN- $\gamma$  et son rôle pathogène dans l'athérosclérose sont largement documentés dans la littérature, plusieurs études rapportent que l'IFN- $\gamma$  peut inhiber la production de MMPs par les macrophages humains et murins, et que son inhibition aggrave la maladie anévrismale aortique chez la souris<sup>245,269,274,275</sup>. L'IL-4 et IL-10 inhibent la production de MMP-9 par des macrophages humains<sup>59</sup>, mais l'IL-4 induit l'expression de la MMP-12 par des macrophages murins<sup>245</sup>. La déficience en IL-10 augmente la sévérité et les complications de la maladie anévrismale aortique induite par l'AngII associée à la neutralisation du TGF- $\beta$  chez la souris C57BL/6J<sup>251</sup>.

La balance Th1/Th2 est susceptible de jouer un rôle dans le développement de l'anévrisme, certains ont proposé l'hypothèse que la réponse Th1 pourrait participer au recrutement des cellules inflammatoires et à l'initiation de l'AAA, puis sous l'effet de l'exposition continue à certains facteurs de risque et de la réponse inflammatoire locale, la réponse Th2 prendrait l'ascendant et influencerait l'évolution de l'AAA à des stades plus avancés de la maladie, différenciant la physiopathologie de l'AAA de celle de l'athérosclérose.

## 2. Remodelage de la matrice extracellulaire

Au cours du développement de l'AAA, l'augmentation locale de la production et de l'activation des protéases va entraîner un déséquilibre de la balance finement régulée entre synthèse et dégradation des composants de la MEC, et la faire dangereusement pencher en faveur de la protéolyse. La destruction et la désorganisation de l'architecture des fibres d'élastine et des composants de la MEC entraîne des modifications structurelles et fonctionnelles de la paroi aortique, qui vont, combinées aux caractéristiques anatomiques et aux forces mécaniques appliquées à l'aorte abdominale, entraîner une dilatation progressive de l'aorte, jusqu'à aboutir à la formation d'un anévrisme.

### a) Dégradation des composants de la MEC

L'évolution de l'anévrisme est dépendant d'un remodelage hautement dynamique entre dégradation et dépôt de composants de la MEC. Les MMPs, les cathepsines et le système fibrinolytique produits par les cellules inflammatoires infiltrant la paroi et par les cellules

vasculaires résidentes vont dégrader l'élastine, les glycoprotéines et les molécules de collagène, modifiant de façon majeure les propriétés structurales de la paroi<sup>276,277</sup>.

Compte tenu de leur rôle dans l'homéostasie de la paroi, la désorganisation des composants de la MEC va également avoir un impact sur l'activité cellulaire locale, et moduler la prolifération, la différenciation, la migration et l'apoptose, faciliter l'angiogenèse et le recrutement de cellules inflammatoires. Il a été montré que les produits de fragmentation de l'élastine, les *Elastin-Derived Peptides* (EDP) favorisent le développement de l'AAA par leur pouvoir hautement chimiotactique sur les monocytes et les neutrophiles et par l'activation et la polarisation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire avec une production accrue de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et de MMP-9. L'administration d'un anticorps qui cible le motif répété de l'élastine VGVAPG réduit l'infiltration macrophagique une semaine après l'induction de l'anévrisme, atténue la réponse inflammatoire et la production de MMP-2 et -9, et finalement limite la dilatation anévrismale<sup>278,279</sup>. Les dérivés du collagène ont également des propriétés chimiotactiques *in vitro* pour les monocytes, mais pas pour les neutrophiles<sup>280</sup>.

Le réseau élastique est une des cibles majeures de l'action des protéases dans le développement de l'AAA, au cours duquel il est dégradé principalement par les MMP-2, -9, -7 et -12. La dégradation importante du réseau élastique est souvent compensée en conditions pathologiques par l'accumulation ou la réticulation d'autres composants de la MEC<sup>281</sup>. En particulier, alors que la proportion d'élastine diminue, la quantité de collagène est augmentée dans la paroi anévrismale chez l'homme, principalement au niveau du ventre de l'anévrisme, entraînant une fibrose pariétale<sup>282</sup>.

Ces changements structuraux vont entraîner des modifications importantes des propriétés fonctionnelles de la paroi aortique. Une ancienne étude montre que l'exposition d'artères canines et humaines à l'élastase entraîne une dilatation artérielle mais sans rupture, alors que l'exposition à la collagénase entraîne la rupture de tous les vaisseaux, suggérant que la dilatation et la rupture pourraient être causées en partie par des mécanismes différents, que l'élastine est nécessaire au maintien du diamètre aortique, et le collagène à l'intégrité du vaisseau<sup>283</sup>. L'augmentation de la production des fragments dérivés du collagène montrent que le collagène est également soumis à une dégradation protéolytique dans la paroi anévrismale chez l'homme<sup>284</sup>. Les molécules de collagènes sont hautement résistantes à la dégradation, qui nécessite l'action de collagénases spécifiques, comme les MMP-1, -8, -13, -14 et -18 ou des

protéases à sérine. Les molécules de collagène déstabilisées peuvent ensuite être plus facilement dégradées par les gélatinases, MMP-2 et MMP-9 ou d'autres protéases. La rupture anévrismale peut survenir quand la protéolyse dépasse le potentiel de synthèse et de réticulation du collagène. En effet, l'activité collagénase dans la paroi est particulièrement augmentée dans les anévrismes rompus<sup>282</sup>, et une faible quantité de collagène a été associée au risque de rupture<sup>285</sup>.

## b) Rôle des MMPs

De nombreuses études ont mis en évidence la participation importante de l'activité métalloprotéinase dans la dégradation matricielle au cours du développement de l'AAA<sup>45,276,286</sup>. Les MMPs peuvent être produites par les cellules inflammatoires infiltrant la paroi, et par les cellules vasculaires et leur expression est fortement influencée par les interactions cellulaires et l'environnement cytokinique. La production de MMPs est donc particulièrement favorisée dans la paroi anévrismale aortique, qui constitue un environnement riche en cellules et en médiateurs pro-inflammatoires. L'inhibition de l'activité MMP par l'administration de doxycycline limite la destruction médiale sans affecter l'infiltration inflammatoire et finalement réduit l'incidence de l'AAA chez le rat et la souris<sup>287,288</sup>. Plusieurs études ont également suggéré que le déséquilibre de la balance entre l'activité MMP et l'activité de leurs inhibiteurs, les TIMPs, contribuait de façon majeure au développement de l'AAA<sup>289,290</sup>.

Les MMP-2 et -9, ou gélatinases, sont les protéases les plus fréquemment et abondamment retrouvées dans la paroi anévrismale. La MMP-2 est normalement exprimée par les cellules vasculaires à l'état de base, son expression et son activité sont augmentées dans le tissu anévrismal, où elle peut être produite par les macrophages et les cellules vasculaires. Les CML issues de tissu anévrismal humain ont une production et une activité accrues de MMP-2 *in vitro*<sup>277,291</sup> et les analyses immunohistochimiques montrent que l'expression de MMP-2 est préférentiellement détectée dans les CML, surtout quand elles se trouvent accolées aux zones de forte infiltration inflammatoire<sup>292</sup>. La concentration de la MMP-2 est augmentée dans les petits anévrismes, et sa concentration tissulaire est corrélée au diamètre aortique dans les larges anévrismes asymptomatiques, suggérant un rôle de MMP-2 dans l'expansion de la dilatation anévrismale<sup>211,293</sup>. La déficience génétique en MMP-2 abolit le développement anévrismal dans un modèle expérimental d'application péri-aortique de CaCl<sub>2</sub>, et cette protection n'est pas altérée par le transfert adoptif de macrophages péritonéaux compétents, soulignant le fait que ces cellules ne sont pas la source majeure de MMP-2 au cours du développement de l'AAA<sup>174</sup>.

La MMP-9 est la MMP majoritaire dans l'AAA, comme l'ont montré de nombreuses études *in vivo* et *in vitro*. Son expression tissulaire et son activation sont fortement augmentées dans les aortes anévrismales humaines, en comparaison avec des aortes athéromateuses et saines<sup>44,277,294</sup>. Les techniques d'immunohistochimie ou d'hybridation *in situ* localisent majoritairement l'expression de la MMP-9 au niveau de l'infiltrat macrophagique dans l'adventice de la paroi anévrismale<sup>39</sup>, mais elle peut également être produite par les cellules vasculaires activées. En effet, la production de MMP-9 par les CML issues d'aortes normales est indétectable *in vitro*, elle est en revanche significativement induite dans les CML issues d'aortes anévrismales<sup>277</sup>. La production de MMP-9 par les macrophages est stimulée *in vitro* par l'interaction avec les lymphocytes T activés *via* une interaction cellulaire médiée par CD40/CD40L<sup>47</sup>, et inhibée par des médiateurs inflammatoires comme INF $\gamma$ , IL-4 et IL-10<sup>59</sup>. L'expression protéique de MMP-9 tissulaire est plus importante dans les anévrismes rompus que dans les larges anévrismes asymptomatiques, suggérant un rôle de la MMP-9 dans l'évolution de l'AAA vers la rupture<sup>295</sup>. Les taux plasmatiques de MMP-9 sont également augmentés chez les patients atteints d'AAA, ils sont significativement plus importants quand ils sont associés à des anévrismes de taille moyenne et des anévrismes rompus, comparé à des petits ou à des larges anévrismes, et chutent de façon significative après réparation endovasculaire, soulignant le caractère dynamique et cinétique de l'activité protéasique au cours du développement de l'AAA<sup>296,297</sup>. Dans un modèle expérimental d'anévrisme induit par infusion intra-luminale d'élastase, la déficience en MMP-9 est associée à une préservation du réseau élastique de la *media* et protège de la dilatation anévrismale chez la souris, sans montrer d'effet sur le recrutement des cellules inflammatoires dans la paroi. Cette protection est également observée après transplantation de cellules de moelle osseuse déficientes en MMP-9 dans des souris receveuses sauvages, mais est abolie par la transplantation de cellules de moelle osseuse exprimant la MMP-9 chez des souris receveuses déficientes en MMP-9<sup>176</sup>. Ces résultats ont été confirmés dans une seconde étude, où la protection conférée par la déficience génétique en MMP-9 est abolie par le transfert adoptif de macrophages péritonéaux compétents, soulignant la participation cruciale des macrophages dans la dégradation de la MEC médiée par la MMP-9<sup>174</sup>.

La MMP-12, ou élastase macrophagique, participe activement à l'activité élastolytique des macrophages<sup>298</sup>. Les analyses de l'expression génique et protéique de la MMP-12 montrent qu'elle est exprimée dans le tissu anévrismal chez l'homme, particulièrement dans la zone active de dégradation du réseau élastique dans la *media*, où elle apparaît accolée aux fragments de lames élastiques et semble exprimée principalement par les macrophages<sup>218</sup>. Les résultats

expérimentaux ont montré des résultats contradictoires quant au rôle de la MMP-12 dans le développement anévrisimal, qui mérite d'être confirmé. En effet, contrairement à la déficience en MMP-9, la déficience en MMP-12 n'a pas d'effet sur le développement anévrisimal dans un modèle induit par perfusion intra-luminale d'élastase<sup>176</sup>. En revanche, dans un modèle de souris *ApoE*<sup>-/-</sup> sous régime riche en matières grasses pendant 5 semaines et dans le modèle d'AAA induit par application péri-aortique de CaCl<sub>2</sub>, la déficience en MMP-12 limite l'incidence d'AAA et la dégradation du réseau élastique dans la paroi, sans toutefois complètement l'abroger, signifiant que la MMP-12 participe au développement de l'AAA, en association avec d'autres protéases<sup>299,300</sup>.

Les études fonctionnelles ont rapporté l'existence d'une importante activité collagénase au cours du développement de l'AAA. L'expression de MMP-1 est augmentée dans les aortes anévrismales, comparée aux aortes saines<sup>45,286</sup>. L'expression de MMP-13 n'est quasiment pas détectée dans les tissus sains, mais est fortement exprimée dans la paroi anévrismale où elle est localisée au niveau des CML<sup>301</sup>. La MMP-8 est exprimée dans la paroi anévrismale et colocalise avec la présence de neutrophiles, cependant, la déficience en MMP-8 n'a aucun effet sur le développement de l'AAA induit par perfusion d'élastase intra-luminale, suggérant que la MMP-8 n'aurait pas un rôle crucial dans le développement de l'AAA<sup>224,284</sup>.

L'expression tissulaire et plasmatique de MMP-3 est augmentée dans les échantillons provenant de patients atteints d'AAA mais son rôle reste largement indéfini<sup>290,297</sup>. Une étude montre que la déficience génétique en MMP-3 chez la souris *ApoE*<sup>-/-</sup> réduit l'incidence du développement d'AAA après 30 semaines de régime riche en matières grasses<sup>302</sup>.

La MT1-MMP est plus exprimée au niveau génique et protéique dans le tissu anévrisimal aortique chez l'homme (surtout dans les monocytes/macrophages, les CML et les fibroblastes) que dans des aortes saines ou athéromateuses. La MT1-MMP joue un rôle important dans la conversion de la MMP-2 en sa forme active, et en effet, le tissu anévrisimal humain a une plus grande capacité d'activation de la pro-MMP2 *in vitro* que le tissu aortique athéromateux ou sain<sup>303</sup>. La déficience génétique en MT1-MMP réduit considérablement l'incidence de la dilatation anévrismale induite par application péri-aortique de CaCl<sub>2</sub>, et le transfert adoptif de macrophages compétents restaure la susceptibilité au développement d'anévrisme<sup>304</sup>, soulignant le rôle de la MT1-MMP dans le développement de l'AAA, et la coopération entre

cellules inflammatoires infiltrantes et cellules vasculaires résidentes dans la dégradation de la MEC de la paroi vasculaire.

L'expression et l'activité des MMPs peuvent être régulée à différents niveaux, et une des hypothèses concernant le remodelage délétère de la MEC au cours du développement de l'AAA est la création d'un déséquilibre entre l'activité MMP et celle de leurs inhibiteurs, les TIMPs. Contrairement à certaines MMPs, TIMP-1 est exprimé dans l'aorte saine et par les CML en conditions de base *in vitro*. La variation de l'expression génique et protéique des inhibiteurs de MMPs, TIMP-1<sup>39,286</sup> et TIMP-2<sup>294</sup> au cours du développement de l'AAA, est variable selon les études, elle souvent augmentée, ou inchangée dans les tissus anévrismaux, et colocalise avec les CML dans la paroi<sup>292,305</sup>. En revanche, le *ratio* de l'expression MMP/TIMP est plus important dans l'aorte anévrismale que dans le tissu sain, suggérant que l'augmentation de l'expression des MMPs prend le dessus sur celle des TIMPs<sup>39,286,294</sup>. La surexpression locale de TIMP-1 dans un modèle anévrisimal d'allogreffe chez le rat restaure la balance MMP/TIMP en diminuant l'expression et l'activité des MMP-2 et -9, et finalement limite la dilatation anévrismale<sup>306</sup>. Dans une autre étude, la déficience génétique en TIMP-1 aggrave la dilatation anévrismale induite par perfusion intra-luminale d'élastase chez la souris<sup>307</sup>, confirmant que l'activité inhibitrice de TIMP-1 contribue au maintien de l'intégrité de la paroi vasculaire au cours du développement de l'AAA.

### c) Implication d'autres protéases

D'autres protéases, les ADAMs, les cathepsines ou les différents composants du système fibrinolytique ont été également été impliqués dans le développement de l'AAA.

L'expression d'ADAM10 et ADAM17 est augmentée dans les aortes abdominales anévrismales comparées à des aortes saines ou athéromateuses, et plusieurs études expérimentales suggèrent leur implication dans la physiopathologie de l'AAA<sup>308,309</sup>. La déficience en ADAM17, spécifiquement dans les CML protège de la survenue de l'AAA dans un modèle d'infusion continue d'AngII + BAPN<sup>310</sup>.

L'expression et l'activité de nombreuses cathepsines (A, B, D, G, H, K, L, S) sont augmentées dans la paroi aortique anévrismale. Parmi elles, l'activité élastolytique des cathepsines L, S, K, produites par les macrophages et les CML est augmentée dans les anévrismes en croissance et

les anévrismes rompus<sup>284</sup>. Cette activité élastolytique est fortement stimulée par la présence de certaines cytokines, comme l'IL-1 $\beta$  ou l'IFN- $\gamma$ <sup>311</sup>. La déficience en cathepsines L, S ou K limite le développement de l'AAA dans les modèles expérimentaux d'infusion continue d'Angiotensine II et de perfusion d'élastase intra-luminale<sup>312-314</sup>. L'expression de la cystatine C, l'inhibiteur majeur de l'activité des protéases à cystéine, est diminuée dans la paroi anévrismale. Sa sécrétion protéique par les CML est induite par le TGF- $\beta$  *in vitro*<sup>315</sup>.

Parmi les protéinases à sérine, la chymase produite par les mastocytes a été détectée en quantité significativement plus importante dans les aortes anévrismales par rapport aux aortes normales<sup>104</sup>. La chymase issues d'AAA est capable d'activer la MMP-9 *in vitro*<sup>316</sup>. Une étude montre que la protéase à sérine, Granzyme B, joue un rôle dans le développement de l'AAA expérimental dans un modèle d'infusion continue d'AngII, en participant à la dégradation des composants de la MEC *via* un mécanisme indépendant de la perforine<sup>317</sup>. La souris déficiente en dipeptidyl-peptidase I (DPPI<sup>-/-</sup>), nécessaire à la maturation post-transcriptionnelle des protéases à sérine, qui présente donc un défaut d'activité de l'élastase neutrophilique, de la cathepsine G, de la chymase ou des granzymes, est protégée contre le développement de l'AAA induit par perfusion intra-luminale d'élastase, avec une protection du réseau élastique et une diminution de l'infiltrat inflammatoire<sup>225</sup>.

Les composants du système fibrinolytique ont été associés au développement de l'AAA. En effet, la concentration des complexes plasmine/anti-plasmine et des D-dimères est plus élevée dans le plasma de patients atteints d'AAA que dans celui de patients contrôles sains. La même étude montre que le plasminogène serait stocké à partir de la circulation dans le thrombus et qu'il y aurait une augmentation de la production des activateurs du plasminogène (PA) dans la paroi anévrismale<sup>318,319</sup>. Les activateurs du plasminogène (tPA ou uPA), produits par les macrophages, les cellules endothéliales et les CML de la paroi aortique peuvent participer à la dégradation des composants de la MEC, activer les MMPs, et entraîner l'activation et la dégranulation des neutrophiles *in vitro*<sup>54,320</sup>. Cependant, les études s'intéressant à la fonction des activateurs du plasminogène rapportent des résultats contradictoires. Alors que dans une étude, la déficience en activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) limite l'incidence et l'expansion de l'AAA chez les souris *ApoE*<sup>-/-</sup> et C57BL/6J après infusion d'AngII<sup>165</sup>, elle n'a pas d'effet sur le diamètre aortique à la fin de l'expérience mais entraîne une augmentation des décès par rupture chez les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> et C57BL/6J, après infusion d'AngII<sup>321</sup>. Enfin, la surexpression locale de l'inhibiteur des activateurs du plasminogène, PAI-1, empêche le

développement d'anévrisme dans un modèle d'allogreffe chez le rat, en réduisant l'activation des MMP-3 et -9<sup>322</sup>. Même si la participation du système fibrinolytique dans le développement de l'AAA n'est pas clairement identifiée, il apparaît qu'il joue un rôle dans l'activation des MMPs au cours du développement de l'AAA.

### 3. Perte des CML et destruction de la *media*

En plus de l'importante détérioration du réseau élastique dans la paroi, une diminution de la densité des CML participe à l'amincissement de la *media*, et constitue une des caractéristiques physiopathologiques majeures de l'AAA.

En conditions homéostatiques, les CML de la paroi vasculaire adoptent un phénotype quiescent et expriment un répertoire unique de protéines contractiles, comme l' $\alpha$ -*smooth muscle actin* ( $\alpha$ -SMA), la *smooth muscle heavy chain* (SM-MHC), la calponine ou la protéine Sm22 $\alpha$ , ce qui les caractérise et leur permet de participer de façon active à la régulation du tonus vasculaire<sup>323</sup>. Dans la paroi anévrismale aortique chez l'homme et dans les modèles expérimentaux d'AAA, on observe une diminution d'environ 75% de l'expression de l' $\alpha$ -SMA, comparé à une paroi aortique saine. Cette perte des marqueurs spécifiques des CML est associée à une augmentation de l'apoptose, quantifiée par des techniques de détection des extrémités 3'OH libres de l'ADN fragmenté, et à une accumulation de molécules impliquées dans la mort cellulaire, comme p53, le couple Fas/FasL ou la perforine. On observe également une augmentation de la production de médiateurs pro-inflammatoires et de protéases, ainsi qu'une modification du phénotype et de l'organisation structurelle des CML vasculaires<sup>293,324-327</sup>.

Les CML vasculaires sont des cellules plastiques, capables de s'adapter aux changements de leur environnement. En réponse à une altération de l'homéostasie tissulaire, elles peuvent subir une déviation du phénotype contractile différencié vers un phénotype dédifférencié et sécrétoire. Ce « switch phénotypique » est associé à des modifications structurelles et fonctionnelles, comme une répression de l'expression des protéines contractiles et une augmentation de l'expression de médiateurs pro-inflammatoires, de protéases, ainsi qu'une modification de leur capacité de prolifération et de migration. Ce changement phénotypique est observé au cours du vieillissement artériel physiologique, mais a aussi été impliqué dans la physiopathologie de maladies vasculaires comme l'athérosclérose ou les anévrismes de l'aorte<sup>328</sup>.

L'expression génique de l' $\alpha$ -SMA et de Sm-22 $\alpha$  est fortement diminuée dans la paroi aortique de souris dans différents modèles expérimentaux d'AAA, et est associée à une augmentation de la production de MMP-2 et de MMP-9 dans la *media*<sup>325,329</sup>. Une étude *in vivo* confirme la relation entre la régulation négative de Sm-22 $\alpha$  et le développement de l'anévrisme et montre d'un côté que l'inhibition de la production de Sm-22 $\alpha$  est associée à une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène et aggrave la maladie anévrismale aortique, et de l'autre côté que la surexpression de Sm-22 $\alpha$  a un effet protecteur contre le développement de l'AAA dans deux modèles expérimentaux d'anévrisme<sup>329</sup>. KLF4, qui a été impliqué dans le switch phénotypique des CML, colocalise avec les CML et est augmenté au cours du développement de l'AAA chez l'homme et dans un modèle d'AAA expérimental induit par la perfusion intraluminaire d'élastase. La déficience totale en KLF4, ou spécifique dans les CML concourt au maintien de l'expression de Sm-22 $\alpha$ , limite la dégradation des lames élastiques, l'infiltration macrophagique et la réponse inflammatoire dans la paroi et réduit *in fine* le développement de l'AAA dans deux modèles expérimentaux chez la souris<sup>330</sup>.

L'analyse transcriptomique des CML issues d'aortes anévrismales confirme l'hétérogénéité de leurs profils d'expression, et rapporte que l'expression de MMP-2, MMP-9 et des cathepsines K et L est augmentée en comparaison avec des CML issues d'aortes non dilatées. Ces cellules ont également une capacité plus importante à dégrader l'élastine *in vitro*, et la co-culture avec des macrophages humains stimule la production de MMP-2 et -9 et amplifie encore plus leur activité élastolytique<sup>331</sup>.

De nombreux facteurs peuvent influencer le phénotype des CML et éventuellement conduire à la mort cellulaire par apoptose, comme la production de facteurs de croissance et cytokines par les cellules inflammatoires adjacentes ou médiée par des interactions directes entre cellules, la structure et la composition de la MEC, le stress oxydant, l'hypoxie ou encore le stress mécanique. La stimulation des CML *in vitro* par l'héparine ou les isoformes du TGF- $\beta$  favorise l'expression de protéines de l'appareil contractile, comme l' $\alpha$ -SMA, la SM-MHC et la calponine<sup>332</sup>. Le collagène fibrillaire de type I, la laminine et le collagène de type IV favorisent l'orientation du phénotype des CML vers un profil plutôt contractile<sup>333,334</sup>, alors que la fibronectine et le collagène monomérique de type I l'orientent plutôt vers un profil sécrétoire<sup>335</sup>. La perte de contact consécutive à la dégradation de la MEC adjacente aux CML peut aussi induire un changement de phénotype et l'apoptose cellulaire<sup>336</sup>. L'AngII peut avoir des effets différents selon le phénotype des CML vasculaires sur lesquelles elle agit, *in vitro* les CML

présentant un phénotype dédifférencié sont particulièrement sensibles à l'apoptose induite par l'AngII<sup>337</sup>. La stimulation combinée par les cytokines pro-inflammatoires IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  induit l'apoptose de CML de rats *in vitro*<sup>338</sup>. A contrario, le TGF- $\beta$  protège les CML de la mort cellulaire<sup>171</sup>. L'apoptose précoce des CML contribue à l'amplification de la réponse inflammatoire et au développement de l'AAA puisque l'inhibition précoce de la mort cellulaire par un inhibiteurs des caspases limite l'infiltration macrophagique, la dégradation des lames élastiques et réduit fortement l'incidence de l'AAA induit par l'AngII chez la souris *ApoE*<sup>-/-</sup><sup>339</sup>.

En conditions homéostatiques, en plus de leur rôle fondamental dans la régulation du tonus vasculaire par leurs propriétés contractiles, les CML représentent la principale source d'élastine dans la paroi, elles contribuent à l'architecture des lames élastiques et possèdent des fonctions modulatrices de la MEC. Leur réduction au cours du développement de l'AAA a donc une influence considérable sur la dégradation structurelle et fonctionnelle de la paroi. L'addition de CML vasculaires dans un modèle d'AAA induit par allogreffe chez le rat protège de la formation d'AAA, en réduisant la dégradation des lames élastiques, l'infiltration des monocytes/macrophages et en modifiant la balance MMP/TIMP au niveau de l'adventice, suggérant qu'une partie des CML vasculaires ont probablement un effet paracrine protecteur de l'homéostasie du vaisseau, avant d'être dépassées par l'activité protéolytique et l'inflammation pariétale générées par les cellules inflammatoires infiltrant le tissu, qui va favoriser leur changement phénotype ou leur destruction<sup>340</sup>.

#### 4.Participation du thrombus

La présence d'un thrombus intra-luminal (TIL) est une des caractéristiques récurrentes observée au cours du développement de l'AAA chez l'homme, puisqu'elle est détectée dans 75% des cas d'AAA<sup>341</sup>. Le TIL est une structure complexe et dynamique, en permanence alimentée par le sang circulant au sein de l'anévrisme et constituée de plusieurs couches qui sont déposées successivement à sa surface au cours du temps, modifiant la composition et la biologie du thrombus<sup>342</sup>. L'épaisseur maximale du thrombus a été corrélée chez l'homme avec les taux de plasmatiques de D-dimères, de complexes plasmine-anti-plasmine, les produits de dégradation de la fibrine, mais aussi avec le diamètre aortique, et la vitesse d'expansion de l'anévrisme<sup>343,344</sup>. L'expansion du thrombus entraîne l'apparition de zones hypoxiques dans la paroi, favorise l'angiogenèse et la néovascularisation au sein de l'AAA<sup>345</sup>. Une étude a montré que la présence d'un thrombus était associée à une augmentation de la présence lymphocytes B et T, de CML apoptotiques ou dédifférenciées, et à une diminution de la paroi vasculaire

sous-jacente<sup>346</sup>. Le stress oxydatif et l'activité protéolytique importante qui se déroulent au sein du thrombus intra-luminal en font un environnement actif mais dans lequel les cellules sont incapables de proliférer ou de se mouvoir. En effet, des plaquettes, des macrophages et des lymphocytes T sont détectés au sein du thrombus, mais leur quantité et leur mobilité diminuent progressivement de la partie luminale vers les parties profondes du thrombus<sup>347</sup>. Le ratio MMP-9/MMP-2 est plus important dans la partie luminale du thrombus que dans la paroi<sup>44</sup>, où l'expression de MMP-9 colocalise avec celle des neutrophiles et la présence de plasminogène est également détectée au sein du thrombus<sup>348</sup>. Ces données suggèrent que les cellules circulantes pourraient se retrouver trappées dans les différentes couches du thrombus, associées aux produits de la coagulation et aux composants plasmatiques, au sein duquel elles pourraient libérer leurs composants intracellulaires et notamment des protéases, qui participeraient au remodelage de la MEC de la paroi sous-jacente et à l'expansion de l'anévrisme.

## E. Les monocytes/macrophages

### 1. Les monocytes

Les monocytes, initialement décrits comme de larges cellules mononuclées, ont longtemps été restreints à l'image du maillon immature faisant le lien entre les précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse et les macrophages et cellules dendritiques tissulaires. Cependant, l'évolution des connaissances sur l'origine des macrophages et des cellules dendritiques dans le tissu, l'amélioration des techniques de phénotypage immunologique et les études fonctionnelles sur les phénomènes immuno-inflammatoires en conditions pathologiques ont révélé une participation bien plus complexe des monocytes à l'inflammation. Les monocytes sont des cellules phagocytaires hautement plastiques, mobiles et rapidement réceptives aux modifications de leur environnement<sup>349</sup>. Ces cellules, principalement circulantes, constituent une population hétérogène en taille, fonction et distribution de marqueurs de surface, ces trois caractéristiques pouvant évoluer selon le contexte systémique ou l'environnement local dans lequel elles se trouvent. L'identification de marqueurs de surface, sur lesquels se base actuellement la classification des sous-types de monocytes, est en constante évolution, impliquant une remise en question permanente de la classification et de la biologie des monocytes. Les monocytes partagent des fonctions communes avec les macrophages et les cellules dendritiques tissulaires, comme la capacité de phagocytose et de présentation d'antigène, la synthèse de médiateurs pro- ou anti-inflammatoires et jouent un rôle important dans la lutte contre les pathogènes, l'inflammation et le remodelage tissulaire.

### a) Sous-populations monocytaires chez l'homme

Chez l'homme, les monocytes représentent environ 10% des leucocytes circulants<sup>350</sup>. L'existence de différents sous-types de monocytes a d'abord été suggérée par l'observation de trois contingents cellulaires ayant des tailles et des fonctions immunologiques différentes<sup>351</sup> au sein de la population de monocytes circulants, les cellules les plus larges ayant une réponse au chimiotactisme plus importante, et les cellules les plus petites une meilleure capacité de présentation antigénique. Ces études rapportent aussi l'existence d'une population morphologiquement et fonctionnellement intermédiaire<sup>352,353</sup>. Ces trois populations ont ensuite été caractérisées par l'expression différentielle de deux marqueurs, le CD14 (*cluster of differentiation 14*) et le CD16 (*cluster of differentiation 16*). Le CD14 agit comme un corécepteur pour la reconnaissance du LPS par d'autres récepteurs membranaires, comme les TLRs. Le CD16, aussi connu sous le nom de FcγRIII est un récepteur des fragments Fc des IgGs. La combinaison de l'expression de ces deux marqueurs sur les cellules HLA-DR+ détermine actuellement la classification arbitraire de trois sous-types de monocytes chez l'homme : les monocytes « classiques » CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>, qui constituent 80 à 90% des monocytes circulants, le reste étant composé des monocytes « intermédiaires » CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> et des monocytes « non-classiques » CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> [Figure 11]. Ces proportions peuvent être modifiées transitoirement, en réponse à un stress ou à des *stimuli* inflammatoires<sup>350</sup>.

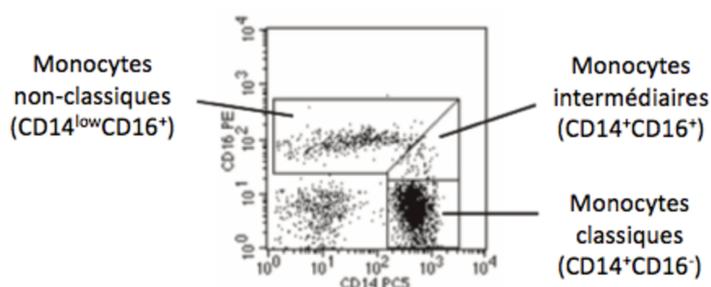


Figure 11 : Caractérisation des sous-types de monocytes humains par cytométrie de flux (adapté de Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2014<sup>354</sup>)

Les monocytes classiques sont caractérisés par une forte expression du récepteur de chimiokine CCR2, de la molécule d'adhésion CD62L (L-sélectine), et des récepteurs de type Toll-like (TLRs). Ils ont une capacité de phagocytose importante et expriment des gènes impliqués dans la lutte antimicrobienne, l'angiogenèse, la cicatrisation et la coagulation, et jouent un rôle

majeur dans la réponse immune innée et la réparation tissulaire<sup>355,356</sup>. En effet, en cas de lésion tissulaire d'origine septique ou stérile, ils sont recrutés sur le site de l'inflammation, produisent une grande variété de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines et d'espèces réactives de l'oxygène et participent à l'initiation et à l'amplification de la réponse inflammatoire<sup>357-359</sup>.

Les monocytes non-classiques expriment fortement le récepteur de chimiokine CX3CR1 et des gènes impliqués dans le réarrangement du cytosquelette et dans la mobilité cellulaire et possèdent une forte capacité de présentation antigénique. Ils sont impliqués dans la surveillance vasculaire et tissulaire en patrouillant le long des vaisseaux par un mécanisme d'adhésion à l'endothélium dépendant de *Lymphocyte function-associated antigen-1* (LFA-1)<sup>355</sup>. Ils répondent principalement au signal chimiotactique de CX3CL1 (Fractalkine), qui permet également l'arrêt et la transmigration des monocytes non-classiques à travers l'endothélium *in vitro*<sup>360</sup>. Ils produisent peu de cytokines en réponse à la stimulation des TLR2 et 4 mais produisent du TNF- $\alpha$ , de l'IL-1 $\beta$  et du CCL3 en réponse aux virus et acides nucléiques *via* l'activation des voies TLR7 et 8, dans un mécanisme dépendant de Myd88<sup>355</sup>. Leur taux circulant est augmenté dans certaines conditions pathologiques comme le cancer, l'infection au VIH, le sepsis ou la maladie coronarienne<sup>361,362</sup>.

Les monocytes intermédiaires forment une population hétérogène, caractérisée par une expression élevée des molécules de la famille HLA et du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II), et possèdent une capacité importante de présentation d'antigène. Ils expriment des marqueurs de surface en commun avec les monocytes classiques et non-classiques, comme CCR2 et CX3CR1, et présentent souvent un profil d'expression graduel de ces marqueurs à l'interface entre les deux autres populations de monocytes, suggérant l'idée toujours débattue à ce jour que les différents sous-types de monocytes pourraient en réalité correspondre à des stades de maturation différents de la population monocyttaire, plutôt qu'à des entités distinctes de différenciation terminale<sup>356,357</sup>. L'expression spécifique de certains marqueurs les différencie cependant des deux autres populations monocytaires, comme celle du récepteur de chimiokine CCR5 ou de l'ACE<sup>360</sup>. Ils sont d'importants producteurs de cytokines pro-inflammatoires en réponse à la présence de cellules tumorales ou à la stimulation par le LPS *in vitro*, comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ <sup>355,363</sup>. Le taux circulant de monocytes intermédiaires a été identifié comme un facteur prédictif indépendant de la survenue d'évènements chez des patients à haut risque cardiovasculaire<sup>364</sup>. Parallèlement, il a été rapporté

une augmentation du taux circulant de monocytes intermédiaires CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> chez les patients atteints d'AAA, en comparaison avec des individus sains<sup>365</sup>.

#### b) Sous-populations monocytaires chez la souris

Chez la souris, les monocytes représentent environ 4-6% des leucocytes circulants, ils expriment fortement l'intégrine CD11b et le récepteur au M-CSF, le CD115 et présentent un faible niveau d'expression de F4/80<sup>350,366</sup>.

Les sous-types de monocytes sont aujourd'hui majoritairement déterminés par l'expression différentielle du marqueur Ly6C (*Lymphocyte Antigen 6C*)<sup>367</sup>. Sur la base de l'expression de marqueurs de surface et de leurs caractéristiques morphologiques, les monocytes murins classiques Ly6C<sup>hi</sup>CX3CR1<sup>low</sup>CCR2<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> sont souvent considérés comme l'équivalent des monocytes classiques CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> et intermédiaires CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> chez l'homme. Les monocytes murins non-classiques Ly6C<sup>lo/-</sup>CX3CR1<sup>hi</sup>CCR2<sup>low</sup>CD62L<sup>-</sup>CD43<sup>+</sup> sont décrits comme l'équivalent murin des monocytes humains CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>. Il existe cependant des différences dans l'expression de certains marqueurs entre les monocytes humains et leurs homologues murins, et chez la souris, les deux sous-populations de monocytes sont représentées de façon équivalente dans le sang circulant.

La courte durée de vie et l'importante plasticité des monocytes en réponse aux changements de leur environnement rendent complexes les tentatives de caractérisation phénotypique et les études fonctionnelles *in vivo* et *in vitro*. En effet, la manipulation des monocytes peut induire des changements de leur état d'activation, de différenciation, altérer leur viabilité ou leurs capacités migratoires<sup>349</sup>. La souris reporter CX3CR1<sup>+/GFP</sup> a contribué à l'identification et à la caractérisation des deux sous-types de monocytes murins circulants, ayant des profils d'expression de marqueurs de surface et des propriétés migratoires différents<sup>368,369</sup>. On ne peut cependant pas exclure le fait que l'inactivation d'un allèle du gène codant pour CX3CR1, induite par cette construction génique, puisse altérer les propriétés/fonctions des populations monocytaires.

Les monocytes classiques Ly6C<sup>hi</sup>, qui expriment CX3CR1 de façon modérée mais expriment fortement par ailleurs d'autres récepteurs de chimiokines comme CCR2, CCR1, CXCR1 et CXCR2, ainsi que la L-sélectine ou CD62L, sont rapidement recrutés sur les sites

inflammatoires. Ils ont une capacité accrue de phagocytose et de production de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  et d'espèces réactives de l'oxygène et sont fortement impliqués dans la lutte antimicrobienne<sup>369,370</sup>. Ils migrent préférentiellement dans la cavité péritonéale après induction d'une inflammation locale par le thioglycollate, et sont rapidement recrutés dans le cœur après un infarctus du myocarde, où ils participent à la phagocytose des débris apoptotiques et à l'inflammation locale, en produisant des protéases et des cytokines pro-inflammatoires<sup>369,371,372</sup>.

Comme leurs homologues chez l'homme, les monocytes non-classiques Ly6C<sup>lo/-</sup> sont décrits comme des patrouilleurs des vaisseaux en conditions physiologiques, ils sont en interaction permanente avec l'endothélium au repos et assurent son intégrité, par un mécanisme de *rolling* dépendant de LFA-1 et infiltrent les tissus non-inflammatoires, comme la rate, les poumons ou le foie<sup>369,373</sup>. En conditions inflammatoires, ils sont recrutés plus tard que les monocytes classiques, et favorisent la réparation tissulaire, l'angiogenèse et le dépôt de composants de la MEC<sup>371</sup>.

Chez la souris, une population intermédiaire est également observée à l'interface entre les monocytes classiques et non classiques, mais cette population n'a jusqu'à présent pas été fonctionnellement caractérisée<sup>374</sup>.

### c) Développement des monocytes et trafic en conditions homéostatiques

L'hématopoïèse au niveau de la moelle osseuse est classiquement décrite comme un processus hautement hiérarchisé, prenant son origine à partir de progéniteurs communs multipotents, les cellules souches hématopoïétiques (*Hematopoietic Stem Cell*, HSC). Les HSCs vont, en se différenciant, générer d'autres précurseurs qui vont progressivement et successivement s'engager vers une lignée cellulaire spécifique *via* l'activation d'un profil d'expression génique qui lui est propre. Les monocytes dérivent successivement du progéniteur commun myéloïde (*Common Myeloid Progenitor*, CMP), du progéniteur commun aux granulocytes et aux monocytes/macrophages (*Granulocyte-Monocyte Progenitor*, GMP), du progéniteur commun aux monocytes et cellules dendritiques (MDP), et enfin du précurseur unipotent des monocytes, le *Common Monocyte Progenitor* (cMoP). Cependant, on sait aujourd'hui que cette représentation hiérarchique de l'hématopoïèse est plus complexe. L'ère de la cytométrie de flux et l'émergence de l'analyse transcriptionnelle sur cellule unique ont apporté de nombreuses informations sur l'expression de marqueurs partagés par les populations de la moelle osseuse. Ces techniques offrent aujourd'hui un schéma plus complexe de

l'hématopoïèse, avec des populations de progéniteurs multipotents hétérogènes, qui seraient pour certains déjà partiellement engagés dans une lignée cellulaire [Figure 12]. Par exemple, une nouvelle population de monocytes, appelée SatM, identifiée récemment, dériverait directement du GMP, pourrait avoir un équivalent chez l'homme et jouerait un rôle important dans la fibrose<sup>375</sup>.

L'engagement vers la lignée myéloïde est associé à un certain nombre de facteurs de transcription et de croissance hématopoïétique, incluant PU.1, CSF-1, IRF8, GATA2 et KLF4, la délétion de ces facteurs entraînant une diminution du nombre de monocytes circulants<sup>376,377</sup>.

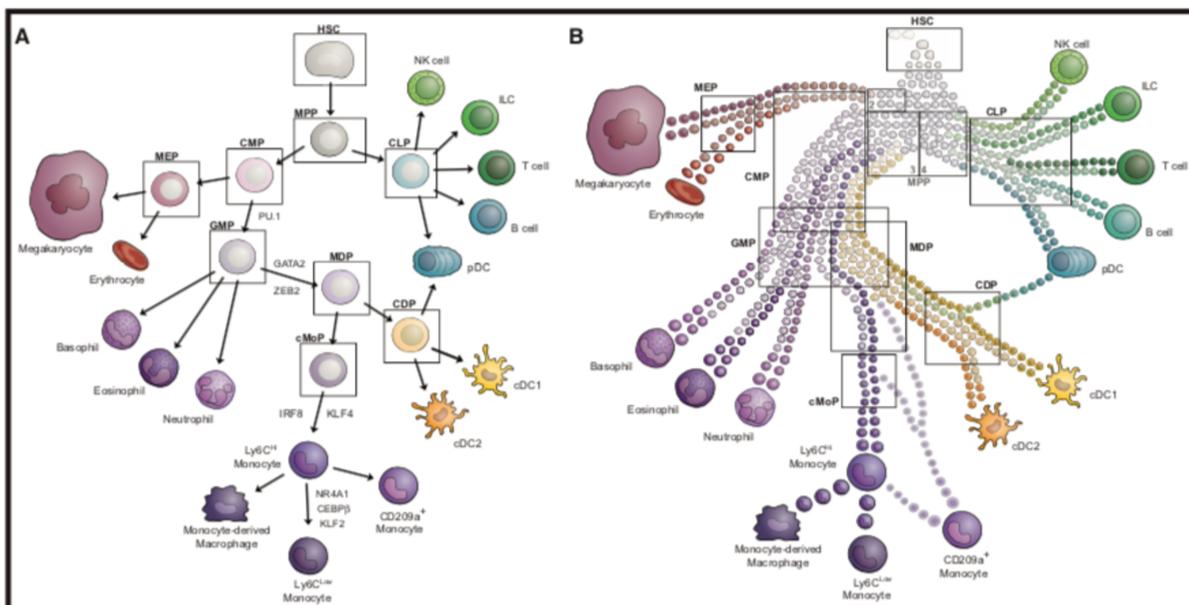


Figure 12 : Représentations schématiques classique (A) et contemporaine (B) de l'hématopoïèse (d'après Guilliams, *et al.*, 2018)

Une fois leur maturation dans la moelle achevée, les monocytes Ly6C<sup>hi</sup> migrent vers le sang circulant par un mécanisme majoritairement dépendant de CCR2. En effet la déficience en CCR2, ou en ses ligands, CCL2 et CCL7, entraîne une diminution du nombre de monocytes Ly6C<sup>hi</sup> circulants, qui restent stockés dans la moelle osseuse<sup>378,379</sup>.

Une fois sortis de la moelle, les monocytes Ly6C<sup>hi</sup> circulent environ 24h au cours desquelles ils peuvent être dirigés vers un tissu périphérique pour se différencier et prendre part au pool de cellules résidentes<sup>349</sup>, soit subir une différenciation progressive en monocytes Ly6C<sup>lo</sup>, par un mécanisme dépendant des facteurs de transcription C/EBPβ et NR4A1 (ou NUR77)<sup>380</sup>. La repopulation du sang circulant 2 à 4 jours après traitement par des liposomes de clodronate est

réalisée presque uniquement par des monocytes Ly6C<sup>hi</sup>, alors que les monocytes Ly6C<sup>lo</sup> ne sont détectés qu'environ 7 jours après, en même temps que le retour à l'équilibre entre les deux sous-types de monocytes<sup>366</sup>. Les monocytes non-classiques Ly6C<sup>lo</sup> ont une durée de vie d'environ 2 et 7 jours chez la souris et chez l'homme respectivement<sup>381</sup>.

Même si la moelle osseuse est le lieu de prédilection de production des monocytes circulants, la présence de précurseurs de la lignée monocyttaire possédant une forte activité proliférative a été observée dans la rate en conditions homéostatiques<sup>382</sup>, et en réponse à une lésion inflammatoire aiguë<sup>383</sup>.

#### d) Trafic monocyttaire dans le contexte de l'AAA : mobilisation et recrutement dans la paroi aortique

La mobilisation et le recrutement des monocytes en conditions inflammatoires est initiée par l'émission de signaux chimiotactiques, qui vont stimuler la migration cellulaire, déclencher la sortie des monocytes des organes lymphoïdes primaires et secondaires, et les diriger vers le site de la lésion. Dans le contexte de l'AAA, l'émission de signaux chimiotactiques de différentes natures peut être initiée par l'exposition chronique de la paroi aortique à certains facteurs de risque comme le tabagisme ou l'hypertension, les changements hémodynamiques, le remodelage de la MEC, l'apparition de micro-dissections et l'inflammation locale. Une augmentation importante de la production de chimiokines a été rapportée dans les aortes anévrismales humaines, comparée à des aortes athéromateuses ou saines et dans les modèles expérimentaux d'AAA<sup>214,257</sup>. Les peptides dérivés de l'élastine, ou EDPs, sécrétés par les extraits de tissu anévrismal aortique favorisent le chimiotactisme des monocytes *via* la liaison à leur récepteur, l'*Elastin Binding Protein* (EBP) *in vitro*<sup>213</sup>. Plusieurs études montrent que des acteurs de l'homéostasie matricielle, comme l'ostéopontine et la thrombospondine 1 pourraient aussi moduler la mobilisation, l'adhésion et la transmigration des monocytes, et que leur déficience limite l'infiltration des monocytes/macrophages et le développement de l'AAA<sup>384,385</sup>.

##### (1) Cinétique et origine de la mobilisation des monocytes

Le phénomène de monocytose, qui consiste en l'augmentation du pool de monocytes circulants en réponse à un signal inflammatoire, a été largement observé dans le contexte des maladies cardiovasculaires chez l'homme et est retrouvé dans les modèles expérimentaux chez la souris<sup>386,387</sup>. Plusieurs études rapportent une mobilisation des monocytes des organes

lymphoïdes vers la circulation et un recrutement tissulaire en 2 temps. Après un infarctus du myocarde chez la souris, une augmentation du pool de monocytes classiques Ly6C<sup>hi</sup> circulants et leur recrutement dans le cœur dans les 3 premiers jours participent à la phase inflammatoire et précèdent la mobilisation des monocytes non classiques Ly6C<sup>lo</sup>, environ 7 jours après l'initiation de la lésion, qui contribue à la phase de résolution de l'inflammation et de réparation tissulaire<sup>217,371</sup>. Il a été montré que la rate contribue de façon majeure à la mobilisation des monocytes après un infarctus du myocarde chez la souris, par un mécanisme dépendant de l'AngII. En effet, la déficience en AT<sub>1A</sub>R ou le traitement par les IECs entraînent un défaut de sortie des monocytes de la rate et une diminution de l'accumulation des monocytes dans le cœur<sup>383,388</sup>. La rate constitue un réservoir significatif de monocytes Ly6C<sup>hi</sup> et Ly6C<sup>lo</sup>, qui peuvent être libérés dans la circulation en réponse à un signal inflammatoire, permettant le recrutement rapide des monocytes dans les tissus. L'Il-1 $\beta$  semble avoir un rôle important dans la régulation de la monopoïèse extra médullaire dans la rate après infarctus du myocarde chez la souris<sup>389</sup>. Chez l'homme, une étude observationnelle montre que l'accumulation de monocytes classiques CD14<sup>+</sup> dans le myocarde infarci *post-mortem* est associée à une diminution de 39% et de 58% des monocytes classiques CD14<sup>+</sup> dans la moelle osseuse et dans la rate respectivement<sup>390</sup>. Des monocytes classiques Ly6C<sup>hi</sup> d'origine splénique sont également retrouvés dans les plaques d'athérosclérose au niveau de l'aorte chez la souris *ApoE*<sup>-/-</sup> sous régime riche en matières grasses<sup>391</sup>.

Dans un modèle expérimental d'AAA chez la souris, l'augmentation précoce du nombre de monocytes classiques Ly6C<sup>hi</sup> dans le sang en réponse à l'AngII est prédictive de la survenue d'un AAA à 28 jours. Elle est associée à une diminution de leur nombre dans la rate, sans changement dans la moelle osseuse, et la splénectomie abolit l'augmentation du nombre de monocytes classiques Ly6C<sup>hi</sup> dans le sang après 3 jours, l'accumulation de macrophages dans l'aorte et *in fine* l'incidence et la sévérité de l'AAA. Comme après infarctus du myocarde chez la souris, la déficience en lymphocytes B limite la mobilisation des monocytes et leur recrutement tissulaire dans le contexte de l'AAA, suggérant le rôle des lymphocytes B dans la sortie des monocytes de la rate en réponse à l'AngII<sup>217,372</sup>. Les monocytes classiques Ly6C<sup>hi</sup> prédominent dans le sang et dans la rate et sont retrouvés en quantité importante dans la paroi anévrismale aortique en réponse à l'AngII. La déficience en Myd88, une protéine adaptatrice nécessaire à la signalisation TLR, abolit cette redistribution des sous-types monocytaires en faveur des monocytes classiques Ly6C<sup>hi</sup> et protège contre le développement de l'AAA<sup>117</sup>. Dans un modèle d'hypertension et de remodelage vasculaire induit par une forte dose d'AngII chez

la souris C57BL/6J normocholestérolémique, une augmentation de l'infiltration des monocytes classiques Ly6C<sup>hi</sup>, mais pas des monocytes non classiques Ly6C<sup>lo</sup> ou des neutrophiles, est observée dans la paroi aortique à 14 jours<sup>392</sup>. Ces données suggèrent un rôle critique des monocytes classiques Ly6C<sup>hi</sup> dans le développement de l'AAA. La limitation de la mobilisation et du recrutement des monocytes classiques pourrait constituer une piste thérapeutique intéressante dans le contexte de l'AAA.

## (2) Axes chimiokine-chimiokine récepteur

Les chimiokines sont des cytokines chimio-attractantes, classées en chimiokines de type CC- CXC-, CX3C- et C-, en fonction de la position de leur résidu cystéine N-terminal. Elles peuvent être sécrétées par de nombreux types cellulaires en cas de lésion tissulaire et favorisent la mobilisation et le recrutement des leucocytes sur le site de la lésion, *via* la fixation à leurs récepteurs, présents à la surface des leucocytes. Il existe un nombre important de chimiokines et de récepteurs de chimiokines, exprimés par un large nombre de types cellulaires, qui agissent bien souvent de concert pour permettre la mobilisation et le recrutement des leucocytes en conditions inflammatoires. Cependant, certains signaux chimiotactiques médiés par les axes chimiokines/récepteurs de chimiokines peuvent avoir une action plus spécifique d'un tissu ou d'un type cellulaire.

L'axe CCL2/CCR2 a souvent été impliqué dans la mobilisation et le recrutement des monocytes en conditions inflammatoires septiques ou stériles, et particulièrement des monocytes classiques Ly6C<sup>hi</sup>, qui expriment fortement le récepteur CCR2<sup>371,379,393</sup>. La production de CCL2, ou MCP-1 est augmentée dans les tissus anévrismaux chez l'homme par rapport à des tissus sains, et dans la paroi aortique en réponse à l'AngII dans des modèles expérimentaux d'anévrisme chez la souris<sup>257,394</sup>. La déficience globale et la délétion hématopoïétique de CCR2, exprimé majoritairement par les monocytes, réduisent l'infiltration macrophagique, la dégradation du réseau élastique et le développement de l'AAA<sup>394,395</sup>. Dans une étude, des monocytes CCR2+ marqués transférés dans une souris CCR2- sous AngII sont détectés dans la paroi aortique, au niveau de l'aorte thoracique ascendante et de l'aorte abdominale supra-rénale, deux localisations particulièrement susceptibles au développement d'anévrisme en réponse à l'AngII<sup>396</sup>. L'administration systémique de siRNA dirigés spécifiquement contre CCR2 et qui s'accumulent *in vivo* dans la moelle osseuse et la rate limite le remodelage délétère du myocarde post-infarctus et le développement de l'athérosclérose en réduisant l'infiltration tissulaire des monocytes classiques Ly6C<sup>hi</sup>. Cibler la dégradation de transcrits de gènes impliqués dans le

recrutement des monocytes pourrait constituer une stratégie thérapeutique intéressante dans le contexte de l'AAA<sup>397</sup>.

L'axe CX3CL1/CX3CR1 a été particulièrement impliqué dans la survie, la mobilisation et le recrutement des monocytes non classiques Ly6C<sup>lo</sup> dans le contexte des maladies cardiovasculaires. L'inhibition de CX3CR1 limite l'infiltration de monocytes non classiques Ly6C<sup>lo</sup> dans le cœur après un infarctus du myocarde chez la souris<sup>371</sup>. CX3CR1 est exprimé dans la paroi aortique anévrismale chez l'homme et chez la souris, et la déficience en CX3CR1 entraîne une protection partielle mais significative contre le développement de l'AAA induit par l'AngII et la neutralisation du TGF- $\beta$ <sup>171,217</sup>.

CCL5, aussi appelée *Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted* (RANTES), est une des chimiokines dont l'expression et/ou la sécrétion sont les plus constamment augmentées dans les tissus anévrismaux humains, comparés à des tissus athéromateux ou sains<sup>214,257</sup>. CCL5 exerce un fort pouvoir attractant sur les monocytes humains *in vitro*<sup>398</sup>, et son dépôt sur la surface luminale de l'endothélium activé favorise l'arrêt des monocytes et facilite leur transmigration<sup>399</sup>. *In vivo*, l'inhibition de la formation de l'hétérodimère CCL5-CXCL4 réduit l'infiltration de monocytes/macrophages dans la paroi aortique dans le modèle d'AAA induit par perfusion d'élastase, sans affecter la mobilisation vers des organes lymphoïdes secondaires comme la rate ou les ganglions<sup>400</sup>. En revanche, la déficience en CCR5 n'a pas montré d'effet protecteur sur le développement de l'AAA induit par application de CaCl<sub>2</sub> dans une autre étude<sup>401</sup>.

Le blocage pharmacologique de l'axe CXCL12/CXCR4 inhibe la production de nombreuses autres chimiokines, comme MCP-1, RANTES, *Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$*  (MIP-1 $\alpha$ ) et de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et l'IL-6, préserve le réseau élastique de la media, limite l'infiltration macrophagique et *in fine* protège contre le développement de l'AAA chez le rat et la souris<sup>402</sup>.

Plusieurs axes chimiokines-récepteurs de chimiokines ont ainsi été impliqués et agissent de façon indépendante ou complémentaire pour promouvoir la mobilisation et le recrutement séquentiel des différents sous-types de monocytes dans la paroi aortique au cours du développement et de la progression de l'AAA.

### (3) Recrutement des monocytes : interaction avec l'endothélium

Le recrutement des monocytes jusque dans la paroi vasculaire s'achève par la migration des cellules du compartiment sanguin vers le compartiment tissulaire au travers de l'endothélium et suit un processus largement décrit dans la littérature qui se déroule en plusieurs étapes : la capture, le « *rolling* », l'adhésion ferme et la transmigration. Il fait intervenir des molécules sollicitées et activées de façon spécifique à chaque étape, renforçant progressivement l'interaction adhésive entre les leucocytes et l'endothélium jusqu'à entraîner la transmigration des premiers dans le tissu [Figure 13]. La cinétique de ce processus peut néanmoins intégrer quelques variations selon la localisation tissulaire ou la nature du vaisseau et des leucocytes impliqués.

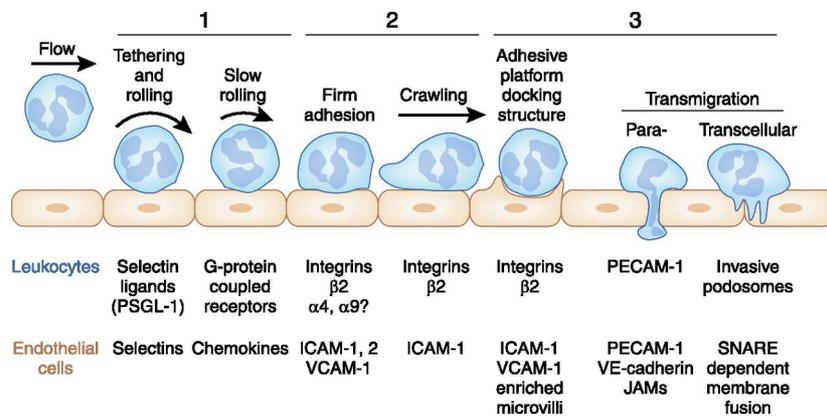


Figure 13 : Les différentes étapes et molécules impliquées dans les interactions leucocytes-endothélium menant à la transmigration (d'après Halbwachs *et al.*, 2012<sup>403</sup>)

Les différentes étapes du recrutement leucocytaire sont médiées par l'expression de molécules d'adhésion à la membrane des leucocytes et des cellules endothéliales. Il existe 3 grandes familles de molécules d'adhésion, les sélectines, la superfamille des immunoglobulines et les intégrines, et leur expression à la membrane leucocytaire ou endothéliale peut être constitutive ou induite en conditions pathologiques par des facteurs hémodynamiques ou inflammatoires<sup>404</sup>.

#### (a) La capture et le *rolling* - Les sélectines

Les sélectines sont spécialisées dans la capture des leucocytes circulants et le *rolling* sur l'endothélium et jouent un rôle important dans l'inflammation vasculaire<sup>405</sup>.

La P-sélectine (CD62P) est contenue de façon constitutive dans les granules  $\alpha$  des plaquettes et dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales, elle est adressée à la membrane en quelques minutes en cas d'activation cellulaire. L'inhibition de la P-sélectine diminue

l'adhésion et le *rolling* des monocytes sur l'endothélium artériel et les veinules post-capillaires *in vitro*, et la déficience génétique en P-sélectine *in vivo* affecte les étapes précoces de la formation des plaques d'athérosclérose, limite l'infiltration des macrophages dans les lésions et retarde le développement de la maladie chez la souris *ApoE*<sup>-/-406,407</sup>.

La E-sélectine (CD62E) est exprimée par l'endothélium, mais son expression n'est pas constitutive, elle est induite par des signaux inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$ , elle est uniquement régulée de façon transcriptionnelle. D'après plusieurs études fonctionnelles *in vivo*, la déficience en E-sélectine ne semble pas avoir un rôle essentiel sur le recrutement tissulaire des leucocytes en conditions inflammatoires<sup>408</sup>.

La L-sélectine (CD62L) est exprimée à la surface des leucocytes. La L-sélectine a été initialement décrite pour son rôle dans le « homing » des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques, et a ensuite été largement impliquée dans la migration et le *rolling* des leucocytes sur l'endothélium en conditions inflammatoires aiguës ou chroniques, septiques ou stériles. La déficience en L-sélectine réduit de 58% et 75% la migration des neutrophiles et des monocytes respectivement dans le péritoine après injection intrapéritonéale de thioglycollate, et améliore fortement la survie dans un modèle expérimental de choc septique induit par le lipopolysaccharide (LPS) chez la souris<sup>409</sup>. La déficience en L-sélectine limite l'infiltration des monocytes/macrophages dans la paroi anévrismale et réduit le développement de l'AAA induit par perfusion d'élastase chez le rat et la souris<sup>410</sup>.

Plusieurs études suggèrent que la L-sélectine pourrait également agir en tant que molécule de signalisation. Son engagement à la surface des leucocytes provoque l'activation cellulaire, favorise la réponse au chimiotactisme des leucocytes<sup>411</sup>, et les étapes suivantes du processus de transmigration. En effet, l'activation prolongée de la L-sélectine par l'inhibition de son clivage à la membrane favorise l'adhésion ferme médiée par LFA-1 et ICAM-1<sup>412</sup>. De par son effet dans l'activation cellulaire, il a été suggéré que la L-sélectine pourrait participer à la régulation de la réponse inflammatoire.

#### (b) L'adhésion ferme et la transmigration – les intégrines

L'adhésion ferme et l'émigration sont quant à elles des étapes plutôt régulées par la liaison entre les intégrines exprimées par les leucocytes et des molécules de la famille des immunoglobulines, comme ICAM-1 et VCAM-1, exprimées par l'endothélium. Les intégrines

peuvent aussi fortement interagir avec des composants de la MEC. La liaison des intégrines leucocytaires à leurs ligands, favorisée par l'action activatrice des chimiokines, va ralentir le phénomène de *rolling* initié par les sélectines, et permettre l'arrêt du leucocyte sur la paroi vasculaire, et donc favoriser sa transmigration<sup>413</sup>.

Parmi les intégrines, les hétérodimères CD18/CD11, comme LFA-1 et Mac-1, ainsi que *very-late antigen-4* (VLA-4) sont exprimés par tous les types de leucocytes, et ont été impliqués dans le recrutement dans le contexte des maladies cardiovasculaires<sup>414</sup>. La déplétion de CD18 par l'administration d'un anticorps monoclonal diminue l'incidence et la sévérité de l'AAA chez le rat dans modèle de perfusion d'élastase, et les monocytes circulants de patients présentant un AAA ont une expression plus importante de LFA-1 et Mac-1 et une meilleure capacité d'adhésion sur une monocouche de cellules endothéliales *in vitro* que les monocytes de patients contrôles<sup>212,415</sup>.

Le mécanisme d'adhésion et de transmigration a été largement décrit dans les veinules post-capillaires, où la faible vitesse du sanguin favorise les interactions entre les monocytes et l'endothélium. Cependant, le développement de la microscopie intra vitale, qui permet de visualiser en temps réel les interactions leucocyte-endothélium, a montré que ce processus peut également se produire dans des vaisseaux de calibres plus importants. En effet, l'exposition à des médiateurs pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , L'IL-1 $\beta$  ou les LDL oxydés induit le *rolling* des leucocytes dans les artères et artérioles<sup>416,417</sup>. L'administration systémique d'Angiotensine II chez le rat entraîne une augmentation de l'adhésion et de la transmigration des neutrophiles au niveau des veinules post-capillaires et des monocytes au niveau des artérioles, suggérant des mécanismes d'adhésion dépendant de la localisation vasculaire et des types cellulaires impliqués<sup>151</sup>.

## e) Les macrophages

### (1) Origine des macrophages dans la paroi aortique

On sait aujourd'hui que l'origine des macrophages tissulaires ne se limite pas au recrutement continu de monocytes dérivés de moelle jusque dans le tissu. En effet, l'existence de macrophages résidents, qui dérivent de précurseurs ayant migré dans les tissus durant la période embryonnaire ou fœtale, a été mise en évidence dans la paroi artérielle. Ces cellules possèdent une capacité d'auto-renouvellement pendant la vie adulte, de façon indépendante des

progéniteurs de la moelle osseuse<sup>418</sup>, mais la contribution de ces cellules résidentes dans la physiopathologie de l'AAA n'a pas été clairement établie.

L'ensemble des données cliniques et expérimentales tend en faveur d'un rôle majeur des macrophages dérivés de monocytes dans la pathogenèse de l'AAA. Une fois entrés dans la paroi vasculaire, les monocytes sont exposés à un changement d'environnement important, qui va entraîner des modifications structurelles, phénotypiques et fonctionnelles, et dans la majorité des cas favoriser leur différenciation en macrophages tissulaires, même s'il a été suggéré que les monocytes classiques Ly6C<sup>hi</sup> peuvent rester dans leur état de monocytes et participer à la formation d'un réservoir tissulaire local<sup>383</sup>.

Les macrophages sont caractérisés par une capacité de phagocytose et de dégradation des produits phagocytés importante et une modeste capacité de présentation antigénique. Ils produisent une quantité importante de cytokines quand ils sont activés, possèdent une faible capacité migratoire et jouent un rôle majeur dans la clairance des débris apoptotiques<sup>419,420</sup>.

Récemment, une étude a mis en évidence la différenciation d'une population spécifique de monocytes Ly6C<sup>hi</sup> en macrophages NOS2<sup>+</sup>, suggérant que l'hétérogénéité des monocytes peut donner naissance à des sous-types différents de macrophages tissulaires<sup>421</sup>. Le microenvironnement cellulaire peut déterminer des programmes de transcription spécifiques et *in fine* les propriétés fonctionnelles des macrophages, et un changement de ce microenvironnement est capable de réverser l'acquisition d'un phénotype particulier<sup>422</sup>.

## (2) Hétérogénéité phénotypique des macrophages dans la paroi anévrismale

La différenciation des monocytes en macrophages et le phénotype des macrophages lui-même est extrêmement sensible à l'environnement cytokinique. En effet, deux grandes voies d'activation des macrophages dépendantes des cytokines ont été décrites, et génèrent des sous-types cellulaires de macrophages aux profils sécrétoires et aux fonctions différents<sup>423</sup>.

Les macrophages activés par la voie classique, ou M1, sont générés par la stimulation des cytokines de type Th1, comme l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ , des produits microbiens comme le LPS, ou encore des facteurs de croissance comme le *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) ou le *Macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF), ils produisent des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-23, NOS2) et de faibles niveaux

d'IL-10, des protéases, des espèces réactives de l'oxygène et ont une forte activité phagocytaire et cytotoxique<sup>424,425</sup>.

Les macrophages activés par les voies alternatives, ou M2, sont générés en réponse à l'IL-4, l'IL-13 et l'IL-10. Ils produisent moins de cytokines pro-inflammatoires mais produisent de l'IL-10 et du TGF- $\beta$ , ont des fonctions régulatrices, une capacité de présentation antigénique accrue, favorisent l'angiogenèse et jouent un rôle important dans la résolution de l'inflammation et la réparation tissulaire<sup>426,427</sup>. Les macrophages de type M2 sont généralement caractérisés par une augmentation d'expression du récepteur au mannose (CD206), de l'arginase-1 (Arg1) et du CMH de classe II<sup>428</sup>.

Cependant, cette classification est principalement fondée sur l'expression de marqueurs et des caractéristiques fonctionnelles observées *in vitro*, en réponse à l'exposition à des facteurs de stimulation contrôlés. En effet, il existerait une plus grande diversité de phénotypes au sein de la population macrophagique dans la paroi aortique inflammatoire *in vivo*, dans le cas de l'athérosclérose ou de l'AAA, où l'environnement cytokinique est bien plus complexe<sup>429</sup> [Figure 14].

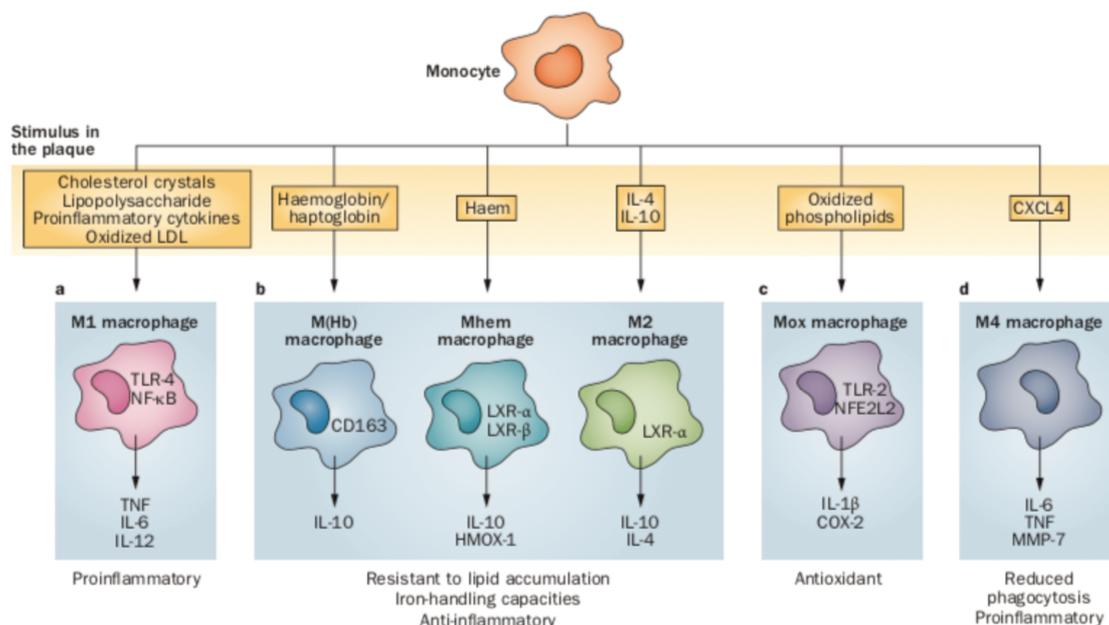


Figure 14 : Hétérogénéité phénotypique des macrophages dans la plaque d'athérosclérose (d'après Chinetti-Gbaguidi *et al.*, 2015<sup>429</sup>)

Chez l'homme, l'analyse de la composition cellulaire de l'aorte aortique anévrismale par cytométrie de flux révèle une prédominance des macrophages de type M2 sur les macrophages de type M1. Une deuxième étude confirme ces données, mais montre que les macrophages de

type M2 sont plutôt localisés au niveau du thrombus intra-luminal, alors que les macrophages de type M1 sont retrouvés au sein de la paroi anévrismale<sup>215,430</sup>. Ces deux études confirment qu'il existe une certaine diversité de phénotypes au sein de la population macrophagique au cours du développement de l'AAA, et les données expérimentales suggèrent qu'il pourrait exister une évolution de ce profil phénotypique au cours du temps.

Dans un modèle d'AAA induit par infusion continue d'AngII chez la souris *ApoE*<sup>-/-</sup>, il est rapporté après 7-10 jours et jusqu'à 28 jours une augmentation du *ratio* M1/M2 dans la paroi anévrismale par rapport à celui du groupe contrôle<sup>431</sup>. L'analyse transcriptomique montre qu'après 14 jours d'infusion d'AngII, le profil d'expression génique dans la paroi aortique évolue, et que l'expression des gènes de l'inflammation est réduite, au profit de l'expression de gènes impliqués dans la réparation tissulaire et la fibrose<sup>432</sup>. Enfin, dans un modèle d'évolution tardive d'anévrisme, où l'AngII est infusée pendant 56 jours, un plus grand nombre de macrophages exprimant le CD206, considéré comme un marqueur de type M2, sont retrouvés dans la paroi, suggérant une évolution du phénotype macrophagique vers un profil plutôt M2 à des stades tardifs de développement<sup>216</sup>.

Comme dans le cas de l'athérosclérose, il est probable que la diversité phénotypique des macrophages dans la paroi anévrismale aortique soit plus complexe, et quelques études commencent à identifier de nouvelles populations de macrophages possédant des fonctions spécifiques<sup>433</sup>.

L'ensemble de ces données suggèrent que l'infiltration de monocytes/macrophages lors des étapes précoces du développement de l'AAA participent à la réponse inflammatoire et sont responsables d'un remodelage délétère de la paroi. Avec le temps, la modification des conditions hémodynamiques, de l'environnement cytokinique, l'apparition de thrombus et de microdissections peuvent entraîner une modulation du phénotype des macrophages vers l'acquisition de fonctions plutôt réparatrices, dans le but de préserver l'intégrité vasculaire. Ces données soulignent néanmoins l'implication de différents sous-types de macrophages dans l'évolution de la pathologie anévrismale aortique, et suggèrent que la modulation du phénotype macrophagique pourrait constituer une piste à étudier dans le traitement préventif de l'AAA.

## F. TREM-1, un puissant régulateur de la réponse immune innée

### 1. Généralités

*Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1* (TREM-1) est un récepteur membranaire de la superfamille des Immunoglobulines identifié en 2000 par Bouchon, exprimé à la surface des granulocytes neutrophiles et des monocytes. TREM-1 est le premier membre décrit de la famille des TREM, qui comprend également TREM-2 et *Trem-Like Transcript-1* (TLT-1), dont le gène est situé sur le chromosome 6 (cluster 6p21.1) chez l'homme et sur le chromosome 17 chez la souris<sup>434-436</sup>. Les gènes murins *Trem-1* et *Trem-2* sont orthologues des gènes *TREM-1* et *TREM-2* humains respectivement<sup>436</sup>. TREM-1 est une glycoprotéine de 30kDa, formée d'un domaine extracellulaire immunoglobuline de type V, d'un domaine transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique, dépourvue de motifs de signalisation intracellulaire. L'engagement de TREM-1 entraîne la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires, principalement au cours d'une action synergique avec des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs, *Pattern recognition receptors*), comme les TLRs et les (*NOD*)-like Receptors (NLRs), à la suite de leur stimulation par des ligands exogènes, les *Pathogen-associated recognition patterns* (PAMPs) dans un contexte d'infection, ou par des ligands endogènes, les *Damage-associated recognition patterns* (DAMPs), libérés dans le cas d'une lésion tissulaire interne, ce qui fait de TREM-1 un puissant acteur de la réponse immune innée. Plus récemment, des études ont montré que plusieurs autres types cellulaires peuvent exprimer TREM-1, de façon constitutive ou transitoire après stimulation, mais de façon moins importante que sur les cellules de la lignée myéloïde. En effet, TREM-1 est exprimé par de nombreuses sous-populations de macrophages, les cellules épithéliales bronchiques, cornéennes ou gastriques, par les cellules endothéliales hépatiques et vasculaires ou encore par les cellules musculaires lisses<sup>437-441</sup>.

TREM-2 est exprimé par de nombreuses variétés de macrophages tissulaires et par les cellules dendritiques<sup>434</sup>. Il est impliqué dans la formation des ostéoclastes et dans la fonction cellulaire de la microglie<sup>442,443</sup>. La délétion génétique de TREM-2 chez des macrophages murins dérivés de la moelle osseuse augmente leur production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 en réponse à différents *stimuli* des voies TLRs, suggérant que, contrairement à TREM-1, TREM-2 aurait un effet régulateur négatif sur la réponse inflammatoire<sup>444</sup>.

TLT-1 est exprimé par les plaquettes, séquestré dans les granules intracellulaires des mégacaryocytes et les granules  $\alpha$  des plaquettes circulantes à l'état de base, et rapidement transloqué à la membrane après stimulation, favorisant l'agrégation plaquettaire. Contrairement à la plupart des autres membres de la famille TREM, il ne s'associe pas avec DAP12 mais possède une queue cytoplasmique plus importante, avec deux domaines ITIM potentiels<sup>445</sup>.

Les membres de la famille TREM sont décrits dans la littérature comme étant des modulateurs de la réponse inflammatoire, permettant l'adaptation de la cellule à la modification de son environnement, et la réponse tissulaire à une agression exogène ou endogène avec pour chef de file TREM-1 qui reste aujourd'hui le plus largement étudié.

## 2. Activation et amplification de la réponse immune innée

### a) Engagement de TREM-1 et synergie avec la signalisation TLR

TREM-1 n'ayant pas de domaine de signalisation intracellulaire propre, son engagement nécessite l'association avec la protéine adaptatrice transmembranaire DAP12 (DNAX-activating protein of 12kDa). Cette interaction va permettre la phosphorylation des résidus tyrosine contenus dans les motifs *Immuno-tyrosin activation motif* (ITAM) de DAP12, qui constituent un site d'amarrage pour la protéine kinase Syk. La phosphorylation de Syk va entraîner le recrutement des molécules de signalisation intracellulaire *Phosphatidylinositol-3 kinase* (PI3K) et *Phospholipase C- $\gamma$*  (PLC- $\gamma$ ) et aboutir, *via* une cascade de phosphorylation impliquant les kinases Akt, JAK/STAT et ERK1/2, à l'activation de facteurs de transcription comme NF- $\kappa$ B, AP1, c-Fos, c-Jun et entraîner une mobilisation du calcium intracellulaire, un réarrangement du cytosquelette et finalement l'activation cellulaire et la production de cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12p40, TNF- $\alpha$ , GM-CSF) et de chimiokines (MCP-1, MCP-3, MIP-1 $\alpha$ )<sup>435,446</sup>. La stimulation de TREM-1 entraîne également l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion impliquées dans l'extravasation des neutrophiles et des monocytes telles que CD11c, CD11b/CD18 (Mac-1) et de molécules de co-stimulation comme CD40, CD86 et CD54 (ICAM-1)<sup>434</sup>.

L'engagement et l'activation de la voie TREM-1 se trouvent au cœur d'un processus de signalisation complexe, faisant intervenir en amont et en aval de sa stimulation propre des interactions croisées avec d'autres voies de signalisation, et principalement avec les voies des TLRs, qui jouent un rôle particulièrement important dans la modulation de la réponse immune

innée, et avec lesquelles la voie TREM-1 partage de nombreux acteurs cellulaires communs<sup>447</sup> [Figure 15].

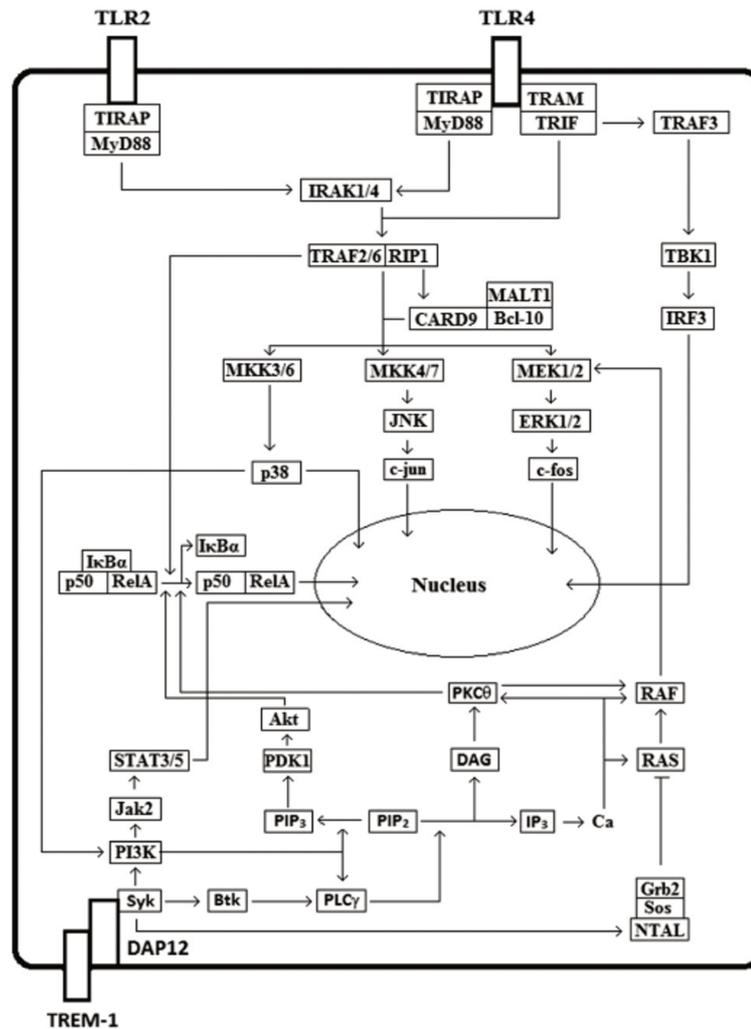


Figure 15 : Représentation schématique des interactions entre les voies de signalisation intracellulaires de TREM-1 et des TLR2 et 4 (D’après Arts *et al.*, 2013<sup>447</sup>)

Dans un premier temps, il a été décrit que la liaison des ligands des TLRs à leurs récepteurs, comme le LPS (ligand de TLR4), l’acide lipoteichoïque (ligand de TLR2) ou encore des bactéries extracellulaires Gram positives ou négatives inactivées par la chaleur, entraîne l’augmentation significative de l’expression membranaire de TREM-1<sup>448,449</sup>, précédant son activation. L’effet le plus important est observé dans le cas de la stimulation avec le LPS, suggérant une relation étroite entre la voie TLR4 et la voie TREM-1. En effet, il a ensuite été démontré que l’induction de l’expression de TREM-1 sur des *Bone-marrow-derived macrophages* (BMDM) par le LPS *in vitro* nécessite la présence de TLR4, cet effet étant indépendant de MyD88 et médié par la protéine adaptatrice TRIF<sup>450</sup>. De plus, il a été décrit que

le LPS induit la colocalisation de TREM-1 et TLR4 dans les rafts lipidiques GM1 à la membrane des neutrophiles, soulignant la possibilité d'une interaction physique entre les deux récepteurs pour induire une synergie de leurs effets<sup>451</sup>. Une étude récente montre que l'état d'activation de la voie TREM-1 est dépendant du degré de multimérisation du récepteur à la surface des neutrophiles et des monocytes humains *in vitro*. La stimulation par le LPS entraîne l'activation de la voie TREM-1 sur les monocytes en 2 temps, elle induit d'abord une augmentation de l'expression de TREM-1 à la membrane, puis le « *clustering* » et la dimérisation du récepteur permet ensuite l'activation cellulaire<sup>452</sup>. Un autre argument en faveur d'une interaction croisée entre les voies TREM-1 et TLR4 est l'existence d'effecteurs communs entre ces deux voies de signalisation. En effet, la stimulation de monocytes humains *in vitro* par le LPS ou par l'anticorps agoniste de TREM-1 entraîne une forte activation des sous-unités P50 et p65 de NF- $\kappa$ B, avec un effet synergique quand ces deux stimulations sont associées<sup>453</sup>. Il a également été montré que TREM-1 peut entraîner la phosphorylation d'IRAK1, un des acteurs majeurs de la voie de signalisation de TLR4, et que l'expression de TREM-1 peut être requise pour maintenir les niveaux d'expression de base de molécules de signalisation clés de la voie TLR4<sup>451,454</sup>.

Au niveau fonctionnel, de nombreuses études ont montré que l'engagement isolé de TREM-1 induit une modeste activation cellulaire. En effet, la liaison de TREM-1 par un anticorps agoniste induit une faible sécrétion d'IL-8 et de *Myeloperoxidase* (MPO) par les neutrophiles, et d'IL-8, MCP-1, GM-CSF, TNF- $\alpha$  ou d'IL-1 $\beta$  par les monocytes humains *in vitro* et cet effet est amplifié par la stimulation par le LPS, soulignant l'importance de la costimulation avec TLR4 pour l'activation cellulaire médiée par TREM-1<sup>434,448,449</sup>. L'étude de Dower *et al.* confirme qu'il existe de nombreuses cibles communes à l'activation des voies TREM-1 et TLR4, mais qu'un certain nombre de facteurs immuno-inflammatoires sont également modulés spécifiquement par la voie TREM-1, de façon indépendante de la voie TLR4<sup>455</sup>. L'inhibition de la voie TREM-1 par un peptide inhibiteur a pour conséquence une diminution de la production de cytokines induites par le LPS, comme TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP-1, IL-8 et IL-10<sup>453,454,456</sup>. D'autres études rapportent l'existence de connections possibles entre TREM-1 et d'autres TLRs. En effet, la liaison des ligands de TLR2 augmente l'expression de TREM-1, par un mécanisme dépendant de Myd88, soulignant l'importance de la nature du stimulus dans les événements cellulaires consécutifs à l'activation de TREM-1<sup>449,450</sup>. Une augmentation modeste de l'expression de TREM-1 et un effet synergique sur la production de TNF- $\alpha$  ont été observés

après stimulation de monocytes *in vitro* par le ligand de TLR3, le Poly(I:C), mais ces données n'ont pas été reproduites avec succès, laissant planer le doute sur l'interaction TREM-1/TLR3<sup>449</sup>. Des interactions avec les voies TLR5, TLR7/8 et TLR9 ont également été décrites mais très peu d'informations sont aujourd'hui disponibles et de futures recherches sont nécessaires afin de confirmer l'existence d'une coopération entre ces voies<sup>457</sup>.

#### b) TREM-1 et NLRs

Les NLRs sont un autre type de PRRs. Parmi les NLRs, NOD1 et NOD2 sont des récepteurs cytosoliques capables de reconnaître des motifs microbiens, principalement les mucopeptides des peptidoglycanes bactériens, mais aussi des motifs moléculaires libérés après certains dommages tissulaires stériles, comme dans le cas de la mort cellulaire. Peu de choses sont connues sur l'interaction entre les voies NLR et la voie TREM-1, mais la stimulation par un anticorps agoniste de TREM-1 augmente de façon significative la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-8, le TNF- $\alpha$  ou l'IL-6 induite par la reconnaissance de peptidoglycanes par NOD1 et NOD2<sup>457,458</sup>. Alors que la stimulation par des agonistes des NLRs n'augmente pas significativement l'expression de la forme soluble de TREM-1 (sTREM-1), à l'inverse, la stimulation par l'anticorps agoniste de TREM-1 augmente le niveau d'expression de base de l'ARNm de NOD2 et augmente la sensibilité de NOD2 à de faibles concentrations de son ligand. La confirmation de cette interaction nécessite des investigations plus poussées, mais ces données laissent suggérer que la coopération de la voie TREM-1 n'est pas restreinte aux seuls TLRs.

#### c) Identification du/des ligand(s) naturel(s) de TREM-1

L'obstacle le plus important à une meilleure compréhension de la biologie du récepteur TREM-1 est l'identification de ses ligands. La difficulté de cette tâche est probablement due à une affinité faible et une dissociation rapide entre le/les ligand(s) et le récepteur. Plusieurs candidats ont néanmoins été proposés, et parmi eux un certain nombre de protéines de la famille des DAMPs. Haselmayer *et al.* ont démontré que le ligand de TREM-1 est exprimé par les plaquettes humaines activées, et qu'il participe à l'activation des neutrophiles en conditions inflammatoires *in vitro*<sup>459</sup>. La purification de protéines totales de plaquettes a permis de montrer que l'actine plaquettaire extracellulaire avait la capacité de lier TREM-1 et d'augmenter l'activation des neutrophiles et macrophages *in vitro* par l'activation de la voie TREM-1<sup>460</sup>. Il a été montré que *High-mobility group box 1* (HMGB1) et *Heat shock protein 70* (HSP70),

libérées par les cellules nécrotiques de lignées de monocytes humains THP-1 activées et d'hépatocytes murins pourraient amplifier la production de TNF- $\alpha$ , d'IL-6 et d'IL-8 induite par l'exposition au LPS de monocytes humains *in vitro* via l'engagement de TREM-1<sup>461,462</sup>. De plus, une seconde étude a mis en évidence une interaction directe entre TREM-1 et HMGB1 par des méthodes d'immunoprécipitation et des « *cross-linking assays* »<sup>462</sup>. Cependant, il semblerait qu'HMGB1 soit incapable d'activer à lui seul la voie TREM-1 et nécessiterait des molécules de co-activation<sup>463</sup>. Il a également été proposé que *Peptidoglycan recognition protein 1* (PGLYRP1), une protéine présente dans les granules des neutrophiles, qui reconnaît les peptidoglycanes bactériens et possède des propriétés bactéricides, pourrait constituer un ligand fonctionnel de TREM-1 dans sa forme multimérisée. Encore une fois il est intéressant de noter que la stimulation par PGLYRP1 soluble seul n'est pas suffisante pour induire l'activation de TREM-1, qui nécessite le *cross-linking* avec un peptidoglycane pour entraîner une activation efficace de la voie TREM-1<sup>464</sup>.

Il semblerait que TREM-1 ait plusieurs ligands putatifs, qu'ils partageraient avec d'autres PRRs, et que l'activation de sa voie soit un système complexe, dépendant de la nature du *stimulus* et du contexte inflammatoire, et faisant intervenir et/ou interagir plusieurs acteurs cellulaires et protéiques entre eux.

#### d) La modulation de la voie TREM-1

L'absence de connaissances sur l'existence d'un ligand spécifique et clairement identifié de TREM-1 a conduit à l'utilisation de différentes stratégies moléculaires permettant de stimuler ou d'inhiber la voie TREM-1 au cours d'études fonctionnelles. Pour activer la voie TREM-1, les auteurs utilisent les propriétés de « *cross-linking* » d'un anticorps agoniste de TREM-1 humain ou murin<sup>434,448,453,465</sup>. Plusieurs stratégies ont été utilisées dans le but d'inhiber la voie TREM-1. Dans plusieurs études, une protéine de fusion, constituée de la partie extracellulaire du récepteur TREM-1 et de la portion Fc d'une Immunoglobuline IgG1 humaine a été utilisée<sup>448,459</sup>. Plus récemment, l'utilisation de peptides inhibiteurs de la voie TREM-1 a fait son apparition dans la littérature. Le premier, appelé LP17 a été construit à partir d'un domaine hautement conservé des séquences humaines et murines de Trem-1, codant pour une portion de la partie extracellulaire du récepteur (LQVTDSGLYRCVIYHPP), qui comprendrait un résidu tyrosine permettant la dimérisation du peptide, ainsi que le domaine de liaison de TREM-1 à son ligand. Le LP17 pourrait donc exercer son effet inhibiteur en empêchant la dimérisation de TREM-1 et donc son activation ou en rentrant en compétition avec son

ligand<sup>453</sup>. Le second, le LR12, a été synthétisé à partir d'un motif très conservé entre les gènes Trem-1 et Trem-11 (LQEEDAGEYGCMM). Le LR12 n'aurait pas d'interaction avec le récepteur TREM-1 et donc pas un effet d'inhibition directe mais aurait une activité « leurre » pour le ligand de TREM-1, empêchant la liaison de ce ligand sur le récepteur membranaire, et inhibant donc la boucle d'amplification de la voie TREM-1<sup>466</sup>.

#### e) Libération d'une forme soluble de TREM-1

L'engagement de TREM-1 entraîne la libération d'une forme soluble du récepteur, appelée sTREM-1 (soluble TREM-1), qui fait suite à l'augmentation transitoire de TREM-1 membranaire dans le temps après stimulation par le LPS, et accompagne les effets pro-inflammatoires induits par la stimulation de la voie TREM-1<sup>453,467</sup>. sTREM-1 est constitué de la partie extracellulaire du récepteur (le domaine Ig-like), qui comprendrait le site de liaison de TREM-1 à son ligand. Deux hypothèses majeures sur la source de ce sTREM-1 cohabitent dans la littérature. Certains suggèrent que le TREM-1 soluble pourrait être généré par la traduction d'un variant d'ARNm de TREM-1 au cours de l'épissage alternatif<sup>468,469</sup>. La masse moléculaire attendue de ce transcrite variant serait de 17,5 kDa, cependant, des western blots réalisés sur surnageants de culture de monocytes stimulés par le LPS montrent que le sTREM-1 aurait en réalité une masse moléculaire de 27kDa, allant donc à l'encontre de cette 1<sup>ère</sup> hypothèse. La 2<sup>e</sup> hypothèse est que le sTREM-1 serait le résultat du clivage protéolytique de la partie extracellulaire du TREM-1 membranaire<sup>453</sup>. En effet, le pré-traitement de monocytes en culture par un inhibiteur spécifique des MMPs, le GM6001, réduit de façon significative la production de sTREM-1 et maintient dans le même temps une expression membranaire de TREM-1 élevée après stimulation par le LPS. Le clivage du sTREM-1 est considéré comme le reflet de l'engagement du récepteur, en effet, le taux de sTREM-1 a par exemple été associé à l'activité de la maladie dans la sclérose systémique cutanée et dans la maladie de Behçet<sup>470</sup> et est également augmenté au cours de l'insuffisance rénale, de l'infarctus du myocarde, dans les maladies inflammatoires de l'intestin, l'arthrite rhumatoïde ou encore la goutte, suggérant l'existence d'une activité biologique de ce peptide soluble<sup>471</sup>. Son rôle reste encore à élucider mais il se pourrait qu'il soit produit pour participer à la régulation négative de la voie TREM-1, en agissant comme un leurre pour le(s) ligand(s) putatif(s) de TREM-1.

### 3. Implication en pathologie

#### a) TREM-1 et pathologies septiques

Le sepsis est causé par une réponse inflammatoire inappropriée et généralisée en réponse à une infection, le plus souvent d'origine bactérienne, qui peut avoir pour conséquence la défaillance d'un ou plusieurs organes, et conduire au décès<sup>472</sup>. Les cellules de l'immunité innée sont la première ligne de défense en cas d'infection, et les monocytes/macrophages et neutrophiles jouent un rôle primordial dans les événements conduisant au sepsis. En raison de son effet amplificateur de la réponse immune innée suite à la stimulation des voies TLRs à la membrane des monocytes/macrophages et neutrophiles, le rôle de TREM-1 a d'abord été largement étudié dans le cadre du sepsis.

Dans un premier temps, Bouchon a montré que l'expression membranaire de TREM-1 sur des neutrophiles et monocytes humains *in vitro* est fortement up-régulée suite à la stimulation par des bactéries extracellulaires comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, ainsi que par l'acide lipoteichoïque (LTA) et le lipopolysaccharide (LPS). *In vivo*, l'expression membranaire de TREM-1 est augmentée sur les granulocytes neutrophiles au sein des lésions cutanées causées par *Staphylococcus aureus*, ainsi que dans les lésions granulomateuses causées par *Bartonella henselae* et *Aspergillus fumigatus*, et dans les prélèvements intra-péritonéaux de patients atteints de choc septique suite à une péritonite bactérienne<sup>448</sup>.

Des études cliniques ont rapporté des taux élevés de sTREM-1 dans les fluides des patients présentant une infection. L'augmentation de TREM-1 dans le lavage bronchio-alvéolaire s'est révélé être le critère le plus efficace pour prédire la présence d'une pneumonie bactérienne ou fongique (98% de sensibilité et 90% de spécificité)<sup>473</sup>. Un taux élevé de sTREM-1 dans le plasma de patients admis en unité de soins intensifs pour suspicion de syndrome de réponse inflammatoire systémique permet également de discriminer de façon fiable l'origine infectieuse. Ces études indiquent que TREM-1 pourrait constituer un outil diagnostique puissant pour détecter la présence d'une infection<sup>474</sup>.

Dans un modèle expérimental d'endotoxémie induite par le LPS, le taux de sTREM-1 est rapidement augmenté dans le sérum des souris septiques et l'inhibition pharmacologique de TREM-1 par administration d'une protéine recombinante ou d'un peptide inhibiteur diminue les concentrations plasmatiques de TNF- $\alpha$  et d'IL1- $\beta$  ainsi que l'infiltration de neutrophiles et

de monocytes dans le péritoine et améliore *in fine* la survie des animaux. A l'inverse, l'administration d'un anticorps agoniste de TREM-1 augmente la mortalité de 50% à 100% après une injection de la DL50 du LPS. L'effet protecteur de l'inhibition de la voie TREM-1 a été confirmé dans deux modèles expérimentaux de péritonite microbienne et de sepsis, causés par injection intrapéritonéale d'*Escherichia coli* ou par ligature caecale (CLP, Caecal Ligation and Puncture)<sup>434,453</sup>. Ces résultats montrent que l'inhibition de la voie TREM-1 réduit de façon efficace la réponse immune innée au cours du choc septique, sans entraver la capacité de l'organisme à contrôler l'infection et à éliminer l'agent pathogène. Cet effet a été confirmé dans les infections à *Leishmania major*, *Influenza virus* ou encore *Legionella pneumophila*<sup>475</sup>. Cependant, certaines études tendent à montrer que l'effet protecteur de TREM-1 dans le cas d'infections d'origine bactérienne pourrait dépendre du pathogène. En effet, la déficience en TREM-1 augmente la dissémination de *Klebsiella pneumoniae*, augmente l'inflammation systémique et augmente la mortalité dans un modèle d'abcès du foie<sup>476</sup>.

La dysfonction endothéliale est un paramètre important qui joue un rôle délétère dans la physiopathologie du sepsis. Une étude publiée en 2018 décrit pour la première fois que l'expression de TREM-1 est inductible sur les cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires (HPMEC) stimulées par le LPS *in vitro*, et au niveau des artères (aorte et artère mésentérique) dans un modèle de choc septique induit par ligature caecale *in vivo*. Dans ce dernier modèle expérimental de choc septique, l'inhibition génétique de *Trem-1* spécifiquement dans les cellules endothéliales est associée à une modulation du trafficking leucocytaire, à une diminution du taux systémique de certains facteurs pro-inflammatoires et *in fine* améliore la survie, érigeant TREM-1 endothélial comme un acteur potentiel de la physiopathologie du sepsis<sup>440</sup>.

Toutes ces données suggèrent que TREM-1 est impliqué dans les événements précoces responsables de l'amplification de la réponse inflammatoire après infection microbienne et que sa modulation pourrait avoir des conséquences thérapeutiques prometteuses sur l'évolution de la maladie septique chez l'homme. D'ailleurs, le peptide LR12 est actuellement testé dans le cadre d'un essai clinique thérapeutique de phase 2 pour son application dans le choc septique ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), NCT03158948).

## b) Implication dans de nombreuses pathologies inflammatoires stériles

Bien que TREM-1 ait été initialement étudié dans les pathologies inflammatoires d'origine infectieuse, de récentes études ont mis en lumière l'importance de sa contribution dans de nombreuses pathologies inflammatoires stériles, aiguës ou chroniques.

En effet, l'expression de TREM-1 est augmentée à la surface des granulocytes neutrophiles et des monocytes/macrophages dans des modèles expérimentaux d'ischémie-reperfusion rénale et d'infarctus du myocarde<sup>465,477</sup>. Le taux de sTREM-1 a été corrélé à la sévérité de la pancréatite aiguë chez la souris, et l'inhibition de TREM-1 par un peptide inhibiteur protège contre les conséquences de la maladie, en diminuant les taux d'aspartate aminotransférase (ASAT)<sup>478,479</sup>. Chez l'homme, des taux de sTREM-1 plus élevés sont retrouvés chez les patients non-survivants par rapport aux survivants, suggérant que le dosage du sTREM-1 pourrait être utilisé comme paramètre prédictif de la défaillance d'organe dans le contexte de la pancréatite aiguë<sup>480,481</sup>. Dans un modèle expérimental d'ischémie intestinale, Gibot *et al.* ont montré que l'inhibition pharmacologique de TREM-1 entraîne une diminution du recrutement et de l'activation leucocytaire, et donc de la réaction systémique locale, limitant les lésions intestinales et améliorant la survie<sup>482</sup>.

Boufenzler *et al.* ont étudié le rôle de TREM-1 au cours de l'infarctus du myocarde et ont montré que l'inactivation génétique et l'inhibition pharmacologique de TREM-1 par le peptide inhibiteur LR12 réduisent la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et IL-6) et de métalloprotéinase (MMP-9) dans le cœur, diminuent la fibrose ainsi que la taille de la zone infarctée et finalement améliorent la fonction cardiaque chez la souris. Une des caractéristiques déterminantes de la résolution de la lésion après un infarctus du myocarde est la balance sensible qui existe entre le type et la quantité de leucocytes recrutés au site de la lésion. Dans cette étude, les auteurs montrent que l'inhibition de TREM-1 limite la mobilisation, le recrutement et l'activation des leucocytes dans le myocarde infarcté, principalement les neutrophiles et les monocytes classiques Ly6C<sup>hi</sup>. Ils ont également confirmé l'effet de l'inhibition de TREM-1 par le LR12 dans un modèle d'ischémie cardiaque chez le rat. Enfin, dans la cohorte FAST-MI, les patients dont le taux de sTREM-1 plasmatique est élevé à l'admission après un infarctus du myocarde ont un sur-risque indépendant de mortalité à 2 ans<sup>465</sup>.

Il semble que TREM-1 joue un rôle particulièrement important dans l'exacerbation d'évènements inflammatoires aigus, et que l'activation de sa voie de signalisation, associée au clivage du sTREM-1, puisse être un outil diagnostique important intimement associé à ces évènements aigus. Mais des études plus récentes et de plus en plus nombreuses montrent que la voie TREM-1 est également impliquée dans le développement et la perpétuation de pathologies inflammatoires chroniques.

En effet, il a été montré que TREM-1 joue un rôle important dans la physiopathologie des maladies inflammatoires de l'intestin, comme la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse, ainsi que dans l'arthrite rhumatoïde, l'ulcère gastrique ou encore la goutte<sup>483-486</sup>. Au cours du développement de ces pathologies, l'expression de TREM-1 tissulaire ou le taux de sTREM-1 dans les fluides biologiques des patients sont associés à une augmentation de la réponse inflammatoire, à la présence d'un infiltrat leucocytaire et finalement à l'activité de la maladie. Dans un modèle expérimental de colite chez la souris, l'inhibition de TREM-1 par le peptide inhibiteur LP17 diminue l'expression génique de TREM-1, du TNF- $\alpha$  et la sévérité de la maladie<sup>483</sup>. Dans un modèle expérimental de fibrose hépatique induite par administration répétée de CCl<sub>4</sub>, TREM-1 exprimé par les cellules de Küppfer favorise l'accumulation chronique de cellules myéloïdes dans le foie, l'activation des cellules stellaires hépatiques, la production de TGF- $\beta$ 1 et finalement augmente la fibrose hépatique. Les souris déficientes pour *Trem-1* (*Trem-1*<sup>-/-</sup>) présentent une diminution de l'expression de gènes codant pour la synthèse de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, un recrutement moindre des neutrophiles, monocytes inflammatoires Ly6C<sup>hi</sup> et macrophages dans le foie, et finalement une réduction de la fibrose hépatique<sup>487</sup>. L'inflammation chronique du foie est un des facteurs responsables du développement du carcinome hépatocellulaire, dans lequel TREM-1 est exprimé par les cellules cancéreuses hépatiques, et son activation augmente leur capacité de prolifération et d'invasion, diminue l'apoptose et promeut la production de facteurs pro-inflammatoires, favorisant le microenvironnement pro-tumoral<sup>488</sup>. Le rôle de TREM-1 a également été étudié dans d'autres types de cancers. En effet, TREM-1 est exprimé par les monocytes/macrophages des épanchements pleuraux malins de patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules, et la co-culture *in vitro* de ces monocytes exprimant TREM-1 augmente la capacité d'invasion des cellules cancéreuses<sup>489,490</sup>.

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique affectant le système cardiovasculaire. Elle touche les artères de gros et moyens calibres, dans lesquels une

accumulation de lipides dans la paroi entraîne la formation de plaques, qui quand elles deviennent instables, peuvent engendrer des événements ischémiques, comme l'infarctus du myocarde, les accidents vasculaires cérébraux ou l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs. L'immunité innée joue un rôle particulièrement important dans le développement et l'évolution des plaques d'athérosclérose, dans lesquelles un nombre important de monocytes circulants sont recrutés, se différencient en macrophages puis en cellules spumeuses après internalisation des lipides oxydés, et participent activement à la réaction inflammatoire délétère chronique de la paroi artérielle. La contribution de TREM-1 au développement de l'athérosclérose expérimentale a été récemment décrite au sein de notre laboratoire. La délétion génétique de *Trem-1*, soit totale, soit uniquement dans le compartiment hématopoïétique et l'inhibition pharmacologique par le LR12 limitent le recrutement des monocytes non classiques Ly6C<sup>lo</sup> et la réponse inflammatoire dans le sinus aortique, diminuent la capacité d'endocytose des lipides oxydés par les macrophages et leur évolution en cellules spumeuses, et finalement réduisent le développement de l'athérosclérose chez la souris. En effet, il est décrit que TREM-1 régule de façon positive l'expression du récepteur de chimiokine CX3CR1, fortement impliqué dans la mobilisation des monocytes non classiques Ly6C<sup>lo</sup>, ainsi que l'expression macrophagique du récepteur scavenger CD36, qui contribue à l'endocytose des lipides oxydés au sein des plaques d'athérosclérose<sup>491</sup>. Une deuxième étude publiée quelques mois plus tard confirme l'effet protecteur de la délétion génétique de *Trem-1* sur le développement de l'athérosclérose *via* une diminution de la différenciation des progéniteurs myéloïdes hématopoïétiques en monocytes, une réduction de l'infiltration macrophagique et une altération du métabolisme intracellulaire du cholestérol, notamment par une diminution de l'expression du CD36 macrophagique. Alors que le nombre circulant de monocytes classiques Ly6C<sup>hi</sup> augmente chez des animaux *ApoE*<sup>-/-</sup> susceptibles au développement de l'athérosclérose sous régime pro-athérogénique, la monocytose est altérée chez les animaux déficients pour *Trem-1*. Le régime pro-athérogène augmente l'expression de TREM-1 membranaire sur les monocytes circulants et sur les monocytes en cours de différenciation et certains sous-types de macrophages dans la plaque d'athérosclérose chez la souris et chez l'homme<sup>492</sup>. De plus, la stimulation de macrophages humains *in vitro* par des LDL oxydées (oxLDL) augmente de façon significative l'expression de TLR4 (et pas de TLR2), ainsi que de TREM-1 au niveau génique et protéique. Dans la même étude, le silencing de TREM-1 inhibe la production des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-6 en réduisant la translocation nucléaire de la sous-unité p65 de NK-kB, diminue la phagocytose des lipides et la formation de cellules spumeuses<sup>493</sup>. Chez

l'homme, des polymorphismes génétiques de *TREM-1* ont été associés avec le risque de maladie coronarienne dans une population russe<sup>494</sup>.

Toutes ces évidences montrent que TREM-1 joue un rôle dans la physiopathologie de nombreuses maladies inflammatoires septiques ou stériles, avec une contribution mécanistique qui peut être différente selon la maladie ou le tissu affecté. L'intérêt de cibler la voie TREM-1 dans le contexte de ces pathologies est que son inhibition empêche une réaction exagérée, mais sans entraîner une complète inhibition de la réponse immune, qui dans de nombreuses pathologies est nécessaire à la résolution des lésions tissulaires.

## II. OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE

L'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA) est une pathologie inflammatoire chronique de la paroi aortique, caractérisée par une dilatation locale et progressive de l'aorte, qui évolue de façon asymptomatique et dont le risque majeur est la rupture. Le développement de l'AAA est associé à une infiltration massive de cellules inflammatoires dans la paroi, une perte des cellules musculaires lisses de la *media*, et un important remodelage des composants de la matrice extracellulaire. De nombreuses évidences cliniques et expérimentales montrent que les macrophages, principalement dérivés de monocytes circulants s'accumulent dans la paroi et participent au développement de l'AAA, en modulant la réponse inflammatoire locale par la production de protéases et de facteurs inflammatoires. Cependant, les mécanismes impliqués dans la mobilisation et le recrutement des monocytes dans la paroi anévrismale aortique sont encore incomplètement compris.

TREM-1 est un récepteur de l'immunité innée, exprimé principalement par les polynucléaires neutrophiles et les monocytes/macrophages. TREM-1 est connu pour son rôle modulateur de la réponse immune innée, il amplifie la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires en réponse à la stimulation des TLRs en conditions septiques. Plus récemment, le rôle pathogène de TREM-1 dans la physiopathologie des maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose ou le remodelage post-ischémique après infarctus du myocarde a été décrit, mais les voies qui régulent son activation dans l'inflammation stérile sont imparfaitement comprises.

L'objectif de ces travaux de thèse était d'étudier le rôle de TREM-1 dans le développement de l'AAA expérimental, et d'identifier les potentiels signaux inflammatoires responsables de son activation dans ce contexte. Pour ce faire, nous avons analysé l'effet de la modulation de TREM-1 dans des modèles « perte- et gain-de-fonction », sur les événements systémiques et locaux associés au développement de l'AAA à différents stades de la maladie dans un modèle d'anévrisme induit par l'infusion continue d'angiotensine II chez la souris hypercholestérolémique *ApoE*<sup>-/-</sup>.

### III.ARTICLE

## **TREM-1 orchestrates Angiotensin II-induced monocyte trafficking and promotes experimental abdominal aortic aneurysm**

**Short title: TREM-1 promotes abdominal aortic aneurysm**

**Word count: 5520**

Marie Vandestienne<sup>a</sup>, Yujiao Zhang<sup>a#</sup>, Icia Santos-Zas<sup>a#</sup>, Rida Al-Rifai<sup>a</sup>, Jeremie Joffre<sup>a</sup>, Andreas Giraud<sup>a</sup>, Jose Vilar<sup>a</sup>, Ludivine Laurans<sup>a</sup>, Bruno Esposito<sup>a</sup>, Florence Pinet<sup>b</sup>, Patrick Bruneval<sup>a, c</sup>, Juliette Raffort<sup>d</sup>, Fabien Lareyre<sup>e</sup>, Amir Boufenzar<sup>f</sup>, Lea Guyonnet<sup>g</sup>, Coralie Guerin<sup>g</sup>, Eric Clauser<sup>a</sup>, Alain Tedgui<sup>a</sup>, Marc Derive<sup>f</sup>, Ziad Mallat<sup>a, h</sup>, Soraya Taleb<sup>a</sup> & Hafid Ait-Oufella<sup>a, i</sup> MD.PhD.

<sup>a</sup> Université de Paris, Inserm U970, Paris-Cardiovascular Research Center, Paris, France

<sup>b</sup> INSERM U1167-Institut Pasteur de Lille, Lille, France

<sup>c</sup> Department of Anatomopathology, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris, France

<sup>d</sup> Université Côte d'Azur, CHU, CNRS, Inserm, IRCAN & Clinical Chemistry Laboratory, Nice, France

<sup>e</sup> Université Côte d'Azur, CHU, CNRS, Inserm, IRCAN & Department of Vascular Surgery, University Hospital of Nice, Nice, France

<sup>f</sup> INOTREM SA, Nancy, France

<sup>g</sup> Université de Paris, Innovative Therapies in Haemostasis, INSERM, F-75006, Paris, France/Institut Curie, Cytometry Platform F-75006, Paris, France/Department of Infection and Immunity, Luxembourg Institute of Health, Luxembourg

<sup>h</sup> Department of Medicine, Division of Cardiovascular Medicine, University of Cambridge, Cambridge, UK.

<sup>i</sup> Medical Intensive Care Unit, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Sorbonne Université, Paris, France

# authors contribute equally to the work

Correspondence to Hafid Ait-Oufella, Inserm U970, Paris Cardiovascular Research Center, 56, rue Leblanc Paris, France

Email: hafid.aitoufella@inserm.fr

### **Competing Financial interests**

Marc Derive is co-founder of INOTREM, a company developing TREM-1 inhibitors. Amir Boufenzler, Marc Derive, and Hafid Ait-Oufella applied a patent on the measurement of plasma sTREM-1 concentration to predict outcome in cardiovascular diseases and applied a patent on therapeutic strategies using inhibiting peptides derived from TREM-1.

### **Disclosures**

None

## Abstract

**Background.** The triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) has been involved in the pathophysiology of several cardiovascular diseases. However, its role in abdominal aortic aneurysm (AAA) remains unknown.

**Objectives.** To investigate whether Angiotensin (Ang) II modulates TREM-1 activity and to explore the role of TREM-1 in a mouse model of AngII-induced abdominal aortic aneurysm (AAA).

**Methods and Results.** We showed that in vivo AngII infusion stimulated TREM-1 expression specifically in Ly6C<sup>high</sup> classical monocytes and increased plasma levels of soluble TREM-1 (sTREM-1). AngII-induced TREM-1 upregulation was unchanged in *Tlr4*<sup>-/-</sup> mice, but was abolished in *Atga1r*<sup>-/-</sup> mice, as well as in Losartan-treated mice, suggesting that TREM-1 regulation was mediated through Angiotensin II Receptor Type I (AT<sub>1</sub>R). In an AngII-induced experimental mouse model of AAA, *Trem-1* gene deletion abolished monocyte mobilization from the spleen, reduced monocyte infiltration in the aorta and decreased aortic mRNA expression of *Ccl2/Ccr2*, *Ccl5/Ccr5*, *Il-1β*, *Tnf-α* and *Mmp-9*. *Trem-1* deficiency and TREM-1 pharmacological blockade limited AAA development and severity. Conversely, antibody-mediated TREM-1 stimulation exacerbated monocyte infiltration within the aortic wall after AngII infusion, through CD62L upregulation, and promoted pro-inflammatory signals in the aorta, resulting in worsening of AAA severity. We also found that circulating levels of sTREM-1 were increased in patients with AAA and TREM-1 expression colocalized with macrophages in human abdominal aortic aneurysms.

**Conclusion.** AngII induces TREM-1 expression and activation through AT<sub>1</sub>R stimulation. TREM-1 is involved in AAA formation by promoting monocyte mobilization from the spleen and recruitment into the aortic wall, which results in exacerbated vascular inflammation.

Targeting TREM-1 represents a novel therapeutic approach to prevent AAA formation that should be tested in the future in humans.

Key words: TREM-1, angiotensin, aneurysm, inflammation, CD62L

## **List of abbreviations**

**AAA**, Abdominal Aortic Aneurysm

**Ang**, Angiotensin

**ApoE**, Apolipoprotein E

**AT<sub>1</sub>R**, Angiotensin II Type 1 Receptor

**CCL-2**, C Chemokine Ligand-2

**CCR-2**, C Chemokine Receptor-2

**CD**, Cluster of Differentiation

**IL-**, Interleukin

**LDL**, Low Density Lipoprotein

**MMP**, Metalloprotease

**RNA**, Ribonucleic Acid

**TLR**, Toll Like Receptor

**TNF-**, Tumor Necrosis Factor

**sTREM-1**, soluble TREM-1

**TREM-1**, Triggering Receptors Expressed on Myeloid cells-1

## **Introduction**

Non-syndromic abdominal aortic aneurysm (AAA) is one of the leading causes of cardiovascular death, particularly in men and women over 60 years of age . Other defined risk factors associated with the development of AAA include male gender, Caucasian ethnicity, a positive family history, smoking and atherosclerosis. The mechanisms of AAA formation are complex; they include elastin degradation, collagen remodeling, smooth muscle cell apoptosis and infiltration of inflammatory cells. During the first critical steps of experimental AAA formation, circulating monocytes interact with activated endothelial cells and are recruited into the aortic wall in a biphasic manner, Ly6-C high classical monocytes (Ly6C<sup>hi</sup>) dominating the acute phase of injury, while Ly6C<sup>low</sup> non-classical monocytes (Ly6C<sup>lo</sup>) being prevalent thereafter <sup>132</sup>. Recruitment to the aortic wall partly depends on GM-CSF (4) and chemokines/chemokine receptors, including CCL2/CCR2, CX3CL1/CX3CR1 and CCL-5/CCR5 axis (5), and adhesion molecules such as Selectins. Monocyte differentiation into macrophages and activation are necessary steps for the formation of aneurysms, associated with the local release of inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) and matrix metalloproteinases (MMPs), which induce arterial wall destruction and subsequent aorta dilatation and life-threatening aneurysm rupture. Neutrophils present within the aneurysmal wall and the adjacent thrombus also contribute to AAA formation and complications (6). However, there is currently no specific treatment targeting the immuno-inflammatory response in AAA and no anti-inflammatory medical therapy is available to prevent excessive inflammatory remodeling of the abdominal aortic wall.

*Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1* (TREM-1) is a member of the Immunoglobulin superfamily (7, 8) constitutively expressed by neutrophils and monocytes/macrophages. TREM-1 expression increases in response to lipopolysaccharide or other sterile pathogen-associated molecular patterns through Toll-like receptors and

Nucleotide-binding oligomerization domain-receptors (8, 9). Engagement of TREM-1, after association with the adapter protein DAP12, results in the production of pro-inflammatory cytokines, including TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , and chemokines, including IL-8, CCL-2 and CCL-7, along with rapid neutrophil degranulation (10). TREM-1 also regulates myeloid cell migration to inflammatory sites (8, 11) upon bacterial invasion. The role of TREM-1 has been mainly investigated in septic shock, but previous studies showed that it also critical in several sterile inflammation conditions, including atherosclerosis and post-ischemic myocardial remodeling (12). In a large multicenter cohort of patients with acute coronary syndromes, our group previously found that plasma levels of soluble TREM-1 were an independent predictor of major adverse cardiovascular events (12). Interestingly, LR12 peptide, a decoy receptor that strongly inhibits TREM-1 engagement by competing with its still unknown endogenous ligand, has been shown to be able to modulate innate immune responses following bacterial aggression in rodents (13), pigs (14) and primates (15), resulting in attenuation of organ dysfunction and improved outcome (13, 14). LR-12 treatment also reduces atherosclerosis development and limits deleterious post-ischemic cardiac remodeling in mice.

Here, we show that Angiotensin II (AngII) increases TREM-1 expression in classical monocytes through AngII Receptor type I (AT<sub>1</sub>R) engagement. In an experimental mouse model of AngII-induced AAA, both *Trem-1* gene deletion and pharmacological blockade limit classical monocyte recruitment into the abdominal aorta and decrease AAA severity. Conversely, TREM-1 stimulation using a monoclonal anti-TREM-1 agonist antibody exacerbates monocyte infiltration in the aorta and worsens AAA severity. Our findings identify TREM-1 as a new actor in the pathophysiology of AAA, paving the way for novel therapeutic strategies to combat AAA formation.

## Methods

### Human samples analysis.

Human samples were obtained from patients with AAA and from organ donors at the University Hospital of Nice. The study was conducted in conformity with the Declaration of Helsinki and was approved by the institutional ethics committee (Comité de Protection des Personnes Sud Méditerranée V, protocol N° 17-030, N°: Collection MCV, N° ID-RCB: 2017-AO1019-44 and N° PFS16-007). All enrolled patients gave informed written consent. This study involves partly a previously published clinical cohort (16, 17). The diagnosis of AAA was defined as a dilatation of the abdominal aorta with a diameter > 30 mm and was checked by a vascular surgeon based on CT-scans. Blood samples were obtained after a peripheral vein puncture after 8 to 12 hours fasting. They were collected in 5 ml BD Vacutainer® tubes coated with EDTA. Samples were centrifuged at 20°C for 10 minutes at 3 000 x g and aliquots of plasma were stored at -80°C until analysis. Infrarenal abdominal aortic tissue were harvested from patients undergoing elective open AAA repair. Healthy abdominal aortic tissue was obtained from patients in a state of brain death. Tissues were immediately snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

### *RNA extraction and analysis*

RNA from tissue samples was extracted using Trizol (Life Technologies, France). For quantitative PCR (qPCR), RNA was reverse transcribed using Quantitec Reverse Transcription Kit (Qiagen). Reverse transcribed cDNAs were quantified by TB Green® Premix Ex Taq™ (Tli RNase H Plus, TAKARA) based q-PCR using specific oligonucleotides (see table) on StepOnePlus Real-Time PCR apparatus (Thermofisher). The relative amount of all mRNAs was calculated using the comparative  $\Delta\Delta C_t$  method using cyclophilin as housekeeping gene. The following primer sequences were used:

TREM-1: Forward 5'-GCC TTG TGC CCA CTC TAT ACC A-3', Reverse 5'-TGG AGA CAT CGG CAG TTG AC-3'; CD62L: Forward 5'-TTA CCT CTG CAT GTA CCT TCA TCT G-3', Reverse 5'-CAC CCT CCT TAA TCA TTG AGA AAC TT-3'; Cyclophilin A: Forward 5'-GCA TAC GGG TCC TGG CAT CTT GTC C-3', Reverse 5'-ATG GTG ATC TTC TTG CTG GTC TTG C-3'.

#### *Soluble TREM-1 levels*

TREM-1 plasma concentration was measured using Quantikine® ELISA Human TREM-1 Immunoassay (R&D Systems, catalog number DTRM10C). The assay was performed according to the manufacturer's protocol. TREM-1 was quantified in the plasma of healthy volunteers or patients with AAA at the University Hospital of Nice (Comité de Protection des Personnes Sud Méditerranée V, protocol N° 17-030, N°: Collection MCV, N° ID-RCB: 2017-AO1019-44 and N° PFS16-007).

#### *Immunofluorescent staining*

The specimens were fixed in formalin and embedded in paraffin (FFPE). Double immunofluorescence was performed as follows. The FFPE sections were first incubated overnight with a TREM-1 goat polyclonal antibody at 1:50 dilution (18) and revealed with an anti-goat biotinylated secondary antibody at 1:500 (Vector, Burlingame, CA, USA), followed by a streptavidin-Alexa Fluor 488 conjugate at 1:500 (ThermoFisher). After rinsing, the sections were incubated with a second primary monoclonal mouse anti-CD68 antibody at 1:100 (Agilent Technologies, Les Ulis, France) to characterize macrophages. Sections were revealed by an anti-mouse antibody conjugated to Alexa Fluor 594 at 1:500 (ThermoFisher). Negative controls were obtained by omitting one of the primary antibodies.

### **Animal studies.**

All experiments were conducted according to the guidelines formulated by the European Community for experimental animal use (L358-86/609EEC) and were approved by the Ethical Committee of INSERM and the French Ministry of Agriculture (agreement A75-15-32). *Apoe*<sup>-/-</sup> *Trem-1*<sup>-/-</sup> mice (Null for both *Apoe* and *Trem-1* genes) have been described previously (18). AT<sub>1A</sub>MUT mice, exhibiting a constant activation of angiotensin II receptor type 1A signaling, were provided by E. Clauser (PARCC, Inserm U970, Paris) (19). *Atgr1a*<sup>-/-</sup> mice have been previously described (20). *Tlr4*<sup>-/-</sup> mice were a kind gift of S. Akira (Osaka, Japan) and were provided by F. Pène (Institut Cochin, Inserm U1016, CNRS UMR8104, Université de Paris).

### ***Pharmacological treatments***

**Angiotensin II infusion.** Angiotensin II (Sigma-Aldrich) was infused in 8- to 10-week old male mice via subcutaneous osmotic pumps (Alzet, Charles River) releasing a constant concentration of 1,000 ng/kg/min for a maximum of 28 days. Maximum abdominal aortic diameters were assessed by measuring external aortic diameter from images taken at the end of the experiment. AAA incidence was determined using a threshold (1.38mm) corresponding to a 50% increase of the mean maximum abdominal aortic diameter of a pool of normal *Apoe*<sup>-/-</sup> mice.

**AT<sub>1</sub>R and AT<sub>2</sub>R blockade.** C57BL/6J mice (Janvier, France) were injected intraperitoneally with PBS, AT<sub>1A</sub>R blocker (Losartan potassium, 40mg/kg/d, Abcam), or AT<sub>2</sub>R blocker (PD123,319, 10mg/kg/d, Sigma Aldrich) 3 days before pump implantation and until the end of the experiment. Blood was harvested just before pump implantation and after 3 days of AngII infusion.

***Anti-TREM-1 monoclonal antibody.*** *Apoe*<sup>-/-</sup> mice were infused with AngII (1,000 ng/kg/min) for 3, 7 or 28 days. Animals were blindly randomized to receive a monoclonal anti-TREM-1 agonist antibody (TREM-1 Ab, 0.2 mg/kg/d, clone 174031, R&D-Biotechne) or an IgG isotype

control antibody (Isotype Ab, 0.2 mg/kg/d, clone 54447, R&D-Biotechne) intraperitoneally once a day for 3, 7 or 5 days respectively. These experiments were repeated several times in order to perform different tissue analyses.

*Anti-CD62L monoclonal antibody.* A functional grade purified anti-mouse CD62L antibody (CD62L Ab, 0.1 mg/kg/d, clone MEL-14, eBiosciences) was intravenously injected on day 0 and day 1 in mice infused with AngII and subjected to TREM-1 Ab or Isotype Ab treatment for 3 days (21).

*TREM-1 Inhibitory Peptide LR-12.* LR12 (LR12, LQEEDAGEYGCM) and LR12-scramble (Scr, the inactive control peptide containing the same amino acids but in a randomized sequence order) were chemically synthesized (Pepscan Presto BV, Lelystad, The Netherlands) as COOH terminally amidated peptides. The correct peptides were obtained with >99% yields and were homogeneous after preparative purification, as confirmed by mass spectrometry and analytic reversed-phase high-performance liquid chromatography. These peptides were free of endotoxin. Animals were blindly randomized to receive 150 µg/mice/d of LR12 or LR12-scramble peptides intraperitoneally once a day for 7 days. This dose was shown to inhibit TREM-1 pathway activation in studies on septic shock (14, 15) and acute myocardial infarction (12).

### ***Characterization of aneurysmal lesions.***

The suprarenal region of the abdominal aorta, subjected to AAA development, were harvested and embedded in both cryostat and paraffin and 7-µm thick sections were used for histology and immunohistochemistry analysis. Sections were stained with Orcein for elastin layers detection. The mean number of elastin layers was quantified by a researcher blinded to the experimental protocol (4 measurements/section, 8 sections/mouse). Sections were stained for macrophages using a rat anti-mouse CD68 primary antibody (clone FA-11, AbD Serotec) revealed with an anti-rat Cy5 secondary antibody (Jackson ImmunoResearch). The percentage

of cellular area positive for CD68 staining (macrophages) was quantified using Histolab software (Microvision) and the CD68+ area/total aortic wall area (media+adventitia) ratio was calculated. TREM-1 immunostaining and colocalization with macrophages were detected using a polyclonal goat anti-mouse TREM-1 antibody, revealed with an anti-goat Cy5 secondary antibody (Jackson ImmunoResearch), and anti-mouse CD68 revealed with an anti-rat AF188 secondary antibody.

#### ***Splenocyte culture and quantitation of cytokine release.***

Splenocytes were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with Glutamax (ThermoFisher Scientific), 10% FCS, and antibiotics. For cytokine measurements, 1 million splenocytes were stimulated with LPS (10 µg/ml), with or without IFN- $\gamma$  (100 UI/ml) for 24 hours. IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  production in the supernatants was measured using specific ELISAs (R&D Systems, BD).

#### ***Quantitation of plasmatic sTREM-1 release.***

Mouse plasma was obtained by centrifugation of heparinized blood collected from the retroorbital sinus. Concentration of sTREM-1 in mouse plasma was determined using a commercially available ELISA (DuoSet; R&D Systems), according to the manufacturer's instructions.

#### ***Fluorescence Molecular Tomography (FMT) Imaging.***

Twenty-four hours before sacrifice, AngII-infused animals were anaesthetized with isoflurane and received intravenously 150 µL of a fluorescent imaging probe MMPsense 680 (NEV 10126, PerkinElmer). The probe is optically silent in its unactivated state and becomes highly fluorescent following activation by MMPs including MMP-2, -3, -9, and -13. Images were acquired using a fluorescence molecular imaging system (FMT 2500TM, VisEnMedical).

### ***Flow cytometry.***

Animals were perfused with cold PBS and whole aortas were rapidly cleaned and harvested under a dissection microscope. Aortas were minced and incubated 30 min at 37°C in an enzymatic digestion cocktail (Collagenase I (450 U/ml, Sigma Aldrich), Collagenase XI (125 U/ml, Sigma Aldrich), Hyaluronidase (60 U/ml, Sigma Aldrich), DNase (60 U/ml, Sigma Aldrich) and Elastase (0.372 U/ml, Sigma Aldrich). Leukocyte suspension was obtained from spleen after meshing and blood, spleen and aorta extracellular antigens were stained with fluorescent labeled anti-mouse antibodies (see Tables) for 30 minutes at 4°C. Flow cytometric acquisitions were done on a BD LSRFortessa (BD Biosciences) and data were analyzed using FlowJo Software (TreeStar, Inc.). Forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) were used to gate live cells, red blood cells, debris, cell aggregates and doublets being excluded. In the blood and in the spleen, neutrophils were identified as CD11b<sup>+</sup>/Ly6G<sup>+</sup> and monocytes as CD11b<sup>+</sup>/Ly6G<sup>-</sup>, Ly6C<sup>hi</sup> or Ly6C<sup>lo</sup>. In the aorta, Ly6C<sup>hi</sup> classical monocytes were identified as CD45<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly6G<sup>-</sup>/F4/80<sup>low</sup>-CD64<sup>low</sup>/CD11c<sup>-</sup>-MHCII<sup>-</sup>/Ly6C<sup>high</sup>.

### **Blood and Spleen**

Antigen	Fluorochrome	Clone	Supplier
B220	AmCyan	RA3-6B2	BD Biosciences
CD11b	BV605	M1/70	BD Biosciences
Ly6C	FITC	AL-21	BD Biosciences
Ly6G	PE	1A8	BD Biosciences
TREM-1	APC	174031	R&D
CD62L	Pacific Blue	MEL-14	e-Bioscience

## Aorta

Antigen	Fluorochrome	Clone	Supplier
CD45	AF700	30-F11	BD Biosciences
CD11b	BV605	M1/70	BD Biosciences
Ly6C	APC-Cy7	AL-21	BD Biosciences
Ly6G	BUV395	1A8	BD Biosciences
CD64	BV421	X54-5/7.1	Biolegend
F4/80	PE	CI:A3-1	Abcam
CD11c	PerCP-Cy5.5	HL3	BD Biosciences
MHC-II	FITC	M5/114.115.2	e-Bioscience
TREM-1	APC	174031	R&D
CD3	PerCP-Cy5.5	145-2C11	e-Bioscience
B220	BUV496	RA3-6B2	BD Biosciences

### *Quantitative real-time PCR.*

Quantitative real time PCR was performed using a Step-one Plus (Applied Biosystems™). GAPDH cycle threshold was used to normalize gene expression: Forward 5'-CGTCCCGTAGACAAAATGGTGAA-3'; Reverse 5'-GCCGTGAGTGGAGTCATACTGGAACA-3'. The following primer sequences were used: Trem-1: Forward 5'-TGCGGTTGTTTCCTCTCCTGGTCTTG-3', Reverse 5'-TGTGAAATAGACACCGCTGAAGGTCCT-3'; Il-1 $\beta$ : Forward 5'-GAAGAGCCCATCCTCTGTGA-3'; Reverse 5'-GGGTGTGCCGTCTTTCATTA-3'; Tnf- $\alpha$ : Forward 5'-GATGGGGGGCTTCCAGAACT-3', Reverse: 5'-CGT GGG CTA CAG GCT TGT CAC-3', Mmp-2: Forward 5'-CCGAGA CCGCTATGTCCACTGT-3', Reverse 5'-CCGGTCATCATCGTAGTTGGTTGT-3', Mmp-9: Forward 5'-

CCGTCATTCGCGTGGATAAGGAGT-3', Reverse 5'-GTAGCCCACGTC CACCTGGTT-3'. Ccl2: Forward 5'-CCCCACTCACCTGCTGCTA-3', Reverse 5'-TACGGGTCAACTTCACATTCAAA-3'; Ccl3: Forward 5'-CACTGCCCTTGCTGTTCTTCTCTGT-3', Reverse 5'-ATCTGCCGGTTTCTCTTAGTCAGGA-3'; Ccl5: Forward 5'-CCCCGCACCTGCCTCACCAT-3', Reverse 5'-TTGGCACACACTTGGCGGTTTCCTT-3'; Ccr2: Forward 5'-AAGAGGGCATTGGATTCACCACAT-3', Reverse 5'-ATGCCGTGGATGAACTGAGGTA-3'; Ccr5: Forward 5'-GGTGAGACATCCGTTCCCCCTACAA-3', Reverse 5'-CAGGAGCTGAGCCGCAATTTGTTTC-3'; Cd62l: Forward 5'-CGCATTCTCGGGGCTGGCATTCT-3', Reverse 5'-CTCTAATGTGGGAGATGCCTGCGTGTA-3'. Relative expression was calculated using the  $\Delta\Delta C_t$  method. For the microarray gene analysis, total RNAs were retrotranscribed with RT2 First Strand Kit (SABiosciences, Tebu-bio, Le Perray-en-Yvelines, France) for PCR arrays (Mouse Innate Immune Profiler PCR Arrays; SABiosciences). All PCRs were performed in a MyiQ Thermal Cycler and quantified by iQ5 software (Qiagen). PCR array results were analyzed using PCR Array Data Analysis Software (SABiosciences) and normalized with 5 house-keeping genes.

***Mass cytometry (CYTOF).***

Cells from spleen and blood were resuspended at  $1 \times 10^7$  cells per ml and stained with cisplatin (5  $\mu$ M) for 5 minutes at room temperature to assess viability. Cells were washed with PBS plus 0.5% BSA at 500g for 10 min. Surface staining was performed by adding a cocktail of pre-conjugated and homemade-conjugated antibodies (Table) for 30 min at room temperature and excess antibodies were removed by washing. Cells were fixed and permeabilized using the FoxP3 Fixation/Permeabilization kit from Invitrogen according to the manufacturer's

instructions. Intracellular staining was performed by adding antibodies for 30 min at room temperature and excess antibodies were removed by washing. Cells were stained with cell-ID Intercalator-Ir in fixation and permeabilization solution (Fluidigm protocol). Prior to acquisition, fixed cells were washed with PBS twice and deionised water twice. Cells were resuspended at  $5 \times 10^5$  per ml in 1:10 calibration beads (EQ Four Element Calibration Beads, Fluidigm), diluted with deionised water and the samples were analyzed with the Helios mass cytometer (Fluidigm) at a flow rate of 0.030 ml per minute. Mass cytometry data were normalized using MatLab method.

For data analyzing, live CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>high/low</sup> cells population was extracted as a new.fcs file using Flowjo and uploaded on Cytobank platform to run unsupervised analysis using Spanning-tree Progression Analysis of Density-normalized Events (SPADE) algorithm. SPADE algorithm generates trees illustrating the relationship between clusters of cells based on a density-dependent down-sampling followed by agglomerative clustering to prevent rare cells from being overlooked among the more abundant cellular population.

Antigen	Metal	Clone	Reference
TCRb	143Nd	H57-597	3143010B
CD69	145Nd	H1.2F3	3145005B
F4/80	146Nd	BM8	3146008B
CCR5*	147Sm	645807	MAB6138
CD11b (Mac-1)	148Nd	M1/70	3148003B
CD19	149Sm	6D5	3149002B
CD25 (IL-2R)	150Nd	3C7	3150002B
Ly-6G	151Eu	1A8	3151010B
CD3e	152Sm	145-2C11	3152004B
CD8a	153Eu	53-6.7	3153012B
GMCSF R	156Gd	698423	MAB6130
Foxp3	158Gd	FJK-16s	3158003A
TCRgd	159Tb	GL3	3159012B
CD45R (B220)	160Gd	RA3-6B2	3160012B
Ly-6C	162Dy	HK1.4	3162014B
CD54 (ICAM-1)	163Dy	YN1/1.7.4	3163020B
CD62L (L-selectin)	164Dy	MEL-14	3164003B
CD161 (NK1.1)	165Ho	PK136	3165018B
CXCR2	167Er	242216	MAB2164
CD206 (MMR)	169Tm	C068C2	3169021B
TREM-1	170Er	174031	MAB1187
CD44	171Yb	IM7	3171003B
CD4	172Yb	RM4-5	3172003B
CXCR1	173Yb	Q810W6	MAB8628
I-A/I-E	174Yb	M5/114.15.2	3174003B
CCR2	175Lu	475301	MAB55381
CX3CR1	176Yb	1H14L7	702321
CD11c	209Bi	N418	3209005B
CD45	89Y	HI30	3089003B

***Statistical analysis.***

Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. Differences between values were examined using the nonparametric Mann-Whitney, Kruskal-Wallis or Fisher's tests when appropriate and were considered significant at  $P < 0.05$ .

## Results

### *Angiotensin II up-regulates TREM-1 expression in Ly6C<sup>hi</sup> Classical monocytes*

To investigate the effect of AngII on TREM-1 expression, C57BL/6J male mice were infused either with PBS or AngII using subcutaneous osmotic pumps and TREM-1 expression was quantified by flow cytometry in blood and spleen at different time points (**Figure 1A**). At baseline, almost all CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> neutrophils expressed TREM-1 (**Figure 1B & 1D & Supplemental fig.1**), whereas less than 1% of circulating CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>hi</sup> classical monocytes expressed TREM-1 (**Figure 1C**). We observed a transient increased expression of TREM-1 on classical monocytes at day 1 following PBS infusion, likely due to the stress associated with subcutaneous osmotic pump implantation. Following AngII infusion, TREM-1 expression on circulating classical monocytes significantly increased at day 1 and remained elevated at day 3 ( $0.98 \pm 0.12$  at baseline versus  $12.52 \pm 3.78$  % after 3 days of AngII,  $P < 0.05$ ) (**Figure 1C**), but did not change on circulating CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>lo</sup> non-classical monocytes (**Supplemental fig.2**). Such an increase of TREM-1 expression on classical monocytes was also observed in the spleen (**Figure 1E & Supplemental fig.3**). Soluble TREM-1 (sTREM-1), shed after receptor stimulation, was barely detectable in the plasma of C57BL/6J mice at baseline, but its levels significantly increased at day 3 after AngII infusion (**Figure 1F**). AngII-induced TREM-1 expression on Ly6C<sup>hi</sup> classical monocytes at day 3, and sTREM-1 plasma levels increased similarly in *Tlr4*<sup>+/+</sup> and *Tlr4*<sup>-/-</sup> treated mice (**Figures 1G - 1I**).

In order to assess the role of the AngII receptors, AT<sub>1</sub>R and AT<sub>2</sub>R, in AngII-mediated TREM-1 up-regulation, we used several complementary approaches. First, we analyzed TREM-1 expression on myeloid populations in AT<sub>1A</sub>MUT mice, a genetically-mouse model characterized by AT<sub>1A</sub>R overactivation (19). When compared to control littermate, the baseline proportion of Ly6C<sup>hi</sup> classical monocytes expressing TREM-1 was significantly higher in the blood of AT<sub>1A</sub> MUT mice (**Figure 1J**). Next, immunocompetent C57BL/6J animals were

infused with AngII and treated with PBS, Losartan (an AT<sub>1</sub>R blocker) or PD123,319 (an AT<sub>2</sub>R inhibitor) (**Figure 1K**). At day 3, AngII-induced increase in TREM-1<sup>+</sup> classical monocytes in the blood was abolished in Losartan-treated mice, but not in the PD123,319-treated mice (**Figure 1L**). The role of AT<sub>1</sub>R in AngII-stimulated expression of TREM-1 in classical monocytes was confirmed in *Atgr1a* deficient mice (**Figure 1M**). Altogether, these results strongly suggest that AngII induces TREM-1 expression and activation on classical monocytes through AT<sub>1</sub>R engagement.

***Angiotensin II up-regulates TREM-1 expression on Ly6C<sup>hi</sup> classical monocytes in hypercholesterolemic ApoE<sup>-/-</sup> mice***

Next, we tested the relevance of our findings in hypercholesterolemic *ApoE<sup>-/-</sup>* mice infused with AngII, an experimental model of AAA (**Figure 2A**). As found in normocholesterolemic C57BL/6J mice, almost all blood CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> neutrophils expressed TREM-1 in *ApoE<sup>-/-</sup>* mice at baseline (**Figure 2B**), and AngII infusion induced TREM-1 expression on circulating Ly6C<sup>hi</sup> classical monocytes at day 3 (**Figure 2C**) and increased plasma levels of sTREM-1 until day 14 (**Figure 2D**).

As previously reported by our group (3) and others, AngII infusion in *ApoE<sup>-/-</sup>* mice promotes the mobilization of classical monocytes from the spleen to the circulating blood, and ultimately to the aortic wall. Interestingly, we detected TREM-1 expression in the aorta of *ApoE<sup>-/-</sup>* mice after AngII infusion at both mRNA (**Figure 2E**) and protein levels (**Figure 2F**), but not after PBS infusion. Using immunofluorescent staining, we showed that TREM-1 co-localized with CD68-positive macrophages (**Figure 2F**).

### ***Trem-1 deficiency limits AAA development in AngII-infused Apoe<sup>-/-</sup> mice***

In order to address the role of TREM-1 in the development of AngII-induced AAA, *Apoe<sup>-/-</sup> Trem-1<sup>+/+</sup>* and *Apoe<sup>-/-</sup> Trem-1<sup>-/-</sup>* mice under a chow diet were infused with AngII (**Figure 2G**) (22). Blood pressure increased following AngII infusion without any significant difference between groups (**Supplemental fig.4**). The absence of TREM-1 expression on myeloid cells in *Apoe<sup>-/-</sup> Trem-1<sup>-/-</sup>* mice was confirmed by flow cytometry (**Supplemental fig.5**). Neutrophil count increased in the blood following AngII infusion without any difference between groups (**Supplemental fig.6**). At day 3, AngII-induced monocytosis was observed in *Apoe<sup>-/-</sup> Trem-1<sup>+/+</sup>* control mice but was abolished in *Trem-1* deficient mice (**Figure 2H**). The number of classical monocytes in the spleen was higher in *Apoe<sup>-/-</sup> Trem-1<sup>-/-</sup>* mice, as well as the spleen/blood classical monocyte ratio (**Supplemental fig.7 a-b**), suggesting impaired monocyte mobilization from the spleen to the blood in response to AngII infusion in the absence of TREM-1. Next, we analyzed monocyte infiltration in the abdominal aorta by flow cytometry after enzymatic digestion. At day 3 after AngII infusion, we found a lower number of Ly6C<sup>hi</sup> classical monocytes in the aorta of AngII-infused *Apoe<sup>-/-</sup> Trem-1<sup>-/-</sup>* mice (**Figure 2I**) compared to the control group, but no difference in infiltrating neutrophil number between groups (**Supplemental fig.8**). Immunostaining corroborates flow cytometry data with a huge decrease in macrophage content in the aorta of AngII-infused *Apoe<sup>-/-</sup> Trem-1<sup>-/-</sup>* mice compared to AngII-infused *Apoe<sup>-/-</sup> Trem-1<sup>+/+</sup>* mice at day 7 (**Figure 2J**). Given that TREM-1 regulates cytokine production (23, 24), we next investigated the local immuno-inflammatory response and we found decreased Il-1b, Tnf-a and Mmp9 mRNA expression in the aorta of AngII-infused *Apoe<sup>-/-</sup> Trem-1<sup>-/-</sup>* mice compared to AngII-infused control mice (**Figure 2K**). Furthermore, global MMP activity (**Figure 2L**), quantified using ex vivo fluorescence molecular tomography imaging, was significantly reduced in the aorta of AngII-infused *Apoe<sup>-/-</sup> Trem-1<sup>-/-</sup>* mice. In AAA, the local activation of MMPs with elastolytic activity, including MMP-9, likely contributed

to elastin degradation and matrix remodeling. Here, *Trem-1* deficiency limited elastin degradation, as assessed by the significantly higher number of elastin layers in the abdominal aorta of AngII-infused *Apoe<sup>-/-</sup>Trem-1<sup>-/-</sup>* mice compared with the aorta of AngII-infused *Apoe<sup>-/-</sup>Trem-1<sup>+/+</sup>* mice at day 7 ( $3.30\pm 0.20$  vs  $4.03\pm 0.19$ ,  $P<0.05$ ) (**Figure 2M**). Finally, the impact of *Trem-1* deficiency on AAA formation was evaluated 28 days after AngII infusion. Aortic abdominal diameter was significantly lower in *Apoe<sup>-/-</sup>Trem-1<sup>-/-</sup>* mice, as compared to *Apoe<sup>-/-</sup>Trem-1<sup>+/+</sup>* mice ( $1.9\pm 0.7$  vs  $1.2\pm 0.2$ ,  $P<0.05$ ) (Figure 2N). AAA incidence, defined as a 50% increase of aorta diameter, was also significantly reduced in *Trem-1* deficient animals (**Supplemental fig.9**).

### ***TREM-1 stimulation aggravates AngII-dependent AAA development in *Apoe<sup>-/-</sup>* mice***

Our results obtained in genetically-modified mice suggest that TREM-1 plays a pathogenic role in AAA formation. We aimed to confirm the role of TREM-1 in immunocompetent animals using a complementary “gain-of-function” approach. AngII-infused *Apoe<sup>-/-</sup>* mice were daily treated with an anti-TREM-1 stimulating antibody (TREM-1 Ab) or an isotype control (Isotype Ab) for 3 or 7 days, depending on the duration of the experiment (**Figure 3A**). Blood pressure following AngII infusion was not different between groups (**Supplemental fig.10**). TREM-1 stimulation in vivo aggravated the pro-inflammatory systemic state of AngII-infused *Apoe<sup>-/-</sup>* mice, as shown by enhanced TNF- $\alpha$  and IL-6 production by LPS/IFN- $\gamma$ -stimulated splenocytes from TREM-1 Ab-treated mice, compared with that from isotype-treated animals (**Figure 3B**). Following in vivo stimulation, plasma levels of sTREM-1 markedly increased (**Figure 3C**) and membrane TREM-1 expression on monocytes decreased (**Figure 3D**), likely due to receptor shedding (25). At day 3, Ly6C<sup>hi</sup> classical monocyte levels in the blood were not different between groups (**Figure 3E**). However, Ly6C<sup>hi</sup> classical monocyte infiltration within the aortic wall was significantly increased in TREM-1 Ab-treated group compared to isotype-treated mice

(**Figure 3F**), without any significant difference in neutrophil and non-classical monocyte infiltration (**Supplemental fig.11**).

We next investigated the local vascular immuno-inflammatory response. We found increased *Il-1b* and *Mmp9* mRNA expression in the aorta of TREM-1 Ab-treated mice (**Figure 3G**). Consequently, TREM-1 Ab-mediated stimulation worsened elastin degradation, as assessed by the significantly lower number of elastin layers in the abdominal aorta of AngII-infused mice treated with anti-TREM-1 stimulating monoclonal antibody at day 7 ( $3.85 \pm 0.03$  in Isotype-Ab group vs  $3.48 \pm 0.09$  in TREM-1 Ab group,  $P < 0.05$ ) (**Figure 3H**). Finally, TREM-1 stimulation aggravated aortic disease severity at day 28 after Ang II infusion. Abdominal aorta diameter was significantly higher in TREM-1 Ab-treated *Apoe*<sup>-/-</sup> mice, as compared to isotype-treated *Apoe*<sup>-/-</sup> mice ( $2.1 \pm 0.7$  vs  $1.5 \pm 0.4$ ,  $P < 0.05$ ) (**Figure 3I**), and AAA incidence was enhanced severely (**Figure 3J**).

#### ***TREM-1 regulates CD62L-dependent classical monocyte infiltration in the aorta***

In order to understand how TREM-1 engagement regulates classical monocyte trafficking in experimental AAA, we analyzed chemokine receptor expression on classical monocytes using mass cytometry one day after AngII infusion. CX3CR1 and CCR2 expression was reduced in *Trem-1* deficient classical monocytes (**Figure 4A**) in circulating blood, which is consistent with previous studies showing that TREM-1 regulates chemokine/chemokine receptor activity in experimental acute myocardial infarction (12). By RT-qPCR, we found a significant reduction of *Ccl5* and *Ccr5* mRNA expression in the aorta of AngII-infused *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem-1*<sup>-/-</sup> mice compared to the aorta of AngII-infused *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem-1*<sup>+/+</sup> mice (**Figure 4B**). Conversely, TREM-1 stimulation led to a significant increase in *Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl5*, *Ccr2* and *Ccr5* mRNA expression in the aorta of AngII-infused *Apoe*<sup>-/-</sup> (**Figure 4C**) suggesting that TREM-1

modulates monocyte trafficking through the regulation of chemokine/chemokine receptor activity.

We also observed significantly decreased expression of CD62L in circulating classical monocytes from *ApoE*<sup>-/-</sup>*Trem-1*<sup>-/-</sup> mice, compared to *ApoE*<sup>-/-</sup>*Trem-1*<sup>+/+</sup> mice (**Figure 4A & D**). This result was confirmed by flow cytometry (**Supplemental fig.12**). *Cd62l* mRNA expression was also reduced in the aorta of AngII-infused *ApoE*<sup>-/-</sup>*Trem-1*<sup>-/-</sup> mice (**Figure 4E**). Conversely, TREM-1 stimulation increased *Cd62l* mRNA expression in the aorta of AngII-infused *ApoE*<sup>-/-</sup> mice (**Figure 4F**). To assess whether monocyte CD62L was involved in their recruitment within the aorta following TREM-1 stimulation, AngII-infused *ApoE*<sup>-/-</sup> mice receiving either stimulating TREM-1 Ab or isotype control were treated with an anti-CD62L neutralizing antibody (**Supplemental fig.13**). CD62L blockade was confirmed by flow cytometry in the blood (**Figure 4G**). Interestingly, CD62L blockade abolished the increase of aortic classical monocyte infiltration induced by TREM-1 activation following AngII infusion (**Figure 4H**).

### ***Pharmacological blockade of TREM-1 reduces AAA formation***

To evaluate a novel therapeutic approach in AAA, we used a well validated inhibitor of TREM-1 activation in rodents and pigs, the dodecapeptide LR12 (12, 14). In a preliminary series of experiments, we found that LR12 treatment during 7 days significantly reduced the inflammatory state in the aorta of *ApoE*<sup>-/-</sup> mice. Using RNA microarray analysis, we identified 5 genes whose expression was downregulated by more than 3-fold following LR12 treatment. Interestingly, mRNA expression of *Ccl2*, *Ccl5* and *Cd62l* was strongly downregulated by LR12 (**Figure 5A**). To validate our hypothesis that TREM-1 pharmacological blockade might be protective in AAA, AngII-infused *ApoE*<sup>-/-</sup> mice fed a chow diet were treated with daily intraperitoneal injections of Scramble or LR-12 peptide and sacrificed at day 7 (**Supplemental fig.14**). LR-12 was well tolerated, we did not observe any differences in animal weight (**data**

**not shown**) or in systolic blood pressure (**Supplemental fig.15**) between Scramble and LR12-treated mice. TREM-1 pharmacological inhibition led to a significant reduction in macrophage content in the abdominal aorta (**Figure 5B**). TREM-1 pharmacological inhibition also reduced elastin layer degradation ( $3.85 \pm 0.19$  in Scr group vs  $4.36 \pm 0.06$  in LR-12 group,  $P < 0.05$ ) (**Figure 5C**) and limited AAA severity. Aorta diameter was significantly lower in LR12-treated *ApoE*<sup>-/-</sup> mice than in Scramble-treated *ApoE*<sup>-/-</sup> mice ( $1.46 \pm 0.10$  in Scr group vs  $1.19 \pm 0.08$  in LR12 group,  $P < 0.05$ ) (**Figure 5D**), and AAA incidence was reduced (**Figure 5E**).

### ***TREM-1 is expressed in the blood and in the aortic wall of patients with AAA***

To evaluate the clinical relevance of our results, we assessed TREM-1 expression in human aortic aneurysms (AAA), compared to normal aortas. By RT-qPCR, we found higher levels of *TREM-1* mRNA expression in AAA compared to normal aortas. *TREM-1* mRNA expression was similar in the neck and in the dilated zone of the AAA (**Figure 6A**). Immunofluorescent staining showed that TREM-1 was barely detectable in normal aortas (**Figure 6B**), but was strongly expressed in abdominal aneurysm, its expression being mostly confined to CD68<sup>+</sup> intimal macrophages (**Figure 6C and D**).

Finally, we quantified sTREM-1 levels in the plasma of healthy volunteers and AAA patients. The characteristics of included populations are detailed in **supplemental table 1**. As expected, healthy subjects are younger and have less frequent cardiovascular risk factors. We found that sTREM-1 plasma levels were more than 3-fold higher in patients with AAA ( $400 \pm 306$  pg/ml) than in healthy individuals ( $119 \pm 86$  pg/ml;  $P < 0.001$ ) (**Figure 6E**).

## Discussion

Here, we found that AngII induced TREM-1 expression on classical monocytes through AT<sub>1</sub>R engagement. In an AngII-induced AAA mouse model, we showed that TREM-1 orchestrated classical monocyte mobilization from the spleen to the blood and modulated monocyte infiltration into the aortic wall through CD62L upregulation. In humans, sTREM-1 levels were increased in the plasma of patients with AAA and TREM-1 was highly expressed within AAA tissue samples, colocalizing with macrophages.

TREM-1 is constitutively expressed on neutrophils and non-classical (8) monocytes. In our study, we showed that AngII infusion increased TREM-1 expression specifically on classical monocytes in the blood and in the spleen. Using genetically-modified mice as «gain- and loss-of-function» models (AT<sub>1A</sub> MUT and *Atgr1a*<sup>-/-</sup> mice, respectively) and pharmacological agents (AT<sub>1</sub>R and AT<sub>2</sub>R blockers), we found that AT<sub>1</sub>R receptor engagement was instrumental in TREM-1 upregulation, whereas AT<sub>2</sub>R was not involved. Increase in TREM-1 expression on classical monocytes at day 1 in the PBS-treated group may be due to the stress caused by surgery and low LPS contamination. However, monocyte TREM-1 expression was no longer increased at day 3 in control mice, whereas it remained high in AngII-treated group. We ruled out the possibility that TREM-1 upregulation was mediated by LPS contaminant since no difference was observed between AngII-treated *Tlr4*<sup>+/+</sup> and *Tlr4*<sup>-/-</sup> mice. Following activation, membrane bound TREM-1 is shed by metalloproteases and released in the milieu. Plasma sTREM-1 has been shown to be increased in sepsis (26) and in acute myocardial infarction, both in mice and human (12). Here, we observed that baseline sTREM-1 was barely detected in the plasma of C57BL/6J and *ApoE*<sup>-/-</sup> mice, but levels significantly increased following AngII infusion and remained elevated for 14 days, suggesting prolonged TREM-1 activation.

Given that the Renin-Angiotensin System has been involved in human AAA pathophysiology (27) and that AngII infusion causes aorta dilation and AAA formation in hypercholesterolemic

mice (28), we investigated whether TREM-1 plays a role in AAA. Previous works from our group and others have shown that AngII infusion induces mobilization of classical monocytes from the spleen to the blood and that early monocytosis is mandatory for AAA formation (3). Interestingly, *Trem-1* deficiency abolished AngII-induced early monocytosis, and reduced AAA incidence and severity. This is in agreement with our previous finding in experimental acute myocardial ischemia, which is characterized by acute production of endogenous AngII, showing that monocytosis occurring after coronary occlusion was prevented in *Trem-1*<sup>-/-</sup> mice, as well as by TREM-1 pharmacological blockade (12). The mechanisms driving splenic monocyte mobilization following AngII stimulation are still in debate. We found a decrease in CCR2 and CX3CR1 expression on classical monocytes at day 1 after AngII infusion in both spleen and blood of *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem-1*<sup>-/-</sup> animals, compared to *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem-1*<sup>+/+</sup> control mice. It is unlikely that the preventive effect of *Trem-1* deficiency on AngII-induced monocytosis was due to decreased CCR2 expression, as previous work showed that AngII-induced monocytosis was not affected by *Ccr2* deficiency (29). CCR5 and its ligand CCL5 are more attractive candidates to explain how TREM-1 orchestrates AngII-induced monocyte mobilization. Mikolajczyk *et al.* recently reported impaired leukocyte recruitment in the aorta in *Ccl5* deficient mice infused by AngII (30). In addition, pharmacological blockade of CCR5 protects against AAA development (5). In our study, *Trem-1* deletion or pharmacological blockade were associated with a significant reduction in *Ccl5* and *Ccr5* mRNA expression in the aortic wall, while antibody-mediated TREM-1 stimulation significantly increased their expression. These observations suggest that the CCL5/CCR5 axis was likely involved in the pathogenic effects of TREM-1 in AngII-induced AAA.

CYTOF characterization of classical monocytes at day 1 after AngII infusion revealed a strong reduction in CD62L expression in *Trem-1* deficient cells in the spleen and in the blood. Decreased *Cd62l* mRNA expression was also observed in the aorta of *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem-1*<sup>-/-</sup> mice, as

well as in LR12-treated *ApoE*<sup>-/-</sup> mice. Conversely, antibody-mediated TREM-1 stimulation increased *Cd62l* mRNA levels in the aorta, suggesting that TREM-1 regulated AngII-induced CD62L expression. CD62L, a member of selectin family expressed by leucocytes, which plays a pivotal role in endothelial adhesion, is involved in AAA pathophysiology, as CD62L-deficient *Sell*<sup>-/-</sup>*ApoE*<sup>-/-</sup> mice have been shown to be protected against AAA development. In our study, we found that CD62L blockade abolished the early increase in monocyte infiltration induced by TREM-1 stimulation, suggesting that TREM-1 orchestrated monocyte adhesion through the regulation of CD62L expression. Interestingly, in human, a significant association between *TREM-1* gene polymorphism and CD62L plasma levels has been reported, supporting the clinical relevance of our finding and the link between both proteins (31).

The protective effect of TREM-1 blockade might be due to local modulation of vascular inflammation. *Il-1β* and *Tnf-α* mRNA expression was reduced in the aorta of *Trem-1* deficient mice, and *Il-1β* mRNA expression was increased by TREM-1 stimulation. Both cytokines promote experimental AAA (32, 33) through vascular cell activation and immune cell recruitment. *Trem-1* deficiency also reduced MMP (-2, -3, -9 and -13) activities. MMPs have been clearly identified as major contributors in AAA pathophysiology. Levels of active MMP-2 and MMP-9 are significantly increased in human AAA tissue samples (34). In mouse models of AAA, MMP-2 and MMP-9 activities in the aortic wall increase over time (35). In the peri-aortic CaCl<sub>2</sub> injury model of AAA, lesion formation was fully blocked in both *Mmp-9* and *Mmp-2* deficient mice (36). MMP-12 is also expressed in mouse (37) and human (38) aortic aneurysmal tissues, mainly by aortic macrophages. While MMP-9 is induced after cell activation, MMP-12 is constitutively expressed by macrophages, and its expression may further be modulated by several stimuli (39, 40). Our group has previously reported that gene deletion of *Mmp-12* reduced AAA severity in the AngII/anti-TGFβ mouse model (37).

Decreased *Il-1 $\beta$*  and *Tnf- $\alpha$*  mRNA expression, as well as decreased metalloprotease activity in the aorta of AngII infused *ApoE<sup>-/-</sup>Trem-1<sup>-/-</sup>* mice likely resulted from reduced macrophage content in the aorta. It may also partly be due to the deviation of *Trem-1* deficient macrophage phenotype toward a less inflammatory profile. TREM-1 inhibition can promote an anti-inflammatory phenotype in both human monocytes and mouse macrophages after LPS (41) or oxidized LDL stimulation (42) *in vitro*. In the same line, in a model of ureteral obstruction–induced nephritis, *Trem-1* deficiency reduced M1 macrophage polarization within the kidney, as illustrated by decreased *Nos2* and increased *Arg1* mRNA expression (43).

Vascular protection associated with TREM-1 invalidation/blockage was unlikely to be mediated by neutrophil modulation. TREM-1 inhibition had no effect on neutrophil mobilization following AngII infusion, nor on neutrophil infiltration in the aortic wall.

Despite the central role of the immune response in the development of AAA (1), most of the therapeutic strategies targeting innate immune pathways have failed (44); a few are still being tested in clinical trials (45). We believe that a multi-target approach through blockade of TREM-1, as obtained with the inhibitory LR-12 dodecapeptide, may provide extended benefit and will be worthy of clinical testing. The relevance of such an approach is further supported by our clinical findings of increased levels of *TREM-1* mRNA expression in human aortic aneurysms and the significant increase in sTREM-1 plasma levels in AAA patients. The safety, tolerability and pharmacokinetics of TREM-1 blockade using LR-12 peptide, named Nangibotide, in healthy volunteers has been validated (46) and a “proof of concept” therapeutic trial is currently on going in sepsis patients (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04055909). We speculated that patients with small AAA represent the population of choice that could benefit from LR-12 treatment to limit AAA growth, because TREM-1 inhibition would prevent continuous myeloid cell recruitment into the aortic wall and sustained pathogenic MMP activity and vascular inflammation.

## **Conclusion**

AngII induces TREM-1 expression and activation through AT<sub>1</sub>R receptor. TREM-1 is involved in the pathophysiology of AAA, orchestrating classical monocyte mobilization from the spleen to the blood and promoting monocyte infiltration in the aortic wall. Targeting TREM-1 represents a novel potential therapeutic approach in human.

The results of our study provide functional evidence that activation of the renin-angiotensin system induces TREM-1 expression/activation through AT<sub>1</sub>R stimulation in sterile inflammatory conditions. We identify TREM-1 as an important contributor to monocyte trafficking and entry into the aortic wall, and consequently to sustained vascular inflammation and exaggerated development of AngII-induced AAA. Targeting TREM-1 represents a novel potential therapeutic approach to limit AAA expansion in human that should be evaluated in the future.

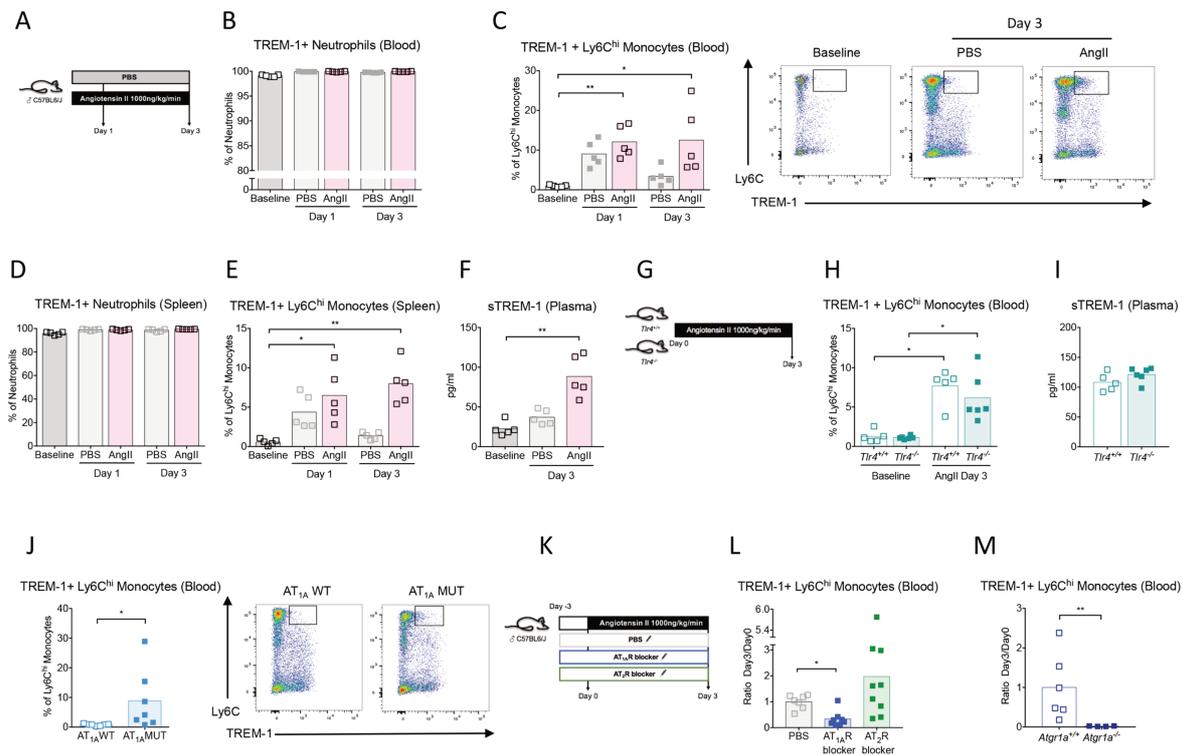
## **Acknowledgements**

This work was supported by Inserm (ZM, ST, AT, HAO), an ANR program (ANR 2018) (HAO) and the British Heart Foundation (Z.M.).

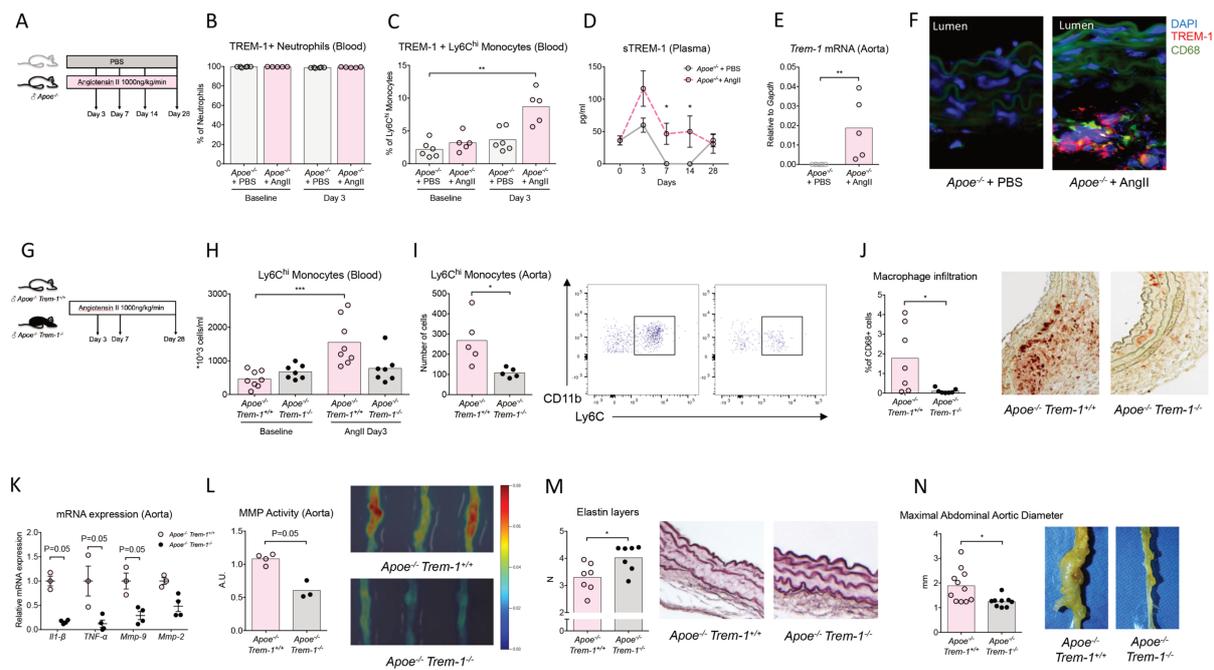
## **Authors Contributions**

Study concept and design, all authors. Acquisitions of data MV, YZ, ISZ, RA, JJ, AG, LG, JR, FL, GC and HAO. Drafting of the manuscript MV, AT, GC and HAO. Critical revision of manuscript, all the authors. Statistical analysis, MV, GC and HAO.

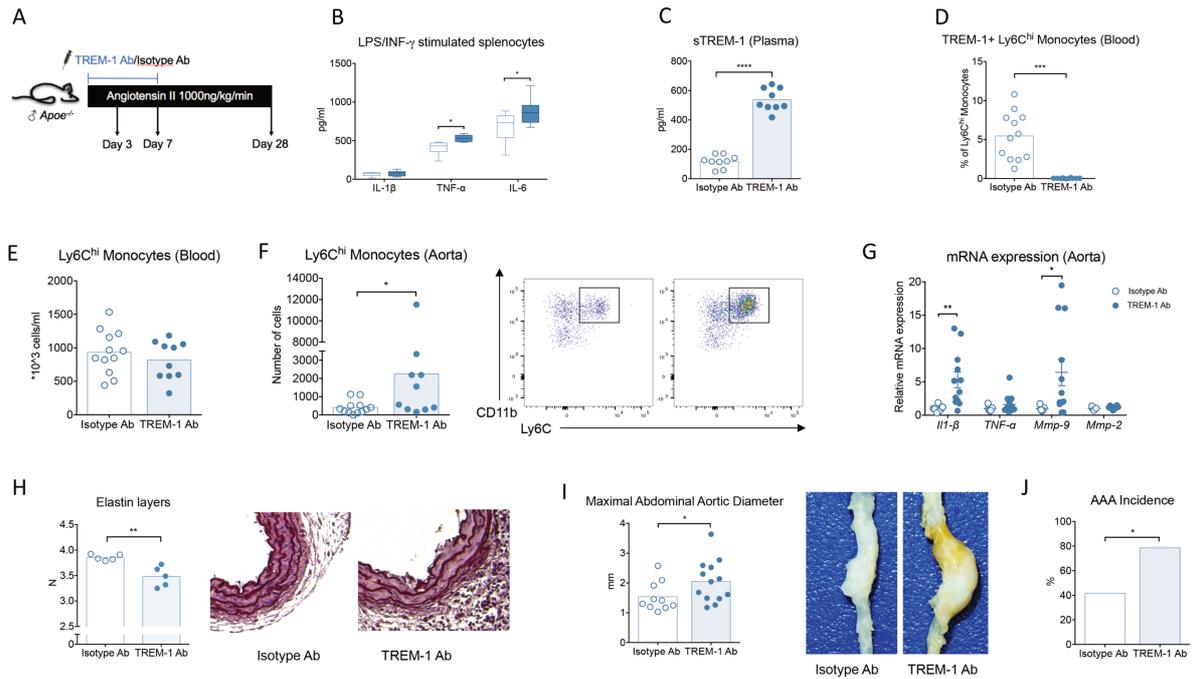
## Figures



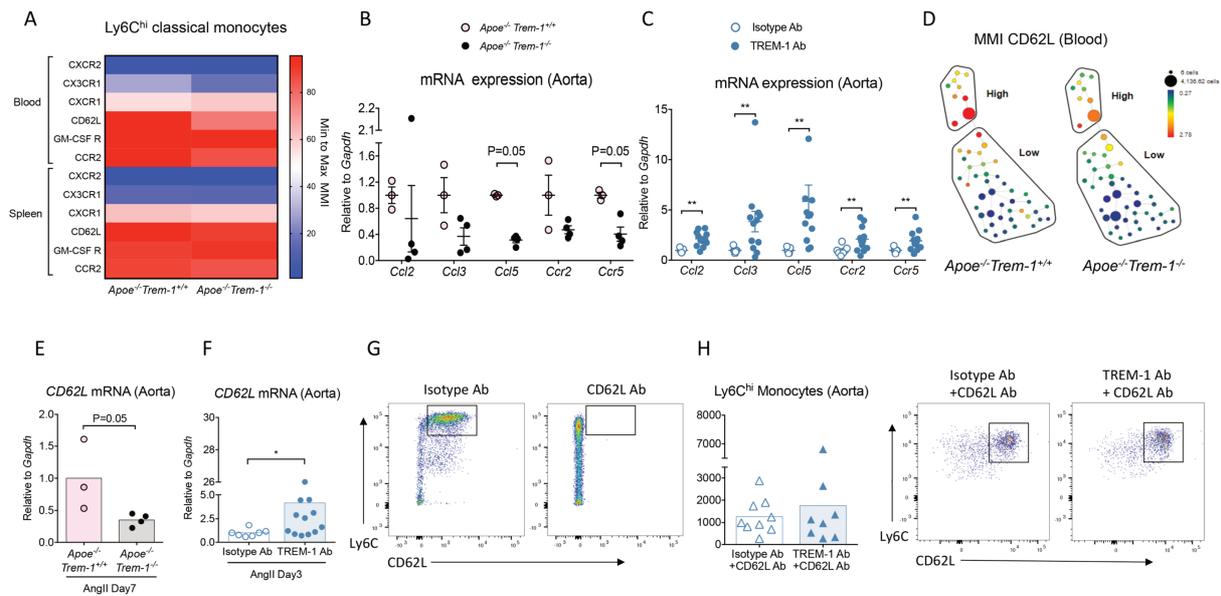
**Figure 1. Angiotensin II induces TREM-1 expression on Ly6C<sup>hi</sup> classical monocytes, and sTREM-1 release through AT<sub>1</sub>R signaling, in a TLR4-independent manner.** (A) C57BL/6J mice were implanted with subcutaneous osmotic minipumps infusing PBS or AngII (1000 ng/kg/min). Flow cytometry analysis of TREM-1 expression on circulating (B) CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> neutrophils and (C) CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup> classical monocytes, splenic (D) neutrophils and (E) Ly6C<sup>hi</sup> classical monocytes at day 1 and day 3 day after AngII infusion. (F) Quantification (ELISA) of plasma soluble TREM-1 at day 3 (N=5/group/time point). (G) *Tlr4*<sup>+/+</sup> and *Tlr4*<sup>-/-</sup> mice were implanted with subcutaneous osmotic minipumps infusing AngII (1000 ng/kg/min). (H) Flow cytometry analysis of membrane TREM-1 expression on Ly6C<sup>hi</sup> classical monocytes at day 3 and (I) quantification of plasma sTREM-1 by ELISA at day 3 (N=5 in *Tlr4*<sup>+/+</sup> group, N=6 in *Tlr4*<sup>-/-</sup> time point). (J) Flow cytometry analysis of TREM-1 expression on circulating Ly6C<sup>hi</sup> classical monocytes in AT<sub>1A</sub>MUT mice (N=7/group; \*P<0.05). (K) C57BL/6J mice were injected intraperitoneally 3 consecutive days with PBS, AT<sub>1</sub>R blocker (Losartan) or AT<sub>2</sub>R blocker (PD123,319) and implanted with subcutaneous osmotic minipumps infusing AngII (1000 ng/kg/min) during 3 days. (L) Variation of TREM-1 membrane expression before and 3 days after AngII infusion on Ly6C<sup>hi</sup> classical monocytes was quantified by flow cytometry (N=7 in PBS group, N=8 in AT<sub>1</sub>R blocker group, N=9 in AT<sub>2</sub>R blocker group/time point). (M) Flow cytometry analysis of the variation of TREM-1 expression on Ly6C<sup>hi</sup> classical monocytes before and 3 days after AngII infusion in *Atgr1a*<sup>+/+</sup> and *Atgr1a*<sup>-/-</sup> mice (N=6 in *Atgr1a*<sup>+/+</sup>, N=4 in *Atgr1a*<sup>-/-</sup> group/time point). [Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney test, \*P<0.05. \*\* P<0.01].



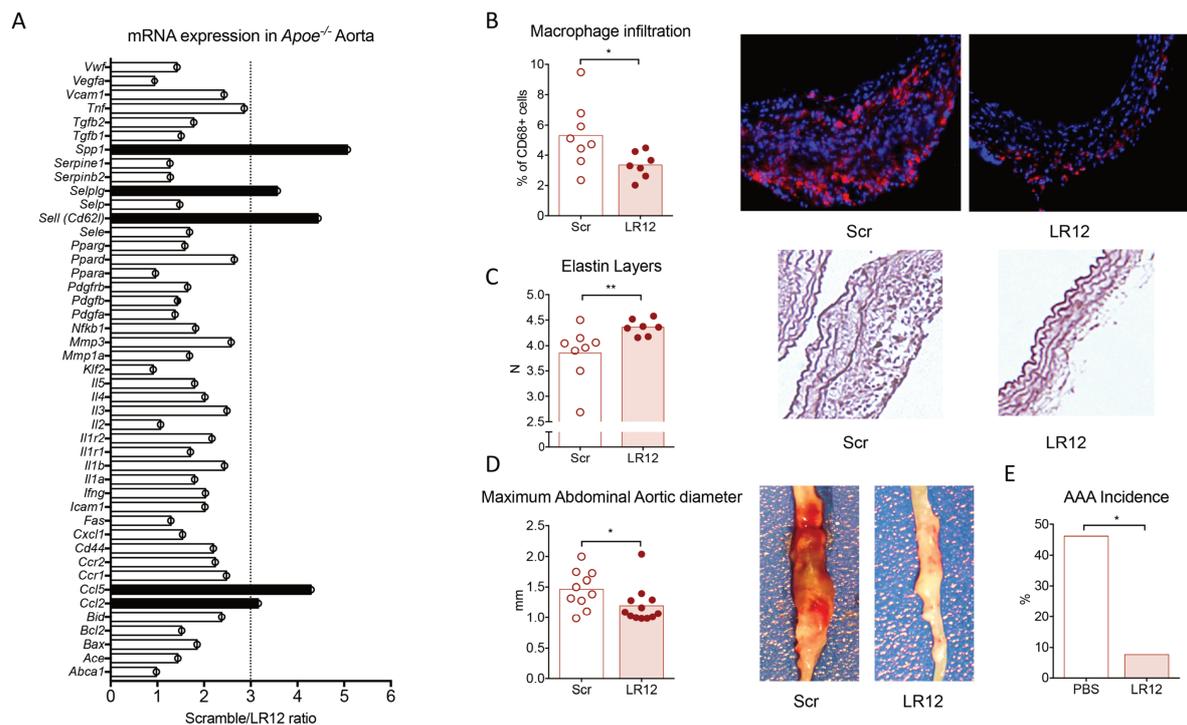
**Figure 2. TREM-1 genetic deletion reduces aneurysm development in Angiotensin II-induced AAA.** (A) Hypercholesterolemic *Apoe*<sup>-/-</sup> mice were implanted with subcutaneous osmotic minipumps infusing PBS (control group) or AngII (1000 ng/kg/min). Flow cytometry analysis of TREM-1 expression on circulating (B) CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> neutrophils and (C) CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>hi</sup> classical monocytes. (D) Kinetic of plasma soluble TREM-1 following AngII infusion (ELISA). (E) Quantification of *Trem-1* mRNA expression in the aorta at day 3 by RT-qPCR. (F) Immunofluorescence staining in the aortic wall of PBS (left) or AngII (right)-infused animals at day 3, DAPI (Blue), TREM-1 (Red) and CD68 (Green) (N=6 in PBS-infused group N=5 in AngII-infused group). (G) *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem*<sup>+/+</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem*<sup>-/-</sup> mice were implanted with subcutaneous osmotic minipumps infusing AngII (1000 ng/kg/min). (H) Flow cytometry quantification of circulating Ly6C<sup>hi</sup> classical monocytes at day 3 (N=8 in *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem*<sup>+/+</sup> group, N=7 in *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem*<sup>-/-</sup> group). (I) Flow cytometry quantification of Ly6C<sup>hi</sup> classical monocyte infiltration in the aortic wall at day 3 (N=5 in each group). (J) Quantification and representative photomicrographs of CD68 positive macrophages in the aorta at day 7 (N=7/group). (K) Quantification of *Il-1β*, *Tnf-α*, *Mmp-2* and *Mmp-9* mRNA expression in aorta at day 7 by RT-qPCR (N=3 in *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem*<sup>+/+</sup> group, N=4 in *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem*<sup>-/-</sup> group). (L) Fluorescent Molecular Tomography quantification of MMP (-2, -3, -9 and -13) activity in aorta at day 7 (N=4 in *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem*<sup>+/+</sup> group, N=3 in *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem*<sup>-/-</sup> group). (M) Quantification of the number of elastin layers in the aortic wall by orcein staining at day 7 (N=7/group). (N) Quantitative analysis and representative photomicrographs of the maximal aortic diameter at day 28 (N=11 in *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem*<sup>+/+</sup> group, N=9 in *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem*<sup>-/-</sup> group). [Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney test, \*P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\*P<0.001].



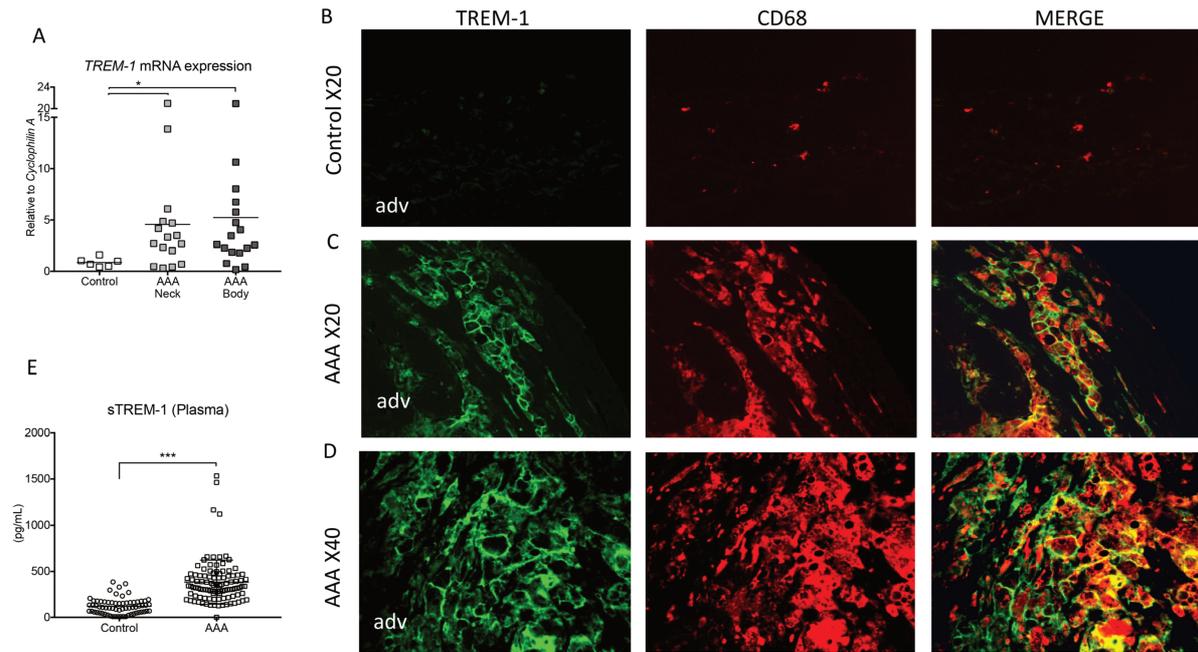
**Fig 3. TREM-1 pharmacologic stimulation worsens Angiotensin-II induced AAA.** (A) *ApoE*<sup>-/-</sup> mice were implanted with subcutaneous osmotic minipumps infusing AngII (1000 ng/kg/min), and were injected intraperitoneally with an agonist TREM-1 monoclonal antibody (TREM-1 Ab) or an isotype control (Isotype Ab) (200μg/kg/d), every day during 3 or 7 days. (B) Quantification of IL-1β, TNF-α and IL-6 production (ELISA) by LPS/IFN-γ stimulated splenocytes and (C) quantification of sTREM-1 plasma levels at day 3 following AngII infusion and TREM-1 Ab or Isotype Ab treatment (N=9 in each group). Flow cytometry quantification of (D) TREM-1 expressing Ly6C<sup>hi</sup> classical monocytes, Ly6C<sup>hi</sup> classical monocyte number (E) in the blood and (F) into the aortic wall (N=12 in the Isotype Ab group and N=10 in the TREM-1 Ab group). (G) Quantification of *Il-1β*, *Tnf-α*, *Mmp-2* and *Mmp-9* mRNA expression in aorta at day 7 by RT-qPCR (N=7 in the Isotype Ab group, N=12 in TREM-1 Ab group). (H) Quantification of the number of elastin layers in the aortic wall after Orcein staining at day 7 (N=5 in each group). (I) Quantitative analysis and representative photomicrographs of the maximal abdominal aortic diameter at day 28 (N=10 in the Isotype Ab group, N=13 in TREM-1 Ab group). (J) AAA incidence at day 28 [Mann-Whitney test, Fisher's test, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001\*\*\*\*P<0.0001].



**Figure 4. TREM-1 modulates Ly6C<sup>hi</sup> classical monocyte trafficking and recruitment in the aortic wall following AngII stimulation via CD62L.** (A) Heatmap representation of chemokine receptors and adhesion molecules expression by classical monocytes in the blood and in the spleen (expressed as Mean Metal Intensity (MMI) measured by mass cytometry at 1 day after AngII infusion in *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem-1*<sup>+/+</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem-1*<sup>-/-</sup> mice (N=4 in each group). (B) Quantification of *Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl5*, *Ccr2*, *Ccr5* mRNA expression in aortas of AngII-infused *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem-1*<sup>+/+</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem-1*<sup>-/-</sup> at day 7 by RT-qPCR (N=3 in *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem*<sup>+/+</sup> group, N=4 in *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem*<sup>-/-</sup> group). (C) Quantification of *Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl5*, *Ccr2*, *Ccr5* mRNA expression in aorta of isotype-treated or mAb TREM-1-treated *Apoe*<sup>-/-</sup> at day 7 after AngII infusion by RT-qPCR (N=7 in the Isotype Ab group, N=12 in TREM-1 Ab group). (D) SPADE tree plots of CD62L expression on classical Ly6C<sup>hi</sup> monocytes (High) and Ly6C<sup>lo</sup> monocytes (Low) in *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem-1*<sup>+/+</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem-1*<sup>-/-</sup> after 1 day of AngII infusion. Each node represents a cluster of cells sharing common surface markers, the size of the node is related to the number of cells forming the cluster and node color is scaled to the median intensity of CD62L expression within each node. (E) Quantification of *CD62l* mRNA expression by RT-qPCR in the aorta of *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem-1*<sup>+/+</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem-1*<sup>-/-</sup> mice, 7 days after AngII infusion (N=3 in *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem*<sup>+/+</sup> group, N=4 in *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem*<sup>-/-</sup> group). (F) Quantification of *CD62l* mRNA expression by RT-qPCR in the aorta of mAb TREM-1-treated or Isotype-treated *Apoe*<sup>-/-</sup> mice after 3 days of AngII infusion (N=7 in Isotype Ab group, N=12 in TREM-1 Ab group). (G to I) *Apoe*<sup>-/-</sup> mice were implanted with subcutaneous osmotic minipumps releasing AngII (1000 ng/kg/min) and were treated i.v. with a neutralizing anti-CD62L antibody (CD62L Ab, 100µg/mice/d) during the first 2 days. *Apoe*<sup>-/-</sup> mice received intraperitoneal injection of either an anti-TREM-1 agonistic antibody (TREM-1 Ab) or an isotype control (Isotype Ab) for 3 days. (G) CD62L blockade was confirmed on Ly6C<sup>hi</sup> classical monocytes in the blood. (H) Quantification and representative dot plot of Ly6C<sup>hi</sup> classical monocyte infiltration in the aorta by flow cytometry after 3 days of AngII infusion (N=9 in the Isotype Ab group, N=8 in group). [Mann-Whitney test, \*P<0.05. \*\* P<0.01].

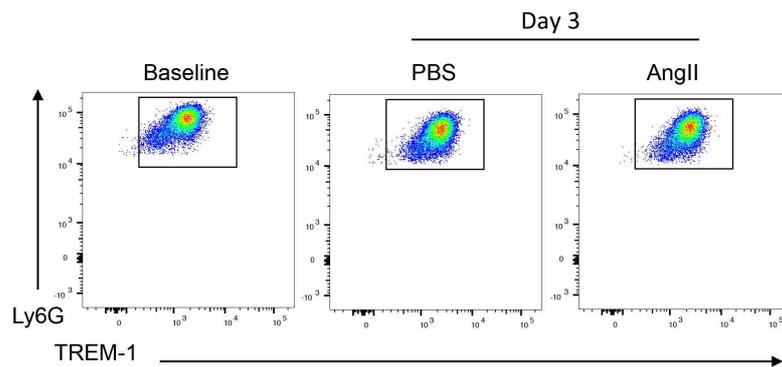


**Fig 5. TREM-1 pharmacologic inhibition protects against experimental AAA.** (A) *Apoe*<sup>-/-</sup> mice under a chow diet were treated intraperitoneally with a TREM-1 inhibitory peptide (LR12), or a control scramble peptide (Scramble) (150 µg/mice/d) for 7 days. MicroArray gene analysis was performed in the whole aorta and LR12-induced gene expression modulation was expressed as Scramble/LR12 ratio. Black bars identified genes whose expression was statistically different between Scramble and LR12-treated mice with a ratio >3. (B to D) *Apoe*<sup>-/-</sup> mice were implanted with subcutaneous osmotic minipumps releasing AngII (1000 ng/kg/min) and treated intraperitoneally with TREM-1 inhibitory peptide (LR12, 150 µg/mice/d) or an inactive scramble peptide (Scr, 150 µg/mice/d) for 7 days (B) Quantification and representative photomicrographs of CD68 positive macrophages in the aorta and (C) histologic quantification of the number of elastin layers in the aortic wall by orcein staining (N=8 in the scramble-treated group, N=7 in the LR12-treated group). (D) Quantitative analysis and representative photomicrographs of the maximal aortic diameter (N=10 in the scramble-treated group, N=12 in the LR12-treated group). (E) AAA incidence. [Mann-Whitney test, Fisher's test, \*P<0.05, \*\* P<0.01].

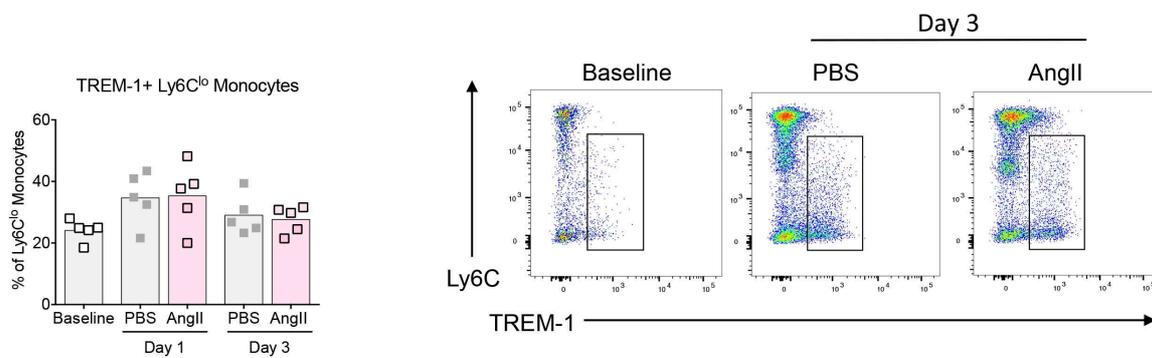


**Figure 6. TREM-1 expression in human AAA.** (A) *TREM-1* mRNA expression was quantified in normal aorta (from organ donors) and in AAA (neck and body) by RT-qPCR. *TREM-1* mRNA expression was significantly higher in AAA tissues than in normal aorta tissue. (B) Immunofluorescent staining confirmed that TREM-1 is not expressed in normal aorta (C-D) but is strongly expressed in AAA tissues and localizes with CD68+ macrophages. (E) Soluble TREM-1 levels were quantified by ELISA in the plasma of healthy volunteers or AAA patients by ELISA. [Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney test, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ ].

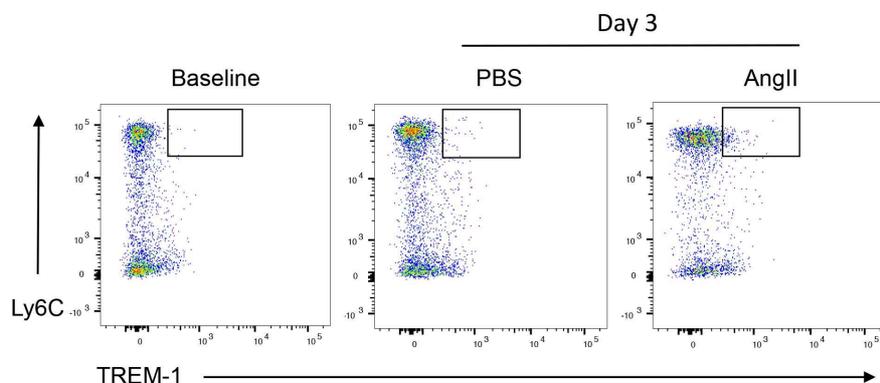
## Supplemental Figures



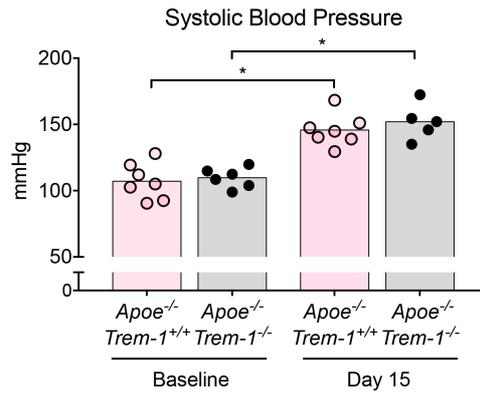
**Supplemental Fig1.** Flow cytometry analysis of TREM-1 expression on circulating CD11b+Ly6G+ neutrophils at baseline and 3 days after PBS or AngII infusion in C57BL/6J mice.



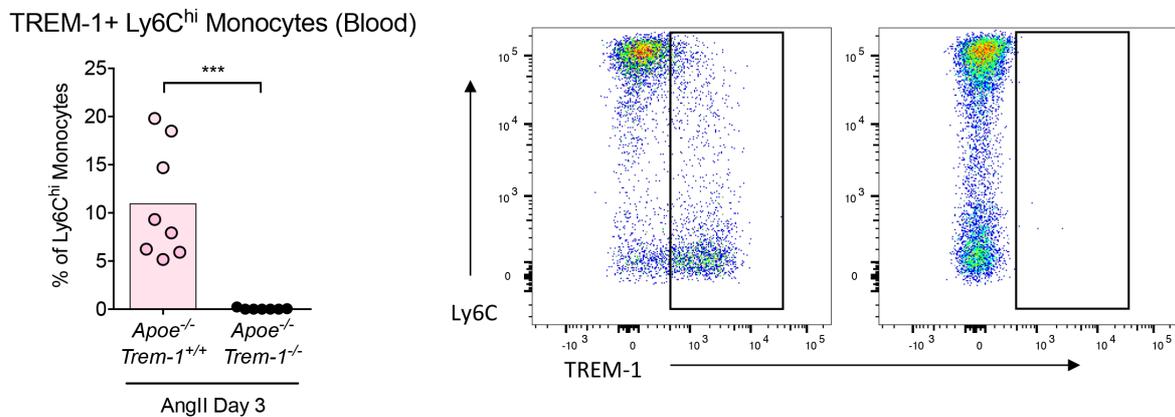
**Supplemental Fig2.** Flow cytometry analysis of TREM-1 expression on CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>low</sup> non-classical monocytes at baseline and after PBS (grey) or AngII infusion (pink) in the blood of C57BL/6J mice.



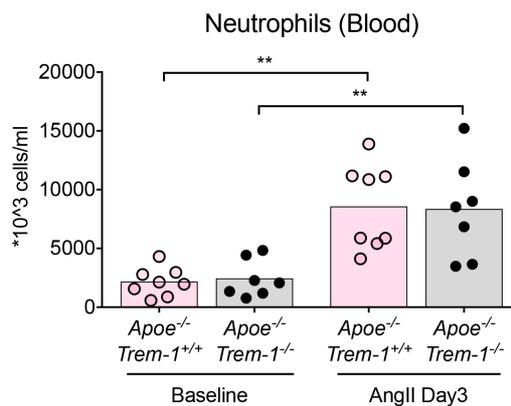
**Supplemental Fig3.** Flow cytometry analysis of TREM-1 expression on CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>high</sup> classical monocytes at baseline and at day 3 day after PBS or AngII infusion in the spleen of C57BL/6J mice.



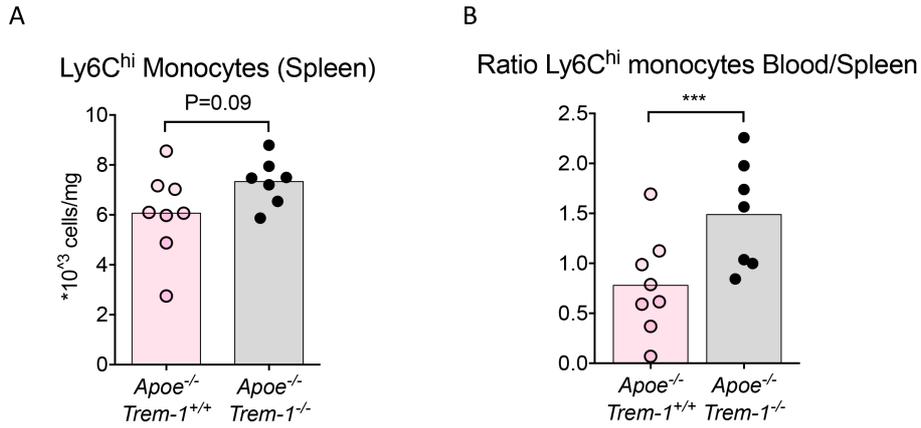
**Supplemental Fig4.** Systolic blood pressure of *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem-1*<sup>+/+</sup> (pink) and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem-1*<sup>-/-</sup> mice (black) at baseline and after AngII infusion (1 μg/kg/min). \*P<0.05



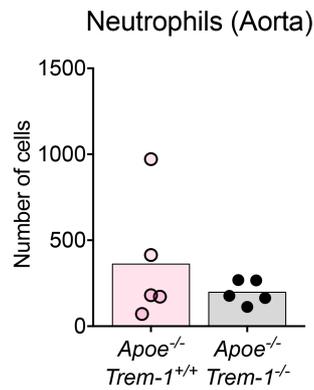
**Supplemental Fig5.** TREM-1 expression on circulating CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>high</sup> classical monocytes of *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem-1*<sup>+/+</sup> (pink) and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem-1*<sup>-/-</sup> mice (black) at day 3 after AngII infusion. \*\*\*P<0.001



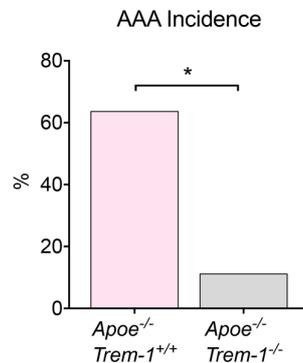
**Supplemental Fig6.** Neutrophil count in the blood of *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem-1*<sup>+/+</sup> (pink) and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem-1*<sup>-/-</sup> mice (black) at baseline and after AngII infusion. \*\*P<0.01



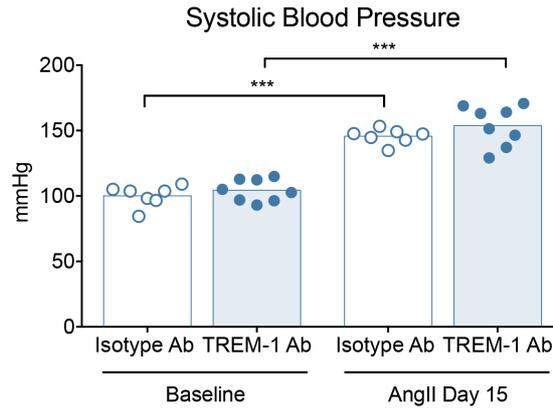
**Supplemental Fig7.** (A) CD11b+Ly6G-Ly6C<sup>high</sup> monocyte count in the spleen of *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem-1*<sup>+/+</sup> (Pink) and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem-1*<sup>-/-</sup> mice (grey) at day 3 after AngII infusion. (B) Ratio between Ly6C<sup>high</sup> monocyte count in the blood and in the spleen in *Apoe*<sup>-/-</sup>/*Trem-1*<sup>+/+</sup> (pink) and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem-1*<sup>-/-</sup> mice (black). \*\*\*P<0.001



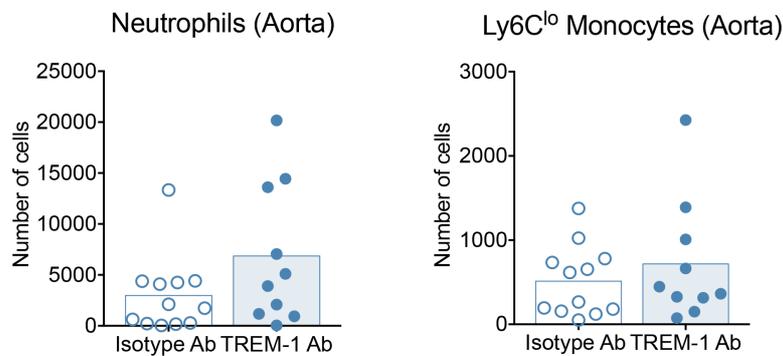
**Supplemental Fig8.** CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> neutrophil count in aorta of *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem-1*<sup>+/+</sup> (pink) and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem-1*<sup>-/-</sup> mice (black) at day 3 after AngII infusion.



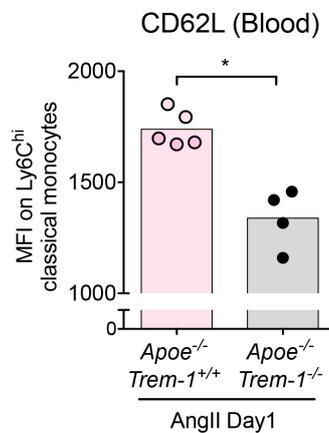
**Supplemental Fig9.** AAA incidence at day 28 after AngII infusion in *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem-1*<sup>+/+</sup> (pink) and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Trem-1*<sup>-/-</sup> mice (black). \*P<0.05, Fisher's test.



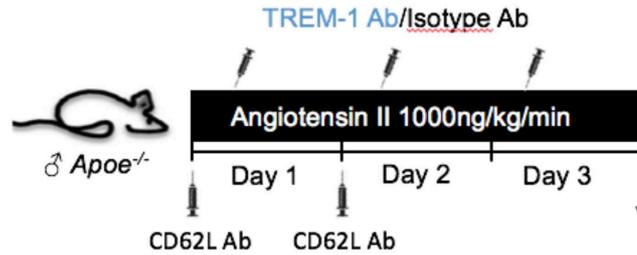
**Supplemental Fig10.** Systolic blood pressure of Isotype-treated (clear blue square) and Ab TREM-1 Ab-treated (solid blue square) *Apoe*<sup>-/-</sup> mice, 15 days after AngII infusion (1μg/kg/min), \*\*\*P<0.001.



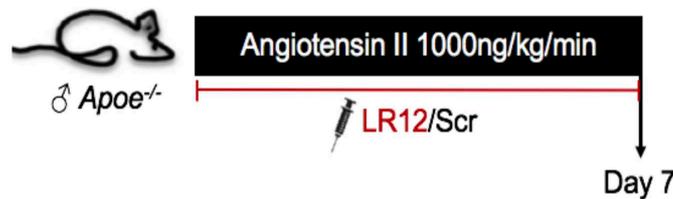
**Supplemental Fig11.** *Apoe*<sup>-/-</sup> mice were implanted with subcutaneous osmotic minipumps infusing AngII (1000 ng/kg/min), and were injected intraperitoneally with an agonist TREM-1 monoclonal antibody (TREM-1 Ab) or an isotype control (Isotype Ab) (200 μg/kg/d), every day for 3 days. Flow cytometry quantification of CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> neutrophils and CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>low</sup> non-classical monocytes into the aortic wall at day 3 after AngII infusion.



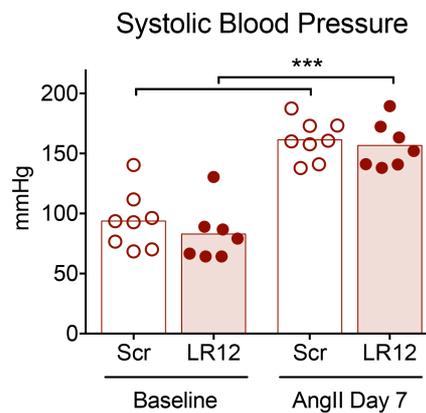
**Supplemental Fig12.** Quantification of CD62L expression on circulating Ly6C<sup>hi</sup> classical monocytes by flow cytometry 1 day after AngII infusion, \*P<0.05.



**Supplemental Fig13.** *Apoe*<sup>-/-</sup> mice were implanted with subcutaneous osmotic minipumps infusing AngII (1000 ng/kg/min) and were treated with either an anti-TREM-1 agonistic antibody (TREM-1 Ab) or an isotype control (Isotype Ab) every day during 3 days. In addition, animals received neutralizing anti-CD62L antibody IV (100µg/mice/d) at day 0 and Day 1.



**Supplemental Fig14.** *Apoe*<sup>-/-</sup> mice were implanted with subcutaneous osmotic minipumps infusing AngII (1000 ng/kg/min), and were injected intraperitoneally with a TREM-1 inhibitory peptide (LR12), or a scramble peptide (Scr) 150 µg/mice/d during 7 days.



**Supplemental Fig15.** Systolic blood pressure of Scramble-treated or LR-12-treated *Apoe*<sup>-/-</sup> mice at baseline and after AngII infusion (1µg/kg/min), \*\*\*P<0.001

	Controls N=69	AAA patients N =104
Age (mean $\pm$ sd)	38 $\pm$ 17	73 $\pm$ 8
Male gender (n, %)	36 (52)	94 (90)
BMI>27 (n, %)	12 (17)	28 (27)
Hypertension (n, %)	1 (2)	61 (60)
Hypercholesterolemia (n, %)	2 (3)	39 (38)
Smoker (n, %)	23 (33)	79 (76)
Diabetes (n, %)	1 (2)	21 (20)

**Supplemental Table 1.**

## References

1. Nordon IM, Hinchliffe RJ, Loftus IM, and Thompson MM. Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol.* 2011;8(2):92-102.
2. Davis FM, Rateri DL, and Daugherty A. Abdominal aortic aneurysm: novel mechanisms and therapies. *Curr Opin Cardiol.* 2015;30(6):566-73.
3. Mellak S, Ait-Oufella H, Esposito B, Loyer X, Poirier M, Tedder TF, et al. Angiotensin II mobilizes spleen monocytes to promote the development of abdominal aortic aneurysm in Apoe<sup>-/-</sup> mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(2):378-88.
4. Ye P, Chen W, Wu J, Huang X, Li J, Wang S, et al. GM-CSF contributes to aortic aneurysms resulting from SMAD3 deficiency. *J Clin Invest.* 2013;123(5):2317-31.
5. Iida Y, Xu B, Xuan H, Glover KJ, Tanaka H, Hu X, et al. Peptide inhibitor of CXCL4-CCL5 heterodimer formation, MKEY, inhibits experimental aortic aneurysm initiation and progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(4):718-26.
6. 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.
7. Bouchon A, Dietrich J, and Colonna M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J Immunol.* 2000;164(10):4991-5.
8. Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, and Colonna M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature.* 2001;410(6832):1103-7.
9. Tamaro A, Derive M, Gibot S, Leemans JC, Florquin S, and Dessing MC. TREM-1 and its potential ligands in non-infectious diseases: from biology to clinical perspectives. *Pharmacol Ther.* 2017;177:81-95.
10. Ford JW, and McVicar DW. TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease. *Curr Opin Immunol.* 2009;21(1):38-46.
11. Klesney-Tait J, Keck K, Li X, Gilfillan S, Otero K, Baruah S, et al. Transepithelial migration of neutrophils into the lung requires TREM-1. *J Clin Invest.* 2013;123(1):138-49.
12. Boufenzler A, Lemarie J, Simon T, Derive M, Bouazza Y, Tran N, et al. TREM-1 Mediates Inflammatory Injury and Cardiac Remodeling Following Myocardial Infarction. *Circ Res.* 2015;116(11):1772-82.
13. Derive M, Bouazza Y, Sennoun N, Marchionni S, Quigley L, Washington V, et al. Soluble TREM-like transcript-1 regulates leukocyte activation and controls microbial sepsis. *J Immunol.* 2012;188(11):5585-92.
14. Derive M, Boufenzler A, Bouazza Y, Groubatch F, Alauzet C, Barraud D, et al. Effects of a TREM-like transcript 1-derived peptide during hypodynamic septic shock in pigs. *Shock.* 2013;39(2):176-82.
15. Derive M, Boufenzler A, and Gibot S. Attenuation of responses to endotoxin by the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 inhibitor LR12 in nonhuman primate. *Anesthesiology.* 2014;120(4):935-42.
16. Lareyre F, Moratal C, Chikande J, Jean-Baptiste E, Hassen-Khodja R, Neels J, et al. Investigation of Plasma Inflammatory Profile in Diabetic Patients With

- Abdominal Aortic Aneurysm: A Pilot Study. *Vasc Endovascular Surg*. 2018;52(8):597-601.
17. Lareyre F, Moratal C, Zereg E, Carboni J, Panaia-Ferrari P, Bayer P, et al. Association of abdominal aortic aneurysm diameter with insulin resistance index. *Biochem Med (Zagreb)*. 2018;28(3):030702.
  18. Joffre J, Potteaux S, Zeboudj L, Loyer X, Boufenzer A, Laurans L, et al. Genetic and Pharmacological Inhibition of TREM-1 Limits the Development of Experimental Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2016;68(25):2776-93.
  19. Billet S, Bardin S, Verp S, Baudrie V, Michaud A, Conchon S, et al. Gain-of-function mutant of angiotensin II receptor, type 1A, causes hypertension and cardiovascular fibrosis in mice. *J Clin Invest*. 2007;117(7):1914-25.
  20. Ponnuswamy P, Joffre J, Herbin O, Esposito B, Laurans L, Binder CJ, et al. Angiotensin II synergizes with BAFF to promote atheroprotective regulatory B cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):4111.
  21. Kolachala VL, Palle S, Shen M, Feng A, Shayakhmetov D, and Gupta NA. Loss of L-selectin-guided CD8(+) , but not CD4(+) , cells protects against ischemia reperfusion injury in a steatotic liver. *Hepatology*. 2017;66(4):1258-74.
  22. Daugherty A, Manning MW, and Cassis LA. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest*. 2000;105(11):1605-12.
  23. Zanzinger K, Schellack C, Nausch N, and Cerwenka A. Regulation of triggering receptor expressed on myeloid cells 1 expression on mouse inflammatory monocytes. *Immunology*. 2009;128(2):185-95.
  24. Dower K, Ellis DK, Saraf K, Jelinsky SA, and Lin LL. Innate immune responses to TREM-1 activation: overlap, divergence, and positive and negative cross-talk with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol*. 2008;180(5):3520-34.
  25. Gomez-Pina V, Soares-Schanoski A, Rodriguez-Rojas A, Del Fresno C, Garcia F, Vallejo-Cremades MT, et al. Metalloproteinases shed TREM-1 ectodomain from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. *J Immunol*. 2007;179(6):4065-73.
  26. Gibot S, Kolopp-Sarda MN, Bene MC, Bollaert PE, Lozniewski A, Mory F, et al. A soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 modulates the inflammatory response in murine sepsis. *J Exp Med*. 2004;200(11):1419-26.
  27. Malekzadeh S, Fraga-Silva RA, Trachet B, Montecucco F, Mach F, and Stergiopoulos N. Role of the renin-angiotensin system on abdominal aortic aneurysms. *Eur J Clin Invest*. 2013;43(12):1328-38.
  28. Daugherty A, and Cassis LA. Mouse models of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(3):429-34.
  29. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*. 2009;325(5940):612-6.
  30. Mikolajczyk TP, Nosalski R, Szczepaniak P, Budzyn K, Osmenda G, Skiba D, et al. Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T-cell accumulation, and vascular dysfunction in hypertension. *FASEB J*. 2016;30(5):1987-99.
  31. Aldasoro Arguinano AA, Dade S, Stathopoulou M, Derive M, Coumba Ndiaye N, Xie T, et al. TREM-1 SNP rs2234246 regulates TREM-1 protein and mRNA levels and is associated with plasma levels of L-selectin. *PLoS One*. 2017;12(8):e0182226.

32. Johnston WF, Salmon M, Pope NH, Meher A, Su G, Stone ML, et al. Inhibition of interleukin-1beta decreases aneurysm formation and progression in a novel model of thoracic aortic aneurysms. *Circulation*. 2014;130(11 Suppl 1):S51-9.
33. Xiong W, MacTaggart J, Knispel R, Worth J, Persidsky Y, and Baxter BT. Blocking TNF-alpha attenuates aneurysm formation in a murine model. *J Immunol*. 2009;183(4):2741-6.
34. Freestone T, Turner RJ, Coady A, Higman DJ, Greenhalgh RM, and Powell JT. Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 1995;15:1145-51.
35. Eagleton MJ, Ballard N, Lynch E, Srivastava SD, Upchurch GR, Jr., and Stanley JC. Early increased MT1-MMP expression and late MMP-2 and MMP-9 activity during Angiotensin II induced aneurysm formation. *J Surg Res*. 2006;135(2):345-51.
36. Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, and Baxter BT. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest*. 2002;110(5):625-32.
37. Wang Y, Ait-Oufella H, Herbin O, Bonnin P, Ramkhalawon 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.
38. Curci JA, Liao S, Huffman MD, Shapiro SD, and Thompson RW. Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest*. 1998;102(11):1900-10.
39. Newby AC. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(12):2108-14.
40. Newby AC. Metalloproteinases promote plaque rupture and myocardial infarction: A persuasive concept waiting for clinical translation. *Matrix Biol*. 2015;44-46:157-66.
41. Gibot S. Clinical review: role of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 during sepsis. *Crit Care*. 2005;9(5):485-9.
42. Wang YS, Li XJ, and Zhao WO. TREM-1 is a positive regulator of TNF-alpha and IL-8 production in U937 foam cells. *Bosn J Basic Med Sci*. 2012;12(2):94-101.
43. Lo TH, Tseng KY, Tsao WS, Yang CY, Hsieh SL, Chiu AW, et al. TREM-1 regulates macrophage polarization in ureteral obstruction. *Kidney Int*. 2014;86(6):1174-86.
44. Wang YD, Liu ZJ, Ren J, and Xiang MX. Pharmacological Therapy of Abdominal Aortic Aneurysm: An Update. *Curr Vasc Pharmacol*. 2018;16(2):114-24.
45. Li H, Bai S, Ao Q, Wang X, Tian X, Li X, et al. Modulation of Immune-Inflammatory Responses in Abdominal Aortic Aneurysm: Emerging Molecular Targets. *J Immunol Res*. 2018;2018:7213760.
46. Cuvier V, Lorch U, Witte S, Olivier A, Gibot S, Delor I, et al. A first-in-man safety and pharmacokinetics study of nangibotide, a new modulator of innate immune response through TREM-1 receptor inhibition. *Br J Clin Pharmacol*. 2018;84(10):2270-9.

## IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

S'appuyant sur différents modèles expérimentaux perte- et gain-de-fonction, ce travail de thèse identifie TREM-1 comme un acteur important du trafic monocyttaire en réponse à l'angiotensine II (AngII) dans un modèle expérimental d'anévrisme de l'aorte abdominale. TREM-1 est un récepteur de l'immunité innée, majoritairement exprimé par les neutrophiles et les monocytes/macrophages, qui participe à l'amplification de la réponse inflammatoire en synergie avec la stimulation de la voie des TLRs. TREM-1 a été impliqué dans la physiopathologie de maladies cardiovasculaires aiguës et chroniques, comme l'infarctus du myocarde et l'athérosclérose.

Nous avons mis en évidence pour la première fois une relation entre l'activation de la signalisation en aval de l'AngII *via* la stimulation de son principal récepteur, AT<sub>1</sub>R, et l'engagement de la voie TREM-1. Le système rénine-angiotensine, à travers l'action de son principal effecteur, l'AngII, est un acteur important de la physiopathologie des maladies cardiovasculaires, et de l'AAA en particulier. En effet, son inhibition est une des stratégies thérapeutiques les plus évaluées à ce jour dans le but de limiter le développement des petits anévrismes ou de réduire le risque de rupture des anévrismes à des stades plus avancés chez l'homme<sup>106,108,110</sup>. L'infusion d'AngII entraîne le développement d'AAA chez la souris hypercholestérolémique *ApoE*<sup>-/-</sup> sur une période de 28 jours, et constitue aujourd'hui un modèle expérimental d'induction d'anévrisme largement reconnu et utilisé<sup>160</sup>. De plus, l'inhibition pharmacologique d'AT<sub>1</sub>R a montré des effets protecteurs sur le développement de l'AAA dans plusieurs modèles expérimentaux d'anévrisme, induits ou non par l'AngII, suggérant un rôle de l'AngII endogène dans le développement de l'AAA<sup>178,495</sup>.

Il a été montré que l'expression de TREM-1 peut être fortement induite, rapidement et transitoirement, en cas d'inflammation stérile ou septique par différents types cellulaires<sup>440,465,487</sup>. La libération du sTREM-1 dans le milieu est considérée comme un reflet de l'état d'activation du récepteur, et est augmentée dans le sepsis et après un infarctus du myocarde chez l'homme et chez la souris<sup>453,465,467</sup>. Alors que TREM-1 est exprimé de façon constitutive à la surface de la totalité des neutrophiles, et d'environ 30% des monocytes non classiques Ly6C<sup>lo</sup>, moins de 1% des monocytes classiques Ly6C<sup>hi</sup> expriment TREM-1 en conditions basales. Dans notre étude, l'infusion d'AngII induit l'expression de TREM-1 de façon significative sur les monocytes classiques Ly6C<sup>hi</sup> après 3 jours dans le sang et dans la

rate, ainsi qu'une augmentation de sa forme soluble, sTREM-1, dans le plasma, chez la souris C57BL/6J normocholestérolémique et chez la souris *ApoE*<sup>-/-</sup> hypercholestérolémique jusqu'au 14<sup>ème</sup> jour d'infusion d'AngII. Il est fort probable que l'augmentation d'expression de TREM-1 à J1 dans le groupe contrôle recevant du PBS soit due à la proximité du geste chirurgical, l'effet n'étant plus visible après 3 jours, contrairement au groupe infusé à l'AngII dans lequel l'effet est maintenu. A l'aide de modèles gain- et perte- de fonction, nous avons montré que l'augmentation de l'expression de TREM-1 sur les monocytes classiques en réponse à l'AngII est médiée par la stimulation d'AT<sub>1</sub>R, et que cette augmentation est en partie indépendante de TLR4, puisque l'expression de TREM-1 augmente également chez les souris *Tlr4*<sup>-/-</sup> en réponse à l'AngII. L'expression de TREM-1 est indétectable dans l'aorte saine, mais est induite au niveau génique et protéique après 3 jours d'infusion d'AngII, où elle colocalise avec l'expression du marqueur macrophagique CD68. Il serait intéressant de confirmer *in vitro* les données obtenues *in vivo* sur la relation entre stimulation d'AT<sub>1</sub>R et activation de la voie TREM-1, et de pouvoir identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'interaction entre ces voies chez les monocytes en réponse à l'AngII.

Suite à la mise en évidence d'une relation étroite entre une dérégulation du système rénine angiotensine et l'activation de la voie TREM-1, nous nous sommes demandé si TREM-1 pouvait être impliqué dans la physiopathologie de l'AAA. Nous avons donc étudié l'effet de la déficience génétique en *Trem-1* sur les événements précoces et tardifs associés au développement de l'AAA, dans un modèle expérimental induit par l'AngII. De précédentes études ont montré que l'AngII déclenche une mobilisation rapide des monocytes classiques dans le sang à partir de la rate, et que cette monocytose précoce est prédictive de la survenue d'un AAA à 28 jours<sup>217,383</sup>. Dans notre étude, la déficience en *Trem-1* abolit la monocytose précoce induite par l'AngII, limite de façon importante l'infiltration des monocytes/macrophages et la dégradation du réseau élastique de la *media*. Finalement, la déficience en *Trem-1* est associée à une diminution de l'incidence et de la sévérité de la maladie anévrismale aortique. Ces données suggèrent un rôle important de TREM-1 dans la modulation du trafic monocytaire en réponse à l'AngII.

Les mécanismes responsables de la mobilisation des monocytes à partir de la rate en réponse à l'AngII sont encore incomplètement compris. L'analyse de l'expression de récepteurs de chimiokines sur les monocytes circulants et dans la paroi aortique a révélé une légère diminution de l'expression de CCR2 et CX3CR1 à la membrane des monocytes classiques Ly6C<sup>hi</sup> des souris déficientes pour *Trem-1* un jour après infusion d'AngII dans le sang et dans

la rate, en comparaison avec le groupe contrôle. Cependant, nous pensons que l'effet modeste de la modulation TREM-1 sur l'expression de l'axe CCR2/CCL2 dans le sang, la rate et l'aorte, peut difficilement expliquer à lui seul l'effet majeur observé sur la mobilisation des monocytes, et donc que d'autres acteurs participent à la mobilisation des monocytes classique médiée par TREM-1 en réponse à l'AngII. De plus, une étude a montré que la déficience en *Ccr2* n'affecte pas la mobilisation monocyttaire à partir de la rate en réponse à un signal inflammatoire aigu<sup>383</sup>. Une étude récente a montré une augmentation de l'expression des récepteurs au CCL5, ou RANTES, dans la paroi aortique en réponse à l'AngII, et un défaut de mobilisation des leucocytes chez la souris déficiente en *Ccl5*<sup>496</sup>. De plus, le blocage pharmacologique de CCR5 limite le développement de l'AAA et ses complications chez la souris<sup>400</sup>. Nous avons montré que la déficience en *Trem-1* chez la souris *ApoE*<sup>-/-</sup> sous AngII est associée à une diminution importante de l'expression génique de *Ccl5* et de *Ccr5*, et qu'à l'inverse, la stimulation pharmacologique de TREM-1 augmente leur expression dans la paroi aortique. Ces données suggèrent que TREM-1 pourrait promouvoir la mobilisation monocyttaire par la stimulation de l'axe CCL5-CCR5 dans le contexte de l'AAA.

Afin de confirmer le rôle pathogène de TREM-1 dans le développement de l'AAA, nous avons utilisé un modèle gain-de-fonction, dans lequel la voie TREM-1 est stimulée par l'administration d'un anticorps agoniste du récepteur (TREM-1 Ab). En effet, 3 jours après le début de l'infusion d'AngII et de l'anticorps stimulant, le taux de sTREM-1 plasmatique est dramatiquement augmenté par rapport au groupe contrôle injecté avec un isotype, et la production des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ , connues pour être fortement régulées par l'activation de TREM-1, par les splénocytes stimulés *ex-vivo* est également augmentée. Malgré un effet aggravant de la stimulation de TREM-1 sur le remodelage matriciel et sur l'incidence et la sévérité de l'AAA à 28 jours, nous n'avons pas observé d'augmentation du taux de monocytes classiques circulants dans le groupe stimulé après 3 jours d'AngII. En revanche, le nombre de monocytes classiques dans la paroi aortique est déjà augmenté après 3 jours de stimulation de la voie TREM-1 par rapport au groupe contrôle, suggérant qu'en plus de moduler la mobilisation des monocytes à partir de la rate, TREM-1 pourrait également favoriser l'entrée des monocytes dans la paroi aortique. L'analyse par cytométrie de masse de l'expression des récepteurs de chimiokines et des molécules d'adhésion révèle que CD62L, ou L-sélectine, est le marqueur membranaire le plus affecté par la déficience en *Trem-1* sur les monocytes classiques Ly6C<sup>hi</sup> après un jour d'infusion d'AngII. L'expression génique de *Cd62l* (ou *Sell*) est également affectée par la modulation de TREM-1 dans la paroi aortique, avec une

diminution chez la souris déficiente *ApoE<sup>-/-</sup>Trem-1<sup>-/-</sup>* et une augmentation chez la souris traitée par l'anticorps agoniste TREM-1 Ab. *Cd62l* ou *Sell* est un des gènes dont l'expression est la plus diminuée dans la paroi aortique après traitement de souris *ApoE<sup>-/-</sup>* par le LR12, l'inhibiteur pharmacologique de TREM-1. La L-sélectine est exprimée par l'ensemble des leucocytes et joue un rôle important dans l'adhésion des monocytes à l'endothélium lors du recrutement tissulaire en conditions inflammatoires, et la souris hypercholestérolémique déficiente pour la L-sélectine (*Sell<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>*) est protégée contre le développement de l'AAA<sup>410</sup>. Ces données suggèrent que TREM-1 pourrait également être impliqué dans le recrutement pariétal des monocytes en réponse à l'AngII *via* la modulation de l'activité de la L-sélectine et de l'adhésion des monocytes à l'endothélium. En effet, le blocage de la L-sélectine par administration d'un anticorps monoclonal anti-CD62L abolit l'augmentation d'infiltration des monocytes classiques Ly6C<sup>hi</sup> dans la paroi aortique induite par la stimulation de la voie TREM-1 chez les souris traitées par l'anticorps agoniste TREM-1 Ab. L'hypothèse de l'implication de TREM-1 dans l'adhésion à l'endothélium, soutenue par les données d'une autre équipe montrant que la surexpression de TREM-1 dans la lignée monocyttaire humaine U937-TD entraîne une augmentation de l'adhésion entre monocytes et endothélium *in vitro*<sup>440</sup>, mérite d'être approfondie dans de futures expériences. Chez l'homme, une association significative a récemment été rapportée entre un polymorphisme du gène codant pour TREM-1 et les niveaux plasmatiques de CD62L soluble, soulignant la pertinence clinique de l'association établie par nos données expérimentales entre TREM-1 et CD62L<sup>497</sup>.

Compte tenu du rôle largement décrit de TREM-1 dans l'amplification de la réponse immune innée, il est possible que sa modulation ait également un effet sur la réponse inflammatoire locale au sein de la paroi aortique, qui constitue une des caractéristiques majeures responsables du remodelage délétère dans la paroi et de l'évolution de la maladie anévrysmale. En effet, l'expression génique de *Il-1 $\beta$*  et du *Tnf- $\alpha$*  est diminuée dans la paroi aortique des souris déficientes pour *Trem-1* et augmentée après l'injection de l'anticorps agoniste TREM-1 Ab. Ces deux cytokines sont impliquées dans le développement de l'AAA, en amplifiant l'activation cellulaire et du recrutement de cellules inflammatoires dans la paroi<sup>262,268</sup>. La délétion génétique de *Trem-1* est associée à une diminution de l'activité métalloprotéinase (MMP-2, -3, -9 et -13) dans la paroi de l'aorte abdominale, par rapport aux souris contrôles. Les MMPs ont clairement été identifiées comme des acteurs majeurs dans la physiopathologie de l'AAA, principalement en raison de leur activité protéasique vis-à-vis des composants de la MEC. Les niveaux tissulaires de MMP-2 et MMP-9 sont augmentés dans les aortes

anévrismales chez l'homme<sup>211</sup> et dans les modèles expérimentaux chez la souris<sup>498</sup>, dans lesquels la délétion génétique de l'une ou l'autre de ces MMPs est associée à une réduction importante du diamètre aortique<sup>174</sup>. Dans notre étude, nous avons observé un effet significatif de la modulation de TREM-1 sur l'expression génique de la *Mmp-9* dans la paroi, mais un effet plus variable sur l'expression de la *Mmp-2*. Ces données sont cohérentes avec la participation de TREM-1 dans le recrutement des monocytes/macrophages, puisque la MMP-9 est majoritairement produite par les macrophages dans la paroi anévrismale, contrairement à la MMP-2, qui serait plutôt produite par les cellules vasculaires.

Nous pensons que l'effet de la modulation de TREM-1 sur les acteurs de la réponse inflammatoire locale et sur la production de MMPs est principalement lié à son effet sur l'infiltration des monocytes/macrophages. Cependant, il n'est pas exclu que la modulation de TREM-1 puisse également avoir un effet sur l'activation et la polarisation phénotypique des cellules de la paroi, en particulier des monocytes/macrophages. La déficience ou l'inhibition de TREM-1 a été associée à une modification du phénotype et de la fonction des monocytes/macrophages vers un profil moins inflammatoire, avec une diminution de l'expression des marqueurs de type M1, comme *Nos2*, et de la production de cytokines pro-inflammatoires et une augmentation de l'expression de marqueurs de type M2, comme *Arg1*<sup>463</sup>. Il serait donc intéressant d'analyser le profil d'expression de ces marqueurs dans la paroi aortique des animaux de notre étude, pour voir si la modulation de TREM-1 est dans ce contexte associée à une déviation du phénotype macrophagique.

Nous ne pensons pas que l'effet protecteur de la délétion de *Trem-1* sur le développement de l'AAA soit dépendant des neutrophiles. En effet, l'inhibition de TREM-1 n'a montré d'effet ni sur la mobilisation des neutrophiles, ni sur leur infiltration dans la paroi aortique en réponse à l'AngII. Cependant, nous ne pouvons pas complètement exclure une contribution indirecte des neutrophiles sur le recrutement des monocytes médié par TREM-1. TREM-1 est fortement et majoritairement exprimé par les cellules myéloïdes, cependant, de récentes études ont décrit l'induction de son expression dans d'autres types cellulaires en conditions inflammatoires. Jolly *et al.* ont notamment récemment rapporté que TREM-1 pouvait être induit à la surface des cellules endothéliales stimulées par le LPS et dans le contexte du sepsis expérimental, et que son activation contribue au recrutement des cellules myéloïdes dans ce contexte<sup>440</sup>. Au vu de nos données sur l'implication potentielle de TREM-1 dans l'adhésion des monocytes à l'endothélium, nous ne pouvons pas totalement exclure une contribution du compartiment

endothélial au phénotype observé dans notre étude sur le recrutement des monocytes dans la paroi aortique au cours du développement de l'AAA, et il serait intéressant de vérifier cette hypothèse dans de futurs travaux.

Il n'existe aujourd'hui aucun traitement pharmacologique permettant de ralentir l'évolution de la maladie anévrismale aortique chez l'homme. Nous pensons que l'inhibition pharmacologique de TREM-1 pourrait être une stratégie thérapeutique clinique intéressante dans le contexte de l'AAA. En effet, de par son effet modulateur de l'inflammation sur plusieurs voies de signalisation impliquées dans le remodelage vasculaire, son inhibition pourrait engendrer des effets bénéfiques multiples. Nous avons montré une augmentation de l'expression génique de *TREM-1* dans la paroi anévrismale aortique, et détecté un niveau plasmatique élevé du TREM-1 soluble chez les patients atteints d'AAA, comparés à des patients contrôles. Dans notre modèle expérimental, le traitement par le LR12, un récepteur leurre qui contribue à l'atténuation de la réponse immune innée, a montré des effets protecteurs sur les événements précoces associés au développement de l'AAA. Il serait intéressant de confirmer ces résultats dans d'autres modèles expérimentaux. Chez l'homme, le LR12 est actuellement testé dans le cadre d'un essai clinique thérapeutique de phase 2 pour son application dans le choc septique ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), NCT03158948). Le traitement par le LR12 dans le contexte de l'AAA pourrait bénéficier aux patients présentant de petits anévrismes, pour permettre de limiter le recrutement continu des cellules myéloïdes et réduire l'inflammation locale et le remodelage délétère dans la paroi anévrismale aortique.

Pour conclure, nous avons montré que l'activation du système rénine angiotensine induit l'expression et l'activation de TREM-1 *via* la stimulation d'AT<sub>1</sub>R en conditions inflammatoires stériles. Nous avons identifié TREM-1 comme un acteur important du trafic et du recrutement monocyttaire participant à la réponse inflammatoire locale dans un modèle expérimental d'anévrisme induit par l'AngII. Cibler TREM-1 représente une stratégie thérapeutique intéressante pour limiter l'expansion de l'AAA chez l'homme, qui mérite d'être évaluée dans le futur.

## V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Roth, G. A. *et al.* Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet* **392**, 1736–1788 (2018).
2. Hannuksela, M., Lundqvist, S. & Carlberg, B. Thoracic aorta – dilated or not? *Scand. Cardiovasc. J.* **40**, 175–178 (2006).
3. Aird, W. C. Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium: I. Structure, Function, and Mechanisms. *Circ. Res.* **100**, 158–173 (2007).
4. Tabit, C. E., Chung, W. B., Hamburg, N. M. & Vita, J. A. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: Molecular mechanisms and clinical implications. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **11**, 61–74 (2010).
5. Chatzizisis, Y. S. *et al.* Role of Endothelial Shear Stress in the Natural History of Coronary Atherosclerosis and Vascular Remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.* **49**, 2379–2393 (2007).
6. Ince, C. *et al.* The Endothelium in Sepsis: *SHOCK* **45**, 259–270 (2016).
7. Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373–376 (1980).
8. Wolinsky, H. & Glagov, S. A Lamellar Unit of Aortic Medial Structure and Function in Mammals. *Circ. Res.* **20**, 99–111 (1967).
9. Sokolis, D. P. Passive mechanical properties and structure of the aorta: segmental analysis. *Acta Physiol.* **190**, 277–289 (2007).
10. Raines, E. W. & Ross, R. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Heart* **69**, S30–S37 (1993).
11. Campbell, J. H., Popadyne, L., Nestel, P. J. & Campbell, G. R. Lipid accumulation in arterial smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **47**, 279–295 (1983).
12. Ruckman, J. L., Luvall, P. A., Hill, K. E., Giro, M. G. & Davidson, J. M. Phenotypic stability and variation in cells of the porcine aorta: Collagen and elastin production. *Matrix Biol.* **14**, 135–145 (1994).
13. Stenmark, K. R. *et al.* The Adventitia: Essential Regulator of Vascular Wall Structure and Function. *Annu. Rev. Physiol.* **75**, 23–47 (2013).
14. Heistad, D. D., Marcus, M. L., Larsen, G. E. & Armstrong, M. L. Role of vasa vasorum in nourishment of the aortic wall. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **240**, H781–H787 (1981).
15. Wagenseil, J. E. & Mecham, R. P. New insights into elastic fiber assembly. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* **81**, 229–240 (2007).
16. Neptune, E. R. *et al.* Dysregulation of TGF- $\beta$  activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat. Genet.* **33**, 407–411 (2003).
17. Shapiro, S. D., Endicott, S. K., Province, M. A., Pierce, J. A. & Campbell, E. J. Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon. *J. Clin. Invest.* **87**, 1828–1834 (1991).
18. Duca, L. *et al.* Matrix ageing and vascular impacts: focus on elastin fragmentation. *Cardiovasc. Res.* **110**, 298–308 (2016).
19. Huchtagowder, V. *et al.* Fibulin-4: A Novel Gene for an Autosomal Recessive Cutis Laxa Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **78**, 1075–1080 (2006).
20. Guo, D. *et al.* LOX Mutations Predispose to Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections. *Circ. Res.* **118**, 928–934 (2016).
21. Brooke, B. New Insights into Elastin and Vascular Disease. *Trends Cardiovasc. Med.* **13**, 176–181 (2003).
22. Ricard-Blum, S. The Collagen Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a004978–a004978 (2011).

23. Sorushanova, A. *et al.* The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Adv. Mater.* **31**, 1801651 (2019).
24. Jacob, M. P. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed. Pharmacother.* **57**, 195–202 (2003).
25. Cocciolone, A. J. *et al.* Elastin, arterial mechanics, and cardiovascular disease. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **315**, H189–H205 (2018).
26. Vouyouka, A. G. *et al.* The role of type I collagen in aortic wall strength with a homotrimeric [ $\alpha$ 1(I)]<sub>3</sub> collagen mouse model. *J. Vasc. Surg.* **33**, 1263–1270 (2001).
27. Wight, T., N. Arterial remodeling in vascular disease: a key role for hyaluronan and versican. *Front. Biosci.* **Volume**, 4933 (2008).
28. Evanko, S. P., Angello, J. C. & Wight, T. N. Formation of Hyaluronan- and Versican-Rich Pericellular Matrix Is Required for Proliferation and Migration of Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 1004–1013 (1999).
29. Wilkinson, T. S., Bressler, S. L., Evanko, S. P., Braun, K. R. & Wight, T. N. Overexpression of hyaluronan synthases alters vascular smooth muscle cell phenotype and promotes monocyte adhesion. *J. Cell. Physiol.* **206**, 378–385 (2006).
30. Fischer, J. W. *et al.* Decorin Promotes Aortic Smooth Muscle Cell Calcification and Colocalizes to Calcified Regions in Human Atherosclerotic Lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 2391–2396 (2004).
31. Sage, E. H. & Bornstein, P. Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. SPARC, tenascin, and thrombospondin. *J. Biol. Chem.* **266**, 14831–14834 (1991).
32. Krishna, S. M. *et al.* A Peptide Antagonist of Thrombospondin-1 Promotes Abdominal Aortic Aneurysm Progression in the Angiotensin II-Infused Apolipoprotein-E-Deficient Mouse. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 389–398 (2015).
33. Zeng, T. *et al.* Thrombospondin 1 Is Increased in the Aorta and Plasma of Patients With Acute Aortic Dissection. *Can. J. Cardiol.* **35**, 42–50 (2019).
34. Midwood, K. *et al.* Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nat. Med.* **15**, 774–780 (2009).
35. Satta, J., Soini, Y., Pöllänen, R., Pääkkö, P. & Juvonen, T. Tenascin expression is associated with a chronic inflammatory process in abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.* **26**, 670–675 (1997).
36. Jana, S., Hu, M., Shen, M. & Kassiri, Z. Extracellular matrix, regional heterogeneity of the aorta, and aortic aneurysm. *Exp. Mol. Med.* **51**, 1–15 (2019).
37. Newby, A. C. Matrix metalloproteinase inhibition therapy for vascular diseases. *Vascul. Pharmacol.* **56**, 232–244 (2012).
38. Visse, R. & Nagase, H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. *Circ. Res.* **92**, 827–839 (2003).
39. Thompson, R. W. *et al.* Production and localization of 92-kilodalton gelatinase in abdominal aortic aneurysms. An elastolytic metalloproteinase expressed by aneurysm-infiltrating macrophages. *J. Clin. Invest.* **96**, 318–326 (1995).
40. Halpert, I. *et al.* Matrilysin is expressed by lipid-laden macrophages at sites of potential rupture in atherosclerotic lesions and localizes to areas of versican deposition, a proteoglycan substrate for the enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 9748–9753 (1996).
41. Murphy, G., Cockett, M. I., Ward, R. V. & Docherty, A. J. Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan. A quantitative comparison of the activities of 95 kDa and 72 kDa gelatinases, stromelysins-1 and -2 and punctuated metalloproteinase (PUMP). *Biochem. J.* **277** ( Pt 1), 277–279 (1991).
42. Shapiro, S. D., Kobayashi, D. K. & Ley, T. J. Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J. Biol. Chem.* **268**, 23824–23829 (1993).

43. Wang, X. & Khalil, R. A. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. in *Advances in Pharmacology* vol. 81 241–330 (Elsevier, 2018).
44. Sakalihasan, N., Delvenne, P., Nusgens, B. V., Limet, R. & Lapière, C. M. Activated forms of MMP2 and MMP9 in abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.* **24**, 127–133 (1996).
45. Irizarry, E. *et al.* Demonstration of Interstitial Collagenase in Abdominal Aortic Aneurysm Disease. *J. Surg. Res.* **54**, 571–574 (1993).
46. Zhou, M., Zhang, Y., Ardans, J. A. & Wahl, L. M. Interferon- $\gamma$  Differentially Regulates Monocyte Matrix Metalloproteinase-1 and -9 through Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Caspase 8. *J. Biol. Chem.* **278**, 45406–45413 (2003).
47. Malik, N., Greenfield, B. W., Wahl, A. F. & Kiener, P. A. Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases. *J. Immunol.* **156**, 3952–3960 (1996).
48. Chizzolini, C., Rezzonico, R., De Luca, C., Burger, D. & Dayer, J.-M. Th2 Cell Membrane Factors in Association with IL-4 Enhance Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) While Decreasing MMP-9 Production by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Differentiated Human Monocytes. *J. Immunol.* **164**, 5952–5960 (2000).
49. Millichip, M. I., Dallas, D. J., Wu, E., Dale, S. & McKie, N. The Metallo-Disintegrin ADAM10 (MADM) from Bovine Kidney Has Type IV Collagenase Activity in Vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**, 594–598 (1998).
50. Black, R. A. *et al.* A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature* **385**, 729–733 (1997).
51. Reiser, J., Adair, B. & Reinheckel, T. Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *J. Clin. Invest.* **120**, 3421–3431 (2010).
52. Davis, G. E., Pintar Allen, K. A., Salazar, R. & Maxwell, S. A. Matrix metalloproteinase-1 and -9 activation by plasmin regulates a novel endothelial cell-mediated mechanism of collagen gel contraction and capillary tube regression in three-dimensional collagen matrices. *J. Cell Sci.* **114**, 917–930 (2001).
53. Chapman, H. A., Reilly, J. J. & Kobzik, L. Role of Plasminogen Activator in Degradation of Extracellular Matrix Protein by Live Human Alveolar Macrophages. *Am. Rev. Respir. Dis.* **137**, 412–419 (1988).
54. Carmeliet, P. *et al.* Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nat. Genet.* **17**, 439–444 (1997).
55. Baker, A. H. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J. Cell Sci.* **115**, 3719–3727 (2002).
56. Brew, K. & Nagase, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1803**, 55–71 (2010).
57. Bernardo, M. M. & Fridman, R. TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP. *Biochem. J.* **374**, 739–745 (2003).
58. Mochizuki, S., Shimoda, M., Shiomi, T., Fujii, Y. & Okada, Y. ADAM28 is activated by MMP-7 (matrilysin-1) and cleaves insulin-like growth factor binding protein-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**, 79–84 (2004).
59. Lacraz, S., Nicod, L. P., Chicheportiche, R., Welgus, H. G. & Dayer, J. M. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J. Clin. Invest.* **96**, 2304–2310 (1995).
60. Nagase, H., Visse, R. & Murphy, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* **69**, 562–573 (2006).
61. Johnston, K. W. *et al.* Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. Subcommittee on Reporting Standards for Arterial Aneurysms, Ad Hoc Committee on Reporting Standards, Society for Vascular Surgery and North American Chapter, International Society for Cardiovascular Surgery. *J.*

- Vasc. Surg.* **13**, 452–458 (1991).
62. Kent, K. C. Abdominal Aortic Aneurysms. *N. Engl. J. Med.* **371**, 2101–2108 (2014).
63. Kochanek, K. D., Murphy, S. L. & Xu, J. Deaths: Final Data for 2011. *Natl. Vital Stat. Rep. Cent. Dis. Control Prev. Natl. Cent. Health Stat. Natl. Vital Stat. Syst.* **63**, 1–120 (2015).
64. Collaborative Aneurysm Screening Study Group (CASS Group), Chichester Aneurysm Screening Group (UK), Viborg Aneurysm Screening Study (Denmark), Western Australia Abdominal Aortic Aneurysm Program (Australia) & Multicentre Aneurysm Screening Study (MASS)(UK). A comparative study of the prevalence of abdominal aortic aneurysms in the United Kingdom, Denmark, and Australia. *J. Med. Screen.* **8**, 46–50 (2001).
65. Kent, K. C. *et al.* Analysis of risk factors for abdominal aortic aneurysm in a cohort of more than 3 million individuals. *J. Vasc. Surg.* **52**, 539–548 (2010).
66. Ashton, H. A. *et al.* The Multicentre Aneurysm Screening Study (MASS) into the effect of abdominal aortic aneurysm screening on mortality in men: a randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* **360**, 1531–1539 (2002).
67. Norman, P. E. *et al.* Population based randomised controlled trial on impact of screening on mortality from abdominal aortic aneurysm. *BMJ* (2004) doi:10.1136/bmj.38272.478438.55.
68. Sidloff, D. A., Stather, P. W., Choke, E., Bown, M. J. & Sayers, R. D. A systematic review and meta-analysis of the association between markers of hemostasis and abdominal aortic aneurysm presence and size. *J. Vasc. Surg.* **59**, 528–535.e4 (2014).
69. Lederle, F. A. Prevalence and Associations of Abdominal Aortic Aneurysm Detected through Screening. *Ann. Intern. Med.* **126**, 441 (1997).
70. Wemmelund, H. *et al.* Statin use and rupture of abdominal aortic aneurysm: Statin use and rupture of abdominal aortic aneurysm. *Br. J. Surg.* **101**, 966–975 (2014).
71. Toghill, B. J., Saratzis, A. & Bown, M. J. Abdominal aortic aneurysm—an independent disease to atherosclerosis? *Cardiovasc. Pathol.* **27**, 71–75 (2017).
72. Elkalioubie, A. *et al.* Meta-Analysis of Abdominal Aortic Aneurysm in Patients With Coronary Artery Disease. *Am. J. Cardiol.* **116**, 1451–1456 (2015).
73. Raffort, J. *et al.* Diabetes and aortic aneurysm: current state of the art. *Cardiovasc. Res.* **114**, 1702–1713 (2018).
74. Sweeting, M. J., Thompson, S. G., Brown, L. C., Powell, J. T. & on behalf of the RESCAN collaborators. Meta-analysis of individual patient data to examine factors affecting growth and rupture of small abdominal aortic aneurysms. *Br. J. Surg.* **99**, 655–665 (2012).
75. Lederle, F. A. The Strange Relationship between Diabetes and Abdominal Aortic Aneurysm. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **43**, 254–256 (2012).
76. Wahlgren, C. M., Larsson, E., Magnusson, P. K. E., Hultgren, R. & Swedenborg, J. Genetic and environmental contributions to abdominal aortic aneurysm development in a twin population. *J. Vasc. Surg.* **51**, 3–7 (2010).
77. Biro, E. *et al.* Meta-analysis of the association between single nucleotide polymorphisms in TGF- $\beta$  receptor genes and abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis* **219**, 218–223 (2011).
78. Golledge, J. & Kuivaniemi, H. Genetics of abdominal aortic aneurysm: *Curr. Opin. Cardiol.* **28**, 290–296 (2013).
79. Jones, G. T. *et al.* Meta-Analysis of Genome-Wide Association Studies for Abdominal Aortic Aneurysm Identifies Four New Disease-Specific Risk Loci. *Circ. Res.* **120**, 341–353 (2017).
80. Bengtsson, H. & Bergqvist, D. Ruptured abdominal aortic aneurysm: a population-based study. *J. Vasc. Surg.* **18**, 74–80 (1993).
81. Laine, M. T., Laukontaus, S. J., Kantonen, I. & Venermo, M. Population-based study of ruptured abdominal aortic aneurysm: Population-based study of ruptured abdominal aortic aneurysm. *Br. J. Surg.* **103**, 1634–1639 (2016).

82. Powell, J. T. & Greenhalgh, R. M. Clinical practice. Small abdominal aortic aneurysms. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1895–1901 (2003).
83. Chaikof, E. L. *et al.* The Society for Vascular Surgery practice guidelines on the care of patients with an abdominal aortic aneurysm. *J. Vasc. Surg.* **67**, 2-77.e2 (2018).
84. Nevitt, M. P., Ballard, D. J. & Hallett, J. W. Prognosis of abdominal aortic aneurysms. A population-based study. *N. Engl. J. Med.* **321**, 1009–1014 (1989).
85. Cronenwett, J. L. *et al.* Actuarial analysis of variables associated with rupture of small abdominal aortic aneurysms. *Surgery* **98**, 472–483 (1985).
86. Guirguis, E. M. & Barber, G. G. The natural history of abdominal aortic aneurysms. *Am. J. Surg.* **162**, 481–483 (1991).
87. Lederle, F. A. *et al.* Immediate repair compared with surveillance of small abdominal aortic aneurysms. *N. Engl. J. Med.* **346**, 1437–1444 (2002).
88. Mortality results for randomised controlled trial of early elective surgery or ultrasonographic surveillance for small abdominal aortic aneurysms. *The Lancet* **352**, 1649–1655 (1998).
89. Lederle, F. A. *et al.* Rupture rate of large abdominal aortic aneurysms in patients refusing or unfit for elective repair. *JAMA* **287**, 2968–2972 (2002).
90. Oliver-Williams, C. *et al.* Lessons learned about prevalence and growth rates of abdominal aortic aneurysms from a 25-year ultrasound population screening programme. *Br. J. Surg.* **105**, 68–74 (2018).
91. Ernst, C. B. Abdominal aortic aneurysm. *N. Engl. J. Med.* **328**, 1167–1172 (1993).
92. Norman, P. E. & Powell, J. T. Abdominal Aortic Aneurysm: The Prognosis in Women Is Worse Than in Men. *Circulation* **115**, 2865–2869 (2007).
93. Sakalihan, N., Limet, R. & Defawe, O. D. Abdominal aortic aneurysm. *Lancet Lond. Engl.* **365**, 1577–1589 (2005).
94. Dubost, C., Allary, M. & Oeconomos, N. Resection of an aneurysm of the abdominal aorta: reestablishment of the continuity by a preserved human arterial graft, with result after five months. *AMA Arch. Surg.* **64**, 405–408 (1952).
95. Schermerhorn, M. L. *et al.* Long-Term Outcomes of Abdominal Aortic Aneurysm in the Medicare Population. *N. Engl. J. Med.* **373**, 328–338 (2015).
96. Parodi, J. C., Palmaz, J. C. & Antonio, S. Transfemoral Intraluminal Graft Implantation for Abdominal Aortic Aneurysms. **9** (1991).
97. Eslami, M. H., Rybin, D., Doros, G., Kalish, J. A. & Farber, A. Comparison of a Vascular Study Group of New England risk prediction model with established risk prediction models of in-hospital mortality after elective abdominal aortic aneurysm repair. *J. Vasc. Surg.* **62**, 1125-1133.e2 (2015).
98. Ferguson, C. D. *et al.* Association of statin prescription with small abdominal aortic aneurysm progression. *Am. Heart J.* **159**, 307–313 (2010).
99. Takagi, H., Yamamoto, H., Iwata, K., Goto, S. & Umemoto, T. Effects of Statin Therapy on Abdominal Aortic Aneurysm Growth: A Meta-analysis and Meta-regression of Observational Comparative Studies. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **44**, 287–292 (2012).
100. Ricci, M. A. *et al.* Effects of Hypertension and Propranolol upon Aneurysm Expansion in the Anidjar/Dobrin Aneurysm Model. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **800**, 89–96 (1996).
101. Brophy, C., Tilson, J. E. & Tilson, M. D. Propranolol delays the formation of aneurysms in the male blotchy mouse. *J. Surg. Res.* **44**, 687–689 (1988).
102. The Propranolol Aneurysm Trial Investigators. Propranolol for small abdominal aortic aneurysms: Results of a randomized trial. *J. Vasc. Surg.* **35**, 72–79 (2002).
103. Tsunemi, K. *et al.* Possible Roles of Angiotensin II-Forming Enzymes, Angiotensin Converting Enzyme and Chymase-like Enzyme, in the Human Aneurysmal Aorta. *Hypertens. Res.* **25**, 817–822 (2002).
104. Nishimoto, M. *et al.* Increased local angiotensin II formation in aneurysmal aorta. *Life Sci.* **71**,

2195–2205 (2002).

105. Kristensen, K. E. *et al.* Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors and Angiotensin II Receptor Blockers in Patients With Abdominal Aortic Aneurysms: Nation-Wide Cohort Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 733–740 (2015).
106. Hackam, D. G., Thiruchelvam, D. & Redelmeier, D. A. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and aortic rupture: a population-based case-control study. *Lancet Lond. Engl.* **368**, 659–665 (2006).
107. Bicknell, C. D., Kiru, G., Falaschetti, E., Powell, J. T. & Poulter, N. R. An evaluation of the effect of an angiotensin-converting enzyme inhibitor on the growth rate of small abdominal aortic aneurysms: a randomized placebo-controlled trial (AARDVARK). *Eur. Heart J.* **37**, 3213–3221 (2016).
108. Lu, H., Rateri, D. L., Bruemmer, D., Cassis, L. A. & Daugherty, A. Involvement of the renin–angiotensin system in abdominal and thoracic aortic aneurysms. *Clin. Sci.* **123**, 531–543 (2012).
109. Sweeting, M. J., Thompson, S. G., Brown, L. C., Greenhalgh, R. M. & Powell, J. T. Use of angiotensin converting enzyme inhibitors is associated with increased growth rate of abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.* **52**, 1–4 (2010).
110. Morris, D. R. *et al.* TELmisartan in the management of abDominal aortic aneurYsm (TEDY): The study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* **16**, 274 (2015).
111. Baxter, B. T. *et al.* Prolonged administration of doxycycline in patients with small asymptomatic abdominal aortic aneurysms: Report of a prospective (Phase II) multicenter study. *J. Vasc. Surg.* **36**, 1–12 (2002).
112. Curci, J. A. *et al.* Preoperative treatment with doxycycline reduces aortic wall expression and activation of matrix metalloproteinases in patients with abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.* **31**, 325–342 (2000).
113. Meijer, C. A. *et al.* Doxycycline for stabilization of abdominal aortic aneurysms: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* **159**, 815–823 (2013).
114. Dai, J. *et al.* Long Term Stabilization of Expanding Aortic Aneurysms by a Short Course of Cyclosporine A through Transforming Growth Factor–Beta Induction. *PLoS ONE* **6**, e28903 (2011).
115. Rouer, M. *et al.* Rapamycin Limits the Growth of Established Experimental Abdominal Aortic Aneurysms. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **47**, 493–500 (2014).
116. Cheng, J., Koenig, S. N., Kuivaniemi, H. S., Garg, V. & Hans, C. P. Pharmacological Inhibitor of Notch Signaling Stabilizes the Progression of Small Abdominal Aortic Aneurysm in a Mouse Model. *J. Am. Heart Assoc.* **3**, (2014).
117. Owens, A. P. *et al.* MyD88 Deficiency Attenuates Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation Independent of Signaling Through Toll-Like Receptors 2 and 4. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 2813–2819 (2011).
118. Yan, H. *et al.* Antagonism of toll-like receptor 2 attenuates the formation and progression of abdominal aortic aneurysm. *Acta Pharm. Sin. B* **5**, 176–187 (2015).
119. Allaire, E. *et al.* Vascular Smooth Muscle Cell Endovascular Therapy Stabilizes Already Developed Aneurysms in a Model of Aortic Injury Elicited by Inflammation and Proteolysis: *Ann. Surg.* **239**, 417–427 (2004).
120. Schneider, F. *et al.* Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Stabilize Already-formed Aortic Aneurysms More Efficiently than Vascular Smooth Muscle Cells in a Rat Model. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **45**, 666–672 (2013).
121. Hashizume, R., Yamawaki-Ogata, A., Ueda, Y., Wagner, W. R. & Narita, Y. Mesenchymal stem cells attenuate angiotensin II-induced aortic aneurysm growth in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Vasc. Surg.* **54**, 1743–1752 (2011).
122. Giraud, A. *et al.* Gingival fibroblasts protect against experimental abdominal aortic aneurysm development and rupture through tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production. *Cardiovasc. Res.* **113**, 1364–1375 (2017).

123. Juvonen, J. *et al.* Elevated Circulating Levels of Inflammatory Cytokines in Patients With Abdominal Aortic Aneurysm. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 2843–2847 (1997).
124. Golledge, J., Tsao, P. S., Dalman, R. L. & Norman, P. E. Circulating Markers of Abdominal Aortic Aneurysm Presence and Progression. *Circulation* **118**, 2382–2392 (2008).
125. Wolny, A. *et al.* Functional and biochemical analysis of angiotensin II-forming pathways in the human heart. *Circ. Res.* **80**, 219–227 (1997).
126. Mehta, P. K. & Griendling, K. K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **292**, C82–C97 (2007).
127. Rasini, E. *et al.* Angiotensin II type 1 receptor expression on human leukocyte subsets: A flow cytometric and RT-PCR study. *Regul. Pept.* **134**, 69–74 (2006).
128. Hahn, A. W., Jonas, U., Bühler, F. R. & Resink, T. J. Activation of human peripheral monocytes by angiotensin II. *FEBS Lett.* **347**, 178–180 (1994).
129. Griendling, K. K., Lassègue, B. & Alexander, R. W. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**, 281–306 (1996).
130. Gunther, S., Gimbrone, M. A. & Alexander, R. W. Regulation by angiotensin II of its receptors in resistance blood vessels. *Nature* **287**, 230–232 (1980).
131. AbdAlla, S., Lothar, H. & Quitterer, U. AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature* **407**, 94–98 (2000).
132. Taniyama, Y. *et al.* Role of p38 MAPK and MAPKAPK-2 in angiotensin II-induced Akt activation in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **287**, C494–C499 (2004).
133. Eguchi, S. *et al.* Calcium-dependent Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation Mediates the Angiotensin II-induced Mitogen-activated Protein Kinase Activation in Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 8890–8896 (1998).
134. Ferrario, C. M. Role of Angiotensin II in Cardiovascular Disease — Therapeutic Implications of More Than a Century of Research. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* **7**, 3–14 (2006).
135. Jones, E., Black, M. & Widdop, R. Angiotensin AT receptor contributes to cardiovascular remodelling of aged rats during chronic AT receptor blockade. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **37**, 1023–1030 (2004).
136. Henrion, D., Kubis, N. & Lévy, B. I. Physiological and Pathophysiological Functions of the AT<sub>2</sub> Subtype Receptor of Angiotensin II: From Large Arteries to the Microcirculation. *Hypertension* **38**, 1150–1157 (2001).
137. Dhande, I., Ma, W. & Hussain, T. Angiotensin AT<sub>2</sub> receptor stimulation is anti-inflammatory in lipopolysaccharide-activated THP-1 macrophages via increased interleukin-10 production. *Hypertens. Res.* **38**, 21–29 (2015).
138. Carey, R. M., Howell, N. L., Jin, X.-H. & Siragy, H. M. Angiotensin Type 2 Receptor-Mediated Hypotension in Angiotensin Type-1 Receptor-Blocked Rats. *Hypertension* **38**, 1272–1277 (2001).
139. McMurray, J. J. *et al.* Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function taking angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Added trial. *The Lancet* **362**, 767–771 (2003).
140. Dickstein, K. & Kjækshus, J. Effects of losartan and captopril on mortality and morbidity in high-risk patients after acute myocardial infarction: the OPTIMAAL randomised trial. *The Lancet* **360**, 752–760 (2002).
141. Touyz, R. M. & Schiffrin, E. L. Tyrosine kinase signaling pathways modulate angiotensin II-induced calcium ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) transients in vascular smooth muscle cells. *Hypertens. Dallas Tex* **1979** **27**, 1097–1103 (1996).
142. Wynne, B. M., Chiao, C.-W. & Webb, R. C. Vascular smooth muscle cell signaling mechanisms for contraction to angiotensin II and endothelin-1. *J. Am. Soc. Hypertens.* **3**, 84–95 (2009).
143. Touyz, R. M. & Schiffrin, E. L. Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth

- muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways: *J. Hypertens.* **19**, 1245–1254 (2001).
144. Griendling, K. K., Minieri, C. A., Ollerenshaw, J. D. & Alexander, R. W. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **74**, 1141–1148 (1994).
145. Pueyo, M. E., Arnal, J.-F., Rami, J. & Michel, J.-B. Angiotensin II stimulates the production of NO and peroxynitrite in endothelial cells. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **274**, C214–C220 (1998).
146. Arenas, I. A., Xu, Y., Lopez-Jaramillo, P. & Davidge, S. T. Angiotensin II-induced MMP-2 release from endothelial cells is mediated by TNF- $\alpha$ . *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **286**, C779–C784 (2004).
147. Tummala, P. E. *et al.* Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation* **100**, 1223–1229 (1999).
148. Chen, X.-L., Tummala, P. E., Olbrych, M. T., Alexander, R. W. & Medford, R. M. Angiotensin II Induces Monocyte Chemoattractant Protein-1 Gene Expression in Rat Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ. Res.* **83**, 952–959 (1998).
149. Kranzhöfer, R. *et al.* Angiotensin Induces Inflammatory Activation of Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 1623–1629 (1999).
150. Kim, J. A., Berliner, J. A. & Nadler, J. L. Angiotensin II Increases Monocyte Binding to Endothelial Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **226**, 862–868 (1996).
151. Alvarez, A. *et al.* Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II. *Blood* **104**, 402–408 (2004).
152. Scott-Burden, T., Resink, T. J., Hahn, A. W. A. & Buhler, F. R. Angiotensin-Induced Growth Related Metabolism Is Activated in Cultured Smooth Muscle Cells From Spontaneously Hypertensive Rats and Wistar-Kyoto Rats. *Am. J. Hypertens.* **4**, 183–188 (1991).
153. Cheng, Z. J., Vapaatalo, H. & Mervaala, E. Angiotensin II and vascular inflammation. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **11**, RA194-205 (2005).
154. Jacoby, D. S. & Rader, D. J. Renin-Angiotensin System and Atherothrombotic Disease: From Genes to Treatment. *Arch. Intern. Med.* **163**, 1155 (2003).
155. Daugherty, A. & Cassis, L. Chronic Angiotensin II Infusion Promotes Atherogenesis in Low Density Lipoprotein Receptor  $-/-$  Mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **892**, 108–118 (1999).
156. Pfeffer, M. A. *et al.* Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N. Engl. J. Med.* **327**, 669–677 (1992).
157. Wassmann, S. *et al.* Inhibition of Diet-Induced Atherosclerosis and Endothelial Dysfunction in Apolipoprotein E/Angiotensin II Type 1A Receptor Double-Knockout Mice. *Circulation* **110**, 3062–3067 (2004).
158. Keidar, S., Attias, J., Smith, J., Breslow, J. L. & Hayek, T. The Angiotensin-II Receptor Antagonist, Losartan, Inhibits LDL Lipid Peroxidation and Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 622–625 (1997).
159. Hayek, T. The angiotensin-converting enzyme inhibitor, fosinopril, and the angiotensin II receptor antagonist, losartan, inhibit LDL oxidation and attenuate atherosclerosis independent of lowering blood pressure in apolipoprotein E deficient mice. *Cardiovasc. Res.* **44**, 579–587 (1999).
160. Daugherty, A., Manning, M. W. & Cassis, L. A. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **105**, 1605–1612 (2000).
161. Barisione, C. *et al.* Rapid dilation of the abdominal aorta during infusion of angiotensin II detected by noninvasive high-frequency ultrasonography. *J. Vasc. Surg.* **44**, 372–376 (2006).
162. Saraff, K., Babamusta, F., Cassis, L. A. & Daugherty, A. Aortic Dissection Precedes Formation

- of Aneurysms and Atherosclerosis in Angiotensin II-Infused, Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 1621–1626 (2003).
163. Rush, C. *et al.* Whole genome expression analysis within the angiotensin II-apolipoprotein E deficient mouse model of abdominal aortic aneurysm. *BMC Genomics* **10**, 298 (2009).
164. Cassis, L. A. *et al.* ANG II infusion promotes abdominal aortic aneurysms independent of increased blood pressure in hypercholesterolemic mice. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **296**, H1660–H1665 (2009).
165. Deng, G. G. *et al.* Urokinase-Type Plasminogen Activator Plays a Critical Role in Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm. *Circ. Res.* **92**, 510–517 (2003).
166. Daugherty, A., Manning, M. W. & Cassis, L. A. Antagonism of AT<sub>2</sub> receptors augments Angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms and atherosclerosis. *Br. J. Pharmacol.* **134**, 865–870 (2001).
167. Cassis, L. A., Rateri, D. L., Lu, H. & Daugherty, A. Bone Marrow Transplantation Reveals That Recipient AT<sub>1a</sub> Receptors Are Required to Initiate Angiotensin II-Induced Atherosclerosis and Aneurysms. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 380–386 (2007).
168. Manning, M. W., Cassis, L. A., Huang, J., Szilvassy, S. J. & Daugherty, A. Abdominal aortic aneurysms: fresh insights from a novel animal model of the disease. *Vasc. Med.* **7**, 45–54 (2002).
169. Bobik, A. Transforming growth factor-betas and vascular disorders. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 1712–1720 (2006).
170. Dai, J. *et al.* Overexpression of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Stabilizes Already-Formed Aortic Aneurysms: A First Approach to Induction of Functional Healing by Endovascular Gene Therapy. *Circulation* **112**, 1008–1015 (2005).
171. Wang, Y. *et al.* TGF- $\beta$  activity protects against inflammatory aortic aneurysm progression and complications in angiotensin II-infused mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 422–432 (2010).
172. Gertz, S. D., Kurgan, A. & Eisenberg, D. Aneurysm of the rabbit common carotid artery induced by periarterial application of calcium chloride in vivo. *J. Clin. Invest.* **81**, 649–656 (1988).
173. Chiou, A. C., Chiu, B. & Pearce, W. H. Murine Aortic Aneurysm Produced by Periarterial Application of Calcium Chloride. *J. Surg. Res.* **99**, 371–376 (2001).
174. Longo, G. M. *et al.* Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J. Clin. Invest.* **110**, 625–632 (2002).
175. Anidjar, S. *et al.* Elastase-induced experimental aneurysms in rats. *Circulation* **82**, 973–981 (1990).
176. Pyo, R. *et al.* Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J. Clin. Invest.* **105**, 1641–1649 (2000).
177. Carsten, C. G. *et al.* Elastase is not sufficient to induce experimental abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.* **33**, 1255–1262 (2001).
178. Iida, Y. *et al.* Efficacy and Mechanism of Angiotensin II Receptor Blocker Treatment in Experimental Abdominal Aortic Aneurysms. *PLoS ONE* **7**, e49642 (2012).
179. Xuan, H. *et al.* Inhibition or deletion of angiotensin II type 1 receptor suppresses elastase-induced experimental abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.* **67**, 573-584.e2 (2018).
180. Liao, S. *et al.* Suppression of experimental abdominal aortic aneurysms in the rat by treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J. Vasc. Surg.* **33**, 1057–1064 (2001).
181. Bhamidipati, C. M. *et al.* Development of a novel murine model of aortic aneurysms using peri-adventitial elastase. *Surgery* **152**, 238–246 (2012).
182. Laser, A. *et al.* Differential gender- and species-specific formation of aneurysms using a novel method of inducing abdominal aortic aneurysms. *J. Surg. Res.* **178**, 1038–1045 (2012).
183. Lareyre, F. *et al.* TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) Blockade Induces a Human-Like Disease in a Non-dissecting Mouse Model of Abdominal Aortic Aneurysm. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **37**,

- 2171–2181 (2017).
184. Lu, G. *et al.* A novel chronic advanced stage abdominal aortic aneurysm murine model. *J. Vasc. Surg.* **66**, 232–242.e4 (2017).
185. Fashandi, A. Z. *et al.* A novel reproducible model of aortic aneurysm rupture. *Surgery* **163**, 397–403 (2018).
186. Norman, P. E. & Powell, J. T. Site Specificity of Aneurysmal Disease. *Circulation* **121**, 560–568 (2010).
187. Quintana, R. A. & Taylor, W. R. Cellular Mechanisms of Aortic Aneurysm Formation. *Circ. Res.* **124**, 607–618 (2019).
188. Isselbacher, E. M. Thoracic and Abdominal Aortic Aneurysms. *Circulation* **111**, 816–828 (2005).
189. Gollidge, J. & Eagle, K. A. Acute aortic dissection. *Lancet Lond. Engl.* **372**, 55–66 (2008).
190. Hiratzka, L. F. *et al.* 2010 ACCF/AHA/AATS/ACR/ASA/SCA/SCAI/SIR/STS/SVM guidelines for the diagnosis and management of patients with Thoracic Aortic Disease: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, American Association for Thoracic Surgery, American College of Radiology, American Stroke Association, Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Interventional Radiology, Society of Thoracic Surgeons, and Society for Vascular Medicine. *Circulation* **121**, e266–369 (2010).
191. Olsson, C., Thelin, S. & Stahle, E. Thoracic aortic aneurysm and dissection: Increasing prevalence and improved outcomes reported in a nationwide population-based study of more than 14,000 cases from 1987 to 2002. *J. Vasc. Surg.* **46**, 609 (2007).
192. Lindsay, M. E. & Dietz, H. C. Lessons on the pathogenesis of aneurysm from heritable conditions. *Nature* **473**, 308–316 (2011).
193. Gillis, E., Van Laer, L. & Loeys, B. L. Genetics of Thoracic Aortic Aneurysm: At the Crossroad of Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling and Vascular Smooth Muscle Cell Contractility. *Circ. Res.* **113**, 327–340 (2013).
194. Renard, M. *et al.* Clinical Validity of Genes for Heritable Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection. *J. Am. Coll. Cardiol.* **72**, 605–615 (2018).
195. Nistri, S. *et al.* Aortic root dilatation in young men with normally functioning bicuspid aortic valves. *Heart* **82**, 19–22 (1999).
196. Dietz, H. C. *et al.* Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature* **352**, 337–339 (1991).
197. Bunton, T. E. *et al.* Phenotypic Alteration of Vascular Smooth Muscle Cells Precedes Elastolysis in a Mouse Model of Marfan Syndrome. *Circ. Res.* **88**, 37–43 (2001).
198. Shores, J., Berger, K. R., Murphy, E. A. & Pyeritz, R. E. Progression of aortic dilatation and the benefit of long-term beta-adrenergic blockade in Marfan's syndrome. *N. Engl. J. Med.* **330**, 1335–1341 (1994).
199. Brooke, B. S. & Patel, N. Angiotensin II Blockade and Aortic-Root Dilation in Marfan's Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **9** (2008).
200. Lacro, R. V. *et al.* Atenolol versus Losartan in Children and Young Adults with Marfan's Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **371**, 2061–2071 (2014).
201. Mallat, Z., Ait-Oufella, H. & Tedgui, A. The Pathogenic Transforming Growth Factor- $\beta$  Overdrive Hypothesis in Aortic Aneurysms and Dissections: A Mirage? *Circ. Res.* **120**, 1718–1720 (2017).
202. Loeys, B. L. *et al.* A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat. Genet.* **37**, 275–281 (2005).
203. Loeys, B. L. *et al.* Aneurysm Syndromes Caused by Mutations in the TGF- $\beta$  Receptor. *N. Engl. J. Med.* **355**, 788–798 (2006).
204. Pepin, M. Clinical and Genetic Features of Ehlers–Danlos Syndrome Type IV, the Vascular Type.

*N. Engl. J. Med.* 8 (2000).

205. Ong, K.-T. *et al.* Effect of celiprolol on prevention of cardiovascular events in vascular Ehlers-Danlos syndrome: a prospective randomised, open, blinded-endpoints trial. *Lancet Lond. Engl.* **376**, 1476–1484 (2010).
206. Brophy, C. M., Reilly, J. M., Smith, G. J. W. & Tilson, M. D. The Role of Inflammation in Nonspecific Abdominal Aortic Aneurysm Disease. *Ann. Vasc. Surg.* **5**, 229–233 (1991).
207. Davis, F. M., Rateri, D. L. & Daugherty, A. Mechanisms of aortic aneurysm formation: translating preclinical studies into clinical therapies. *Heart Br. Card. Soc.* **100**, 1498–1505 (2014).
208. Koch, A. E. *et al.* Human abdominal aortic aneurysms. Immunophenotypic analysis suggesting an immune-mediated response. *Am. J. Pathol.* **137**, 1199–1213 (1990).
209. Lenk, G. M. *et al.* Whole genome expression profiling reveals a significant role for immune function in human abdominal aortic aneurysms. *BMC Genomics* **8**, 237 (2007).
210. Biro, E. *et al.* Differential gene expression in human abdominal aortic aneurysm and aortic occlusive disease. *Oncotarget* **6**, (2015).
211. Freestone, T. *et al.* Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**, 1145–1151 (1995).
212. Ricci, M. A. *et al.* Anti-CD 18 monoclonal antibody slows experimental aortic aneurysm expansion. *J. Vasc. Surg.* **23**, 301–307 (1996).
213. Hance, K. A., Tataria, M., Ziporin, S. J., Lee, J. K. & Thompson, R. W. Monocyte chemotactic activity in human abdominal aortic aneurysms: Role of elastin degradation peptides and the 67-kD cell surface elastin receptor. *J. Vasc. Surg.* **35**, 254–261 (2002).
214. Koch, A. E. *et al.* Enhanced production of the chemotactic cytokines interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 in human abdominal aortic aneurysms. *Am. J. Pathol.* **142**, 1423–1431 (1993).
215. Boytard, L. *et al.* Role of Proinflammatory CD68<sup>+</sup> Mannose Receptor<sup>-</sup> Macrophages in Peroxiredoxin-1 Expression and in Abdominal Aortic Aneurysms in Humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 431–438 (2013).
216. Rateri, D. L. *et al.* Prolonged Infusion of Angiotensin II in apoE<sup>-/-</sup> Mice Promotes Macrophage Recruitment with Continued Expansion of Abdominal Aortic Aneurysm. *Am. J. Pathol.* **179**, 1542–1548 (2011).
217. Mellak, S. *et al.* Angiotensin II Mobilizes Spleen Monocytes to Promote the Development of Abdominal Aortic Aneurysm in ApoE<sup>-/-</sup> Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 378–388 (2015).
218. Curci, J. A., Liao, S., Huffman, M. D., Shapiro, S. D. & Thompson, R. W. Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. *J. Clin. Invest.* **102**, 1900–1910 (1998).
219. Liu, J. *et al.* Cathepsin L expression and regulation in human abdominal aortic aneurysm, atherosclerosis, and vascular cells. *Atherosclerosis* **184**, 302–311 (2006).
220. Lee, E. *et al.* Human Vascular Smooth Muscle Cell–Monocyte Interactions and Metalloproteinase Secretion in Culture. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**, 2284–2289 (1995).
221. Raffort, J. *et al.* Monocytes and macrophages in abdominal aortic aneurysm. *Nat. Rev. Cardiol.* **14**, 457–471 (2017).
222. Houard, X. *et al.* Mediators of neutrophil recruitment in human abdominal aortic aneurysms. *Cardiovasc. Res.* **82**, 532–541 (2009).
223. Murphy, E. A., Danna-Lopes, D., Sarfati, I., Rao, S. K. & Cohen, J. R. Nicotine-Stimulated Elastase Activity Release by Neutrophils in Patients with Abdominal Aortic Aneurysms. *Ann. Vasc. Surg.* **12**, 41–45 (1998).
224. Eliason, J. L. *et al.* Neutrophil Depletion Inhibits Experimental Abdominal Aortic Aneurysm Formation. *Circulation* **112**, 232–240 (2005).
225. Pagano, M. B. *et al.* Critical role of dipeptidyl peptidase I in neutrophil recruitment during the

- development of experimental abdominal aortic aneurysms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 2855–2860 (2007).
226. Meher, A. K. *et al.* Novel Role of IL (Interleukin)-1 $\beta$  in Neutrophil Extracellular Trap Formation and Abdominal Aortic Aneurysms. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **38**, 843–853 (2018).
227. Ihara, M. *et al.* Increased Chymase-Dependent Angiotensin II Formation in Human Atherosclerotic Aorta. *Hypertension* **33**, 1399–1405 (1999).
228. Sun, J. *et al.* Mast cells modulate the pathogenesis of elastase-induced abdominal aortic aneurysms in mice. *J. Clin. Invest.* **117**, 3359–3368 (2007).
229. Sun, J. *et al.* Critical Role of Mast Cell Chymase in Mouse Abdominal Aortic Aneurysm Formation. *Circulation* **120**, 973–982 (2009).
230. Tsuruda, T. *et al.* Adventitial Mast Cells Contribute to Pathogenesis in the Progression of Abdominal Aortic Aneurysm. *Circ. Res.* **102**, 1368–1377 (2008).
231. Sillesen, H. *et al.* Randomized clinical trial of mast cell inhibition in patients with a medium-sized abdominal aortic aneurysm. *Br. J. Surg.* **102**, 894–901 (2015).
232. Chan, W. L., Pejnovic, N., Liew, T. V. & Hamilton, H. Predominance of Th2 response in human abdominal aortic aneurysm: Mistaken identity for IL-4-producing NK and NKT cells? *Cell. Immunol.* **233**, 109–114 (2005).
233. Forester, N. D., Cruickshank, S. M., Scott, D. J. A. & Carding, S. R. Functional characterization of T cells in abdominal aortic aneurysms. *Immunology* **115**, 262–270 (2005).
234. Forester, N. D., Cruickshank, S. M., Scott, D. J. A. & Carding, S. R. Increased natural killer cell activity in patients with an abdominal aortic aneurysm. *Br. J. Surg.* **93**, 46–54 (2006).
235. Bobryshev, Y. Immunophenotypic analysis of the aortic aneurysm wall suggests that vascular dendritic cells are involved in immune responses. *Cardiovasc. Surg.* **6**, 240–249 (1998).
236. Curci, J. A. & Thompson, R. W. Adaptive cellular immunity in aortic aneurysms: cause, consequence, or context? *J. Clin. Invest.* **114**, 168–171 (2004).
237. Ocana, E. Characterisation of T and B lymphocytes infiltrating abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis* **170**, 39–48 (2003).
238. Furusho, A. *et al.* Involvement of B Cells, Immunoglobulins, and Syk in the Pathogenesis of Abdominal Aortic Aneurysm. *J. Am. Heart Assoc.* **7**, (2018).
239. Meher, A. K. *et al.* B2 Cells Suppress Experimental Abdominal Aortic Aneurysms. *Am. J. Pathol.* **184**, 3130–3141 (2014).
240. Kyaw, T. *et al.* B1a B Lymphocytes Are Atheroprotective by Secreting Natural IgM That Increases IgM Deposits and Reduces Necrotic Cores in Atherosclerotic Lesions. *Circ. Res.* **109**, 830–840 (2011).
241. Kyaw, T. *et al.* Conventional B2 B Cell Depletion Ameliorates whereas Its Adoptive Transfer Aggravates Atherosclerosis. *J. Immunol.* **185**, 4410–4419 (2010).
242. Schaheen, B. *et al.* B-Cell Depletion Promotes Aortic Infiltration of Immunosuppressive Cells and Is Protective of Experimental Aortic Aneurysm. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36**, 2191–2202 (2016).
243. Uchida, H. A. *et al.* Total lymphocyte deficiency attenuates AngII-induced atherosclerosis in males but not abdominal aortic aneurysms in apoE deficient mice. *Atherosclerosis* **211**, 399–403 (2010).
244. Schönbeck, U., Sukhova, G. K., Gerdes, N. & Libby, P. TH2 Predominant Immune Responses Prevail in Human Abdominal Aortic Aneurysm. *Am. J. Pathol.* **161**, 499–506 (2002).
245. Shimizu, K., Shichiri, M., Libby, P., Lee, R. T. & Mitchell, R. N. Th2-predominant inflammation and blockade of IFN- $\gamma$  signaling induce aneurysms in allografted aortas. *J. Clin. Invest.* **114**, 300–308 (2004).
246. Galle, C. *et al.* Predominance of type 1 CD4+T cells in human abdominal aortic aneurysm. *Clin. Exp. Immunol.* **0**, 051006055454003 (2005).

247. Xiong, W., Zhao, Y., Prall, A., Greiner, T. C. & Baxter, B. T. Key Roles of CD4<sup>+</sup> T Cells and IFN- $\gamma$  in the Development of Abdominal Aortic Aneurysms in a Murine Model. *J. Immunol.* **172**, 2607–2612 (2004).
248. Yin, M. *et al.* Deficient CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T Regulatory Cell Function in Patients With Abdominal Aortic Aneurysms. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 1825–1831 (2010).
249. Meng, X. *et al.* Regulatory T Cells Prevent Angiotensin II–Induced Abdominal Aortic Aneurysm in Apolipoprotein E Knockout Mice. *Hypertension* **64**, 875–882 (2014).
250. Zhou, Y. *et al.* Regulatory T cells in human and angiotensin II-induced mouse abdominal aortic aneurysms. *Cardiovasc. Res.* **107**, 98–107 (2015).
251. Ait-Oufella, H. *et al.* Natural Regulatory T Cells Limit Angiotensin II–Induced Aneurysm Formation and Rupture in Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 2374–2379 (2013).
252. Yodoi, K. *et al.* Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells Play a Protective Role in Angiotensin II–Induced Aortic Aneurysm Formation in Mice. *Hypertension* **65**, 889–895 (2015).
253. Sharma, A. K. *et al.* Experimental Abdominal Aortic Aneurysm Formation Is Mediated by IL-17 and Attenuated by Mesenchymal Stem Cell Treatment. *Circulation* **126**, S38–S45 (2012).
254. Wei, Z. *et al.* Inhibiting the Th17/IL-17A–Related Inflammatory Responses With Digoxin Confers Protection Against Experimental Abdominal Aortic Aneurysm. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 2429–2438 (2014).
255. Romain, M. *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.* **33**, 581–584 (2013).
256. Zhou, H. *et al.* CD43-Mediated IFN- $\gamma$  Production by CD8<sup>+</sup> T Cells Promotes Abdominal Aortic Aneurysm in Mice. *J. Immunol.* **190**, 5078–5085 (2013).
257. Middleton, R. K. *et al.* The pro-inflammatory and chemotactic cytokine microenvironment of the abdominal aortic aneurysm wall: A protein array study. *J. Vasc. Surg.* **45**, 574–580 (2007).
258. Moyer, C. F., Sajuthi, D., Tulli, H. & Williams, J. K. Synthesis of IL-1 alpha and IL-1 beta by arterial cells in atherosclerosis. *Am. J. Pathol.* **138**, 951–960 (1991).
259. Keen, R. R. *et al.* Interleukin-1 beta induces differential gene expression in aortic smooth muscle cells. *J. Vasc. Surg.* **20**, 774–784; discussion 784–786 (1994).
260. Galis, Z. S. *et al.* Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ. Res.* **75**, 181–189 (1994).
261. Haraldsen, G., Kvale, D., Lien, B., Farstad, I. N. & Brandtzaeg, P. Cytokine-regulated expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human microvascular endothelial cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **156**, 2558–2565 (1996).
262. Johnston, W. F. *et al.* Genetic and Pharmacologic Disruption of Interleukin-1 $\beta$  Signaling Inhibits Experimental Aortic Aneurysm Formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 294–304 (2013).
263. Loppnow, H. & Libby, P. Proliferating or interleukin 1-activated human vascular smooth muscle cells secrete copious interleukin 6. *J. Clin. Invest.* **85**, 731–738 (1990).
264. Harrison, S. C. *et al.* Interleukin-6 receptor pathways in abdominal aortic aneurysm. *Eur. Heart J.* **34**, 3707–3716 (2013).
265. Pope, N. H. *et al.* Interleukin-6 Receptor Inhibition Prevents Descending Thoracic Aortic Aneurysm Formation. *Ann. Thorac. Surg.* **100**, 1620–1626 (2015).
266. Nishihara, M. *et al.* The role of IL-6 in pathogenesis of abdominal aortic aneurysm in mice. *PLOS ONE* **12**, e0185923 (2017).
267. Paige, E. *et al.* Interleukin-6 Receptor Signaling and Abdominal Aortic Aneurysm Growth Rates. *Circ. Genomic Precis. Med.* **12**, (2019).
268. Xiong, W. *et al.* Blocking TNF- $\alpha$  Attenuates Aneurysm Formation in a Murine Model. *J. Immunol.*

- 183**, 2741–2746 (2009).
269. Xie, B., Dong, Z. & Fidler, I. J. Regulatory mechanisms for the expression of type IV collagenases/gelatinases in murine macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **152**, 3637–3644 (1994).
270. Amento, E. P., Ehsani, N., Palmer, H. & Libby, P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. J. Vasc. Biol.* **11**, 1223–1230 (1991).
271. Roberts, A. B. *et al.* Transforming growth factor type  $\beta$ : Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **5** (1986).
272. Zhang, P. *et al.* Smad4 Deficiency in Smooth Muscle Cells Initiates the Formation of Aortic Aneurysm. *Circ. Res.* **118**, 388–399 (2016).
273. Shimizu, K., Libby, P. & Mitchell, R. Local Cytokine Environments Drive Aneurysm Formation in Allografted Aortas. *Trends Cardiovasc. Med.* **15**, 142–148 (2005).
274. Shapiro, S. D., Campbell, E. J., Kobayashi, D. K. & Welgus, H. G. Immune modulation of metalloproteinase production in human macrophages. Selective pretranslational suppression of interstitial collagenase and stromelysin biosynthesis by interferon-gamma. *J. Clin. Invest.* **86**, 1204–1210 (1990).
275. King, V. L. *et al.* Interferon- $\gamma$  and the Interferon-Inducible Chemokine CXCL10 Protect Against Aneurysm Formation and Rupture. *Circulation* **119**, 426–435 (2009).
276. Newmans, K. M. *et al.* Matrix Metalloproteinases in Abdominal Aortic Aneurysm: Characterization, Purification, And Their Possible Sources. *Connect. Tissue Res.* **30**, 265–276 (1994).
277. Patel, M. I., Melrose, J., Ghosh, P. & Appleberg, M. Increased synthesis of matrix metalloproteinases by aortic smooth muscle cells is implicated in the etiopathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.* **24**, 82–92 (1996).
278. Dale, M. A. *et al.* Elastin-Derived Peptides Promote Abdominal Aortic Aneurysm Formation by Modulating M1/M2 Macrophage Polarization. *J. Immunol.* **196**, 4536–4543 (2016).
279. Senior, R. M., Griffin, G. L. & Mecham, R. P. Chemotactic activity of elastin-derived peptides. *J. Clin. Invest.* **66**, 859–862 (1980).
280. Postlethwaite, A. E. & Kang, A. H. Collagen-and collagen peptide-induced chemotaxis of human blood monocytes. *J. Exp. Med.* **143**, 1299–1307 (1976).
281. Carmo, M. *et al.* Alteration of Elastin, Collagen and their Cross-links in Abdominal Aortic Aneurysms. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **23**, 543–549 (2002).
282. Menashi, S., Campa, J. S., Greenhalgh, R. M. & Powell, J. T. Collagen in abdominal aortic aneurysm: Typing, content, and degradation. *J. Vasc. Surg.* **6**, 578–582 (1987).
283. Dobrin, P. B., Baker, W. H. & Gley, W. C. Elastolytic and collagenolytic studies of arteries. Implications for the mechanical properties of aneurysms. *Arch. Surg. Chic. Ill 1960* **119**, 405–409 (1984).
284. Abdul-Hussien, H. *et al.* Collagen Degradation in the Abdominal Aneurysm. *Am. J. Pathol.* **170**, 809–817 (2007).
285. Klink, A. *et al.* In Vivo Characterization of a New Abdominal Aortic Aneurysm Mouse Model With Conventional and Molecular Magnetic Resonance Imaging. *J. Am. Coll. Cardiol.* **58**, 2522–2530 (2011).
286. Tamarina, N. A., McMillan, W. D., Shively, V. P. & Pearce, W. H. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in aneurysms and normal aorta. *Surgery* **122**, 264–272 (1997).
287. Petrincec, D. *et al.* Doxycycline inhibition of aneurysmal degeneration in an elastase-induced rat model of abdominal aortic aneurysm: Preservation of aortic elastin associated with suppressed production of 92 kd gelatinase. *J. Vasc. Surg.* **23**, 11 (1996).
288. Manning, M. W., Cassis, L. A. & Daugherty, A. Differential Effects of Doxycycline, a Broad-Spectrum Matrix Metalloproteinase Inhibitor, on Angiotensin II-Induced Atherosclerosis and

- Abdominal Aortic Aneurysms. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 483–488 (2003).
289. Knox, J. B., Sukhova, G. K., Whitemore, A. D. & Libby, P. Evidence for altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in human aortic diseases. *Circulation* **95**, 205–212 (1997).
290. Carrell, T. W. G., Burnand, K. G., Wells, G. M. A., Clements, J. M. & Smith, A. Stromelysin-1 (Matrix Metalloproteinase-3) and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 Are Overexpressed in the Wall of Abdominal Aortic Aneurysms. *Circulation* **105**, 477–482 (2002).
291. Crowther, M., Brindle, N. P. J., Sayers, R., Bell, P. R. F. & Thompson, M. M. Aneurysmal Smooth Muscle Cells Exhibit Increased Matrix Metalloproteinase-2 Production in Vitro. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **800**, 283–285 (1996).
292. McMillan, W. D., Patterson, B. K. & Keen, R. R. In situ localization and quantification of seventy-two-kilodalton type IV collagenase in aneurysmal, occlusive, and normal aorta. *J. Vasc.* **22**, 11 (1995).
293. Crowther, M., Goodall, S., Jones, J. L., Bell, P. R. F. & Thompson, M. M. Localization of matrix metalloproteinase 2 within the aneurysmal and normal aortic wall: Pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *Br. J. Surg.* **87**, 1391–1400 (2000).
294. Elmore, J. R., Keister, B. F., Franklin, D. P., Youkey, J. R. & Carey, D. J. Expression of matrix metalloproteinases and TIMPs in human abdominal aortic aneurysms. *Ann. Vasc. Surg.* **12**, 221–228 (1998).
295. Petersen, E., Wågberg, F. & Angquist, K. A. Proteolysis of the abdominal aortic aneurysm wall and the association with rupture. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.* **23**, 153–157 (2002).
296. Hovsepian, D. M. *et al.* Elevated Plasma Levels of Matrix Metalloproteinase-9 in Patients with Abdominal Aortic Aneurysms: A Circulating Marker of Degenerative Aneurysm Disease. *J. Vasc. Interv. Radiol.* **11**, 1345–1352 (2000).
297. Sangiorgi, G. *et al.* Plasma Levels of Metalloproteinases-3 and -9 as Markers of Successful Abdominal Aortic Aneurysm Exclusion After Endovascular Graft Treatment. *Circulation* **104**, I-288–I-295 (2001).
298. Shipley, J. M., Wesselschmidt, R. L., Kobayashi, D. K., Ley, T. J. & Shapiro, S. D. Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 3942–3946 (1996).
299. Luttun, A. *et al.* Loss of Matrix Metalloproteinase-9 or Matrix Metalloproteinase-12 Protects Apolipoprotein E-Deficient Mice Against Atherosclerotic Media Destruction but Differentially Affects Plaque Growth. *Circulation* **109**, 1408–1414 (2004).
300. Longo, G. M. *et al.* MMP-12 has a role in abdominal aortic aneurysms in mice. *Surgery* **137**, 457–462 (2005).
301. Mao, D., Lee, J. K., VanVickle, S. J. & Thompson, R. W. Expression of Collagenase-3 (MMP-13) in Human Abdominal Aortic Aneurysms and Vascular Smooth Muscle Cells in Culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**, 904–910 (1999).
302. Silence, J., Lupu, F., Collen, D. & Lijnen, H. R. Persistence of Atherosclerotic Plaque but Reduced Aneurysm Formation in Mice With Stromelysin-1 (MMP-3) Gene Inactivation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 1440–1445 (2001).
303. Nollendorfs, A., Greiner, T. C., Nagase, H. & Baxter, B. T. The expression and localization of membrane type-1 matrix metalloproteinase in human abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.* **34**, 316–322 (2001).
304. Xiong, W. *et al.* Membrane-type 1 Matrix Metalloproteinase Regulates Macrophage-dependent Elastolytic Activity and Aneurysm Formation *in Vivo*. *J. Biol. Chem.* **284**, 1765–1771 (2009).
305. McMillan, W. D. *et al.* In situ localization and quantification of mRNA for 92-kD type IV collagenase and its inhibitor in aneurysmal, occlusive, and normal aorta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**, 1139–1144 (1995).

306. Allaire, E., Forough, R., Clowes, M., Starcher, B. & Clowes, A. W. Local overexpression of TIMP-1 prevents aortic aneurysm degeneration and rupture in a rat model. *J. Clin. Invest.* **102**, 1413–1420 (1998).
307. Eskandari, M. K. *et al.* Enhanced abdominal aortic aneurysm in TIMP-1-deficient mice. *J. Surg. Res.* **123**, 289–293 (2005).
308. Satoh, H. *et al.* Expression and localization of tumour necrosis factor- $\alpha$  and its converting enzyme in human abdominal aortic aneurysm. *Clin. Sci.* **106**, 301–306 (2004).
309. Folkesson, M. *et al.* Proteolytically active ADAM10 and ADAM17 carried on membrane microvesicles in human abdominal aortic aneurysms. *Thromb. Haemost.* **114**, 1165–1174 (2015).
310. Kawai, T. *et al.* Vascular ADAM17 (a Disintegrin and Metalloproteinase Domain 17) Is Required for Angiotensin II/ $\beta$ -Aminopropionitrile-Induced Abdominal Aortic Aneurysm. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **70**, 959–963 (2017).
311. Sukhova, G. K., Shi, G. P., Simon, D. I., Chapman, H. A. & Libby, P. Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* **102**, 576–583 (1998).
312. Qin, Y. *et al.* Deficiency of cathepsin S attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovasc. Res.* **96**, 401–410 (2012).
313. Sun, J. *et al.* Cathepsin K deficiency reduces elastase perfusion-induced abdominal aortic aneurysms in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 15–23 (2012).
314. Sun Jiusong *et al.* Cathepsin L Activity Is Essential to Elastase Perfusion-Induced Abdominal Aortic Aneurysms in Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 2500–2508 (2011).
315. Shi, G.-P. *et al.* Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms. *J. Clin. Invest.* **104**, 1191–1197 (1999).
316. Furubayashi, K. *et al.* Chymase activates promatrix metalloproteinase-9 in human abdominal aortic aneurysm. *Clin. Chim. Acta* **388**, 214–216 (2008).
317. Chamberlain, C. M. *et al.* Perforin-Independent Extracellular Granzyme B Activity Contributes to Abdominal Aortic Aneurysm. *Am. J. Pathol.* **176**, 1038–1049 (2010).
318. Houard, X. *et al.* Topology of the fibrinolytic system within the mural thrombus of human abdominal aortic aneurysms. *J. Pathol.* **212**, 20–28 (2007).
319. Reilly, J. M., Sicard, G. A. & Lucore, C. L. Abnormal expression of plasminogen activators in aortic aneurysmal and occlusive disease. *J. Vasc. Surg.* **19**, 865–872 (1994).
320. Cuadrado, E. *et al.* Tissue plasminogen activator (t-PA) promotes neutrophil degranulation and MMP-9 release. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 207–214 (2008).
321. Uchida, H. A., Poduri, A., Subramanian, V., Cassis, L. A. & Daugherty, A. Urokinase-Type Plasminogen Activator Deficiency in Bone Marrow-Derived Cells Augments Rupture of Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysms. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 2845–2852 (2011).
322. Allaire, E. *et al.* Prevention of aneurysm development and rupture by local overexpression of plasminogen activator inhibitor-1. *Circulation* **98**, 249–255 (1998).
323. Owens, G. K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol. Rev.* **75**, 487–517 (1995).
324. López-Candales, A. *et al.* Decreased vascular smooth muscle cell density in medial degeneration of human abdominal aortic aneurysms. *Am. J. Pathol.* **150**, 993–1007 (1997).
325. Ailawadi, G. *et al.* Smooth muscle phenotypic modulation is an early event in aortic aneurysms. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **138**, 1392–1399 (2009).
326. Holmes, D. R., López-Candales, A., Liao, S. & Thompson, R. W. Smooth Muscle Cell Apoptosis and p53 Expression in Human Abdominal Aortic Aneurysms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **800**, 286–287 (1996).
327. Henderson, E. L. *et al.* Death of Smooth Muscle Cells and Expression of Mediators of Apoptosis

- by T Lymphocytes in Human Abdominal Aortic Aneurysms. *Circulation* **99**, 96–104 (1999).
328. Lacolley, P., Regnault, V., Nicoletti, A., Li, Z. & Michel, J.-B. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc. Res.* **95**, 194–204 (2012).
329. Zhong, L. *et al.* SM22 $\alpha$  (Smooth Muscle 22 $\alpha$ ) Prevents Aortic Aneurysm Formation by Inhibiting Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching Through Suppressing Reactive Oxygen Species/NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor- $\kappa$ B). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **39**, (2019).
330. Salmon, M. *et al.* KLF4 Regulates Abdominal Aortic Aneurysm Morphology and Deletion Attenuates Aneurysm Formation. *Circulation* **128**, S163–S174 (2013).
331. Airhart, N. *et al.* Smooth muscle cells from abdominal aortic aneurysms are unique and can independently and synergistically degrade insoluble elastin. *J. Vasc. Surg.* **60**, 1033-1042.e5 (2014).
332. Hao, H. *et al.* Heterogeneity of Smooth Muscle Cell Populations Cultured From Pig Coronary Artery. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 1093–1099 (2002).
333. Ichii, T. *et al.* Fibrillar Collagen Specifically Regulates Human Vascular Smooth Muscle Cell Genes Involved in Cellular Responses and the Pericellular Matrix Environment. *Circ. Res.* **88**, 460–467 (2001).
334. Thyberg, J. & Hultgårdh-Nilsson, A. Fibronectin and the basement membrane components laminin and collagen type IV influence the phenotypic properties of subcultured rat aortic smooth muscle cells differently. *Cell Tissue Res.* **276**, 263–271 (1994).
335. Hedin, U., Bottger, B. A., Forsberg, E., Johansson, S. & Thyberg, J. Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* **107**, 307–319 (1988).
336. Juliano, R. L. & Haskill, S. Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* **120**, 577–585 (1993).
337. Bascands, J.-L. *et al.* Angiotensin II Induces Phenotype-Dependent Apoptosis in Vascular Smooth Muscle Cells. *Hypertension* **38**, 1294–1299 (2001).
338. Geng, Y.-J., Wu, Q., Muszynski, M., Hansson, G. K. & Libby, P. Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells Induced by In Vitro Stimulation With Interferon- $\gamma$ , Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , and Interleukin-1 $\beta$ . *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 19–27 (1996).
339. Yamanouchi, D. *et al.* Effects of Caspase Inhibitor on Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm in Apolipoprotein E–Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 702–707 (2010).
340. Allaire, E. *et al.* Paracrine effect of vascular smooth muscle cells in the prevention of aortic aneurysm formation. *J. Vasc. Surg.* **36**, 1018–1026 (2002).
341. Harter, L. P., Gross, B. H., Callen, P. W. & Barth, R. A. Ultrasonic evaluation of abdominal aortic thrombus. *J. Ultrasound Med.* **1**, 315–318 (1982).
342. Touat, Z. *et al.* Renewal of Mural Thrombus Releases Plasma Markers and Is Involved in Aortic Abdominal Aneurysm Evolution. *Am. J. Pathol.* **168**, 1022–1030 (2006).
343. Yamazumi, K., Ojio, M., Okumura, H. & Aikou, T. An activated state of blood coagulation and fibrinolysis in patients with abdominal aortic aneurysm. *Am. J. Surg.* **175**, 297–301 (1998).
344. Wolf, Y. G. *et al.* Computed tomography scanning findings associated with rapid expansion of abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.* **20**, 529–538 (1994).
345. Vorp, D. A. *et al.* Association of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm with local hypoxia and wall weakening. *J. Vasc. Surg.* **34**, 291–299 (2001).
346. Kazi, M. *et al.* Influence of intraluminal thrombus on structural and cellular composition of abdominal aortic aneurysm wall. *J. Vasc. Surg.* **38**, 1283–1292 (2003).
347. Adolph, R. *et al.* Cellular content and permeability of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm. *J. Vasc. Surg.* **25**, 916–926 (1997).
348. Fontaine, V. *et al.* Involvement of the Mural Thrombus as a Site of Protease Release and Activation in Human Aortic Aneurysms. *Am. J. Pathol.* **161**, 1701–1710 (2002).

349. Tacke, F. & Randolph, G. J. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* **211**, 609–618 (2006).
350. Williams, M., Mildner, A. & Yona, S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity* **49**, 595–613 (2018).
351. Yasaka, T., Mantich, N. M., Boxer, L. A. & Baehner, R. L. Functions of human monocyte and lymphocyte subsets obtained by countercurrent centrifugal elutriation: differing functional capacities of human monocyte subsets. *J. Immunol.* **127**, 1515–1518 (1981).
352. Zembala, M., Uracz, W., Ruggiero, I., Mytar, B. & Pryjma, J. Isolation and functional characteristics of FcR<sup>+</sup> and FcR<sup>-</sup> human monocyte subsets. *J. Immunol.* **133**, 1293–1299 (1984).
353. Arenson, E. B., Epstein, M. B. & Seeger, R. C. Volumetric and functional heterogeneity of human monocytes. *J. Clin. Invest.* **65**, 613–618 (1980).
354. Ziegler-Heitbrock, L. Monocyte subsets in man and other species. *Cell. Immunol.* **289**, 135–139 (2014).
355. Cros, J. *et al.* Human CD14<sup>dim</sup> Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity* **33**, 375–386 (2010).
356. Idzkowska, E. *et al.* The Role of Different Monocyte Subsets in the Pathogenesis of Atherosclerosis and Acute Coronary Syndromes. *Scand. J. Immunol.* **82**, 163–173 (2015).
357. Wong, K. L. *et al.* Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* **118**, e16–e31 (2011).
358. Ingersoll, M. A., Platt, A. M., Potteaux, S. & Randolph, G. J. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Trends Immunol.* **32**, 470–477 (2011).
359. Zawada, A. M. *et al.* SuperSAGE evidence for CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes as a third monocyte subset. *Blood* **118**, e50–e61 (2011).
360. Ancuta, P. *et al.* Fractalkine Preferentially Mediates Arrest and Migration of CD16<sup>+</sup> Monocytes. *J. Exp. Med.* **197**, 1701–1707 (2003).
361. Pulliam, L., Gascon, R., Stubblebine, M., McGuire, D. & McGrath, M. S. Unique monocyte subset in patients with AIDS dementia. *The Lancet* **349**, 692–695 (1997).
362. Tallone, T. *et al.* Heterogeneity of Human Monocytes: An Optimized Four-Color Flow Cytometry Protocol for Analysis of Monocyte Subsets. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **4**, 211–219 (2011).
363. Belge, K.-U. *et al.* The Proinflammatory CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> DR<sup>++</sup> Monocytes Are a Major Source of TNF. *J. Immunol.* **168**, 3536–3542 (2002).
364. Rogacev, K. S. *et al.* CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> Monocytes Independently Predict Cardiovascular Events. *J. Am. Coll. Cardiol.* **60**, 1512–1520 (2012).
365. Ghigliotti, G. *et al.* CD16<sup>+</sup> Monocyte Subsets Are Increased in Large Abdominal Aortic Aneurysms and Are Differentially Related with Circulating and Cell-Associated Biochemical and Inflammatory Biomarkers. *Dis. Markers* **34**, 131–142 (2013).
366. Sunderkötter, C. *et al.* Subpopulations of Mouse Blood Monocytes Differ in Maturation Stage and Inflammatory Response. *J. Immunol.* **172**, 4410–4417 (2004).
367. Randolph, G. J. The fate of monocytes in atherosclerosis. *J. Thromb. Haemost.* **7**, 28–30 (2009).
368. Jung, S. *et al.* Analysis of Fractalkine Receptor CX3CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4106–4114 (2000).
369. Geissmann, F., Jung, S. & Littman, D. R. Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity* **19**, 71–82 (2003).
370. Tacke, F. *et al.* Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* **117**, 185–194 (2007).
371. Nahrendorf, M. *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.* **204**, 3037–3047 (2007).
372. Zougari, Y. *et al.* B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after

- acute myocardial infarction. *Nat. Med.* **19**, 1273–1280 (2013).
373. Auffray, C. *et al.* Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior. *Science* **317**, 666–670 (2007).
374. Mildner, A. *et al.* Genomic Characterization of Murine Monocytes Reveals C/EBP $\beta$  Transcription Factor Dependence of Ly6C<sup>+</sup> Cells. *Immunity* **46**, 849–862.e7 (2017).
375. Satoh, T. *et al.* Identification of an atypical monocyte and committed progenitor involved in fibrosis. *Nature* **541**, 96–101 (2017).
376. Kurotaki, D. *et al.* Essential role of the IRF8-KLF4 transcription factor cascade in murine monocyte differentiation. *Blood* **121**, 1839–1849 (2013).
377. McKercher, S. R. *et al.* Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J.* **15**, 5647–5658 (1996).
378. Serbina, N. V. & Pamer, E. G. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* **7**, 311–317 (2006).
379. Tsou, C.-L. *et al.* Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J. Clin. Invest.* **117**, 902–909 (2007).
380. Polletti, S. & Natoli, G. Understanding Spontaneous Conversion: The Case of the Ly6C<sup>+</sup> Monocyte. *Immunity* **46**, 764–766 (2017).
381. Patel, A. A. *et al.* The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J. Exp. Med.* **214**, 1913–1923 (2017).
382. Hettinger, J. *et al.* Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat. Immunol.* **14**, 821–830 (2013).
383. Swirski, F. K. *et al.* Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites. *Science* **325**, 612–616 (2009).
384. Bruemmer, D. *et al.* Angiotensin II-accelerated atherosclerosis and aneurysm formation is attenuated in osteopontin-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **112**, 1318–1331 (2003).
385. Liu, Z. *et al.* Thrombospondin-1 (TSP1) Contributes to the Development of Vascular Inflammation by Regulating Monocytic Cell Motility in Mouse Models of Abdominal Aortic Aneurysm. *Circ. Res.* **117**, 129–141 (2015).
386. Swirski, F. K. *et al.* Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J. Clin. Invest.* **117**, 195–205 (2007).
387. Dutta, P. & Nahrendorf, M. Regulation and consequences of monocytosis. *Immunol. Rev.* **262**, 167–178 (2014).
388. Leuschner, F. *et al.* Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition Prevents the Release of Monocytes From Their Splenic Reservoir in Mice With Myocardial Infarction. *Circ. Res.* **107**, 1364–1373 (2010).
389. Leuschner, F. *et al.* Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopoiesis. *J. Exp. Med.* **209**, 123–137 (2012).
390. van der Laan, A. M. *et al.* Monocyte subset accumulation in the human heart following acute myocardial infarction and the role of the spleen as monocyte reservoir. *Eur. Heart J.* **35**, 376–385 (2014).
391. Robbins, C. S. *et al.* Extramedullary Hematopoiesis Generates Ly-6C<sup>high</sup> Monocytes That Infiltrate Atherosclerotic Lesions. *Circulation* **125**, 364–374 (2012).
392. Moore, J. P. *et al.* M2 macrophage accumulation in the aortic wall during angiotensin II infusion in mice is associated with fibrosis, elastin loss, and elevated blood pressure. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **309**, H906–H917 (2015).
393. Kurihara, T., Warr, G., Loy, J. & Bravo, R. Defects in Macrophage Recruitment and Host Defense in Mice Lacking the CCR2 Chemokine Receptor. *J. Exp. Med.* **186**, 1757–1762 (1997).
394. Ishibashi, M. Bone Marrow-Derived Monocyte Chemoattractant Protein-1 Receptor CCR2 Is

- Critical in Angiotensin II-Induced Acceleration of Atherosclerosis and Aneurysm Formation in Hypercholesterolemic Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, e174–e178 (2004).
395. Daugherty, A. *et al.* Angiotensin II infusion promotes ascending aortic aneurysms: attenuation by CCR2 deficiency in apoE<sup>-/-</sup> mice. *Clin. Sci.* **118**, 681–689 (2010).
396. Tieu, B. C. *et al.* An adventitial IL-6/MCP1 amplification loop accelerates macrophage-mediated vascular inflammation leading to aortic dissection in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 3637–3651 (2009).
397. Leuschner, F. *et al.* Therapeutic siRNA silencing in inflammatory monocytes in mice. *Nat. Biotechnol.* **29**, 1005–1010 (2011).
398. Schall, T. J., Bacon, K., Toy, K. J. & Goeddel, D. V. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* **347**, 669–671 (1990).
399. von Hundelshausen, P. *et al.* RANTES Deposition by Platelets Triggers Monocyte Arrest on Inflamed and Atherosclerotic Endothelium. *Circulation* **103**, 1772–1777 (2001).
400. Iida, Y. *et al.* Peptide Inhibitor of CXCL4–CCL5 Heterodimer Formation, MKEY, Inhibits Experimental Aortic Aneurysm Initiation and Progression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 718–726 (2013).
401. MacTaggart, J. N., Xiong, W., Knispel, R. & Baxter, B. T. Deletion of CCR2 but not CCR5 or CXCR3 inhibits aortic aneurysm formation. *Surgery* **142**, 284–288 (2007).
402. Michineau, S. *et al.* Chemokine (C-X-C Motif) Receptor 4 Blockade by AMD3100 Inhibits Experimental Abdominal Aortic Aneurysm Expansion Through Anti-Inflammatory Effects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 1747–1755 (2014).
403. Halbwachs, L. & Lesavre, P. Endothelium-Neutrophil Interactions in ANCA-Associated Diseases. *J. Am. Soc. Nephrol.* **23**, 1449–1461 (2012).
404. Kubes, P. & Kanwar, S. Histamine induces leukocyte rolling in post-capillary venules. A P-selectin-mediated event. *J. Immunol.* **152**, 3570–3577 (1994).
405. Ley, K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol. Med.* **9**, 263–268 (2003).
406. Ramos, C. L. *et al.* Direct Demonstration of P-Selectin– and VCAM-1–Dependent Mononuclear Cell Rolling in Early Atherosclerotic Lesions of Apolipoprotein E–Deficient Mice. *Circ. Res.* **84**, 1237–1244 (1999).
407. Dong, Z. M., Brown, A. A. & Wagner, D. D. Prominent Role of P-Selectin in the Development of Advanced Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice. *Circulation* **101**, 2290–2295 (2000).
408. Patel, K. D., Cuvelier, S. L. & Wiehler, S. Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment. *Semin. Immunol.* **14**, 73–81 (2002).
409. Tedder, T. F., Steeber, D. A. & Pizcueta, P. L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. *J. Exp. Med.* **181**, 2259–2264 (1995).
410. Hannawa, K. K. *et al.* L-Selectin–Mediated Neutrophil Recruitment in Experimental Rodent Aneurysm Formation. *Circulation* **112**, 241–247 (2005).
411. Hickey, M. J. *et al.* L-Selectin Facilitates Emigration and Extravascular Locomotion of Leukocytes During Acute Inflammatory Responses In Vivo. *J. Immunol.* **165**, 7164–7170 (2000).
412. Hafezi-Moghadam, A., Thomas, K. L., Prorock, A. J., Huo, Y. & Ley, K. L-Selectin Shedding Regulates Leukocyte Recruitment. *J. Exp. Med.* **193**, 863–872 (2001).
413. Alon, R. & Feigelson, S. From rolling to arrest on blood vessels: leukocyte tap dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts. *Semin. Immunol.* **14**, 93–104 (2002).
414. Larson, R. S. & Springer, T. A. Structure and Function of Leukocyte Integrins. *Immunol. Rev.* **114**, 181–217 (1990).
415. Samadzadeh, K. M. *et al.* Monocyte activity is linked with abdominal aortic aneurysm diameter. *J. Surg. Res.* **190**, 328–334 (2014).
416. Lehr, H. A., Seemüller, J., Hübner, C., Menger, M. D. & Messmer, K. Oxidized LDL-induced

- leukocyte/endothelium interaction in vivo involves the receptor for platelet-activating factor. *Arterioscler. Thromb. J. Vasc. Biol.* **13**, 1013–1018 (1993).
417. Eriksson, E. E., Werr, J., Guo, Y., Thoren, P. & Lindbom, L. Direct Observations In Vivo on the Role of Endothelial Selectins and  $\alpha_4$  Integrin in Cytokine-Induced Leukocyte-Endothelium Interactions in the Mouse Aorta. *Circ. Res.* **86**, 526–533 (2000).
418. Ensan, S. *et al.* Self-renewing resident arterial macrophages arise from embryonic CX3CR1+ precursors and circulating monocytes immediately after birth. *Nat. Immunol.* **17**, 159–168 (2016).
419. Ait-Oufella, H. *et al.* Lactadherin Deficiency Leads to Apoptotic Cell Accumulation and Accelerated Atherosclerosis in Mice. *Circulation* **115**, 2168–2177 (2007).
420. Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C. & Haslett, C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 965–975 (2002).
421. Menezes, S. *et al.* The Heterogeneity of Ly6Chi Monocytes Controls Their Differentiation into iNOS+ Macrophages or Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Immunity* **45**, 1205–1218 (2016).
422. Gosselin, D. *et al.* Environment Drives Selection and Function of Enhancers Controlling Tissue-Specific Macrophage Identities. *Cell* **159**, 1327–1340 (2014).
423. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 958–969 (2008).
424. Mantovani, A., Garlanda, C. & Locati, M. Macrophage Diversity and Polarization in Atherosclerosis: A Question of Balance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 1419–1423 (2009).
425. Mosser, D. M. The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* **73**, 209–212 (2003).
426. Jetten, N. *et al.* Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. *Angiogenesis* **17**, 109–118 (2014).
427. Tabas, I. & Bornfeldt, K. E. Macrophage Phenotype and Function in Different Stages of Atherosclerosis. *Circ. Res.* **118**, 653–667 (2016).
428. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 23–35 (2003).
429. Chinetti-Gbaguidi, G., Colin, S. & Staels, B. Macrophage subsets in atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.* **12**, 10–17 (2015).
430. Dutertre, C.-A. *et al.* Deciphering the Stromal and Hematopoietic Cell Network of the Adventitia from Non-Aneurysmal and Aneurysmal Human Aorta. *PLoS ONE* **9**, e89983 (2014).
431. Qin, Z. *et al.* Angiotensin II-induced TLR4 mediated abdominal aortic aneurysm in apolipoprotein E knockout mice is dependent on STAT3. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **87**, 160–170 (2015).
432. Spin, J. M. *et al.* Transcriptional profiling and network analysis of the murine angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm. *Physiol. Genomics* **43**, 993–1003 (2011).
433. Takei, Y., Tanaka, T., Kent, K. C. & Yamanouchi, D. Osteoclastogenic Differentiation of Macrophages in the Development of Abdominal Aortic Aneurysms. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36**, 1962–1971 (2016).
434. Bouchon, A., Dietrich, J. & Colonna, M. Cutting Edge: Inflammatory Responses Can Be Triggered by TREM-1, a Novel Receptor Expressed on Neutrophils and Monocytes. *J. Immunol.* **164**, 4991–4995 (2000).
435. Klesney-Tait, J., Turnbull, I. R. & Colonna, M. The TREM receptor family and signal integration. *Nat. Immunol.* **7**, 1266–1273 (2006).
436. Allcock, R. J. N., Barrow, A. D., Forbes, S., Beck, S. & Trowsdale, J. The human TREM gene cluster at 6p21.1 encodes both activating and inhibitory single IgV domain receptors and includes NKp44. *Eur. J. Immunol.* **33**, 567–577 (2003).
437. Chen, L. C., Laskin, J. D., Gordon, M. K. & Laskin, D. L. Regulation of TREM expression in hepatic macrophages and endothelial cells during acute endotoxemia. *Exp. Mol. Pathol.* **84**, 145–155 (2008).
438. Rigo, I. *et al.* Induction of triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-1) in airway

- epithelial cells by 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub>. *Innate Immun.* **18**, 250–257 (2012).
439. Schmausser, B. *et al.* Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) expression on gastric epithelium: implication for a role of TREM-1 in *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Exp. Immunol.* **152**, 88–94 (2008).
440. Jolly, L. *et al.* Targeted endothelial gene deletion of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 protects mice during septic shock. *Cardiovasc. Res.* **114**, 907–918 (2018).
441. Wang, F. *et al.* Increased serum TREM-1 level is associated with in-stent restenosis, and activation of TREM-1 promotes inflammation, proliferation and migration in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **267**, 10–18 (2017).
442. Paloneva, J. *et al.* DAP12/TREM2 deficiency results in impaired osteoclast differentiation and osteoporotic features. *J. Exp. Med.* **198**, 669–675 (2003).
443. Takahashi, K., Rochford, C. D. P. & Neumann, H. Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *J. Exp. Med.* **201**, 647–657 (2005).
444. Turnbull, I. R. *et al.* Cutting edge: TREM-2 attenuates macrophage activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **177**, 3520–3524 (2006).
445. Washington, A. V. *et al.* A TREM family member, TLT-1, is found exclusively in the alpha-granules of megakaryocytes and platelets. *Blood* **104**, 1042–1047 (2004).
446. Tessarz, A. S. & Cerwenka, A. The TREM-1/DAP12 pathway. *Immunol. Lett.* **116**, 111–116 (2008).
447. Arts, R. J. W., Joosten, L. A. B., van der Meer, J. W. M. & Netea, M. G. TREM-1: intracellular signaling pathways and interaction with pattern recognition receptors. *J. Leukoc. Biol.* **93**, 209–215 (2013).
448. Bouchon, A., Facchetti, F., Weigand, M. A. & Colonna, M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* **410**, 1103–1107 (2001).
449. Bleharski, J. R. *et al.* A Role for Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 in Host Defense During the Early-Induced and Adaptive Phases of the Immune Response. *J. Immunol.* **170**, 3812–3818 (2003).
450. Zheng, H. *et al.* MYD88-dependent and -independent activation of TREM-1 via specific TLR ligands. *Eur. J. Immunol.* **40**, 162–171 (2009).
451. Fortin, C. F., Lesur, O. & Fulop, T. Effects of TREM-1 activation in human neutrophils: activation of signaling pathways, recruitment into lipid rafts and association with TLR4. *Int. Immunol.* **19**, 41–50 (2006).
452. Carrasco, K. *et al.* TREM-1 multimerization is essential for its activation on monocytes and neutrophils. *Cell. Mol. Immunol.* **16**, 460–472 (2019).
453. Gibot, S. *et al.* A Soluble Form of the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 Modulates the Inflammatory Response in Murine Sepsis. *J. Exp. Med.* **200**, 1419–1426 (2004).
454. Ornatowska, M. *et al.* Functional genomics of silencing TREM-1 on TLR4 signaling in macrophages. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **293**, L1377–L1384 (2007).
455. Dower, K., Ellis, D. K., Saraf, K., Jelinsky, S. A. & Lin, L.-L. Innate Immune Responses to TREM-1 Activation: Overlap, Divergence, and Positive and Negative Cross-Talk with Bacterial Lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **180**, 3520–3534 (2008).
456. Zeng, H., Ornatowska, M., Joo, M. S. & Sadikot, R. T. TREM-1 expression in macrophages is regulated at transcriptional level by NF- $\kappa$ B and PU.1. *Eur. J. Immunol.* **37**, 2300–2308 (2007).
457. Netea, M. G. *et al.* Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) amplifies the signals induced by the NACHT-LRR (NLR) pattern recognition receptors. *J. Leukoc. Biol.* **80**, 1454–1461 (2006).
458. Prüfer, S. *et al.* Distinct Signaling Cascades of TREM-1, TLR and NLR in Neutrophils and

- Monocytic Cells. *J. Innate Immun.* **6**, 339–352 (2014).
459. Haselmayer, P., Grosse-Hovest, L., von Landenberg, P., Schild, H. & Radsak, M. P. TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation. *Blood* **110**, 1029–1035 (2007).
460. Fu, L. *et al.* Identification of Extracellular Actin As a Ligand for Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 Signaling. *Front. Immunol.* **8**, 917 (2017).
461. El Mezayen, R. *et al.* Endogenous signals released from necrotic cells augment inflammatory responses to bacterial endotoxin. *Immunol. Lett.* **111**, 36–44 (2007).
462. Wu, J. *et al.* The Pro-inflammatory Myeloid Cell Receptor TREM-1 Controls Kupffer Cell Activation and Development of Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res.* **72**, 3977–3986 (2012).
463. Lo, T.-H. *et al.* TREM-1 regulates macrophage polarization in ureteral obstruction. *Kidney Int.* **86**, 1174–1186 (2014).
464. Read, C. B. *et al.* Cutting Edge: Identification of Neutrophil PGLYRP1 as a Ligand for TREM-1. *J. Immunol.* **194**, 1417–1421 (2015).
465. Boufenzler, A. *et al.* TREM-1 Mediates Inflammatory Injury and Cardiac Remodeling Following Myocardial Infarction. *Circ. Res.* **116**, 1772–1782 (2015).
466. Derive, M. *et al.* Soluble Trem-like Transcript-1 Regulates Leukocyte Activation and Controls Microbial Sepsis. *J. Immunol.* **188**, 5585–5592 (2012).
467. Gomez-Pina, V. *et al.* Metalloproteinases Shed TREM-1 Ectodomain from Lipopolysaccharide-Stimulated Human Monocytes. *J. Immunol.* **179**, 4065–4073 (2007).
468. Mahdy, A. M., Lowes, D. A., Galley, H. F., Bruce, J. E. & Webster, N. R. Production of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells by lipopolysaccharide-stimulated human neutrophils involves de novo protein synthesis. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* **13**, 492–495 (2006).
469. Gingras, M.-C., Lapillonne, H. & Margolin, J. F. TREM-1, MDL-1, and DAP12 expression is associated with a mature stage of myeloid development. *Mol. Immunol.* **38**, 817–824 (2002).
470. Tomita, H. *et al.* Elevated serum concentrations of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in diffuse cutaneous systemic sclerosis: association with severity of pulmonary fibrosis. *J. Rheumatol.* **37**, 787–791 (2010).
471. Tammaro, A. *et al.* TREM-1 and its potential ligands in non-infectious diseases: from biology to clinical perspectives. *Pharmacol. Ther.* **177**, 81–95 (2017).
472. Nathan, C. & Ding, A. TREM-1: A new regulator of innate immunity in sepsis syndrome. *Nat. Med.* **7**, 530–532 (2001).
473. Gibot, S. *et al.* Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells and the diagnosis of pneumonia. *N. Engl. J. Med.* **350**, 451–458 (2004).
474. Gibot, S. *et al.* Plasma level of a triggering receptor expressed on myeloid cells-1: its diagnostic accuracy in patients with suspected sepsis. *Ann. Intern. Med.* **141**, 9–15 (2004).
475. Weber, B. *et al.* TREM-1 Deficiency Can Attenuate Disease Severity without Affecting Pathogen Clearance. *PLoS Pathog.* **10**, e1003900 (2014).
476. Lin, Y.-T. *et al.* TREM-1 promotes survival during *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in mice. *Infect. Immun.* **82**, 1335–1342 (2014).
477. Campanholle, G. *et al.* TLR-2/TLR-4 TREM-1 Signaling Pathway Is Dispensable in Inflammatory Myeloid Cells during Sterile Kidney Injury. *PLoS ONE* **8**, e68640 (2013).
478. Liu, M., Wu, W., Zhao, Q., Feng, Q. & Wang, W. High Expression Levels of Trigger Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 on Neutrophils Associated with Increased Severity of Acute Pancreatitis in Mice. *Biol. Pharm. Bull.* **38**, 1450–1457 (2015).
479. Kamei, K. *et al.* Role of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in experimental severe acute pancreatitis. *J. Hepato-Biliary-Pancreat. Sci.* **17**, 305–312 (2010).
480. Ferat-Osorio, E. *et al.* Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 expression on monocytes is associated with inflammation but not with infection in acute pancreatitis. *Crit. Care Lond. Engl.* **13**,

R69 (2009).

481. Yasuda, T. *et al.* Increased levels of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in patients with acute pancreatitis. *Crit. Care Med.* **36**, 2048–2053 (2008).
482. Gibot, S. *et al.* Effects of the TREM-1 pathway modulation during mesenteric ischemia-reperfusion in rats. *Crit. Care Med.* **36**, 504–510 (2008).
483. Schenk, M., Bouchon, A., Seibold, F. & Mueller, C. TREM-1-expressing intestinal macrophages crucially amplify chronic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel diseases. *J. Clin. Invest.* **117**, 3097–3106 (2007).
484. Collins, C. E. *et al.* Elevated synovial expression of triggering receptor expressed on myeloid cells 1 in patients with septic arthritis or rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **68**, 1768–1774 (2009).
485. Koussoulas, V. *et al.* Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells (sTREM-1): a new mediator involved in the pathogenesis of peptic ulcer disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **18**, 375–379 (2006).
486. Murakami, Y. *et al.* Induction of triggering receptor expressed on myeloid cells 1 in murine resident peritoneal macrophages by monosodium urate monohydrate crystals. *Arthritis Rheum.* **54**, 455–462 (2006).
487. Nguyen-Lefebvre, A. T. *et al.* The innate immune receptor TREM-1 promotes liver injury and fibrosis. *J. Clin. Invest.* **128**, 4870–4883 (2018).
488. Duan, M. *et al.* TREM-1, an inflammatory modulator, is expressed in hepatocellular carcinoma cells and significantly promotes tumor progression. *Ann. Surg. Oncol.* **22**, 3121–3129 (2015).
489. Ho, C.-C. *et al.* TREM-1 Expression in Tumor-associated Macrophages and Clinical Outcome in Lung Cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**, 763–770 (2008).
490. Yuan, Z. *et al.* TREM-1 Is Induced in Tumor Associated Macrophages by Cyclo-Oxygenase Pathway in Human Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS ONE* **9**, e94241 (2014).
491. Joffre, J. *et al.* Genetic and Pharmacological Inhibition of TREM-1 Limits the Development of Experimental Atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **68**, 2776–2793 (2016).
492. Zysset, D. *et al.* TREM-1 links dyslipidemia to inflammation and lipid deposition in atherosclerosis. *Nat. Commun.* **7**, 13151 (2016).
493. Li, H., Hong, F., Pan, S., Lei, L. & Yan, F. Silencing Triggering Receptors Expressed on Myeloid Cells-1 Impaired the Inflammatory Response to Oxidized Low-Density Lipoprotein in Macrophages. *Inflammation* **39**, 199–208 (2016).
494. Golovkin, A. S. *et al.* Association of TLR and TREM-1 gene polymorphisms with risk of coronary artery disease in a Russian population. *Gene* **550**, 101–109 (2014).
495. Matsumoto, S. *et al.* Impact of RGS2 deficiency on the therapeutic effect of telmisartan in angiotensin II-induced aortic aneurysm. *Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens.* **33**, 1244–1249 (2010).
496. Mikolajczyk, T. P. *et al.* Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T-cell accumulation, and vascular dysfunction in hypertension. *FASEB J.* **30**, 1987–1999 (2016).
497. Aldasoro Arguinano, A.-A. *et al.* TREM-1 SNP rs2234246 regulates TREM-1 protein and mRNA levels and is associated with plasma levels of L-selectin. *PLOS ONE* **12**, e0182226 (2017).
498. Eagleton, M. J. *et al.* Early Increased MT1-MMP Expression and Late MMP-2 and MMP-9 Activity during Angiotensin II Induced Aneurysm Formation. *J. Surg. Res.* **135**, 345–351 (2006).

## RESUME

L'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA) représente une des principales causes de décès cardiovasculaires à travers le monde, principalement parmi les hommes de plus de 65 ans. L'AAA se manifeste par une dilatation focale de l'aorte, qui est la conséquence d'un remodelage délétère de la paroi aortique, associant une infiltration inflammatoire importante, une perte des cellules musculaires lisses et un remaniement de la matrice extracellulaire, et dont le risque majeur est la rupture, potentiellement létale. De nombreuses études expérimentales et cliniques suggèrent que la dérégulation du système rénine-angiotensine serait impliquée dans le développement de l'AAA. TREM-1 (*Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1*) est un récepteur membranaire exprimé principalement par les cellules myéloïdes, dont l'activation amplifie la réponse immune innée, en association avec la voie des TLRs. L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier le rôle du récepteur TREM-1 dans le développement de l'anévrisme de l'aorte abdominale expérimental, en utilisant différentes approches « perte et gain de fonction » dans un modèle murin d'AAA induit par l'infusion continue d'angiotensine II (AngII).

Nous avons montré que l'infusion d'Ang II augmente le pool de monocytes classiques Ly6C<sup>hi</sup> exprimant TREM-1 *via* une activation du récepteur AT<sub>1</sub>R de façon indépendante du récepteur TLR4 chez la souris. La délétion génique de *Trem-1* chez la souris hypercholestérolémique *ApoE<sup>-/-</sup>Trem-1<sup>-/-</sup>* limite l'infiltration macrophagique, la réponse inflammatoire locale, l'activité métalloprotéinase, la dégradation du réseau élastique dans la paroi, et *in fine* réduit l'incidence et la sévérité de la dilatation anévrismale aortique. *A contrario* la stimulation pharmacologique de TREM-1 par un anticorps agoniste augmente le recrutement des monocytes classiques Ly6C<sup>hi</sup> dans la paroi aortique, la réponse locale pro-inflammatoire, la dégradation du réseau élastique et finalement aggrave la maladie anévrismale aortique. Enfin, le traitement par LR-12, un peptide inhibant l'activation de TREM-1, chez la souris *ApoE<sup>-/-</sup>* sous angiotensine II limite l'inflammation aortique, la dégradation matricielle et protège contre la dilatation aortique. Chez l'homme, l'expression génique et protéique de TREM-1 est augmentée dans les aortes anévrismales par rapport aux aortes saines et colocalise localement avec la présence de macrophages.

Pour conclure, nous avons montré que le récepteur TREM-1 est exprimé en réponse à l'angiotensine II et que TREM-1 est impliqué dans la physiopathologie de la maladie anévrismale aortique, en régulant le trafic et l'activation des monocytes dans la paroi aortique. L'inhibition de TREM-1 pourrait constituer une nouvelle stratégie thérapeutique pour limiter le développement et les complications de l'anévrisme de l'aorte abdominale.

# ABSTRACT

Abdominal Aortic Aneurysm (AAA) is one of the leading causes of cardiovascular death globally, especially among men over 65 years of age. AAA is characterized by a focal dilation of the aorta, which is the consequence of an adverse remodeling occurring in the aortic wall that entails a massive infiltration of inflammatory cells, a loss of smooth muscle cells and a structural and functional reorganization of the extracellular matrix resulting in life-threatening aneurysmal rupture. Clinical and experimental studies suggest that a dysregulated renin-angiotensin system is involved in AAA pathophysiology. TREM-1 (Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1) is a cell surface receptor mainly expressed by myeloid cells. TREM-1 engagement leads to the amplification of the innate immune response, in synergy with TLR pathways activation. The aim of this PhD project was to decipher the role of TREM-1 in AAA development and complications, using loss- or gain-of-function experimental strategies in a murine AngII-induced AAA model.

Here, we showed that AngII increases the pool of Ly6C<sup>hi</sup> classical monocytes expressing TREM-1 via AT<sub>1</sub>R stimulation, in a TLR4-independent manner, suggesting an interaction between renin-angiotensin system and TREM-1 signaling pathway. Genetic deletion of *Trem-1* in dyslipidemic *ApoE<sup>-/-</sup>Trem-1<sup>-/-</sup>* limits macrophage infiltration, inflammatory response, metalloproteinase activity and extracellular matrix remodeling, hampering AAA development. Conversely, pharmacologic stimulation of TREM-1 with an agonist antibody increases Ly6C<sup>hi</sup> monocyte recruitment in the aortic wall, local pro-inflammatory response and elastin degradation, which promotes AAA development. Pharmacologic inhibition of TREM-1 with LR12, an inhibitory peptide, was demonstrated to reduce AAA development by limiting early aortic inflammation and extracellular matrix degradation. In addition, TREM-1 was found to be localized with macrophage infiltration and that the gene and protein expression of TREM-1 were also found to be increased in human aneurysmal aortic tissue compared to control counterparts.

To conclude, we showed that TREM-1 receptor engagement is induced in response to AngII stimulation and is implicated in AAA development through regulation of monocyte trafficking and activation into the aortic wall. Inhibition of TREM-1 may thus constitute a promising novel therapeutic strategy to limit AAA development.