



HAL
open science

Analyse moléculaire des types cellulaires impliqués dans l'anévrisme de l'aorte abdominale

Ludovic Boytard

► **To cite this version:**

Ludovic Boytard. Analyse moléculaire des types cellulaires impliqués dans l'anévrisme de l'aorte abdominale. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2012. Français. NNT : 2012LIL2S035 . tel-00825204

HAL Id: tel-00825204

<https://theses.hal.science/tel-00825204>

Submitted on 23 May 2013

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.

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE LILLE 2
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE DE LILLE

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE
en Sciences de la Vie et de la Santé

**Analyse moléculaire des types cellulaires impliqués
dans l'anévrisme de l'aorte abdominale**

Soutenue publiquement le 20 décembre 2012 par

Ludovic BOYTARD

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Philippe Amouyel
Madame le Docteur Carmen Martinez
Monsieur le Docteur Jean-Baptiste Michel
Monsieur le Professeur Stephan Haulon
Monsieur le Professeur Didier Plissonnier
Madame le Docteur Florence Pinet

Président du Jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse

Unité INSERM U744 – Institut Pasteur de Lille

*A mon père,
parce que j'aurais malgré tout
apprécié que tu sois là pour voir ça.*

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais tout d'abord remercier le Professeur Philippe Amouyel pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ces travaux de thèse au sein de son laboratoire.

Je remercie également le Docteur Florence Pinet pour m'avoir suivi et aidé depuis mon premier passage au laboratoire pour mon stage de BTS. Merci de m'avoir redonné l'opportunité d'effectuer mon stage de master et de m'avoir confié un projet de thèse par la suite. Je vous suis très reconnaissant de m'avoir guidé lors de mes travaux et pour toute l'aide que vous m'avez apporté tout au long de ma thèse et de la rédaction de ce mémoire.

Je remercie ensuite les membres de mon jury de thèse : le Docteur Carmen Martinez et le Docteur Jean-Baptiste Michel pour me faire l'honneur d'avoir accepté d'être rapporteurs de ces travaux de thèse, ainsi que le Professeur Didier plissonnier pour avoir accepté d'assister à ma soutenance et de juger ces travaux de thèse et le Professeur Stephan Haulon pour la collaboration qui a rendu ce travail possible et pour avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse.

Je souhaiterais également remercier les membres de mon équipe et du laboratoire : un grand merci à Adelina pour m'avoir formé et soutenu lors de mon master et à Maggy et Olivia pour l'aide apportée pour certaines manipulations. Merci à Anne-Sophie et Chantal pour leur aide indispensable. Merci à Nadine pour toutes mes impressions en couleurs de trucs pas toujours appétissants et l'aide apportée au niveau informatique en général. Merci à tous les autres, ceux qui sont toujours présents au laboratoire et ceux qui sont déjà parti, Christophe Bauters, Nicolas Lamblin, Jean Dallongeville, Jean-Charles Lambert, Aline Meirhaeghe, Bart Dermaut, Marie, Marine, Lionel, Annie, Hélène, Florian, Julie, Anne-Marie, Frank, Louisa, Benjamin, Vincent, Pierre, Céline, Julien, Valérie, Thibaut, Julie Dumont, Xavier, Gianni, Chloé, Houssam, Clémence et tous ceux que je n'ai pas l'occasion de citer pour l'ambiance qui règne au laboratoire.

Je remercie aussi toutes les personnes avec qui nous avons collaboré, le service du Professeur Stephan Haulon pour leur disponibilité et leur implication dans la collecte des biopsies, l'équipe du Professeur Bart Staels, le Docteur Giulia Chinetti-Gbaguidi, Jonathan Vanhoutte et Bruno Derudas pour les appareils de microdissection laser et leur aide en q-PCR, ainsi que la plateforme de spectrométrie de masse de Lens et Johan Hachani pour sa rapidité de réaction et sa disponibilité.

Je voudrais particulièrement remercier tous ceux qui sont devenus des amis plus que des collègues. Merci à vous pour toutes nos discussions, nos soirées, nos rigolades. J'espère que ça continuera au-delà de la thèse.

Emilie, merci à toi ô vénérable de m'avoir soutenu quand c'était difficile. Même si tu n'es plus au labo tu feras toujours partie des meubles dans nos esprits. Et merci à Emeric pour m'avoir fait confiance et repassé le flambeau de l'association Bioaddoct. Encore tous mes vœux de bonheur à tous les deux.

Sophie, notre redoutable chaperon rouge. Merci d'avoir servi d'éclaireur dans les méandres administratifs qu'est l'inscription en thèse. Bon courage pour ta soutenance de thèse. Une pensée aussi pour Maxim, ne vas pas trop loin avec tes blagues !

Anaïs, même mariée tu restes notre Moumou nationale ! Bon courage également pour ta thèse. Je suis juste derrière toi. Merci aussi à David pour les jeux découverts, les bandes dessinées prêtées, et merci d'avoir organisé le voyage au Japon. J'ai hâte qu'on s'y retrouve tous pour manger des nouilles et rigoler.

Florent, merci pour tous nos délires ! Toujours plus loin, toujours plus forts, toujours plus décalés ! Il faut qu'on continue les cinémas hebdomadaires, je pense que c'est une bonne habitude. Un bon courage aussi pour ton génocide de souris et la fin de ta thèse.

La toute petite demi-Florie et ses dédicaces. Même si on a des goûts différents, ça fait toujours plaisir de partager des films. Et au moins on est d'accord sur Fight Club ! Laurent aussi, pour ses partages musicaux (merci de m'avoir fait découvrir ASF par exemple).

Rafaëlle, merci pour toute l'aide que tu m'as apporté tant au niveau des expériences qu'au niveau du moral. J'espère que la suite de ta thèse se déroulera pour le mieux et que tu trouveras plein de miARN.

Justine, merci pour ta bonne humeur continue et tes conseils médicaux (même si je ne regarde toujours pas les calories de ce que je mange).

Marion, je te souhaite bon courage pour la suite de ta thèse et j'espère que je serais là pour y assister. Toi et Jordan devez me rattraper sur les séries pour qu'on puisse en discuter !

Amandine, pour nos fous rires et pour avoir toujours quelque chose à dire pour m'éviter de penser à des choses déprimantes. Bon retour au labo et bon courage pour ton master et la suite.

Aude et Yoann, bon courage à vous deux pour la suite de vos projets professionnels et surtout avec votre « champion ». Yoann : entraîne-toi un peu en sport, c'est fatiguant de te battre en course de haie, basket, kayak, etc.

Fancy, merci aussi de ta bonne humeur et bonne continuation professionnellement et avec le petit Noam.

Je remercie tous mes amis, qui m'ont supporté jusque là et qui ont toujours été là quand j'en ai eu besoin.

Romuald, Mélanie (bon courage pour Psychotrope), Agathe, Amélie, Nico, Maximilien, Améline, Florian, Aurélie, Julien, Mélanie, Rémi, Greg, Clotilde, Raphaël, Mikael, Oussama, Thomas, Maxence, Pierre, Hugo, Yoan, Lucien, Olivier et tous les autres : merci.

Enfin merci à ma famille, qui a toujours été derrière moi, surtout quand j'en avais besoin. Un grand merci à ma mère, toujours présente et attentive, à Quentin, toujours disponible, à Vanissa, souris toujours, ça te va très bien, à Jean-Michel pour son énorme sympathie et pour me considérer comme son fils, à ma tante, mon parrain, mon cousin et mon grand-père, toujours encourageants. Je vous remercie tous du fond du cœur.

RESUME

L'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA) est une maladie vasculaire consistant en une dilatation de l'aorte abdominale. Son caractère asymptomatique rend importante la recherche de biomarqueurs afin de faciliter la prise en charge des patients.

Le but de mes travaux de thèse a été d'étudier spécifiquement les types cellulaires impliqués dans l'AAA.

Après obtention d'une banque d'échantillons d'AAA, nous avons localisé ces types cellulaires et repéré 3 zones d'intérêt : le thrombus intraluminal contenait des neutrophiles, lymphocytes T, mastocytes et macrophages M2. Les macrophages M1 étaient localisés dans l'adventice, avec les lymphocytes B et des mastocytes. La média contenait des cellules musculaires lisses (CML) dont le phénotype variait entre les états sain, anévrysmal et apoptotique.

Ces résultats suggérant une implication différente des deux types de macrophages et une évolution des CML au cours de l'AAA, nous avons isolé ces deux types cellulaires du tissu anévrysmal par microdissection laser afin d'y étudier l'expression de biomarqueurs potentiels. Nous avons ainsi montré que l'augmentation plasmatique de peroxiredoxine-1 provient des macrophages M1 et que l'augmentation d'ADAMTS5 provient des CML anévrysmales allongées.

Nous avons ensuite comparé les protéomes des macrophages M1 et M2 afin d'élucider leur rôle dans l'AAA et d'identifier de nouveaux biomarqueurs. Cinq protéines différentielles ont été identifiées impliquées dans la phagocytose ou la réponse au stress.

L'étude des différents types cellulaires impliqués dans l'AAA pourrait nous permettre une meilleure compréhension de ses mécanismes et l'identification de biomarqueurs potentiels de cette pathologie.

MOTS CLES

Anévrisme de l'aorte abdominale, humain, biomarqueurs, microdissection laser, immunohistochimie, protéomique, inflammation, macrophages, cellules musculaires lisses, tissus lymphoïdes tertiaires.

TITLE

Study of the different cell types involved in the development of abdominal aortic aneurysm

ABSTRACT

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is a vascular disease consisting in a dilatation of the abdominal aorta. As AAA is asymptomatic, it is important to identify new biomarkers in order to improve the early care management of patients.

The aim of this work was to study specifically the cell types involved in the development of AAA.

After collection of an AAA samples bank, we located these cell types among the tissue and highlighted 3 interesting areas: the intraluminal thrombus contained neutrophils, T lymphocytes, mast cells and M2 macrophages. M1 macrophages were located in the adventitia along with B lymphocytes and other mast cells. The media contained smooth muscle cells (SMC) with a phenotype varying from a healthy state, to an aneurysmal one and to an apoptotic one.

These results suggest a different role of the two subtypes of macrophages and an evolution of SMCs during AAA. Thus, we chose to isolate these subtypes from the aneurysmal tissue with laser microdissection in order to study the proteins differentially expressed between them that could be potential biomarkers. We showed that the plasmatic increase in peroxiredoxin-1 levels in AAA patients came from pro-inflammatory M1 macrophages and the increase in ADAMTS5 levels came from aneurysmal elongated SMCs.

We then compared the whole proteome of M1 and M2 macrophages in order to elucidate their role in AAA and identify new biomarkers. Five differentially expressed proteins were identified, implicated in phagocytosis and stress response.

The study of the different cell types involved in AAA could enable us a better understanding of its mechanisms and allow the identification of new potential biomarkers for this pathology.

KEYWORDS

Abdominal aortic aneurysm, human, biomarkers, laser microdissection, immunohistochemistry, proteomics, inflammation, macrophages, smooth muscle cells, tertiary lymphoid organs.

LISTE DES PUBLICATIONS

Ce travail de thèse a donné lieu aux publications et communications suivantes :

Publications originales dans des revues à comité de lecture :

Boytard L, Spear R, Chinetti-Gbaguidi G, Acosta-Martin AE, Vanhoutte J, Lamblin N, Staels B, Amouyel P, Haulon S, Pinet F. Role of proinflammatory CD68⁺MR⁻ macrophages in peroxiredoxin-1 expression and in abdominal aortic aneurysms in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (in press)

Boytard L, Spear R, Acosta-Martin AE, Amouyel P, Haulon S, Pinet F. Distribution and localization of inflammatory cells in human abdominal aortic aneurysm. *Int J Exp Pathol.* (soumis)

Acosta-Martin AE, Gwinner F, Boytard L, Chwastyniak M, Beseme O, Drobecq H, Duban-Deweert S, Juthier F, Jude B, Amouyel P, Pinet F, Schwikowski B. Identifications of additional proteins in differential proteomics using interaction networks. *Proteomics.* (soumis)

Communications dans des congrès :

Boytard L, Acosta-Martin AE, Chwastyniak M, Saels B, Amouyel P, Haulon S, Pinet F. Profil protéomique des cellules vasculaires impliquées dans l'anévrisme de l'aorte abdominale. *XXVII^{ème} Congrès du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRRC)*, Avril 2010, Nantes. Présentation poster.

Boytard L, Acosta-Martin AE, Chwastyniak M, Staels B, Amouyel P, Haulon S, Pinet F. Localisation des types cellulaires impliqués dans l'anévrisme de l'aorte abdominale. *XXVIII^{ème} Congrès du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRRC)*, Mai 2011, Lyon. Sélection pour présentation orale et présentation poster.

Boytard L, Spear R, Acosta-Martin AE, Chwastyniak M, Staels B, Amouyel P, Haulon S, Pinet F. Localisation et analyse protéomique des types cellulaires impliqués dans l'anévrisme de l'aorte abdominale. *XI^{ème} Colloque annuel des doctorants (Journée André Verbert)*, Septembre 2011, Lille. Sélection pour présentation orale.

Boytard L, Spear R, Acosta-Martin AE, Vanhoutte J, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B, Amouyel P, Haulon S, Pinet F. Etude phénotypique des cellules de l'inflammation impliquées dans l'anévrisme de l'aorte abdominale. *XXIX^{ème} Congrès du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRRC)*, Avril 2012, Bordeaux. Présentation poster.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
LISTE DES ABREVIATIONS	5
INTRODUCTION.....	9
1. Anévrisme de l'aorte abdominale.....	9
1.1. Définition.....	9
1.2. Anatomie	9
1.2.1. Aorte saine versus aorte anévrysmale	9
1.2.2. Thrombus intraluminal	10
1.3. Epidémiologie	11
1.4. Facteurs de risque.....	11
1.4.1. Age, sexe et ethnicité.....	11
1.4.2. Consommation de tabac	11
1.4.3. Athérombose	12
1.4.4. Hypertension	12
1.4.5. Diabète.....	13
1.4.6. Prédisposition génétique.....	13
1.4.7. Infections bactériennes	14
1.5. Mécanismes	15
1.5.1. Stress oxydatif	15
1.5.2. Extravasation tissulaire des leucocytes.....	15
1.5.2.1. Neutrophiles	15
1.5.2.2. Macrophages	16
1.5.2.3. Lymphocytes	16
1.5.2.4. Mastocytes.....	17
1.5.3. Dégradation de la matrice extracellulaire.....	18
1.6. Détection, prise en charge et chirurgie	19
1.6.1. Détection	19

Sommaire

1.6.2.	Prise en charge.....	20
1.6.3.	Chirurgie.....	20
1.7.	Biomarqueurs actuels	22
2.	Recherche de biomarqueurs	25
2.1.	Généralités.....	25
2.2.	Protéomique.....	25
2.3.	Types d'échantillons.....	28
2.3.1.	Modèles animaux.....	28
2.3.2.	Sérum, plasma	28
2.3.3.	Urine.....	31
2.3.4.	Cellules anévrysmales	31
2.3.5.	Tissus.....	32
2.4.	Techniques d'analyses protéomiques	33
2.4.1.	Fractionnement.....	33
	Méthodes en gel	33
	Méthodes sans gel	36
2.4.2.	Identification	37
	Sources	37
	Analyseurs.....	38
	Fragmentation.....	39
3.	Stratégie expérimentale	41
	RESULTATS.....	43
1.	Objectifs	43
2.	Constitution d'une banque d'échantillons	45
3.	Localisation des types cellulaires impliqués dans l'anévrysme de l'aorte abdominale.....	48
3.1.	Article : Distribution et localisation des cellules inflammatoires dans l'anévrysme de l'aorte abdominale.....	49
	Conclusion de l'article	51
3.2.	Localisation des cellules endothéliales.....	52

3.3. Localisation des cellules musculaires lisses	53
4. Etude des deux types de macrophages M1 et M2 isolés du tissu anévrysmal par microdissection laser	57
4.1. Article : Rôle des macrophages pro-inflammatoires CD68 ⁺ MR ⁻ dans l'expression de peroxyredoxine-1 dans les anévrysmes de l'aorte abdominale chez l'homme	58
Résultats complémentaires	59
Conclusion de l'article	62
4.2. Etude des profils protéomiques des deux types de macrophages M1 et M2	63
4.2.1. Mise au point de la technique 2D-DIGE	63
Test de la sensibilité de la technique 2D-DIGE	63
Mise au point du tampon d'extraction.....	64
4.2.2. Comparaison des profils protéomiques des macrophages de type M1 et M2	65
4.2.2.1. Méthodes	65
Isolement par microdissection laser des macrophages M1 et M2	65
Electrophorèse bidimensionnelle DIGE	65
Identification des spots par spectrométrie de masse.....	66
4.2.2.2. Résultats	66
4.2.3. Discussion, limitations et perspectives	71
5. Etude d'ADAMTS5, un biomarqueur potentiel de l'anévrysme de l'aorte abdominale dans les cellules musculaires lisses.....	75
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	81
BIBLIOGRAPHIE	87
ANNEXES	109
1. Annexe 1 : Images des spots différentiellement exprimés entre les macrophages M1 et M2	109
2. Annexe 2 : Identification de protéines additionnelles en protéomique différentielle grâce à un réseau d'interactions des protéines	111

LISTE DES ABREVIATIONS

- AAA : anévrisme de l'aorte abdominale
ACE : *angiotensin-converting enzyme*
ACN: acétonitrile
ADAMTS5 : *a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin-1 motifs 5*
ADN : acide désoxyribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messenger
AOMI : artériopathie oblitérante des membres inférieurs
ATLO : *adventitial tertiary lymphoid organ*
CapZ : protéine de coiffe des disques Z
CCL18 : *chemokine (C-C motif) ligand 18*
CD : cluster de différenciation
CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate
CHCA : acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
CID : dissociation induite par collision
CML : cellule musculaire lisse
CPA : cellule présentatrice d'antigène
Cy : cyanine
DIGE : *differential gel electrophoresis*
DTT : dithiothréitol
EDTA : éthylène diamine tétraacétique
ESI : ionisation par électrospray
ETD : dissociation induite par transfert d'électron
EVAR : opération par voie endovasculaire
FT-ICR : *fourier transform-ion cyclotron resonance*
GWA : *genome-wide association*
HCl : acide chlorhydrique
HDL : lipoprotéine de haute densité
HILIC : chromatographie liquide d'interactions hydrophiles
HSP : protéine de choc thermique
HUPO : organisation sur le protéome humain
IEF : iso-électro focalisation
Ig : immunoglobuline
IL1 β : interleukine 1 beta
ILT : thrombus intra-luminal

Liste des abréviations

IPG : gradient de pH immobilisé
IRM : imagerie par résonance magnétique
IT : trappe ionique
LC : chromatographie liquide
LDL : lipoprotéine de faible densité
Lp(a) : lipoprotéine a
MMP : métalloprotéase de matrice
MIF : facteur d'inhibition de la migration
miARN : micro ARN
MPT : modification post-traductionnelle
MS : spectrométrie de masse
m/z : rapport masse sur charge
MALDI : desorption-ionisation laser assistée par matrice
MGG : may-grunwald giemsa
MRC1 : récepteur au mannose de type C 1
NGAL : lipocaline associée à la gélatinase de neutrophile
OAR : opération de mise à plat
ORO : oil red O
PAGE : électrophorèse en gel de polyacrylamide
PFS : prélèvement à des fins scientifiques
pI : point isoélectrique
PMF : empreinte de masse peptidique
ppm : partie par million
PPP : projet du protéome du plasma
QPRC : *quantitative polymerase chain reaction*
Qtrap : quadripôle
ROS : dérivé réactif de l'oxygène
RPLC : chromatographie liquide en phase inverse
SAX : chromatographie d'échange d'anions forts
SCX : chromatographie d'échange de cations forts
SDS : sodium dodécyl sulfate
SMA : actine de cellule musculaire
TCEP : tris (2-carboxyethyl) phosphine
TDM : tomodensitométrie
TEMED : tetramethylethylenediamine
TFA : acide trifluoroacétique

TIMP : inhibiteur tissulaire de métalloprotéase

TNF : *tumor necrosis factor*

TOF : temps de vol

TQ : triple quadripôle

ULB : *urea lysis buffer*

WCX : chromatographie d'échange de cations faibles

INTRODUCTION

1. Anévrisme de l'aorte abdominale

1.1. Définition

L'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA) est une maladie vasculaire consistant en une dilatation de l'aorte au niveau abdominal (figure 1). Une autre définition, plus physiologique, d'un anévrisme de l'aorte abdominale est la perte de la fonction de contention du sang [Michel *et al.* 2008]. L'anévrisme de l'aorte abdominale se caractérise par une dégradation de la paroi au niveau anévrismal, entraînant une perte de sa rigidité et de son élasticité et pouvant conduire à la rupture d'anévrisme, souvent fatale pour le patient. Une aorte est considérée anévrismale lorsque son diamètre augmente de plus de 1,5 fois du diamètre normal d'une aorte et que l'on observe une perte du parallélisme des parois. Le diamètre d'une aorte varie en moyenne de 1,5 à 2 cm en fonction du sexe, on parle d'anévrisme lorsque le diamètre de l'aorte dépasse 3 cm. La figure 1 montre le schéma d'une aorte saine et d'une aorte présentant un anévrisme.

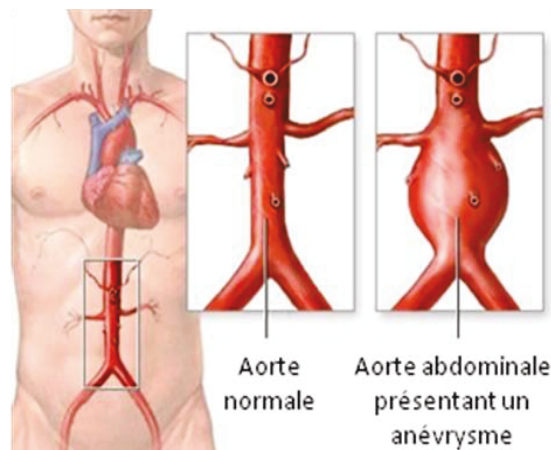


Figure 1. Schéma représentatif d'une aorte saine (à gauche) et anévrismale (à droite)

1.2. Anatomie

1.2.1. Aorte saine versus aorte anévrismale

La paroi d'une aorte saine est composée de 3 couches : l'intima, la média et l'adventice (figure 2). L'intima est composée principalement d'endothélium et est l'interface entre la paroi aortique et le sang. La média est composée de cellules musculaires lisses (CML), ainsi que d'élastine et collagène composant la matrice extracellulaire et principaux constituants structurels de l'aorte. Ce sont ces protéines qui vont donner à l'aorte son élasticité et sa rigidité. Enfin, l'adventice est composée de cellules graisseuses et de tissu conjonctif. Dans le cas d'une aorte anévrismale, on observe une

Introduction

dégradation de la matrice extracellulaire et une mort des cellules musculaires lisses, entraînant un amincissement de la média et une dégradation de l'adventice. On observe aussi dans la plupart des cas la formation d'un thrombus intraluminal (ILT) (figure 2).

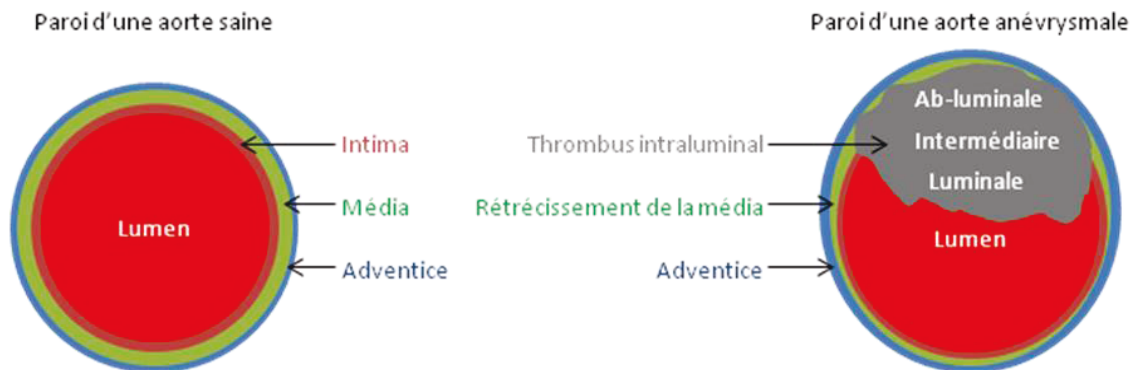


Figure 2. Schéma représentatif des différentes couches d'une paroi aortique saine (à gauche) et anévrysmale (à droite)

1.2.2. Thrombus intraluminal

Le thrombus intraluminal est un caillot formé au sein de l'aorte, à l'interface avec le sang. Il est composé de couches de fibrine plus ou moins dégradées. En effet, le thrombus intraluminal peut lui-même être divisé en plusieurs couches. Dans la partie luminale du thrombus, on observe un agrégat d'hématies et de la fibrine organisée en un réseau non dégradé alors qu'on observe un réseau fibrinolyté dans la partie ab-luminale du thrombus. Une hypothèse a été formulée selon laquelle les différentes couches du thrombus représentent différents temps de sa formation. Le thrombus se formerait alors d'une suite de coagulation à l'interface luminale et d'une dégradation des couches plus anciennes [Michel *et al.* 2011].

L'agglutination des hématies dans la partie luminale du thrombus va relâcher dans le milieu de l'hémoglobine libre, dont la dégradation va entraîner un stress oxydatif. D'autre part, l'action de la thrombine sur le fibrinogène va former un réseau de fibrine. Elle va aussi être responsable de l'activation et la rétention de plasminogène [Houard *et al.* 2009], impliqué dans la lyse progressive de la fibrine [Fontaine *et al.* 2002]. Enfin, l'activation des plaquettes va entraîner la rétention de leucocytes. Les couches intermédiaires et ab-luminales sont moins riches en cellules du sang.

Il a été démontré que la présence d'un thrombus intraluminal est liée à une épaisseur moindre de la paroi aortique, une plus forte activité protéolytique, moins de cellules musculaires lisses dans la média et une plus forte extravasation des leucocytes dans l'adventice [Kazi *et al.* 2003].

1.3. Epidémiologie

L'anévrisme de l'aorte abdominale a une prévalence de 5% chez les hommes âgés et est une des principales causes de décès dans les pays développés avec 1 à 4% de la mortalité chez les hommes de plus de 65 ans. Suite à une rupture d'anévrisme, la mortalité s'élève à 70 à 95%. Le risque de rupture de l'anévrisme augmente en fonction de la taille de l'anévrisme. En effet, le taux de rupture d'un anévrisme varie de 0 à 5% pour un anévrisme de diamètre inférieur à 5 cm, de 3 à 15% pour un diamètre entre 5 et 6 cm et peut monter jusqu'à 50% pour un diamètre supérieur à 8 cm [Brewster *et al.* 2003]. Le risque de rupture est aussi dépendant de la vitesse d'expansion de l'anévrisme. Un anévrisme grossissant de plus de 0,5 cm en 6 mois est considéré comme à haut risque de rupture [Brady *et al.* 2004]. Pour ces raisons, un anévrisme de taille supérieure à 5 cm de diamètre ou qui s'étend rapidement est recommandé pour une opération programmée de chirurgie (voir 1.6.3-Chirurgie) [Brewster *et al.* 2003].

1.4. Facteurs de risque

1.4.1. Age, sexe et ethnicité

L'anévrisme de l'aorte abdominale touche principalement les hommes âgés. On observe la présence d'un anévrisme chez 1% des hommes de plus de 55 ans, et la prévalence augmente de 2 à 4% par décennie après cet âge [Singh *et al.* 2001, Powell *et al.* 2003].

Les anévrismes sont 4 à 6 fois plus courants chez les hommes que chez les femmes [Lederle *et al.* 2001], et ils apparaissent environ 10 ans plus tard chez les femmes [McFarlane 1991]. Cependant, il semblerait qu'en fonction des critères diagnostiques choisis, la prévalence d'un AAA chez les femmes varie de 0,8% à 9,4% [Wanhainen *et al.* 2001] indiquant qu'un diagnostic pour un AAA défini sur un diamètre supérieur à 3 cm entraînerait une sous-estimation de la prévalence des anévrismes. De plus, Brown *et al.* ont montré que le risque de rupture d'un anévrisme d'une taille comprise entre 5 et 6 cm était jusqu'à 4 fois supérieur chez les femmes que chez les hommes [Brown *et al.* 2003].

Enfin, une étude a montré que les anévrismes étaient plus fréquents chez les hommes blancs que chez les hommes noirs [Lederle *et al.* 2000].

1.4.2. Consommation de tabac

La consommation de tabac est un facteur de risque majeur et a été montré comme étant le plus fortement associé avec le développement d'un AAA [Lederle *et al.* 2000]. En effet, les fumeurs ont environ 7,6 fois plus de risque de développer un anévrisme que les non-fumeurs. Les anciens fumeurs ont encore environ 3 fois plus de chances de développer un anévrisme que les non fumeurs

[Wilmink *et al.* 1999]. Cependant, l'incidence de la consommation de tabac sur le risque d'AAA dépend du nombre d'années de tabagisme, et le risque diminue proportionnellement au nombre d'années d'arrêt de tabagisme [Lederle *et al.* 1997].

1.4.3. Athérombose

Plusieurs études ont montré que l'AAA était associé à l'athérombose [Cornuz *et al.* 2004, Golledge *et al.* 2006], cependant, il n'a pas été démontré si le lien entre ces deux pathologies était causal ou simplement dû à des facteurs de risque communs. Une première hypothèse est que l'athérombose soit la cause de l'AAA. En effet, suite au stress causé par les lésions athérombotiques et à la perturbation du flux sanguin, la paroi aortique entamerait un processus de remodelage de la matrice extracellulaire afin de normaliser le diamètre interne de l'aorte [Ward *et al.* 2000]. Il a en effet été montré que le diamètre de la lumière et le niveau de remodelage de la matrice étaient augmentés en amont de lésions athérombotiques [Ward *et al.* 2000]. Ce remodelage expliquerait l'amincissement de la média dans l'AAA et les molécules pro-inflammatoires sécrétées lors de cette dégradation pourraient déclencher la réponse immunitaire observée dans l'anévrisme. Cependant, cette théorie impliquerait que chaque patient développant un AAA présente obligatoirement des lésions athérombotiques, ce qui n'est pas le cas.

Une seconde hypothèse suggère que l'AAA et l'athérombose sont indépendants. Ces pathologies se développeraient en parallèle à cause de facteurs de risque environnementaux et génétiques communs mais les mécanismes impliqués dans leur développement sont différents.

Enfin, une troisième hypothèse avance que l'athérombose ou l'anévrisme pourraient se développer en premier et stimuler le développement de l'autre pathologie.

1.4.4. Hypertension

L'hypertension est souvent décrite comme un facteur de risque pour l'anévrisme de l'aorte abdominale. Cependant, son implication dans cette pathologie n'est pas clairement définie. En effet, certaines études ont montré une association entre AAA et hypertension [Brown *et al.* 1999, Jamrozik *et al.* 2000, Vardulaki *et al.* 2000, Singh *et al.* 2001, Tornwall *et al.* 2001, Forsdahl *et al.* 2009] alors que d'autres n'ont pas trouvé de corrélation entre ces deux pathologies [Lindholm *et al.* 1985, Bengtsson *et al.* 1991, Alcorn *et al.* 1996, Lee *et al.* 1997, Blanchard *et al.* 2000, Wanhainen *et al.* 2005]. Des études sur des modèles expérimentaux ont également apporté des résultats contraires. En effet, le risque de développer un AAA a été trouvé comme significativement augmenté chez des rats hypertendus traités par perfusion d'élastase (voir 2.3.1-Modèles animaux) [Gadowski *et al.* 1993, Shiraya *et al.* 2006] alors que Cassis *et al.* [Cassis *et al.* 2009] ont montré que le risque de développer

un AAA dans un modèle d'infusion d'angiotensine II (voir 2.3.1-Modèles animaux) sur des souris n'était pas dépendant de la pression sanguine, et donc de l'hypertension.

1.4.5. Diabète

Bien que les mécanismes ne soient pas entièrement établis, plusieurs études ont montré qu'il existait un lien entre le diabète et l'AAA. En effet, Shantikumar *et al* [Shantikumar *et al.* 2010], dans une revue se basant sur la littérature, suggèrent un effet protecteur du diabète sur le développement d'un AAA. De plus, la vitesse d'expansion d'un petit anévrisme est diminuée chez les patients présentant également un diabète [Golledge *et al.* 2008a].

Cet effet pourrait venir du fait que les mécanismes impliqués dans le diabète ont des effets opposés à ceux de l'anévrisme. En effet, chez un patient diabétique, l'hyperglycémie entraîne une prolifération des cellules musculaires lisses et une augmentation de la matrice extracellulaire [Jones *et al.* 1999, Norman *et al.* 2007] et l'hyperinsulinémie entraîne une baisse de la fibrinolyse dans le thrombus [Dunn *et al.* 2005]. De plus, l'effet de traitements du diabète, comme les inhibiteurs d'ACE (angiotensin-converting enzyme), les hypoglycémiques ou les statines vont diminuer la réponse inflammatoire et l'expression des métalloprotéases de matrice (MMP) [Haffner *et al.* 2002, Ahimastos *et al.* 2005, Li *et al.* 2005, Evans *et al.* 2007, Jones *et al.* 2009]. Les inhibiteurs d'ACE ont d'ailleurs été montrés comme ayant un effet protecteur sur le développement d'un AAA [Liao *et al.* 2001, Hackam *et al.* 2006]. Golledge *et al* [Golledge *et al.* 2008a] ont également montré que les réseaux de collagène glycosilé dans le cas d'un patient diabétique réduit la quantité de MMP sécrétée par les monocytes-macrophages, ce qui protégerait la paroi aortique.

1.4.6. Prédisposition génétique

Des études ont montré que des facteurs génétiques étaient impliqués dans le développement d'un anévrisme de l'aorte abdominale. En effet, une étude nationale a montré un risque d'occurrence d'un AAA doublé chez les parents proches d'un patient présentant un AAA [Larsson *et al.* 2009].

Deux variants génétiques ont été montrés comme associés au développement d'un AAA par des études GWAs. Le premier, rs10757278 situé sur le locus 9p21 à proximité d'un gène de régulation de la croissance et survie cellulaire, était connu comme étant associé aux maladies coronariennes mais a aussi été montré comme étant associé à l'AAA et l'anévrisme cérébral [Helgadottir *et al.* 2008]. Le second variant est situé sur le locus 9q33 à proximité d'un gène codant pour un inhibiteur de croissance et de survie cellulaire, et a été montré comme associé à l'AAA mais pas à l'anévrisme

cérébral, indépendamment du tabagisme, du taux de lipides, de l'obésité, du diabète et de l'hypertension [Gretarsdottir *et al.* 2010].

1.4.7. Infections bactériennes

Chlamydia pneumoniae est un pathogène courant causant des infections respiratoires [Grayston *et al.* 1990, Saikku 1992]. Il a été décrit comme étant impliqué dans des maladies cardiovasculaires comme l'infarctus du myocarde [Saikku *et al.* 1988] ou l'athérombose [Kuo *et al.* 1993]. Il a également été montré comme pouvant persister et se multiplier dans les cellules endothéliales [Kaukoranta-Tolvanen *et al.* 1994]. Juvonen *et al.* ont montré que *Chlamydia pneumoniae* était détectée dans la plupart des AAA, et ont avancé qu'elle pouvait être un facteur déclenchant l'anévrisme en induisant la réponse immunitaire [Juvonen *et al.* 1997]. Des études ultérieures ont confirmé l'implication de *Chlamydia pneumoniae* dans la pathologie anévrysmale. En effet, il a été montré que des lymphocytes T spécifiques de cette bactérie étaient présents parmi les cellules du tissu anévrysmal [Halme *et al.* 1999] et qu'elle induit la production de MMP par les macrophages [Kol *et al.* 1998]. Enfin, comme des études ont montré une association entre la consommation de tabac et des infections par *Chlamydia pneumoniae* [Hahn *et al.* 1992, Karvonen *et al.* 1994], Juvonen avance l'hypothèse qu'une infection par *Chlamydia pneumoniae* causée par la consommation de tabac pourrait conduire au développement d'un AAA [Juvonen *et al.* 1997].

D'autres études ont détecté la présence d'ADN de pathogènes parodontaux dans les tissus cardiovasculaires dont le tissu anévrysmal [Gaetti-Jardim E Jr *et al.* 2009, Nakano *et al.* 2009, Nakano *et al.* 2011]. En 2011, une équipe a montré une corrélation entre *Porphyromonas gingivalis* et le diamètre de l'anévrisme [Aoyama *et al.* 2011]. De manière intéressante, aucune corrélation n'a été montrée avec des pathogènes agressifs. De plus, les réseaux de fibrine de la paroi aortique permettent l'adhésion de bactéries [Fitzgerald *et al.* 2006, Bamford *et al.* 2007] et l'hémoglobine l'adhésion de *Porphyromonas gingivalis* [Pathirana *et al.* 2006]. Le thrombus intraluminal sert également de source de nutriments pour plusieurs pathogènes parodontaux dont *Porphyromonas gingivalis* [Olczak *et al.* 2005]. Enfin, en 2011, Delbosc *et al.* ont montré que des injections répétées de *Porphyromonas gingivalis* sur des rats ayant subi une xénogreffe (voir 2.3.1. Modèles animaux) accélèrent le développement de l'anévrisme et ces rats présentent également d'autres symptômes caractéristiques de la pathologie chez l'humain comme un thrombus intraluminal riche en neutrophiles, contrairement aux rats témoins sans injection de pathogène, qui guérissent [Delbosc *et al.* 2011].

1.5. Mécanismes

1.5.1. Stress oxydatif

Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) sont des composés chimiques oxygénés comme les radicaux libres, des ions oxygénés ou des peroxydes rendus très réactifs. Ils sont produits naturellement par certains mécanismes cellulaires et éliminés par des systèmes enzymatiques ou des antioxydants (comme les vitamines C ou E par exemple). Cependant, une forte concentration de ROS peut entraîner un stress oxydatif, entraînant la mort par apoptose ou nécrose des cellules.

Dans l'AAA, l'hème des hématies agglutinées dans l'ILT constitue une forte source d'oxydation [Michel *et al.* 2010] et une augmentation des ROS, et donc du niveau de stress oxydatif, a été montré dans l'AAA humain par Miller *et al.* [Miller, Jr. *et al.* 2002]. Le stress oxydatif va en effet contribuer à l'inflammation du tissu anévrysmal [McCormick *et al.* 2007] et joue un rôle dans la régulation des métalloprotéases de matrice [Wassef *et al.* 2001]. En effet, il a été montré chez des souris après application de chlorure de calcium (voir 2.3.1. Modèles animaux) qu'une inhibition des ROS diminuait l'expression de MMP-2 et MMP-9, réduisant la formation de l'anévrysme [Xiong *et al.* 2009].

1.5.2. Extravasation tissulaire des leucocytes

1.5.2.1. Neutrophiles

Les neutrophiles sont une importante source de protéases. Il a été montré que les neutrophiles étaient présents au sein du tissu anévrysmal, principalement dans le thrombus intraluminal, à l'interface avec le sang, mais aussi dans l'adventice [Houard *et al.* 2009]. Les neutrophiles jouent un rôle majeur dans le développement de l'anévrysme de l'aorte abdominale. En effet, Eliason *et al.* ont montré qu'une déplétion en neutrophiles empêche la formation d'AAA dans un modèle expérimental de souris, par une diminution de la quantité de MMP-2 et -9 et pas de recrutement d'autres leucocytes [Eliason *et al.* 2005]. De plus, les neutrophiles ont été montrés comme responsables de l'augmentation de la quantité de MMP-9 dans le thrombus intraluminal par rapport au reste de la paroi aortique anévrysmale [Fontaine *et al.* 2002]. Les neutrophiles sont aussi la principale source de production de lipocaline associée à la gélatinase de neutrophile (NGAL), qui forme des complexes avec la MMP-9, complexes qui vont protéger la MMP-9 de la dégradation, et qui sont présents dans le thrombus et la paroi aortique anévrysmale [Folkesson *et al.* 2007].

Outre leur rôle dans la production de MMP, les neutrophiles ont aussi un rôle de recruteurs de leucocytes [Chertov *et al.* 1997] crucial dans l'AAA. En effet, une étude a montré qu'une perte de la fonction de recrutement des neutrophiles dans un modèle animal de souris avec injection d'élastase empêche la formation d'un anévrysme [Pagano *et al.* 2007].

1.5.2.2. Macrophages

Les macrophages sont des cellules différenciées de monocytes. Leur rôle principal est la phagocytose, c'est-à-dire l'internalisation et la dégradation de débris cellulaires ou corps étrangers, qui est l'une des fonctions de l'inflammation précoce dans l'AAA [Michel *et al.* 2007]. Les macrophages ont été montrés comme participant à la réponse inflammatoire lors de l'AAA [Koch *et al.* 1990, Bobryshev *et al.* 2001]. De plus, plusieurs protéines sécrétées par les macrophages (comme le tumor necrosis factor α (TNF α), le facteur d'inhibition de migration (MIF) ou la protéine angiopoïétin-like dérivée des macrophages) ont été décrites comme surexprimées dans la pathologie anévrysmale [Kaneko *et al.* 2011, Pan *et al.* 2003, Tazume *et al.* 2012]. Il a également été montré que le contact direct entre macrophages et lymphocytes augmente la production de métalloprotéases de matrice, dégradant la matrice extracellulaire et favorisant l'expansion de l'AAA [Lacraz *et al.* 1994].

Les macrophages auraient plusieurs propriétés au sein de l'AAA. En effet, outre leurs propriétés phagocytaires, ils peuvent se comporter comme cellules présentatrices d'antigènes, mais aussi sécréter des collagénases et des élastases, qui vont dégrader la matrice extracellulaire [Rizzo *et al.* 1989]. Gordon [Gordon 2003] a montré qu'il existait deux sous-types de macrophages aux propriétés différentes : les macrophages de type M1 présentent des propriétés pro-inflammatoires et sont impliqués dans la réponse antimicrobienne et l'immunité cellulaire et sont recrutés dans les tissus dégradés ; les macrophages de type M2 présentent quant à eux des propriétés anti-inflammatoires et sont impliqués dans la réponse immunitaire humorale et les réponses allergiques et antiparasitaires. Chinetti-Gbaguidi *et al.* [Chinetti-Gbaguidi *et al.* 2011] ont montré une implication différente de ces deux sous-types de macrophages dans des plaques athérosclérotiques. Dans ces plaques, les macrophages M1 étaient localisés dans les plaques lipidiques et étaient plus susceptibles, en phagocytant ces lipides, de se changer en cellules spumeuses. Les macrophages M2 étaient quant à eux localisés dans les zones plus riches en cellules et plus stables de la paroi artérielle. Cependant, aucune étude dans la pathologie anévrysmale n'a été réalisée pour élucider les rôles de ces deux sous-types de macrophages.

1.5.2.3. Lymphocytes

Les lymphocytes sont distingués en deux lignées : les lymphocytes T et les lymphocytes B. Les lymphocytes T sont des cellules issues du thymus et impliquées dans l'immunité cellulaire. Il existe plusieurs types de lymphocytes T aux propriétés différentes : les lymphocytes T cytotoxiques, pouvant détruire les cellules infectées, les lymphocytes T auxiliaires, pouvant activer d'autres

lymphocytes (lymphocytes T en cytotoxiques et lymphocytes B en plasmocytes) et les lymphocytes T suppresseurs, empêchant l'activation des lymphocytes auto-immuns.

L'appellation des lymphocytes B vient de « bourse de Fabricius », organe chez les oiseaux dans lesquels les lymphocytes B arrivent à maturité. Chez l'homme, ils proviennent de la moelle osseuse. Les lymphocytes B sont responsables de l'immunité humorale par la production d'immunoglobulines. Ils sont activés par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), comme les macrophages, et se différencient en plasmocytes. Une fois différenciés, ils vont produire en grande quantité les anticorps dirigés contre l'antigène activateur. Il existe deux types de cellules B : les plasmocytes, lymphocytes B activés par des CPA et les lymphocytes B à mémoire, cellules à longue durée de vie et pouvant produire en cas de seconde infection des anticorps dirigés spécifiquement contre un antigène déjà rencontré.

Ces deux lignées lymphocytaires sont impliquées dans la pathologie anévrysmale, avec une prédominance de lymphocytes T [Ocana *et al.* 2003]. Les lymphocytes T cytotoxiques ont été décrits comme fortement présents dans les petits anévrysmes [Duftner *et al.* 2005] et produisent des cytokines responsables de la mort des cellules musculaires lisses [Henderson *et al.* 1999]. Une étude a également montré une baisse de lymphocytes T auxiliaires régulant l'activation des macrophages et lymphocytes T cytotoxiques, promouvant le développement de l'AAA [Caligiuri *et al.* 2006]. Ocana *et al* ont également montré que les lymphocytes T et B de la paroi anévrysmale expriment tous un phénotype correspondant à des cellules mémoires, suggérant que seuls les lymphocytes mémoires migreraient vers la paroi anévrysmale. La même étude montre que dans un cas sur neuf, les lymphocytes B présentent un phénotype correspondant à ceux présents dans des centres germinatifs, suggérant la possible formation de structures lymphoïdes dans l'AAA [Ocana *et al.* 2003].

1.5.2.4. Mastocytes

Les mastocytes sont des cellules granuleuses impliquées principalement dans la réponse allergique. Ils sont une forte source de protéases et de médiateurs pro-inflammatoires. L'activation des mastocytes par un stimulus extérieur (comme l'activation des récepteurs aux IgE par exemple) entraîne la dégranulation des mastocytes, c'est-à-dire la libération d'une grande quantité de protéases. L'activation des mastocytes entraîne également la synthèse d'un grand nombre de cytokines et chemokines qui vont induire la réponse inflammatoire, le remodelage et l'angiogénèse dans le tissu [Krishnaswamy *et al.* 2006].

Des études dans des modèles animaux déficients en mastocytes ont montré que ces cellules étaient impliquées dans le développement de l'AAA. En effet, Sun *et al* ont montré l'absence d'AAA

chez des souris déficientes en mastocytes [Sun *et al.* 2007] et Tsuruda *et al.* ont montré une réponse plus faible à l'infusion de calcium chez des rats déficients en mastocytes [Tsuruda *et al.* 2008].

Les mastocytes dégranulant relâchent donc des protéases dans le tissu, dont la cathepsine G, qui active des métalloprotéases de matrice et participent donc à la dégradation de la matrice et à la mort des cellules musculaires lisses [Swedenborg *et al.* 2011]. Elles relâchent également de la tryptase, qui régule la migration des cellules de l'inflammation et l'apoptose des cellules musculaires lisses, et qui est surexprimée dans les AAA [Zhang *et al.* 2011].

1.5.3. Dégradation de la matrice extracellulaire

Les principaux constituants de la matrice extracellulaire de la paroi aortique sont l'élastine et le collagène. Il a été montré que 19 métalloprotéases de matrice (MMP), sur 23 décrites, peuvent dégrader différentes formes d'élastine et de collagène chez l'homme [Raffetto *et al.* 2008]. Plusieurs études ont mis en évidence une augmentation de l'expression de MMP dans le cas d'un AAA chez l'homme [Annabi *et al.* 2002, Abdul-Hussien *et al.* 2007] et dans des modèles expérimentaux [Godin *et al.* 2000, Rush *et al.* 2009]. Des augmentations de MMP-2, MMP-9 et MMP-12 dans la média semblent impliquées dans le développement de l'AAA [Sakalihan *et al.* 1996, Wassef *et al.* 2001, Thompson *et al.* 2002, Annabi *et al.* 2002, Longo *et al.* 2002]. De manière intéressante, les MMP-2 et MMP-9 sont exprimées dans de nombreux tissus par différents types cellulaires, alors que la MMP-12 est sécrétée spécifiquement par les macrophages [Shapiro *et al.* 1993]. En effet, Shiraya *et al.* [Shiraya *et al.* 2009] ont montré l'importance de la MMP-12 dans un modèle d'AAA chez le rat perfusé à l'élastase : après inhibition du recrutement de macrophages sur le site de l'AAA, les taux de MMP-12 étaient réduits et la synthèse d'élastase et de collagène augmentée. D'autres MMP comme les MMP-3, MMP-8 et MMP-13 sont impliquées dans la dégradation du collagène dans l'adventice [Rizas *et al.* 2009].

Un autre mécanisme important dans la dégradation de la matrice extracellulaire est la modification de la balance entre MMP et leurs inhibiteurs : les inhibiteurs tissulaires de métalloprotéases de matrice (TIMP), qui a été décrite comme impliquée dans l'AAA [Knox *et al.* 1997]. Ces TIMP sont sécrétées au sein du tissu anévrysmal par les macrophages et les cellules musculaires lisses et vont jouer un rôle dans l'AAA. Par exemple, une surexpression de TIMP-3 entraîne la mort par apoptose des cellules musculaires lisses, qui sont les seules cellules capables de synthétiser le collagène et l'élastine [Baker *et al.* 1998]. Il a également été montré que TIMP-1, en interagissant avec les MMP-2 et MMP-9, jouait un rôle dans le développement de l'AAA, et que TIMP-2 était impliqué dans les stages précoces de l'AAA [Nishimura *et al.* 2003]. Enfin, une étude a

montré une diminution du développement de l'anévrisme dans un modèle de souris déficientes en TIMP-2 [Xiong *et al.* 2006].

Le recrutement exponentiel dans la paroi anévrysmale des cellules de l'inflammation va donc entraîner une augmentation de la quantité de MMP et un dérèglement de la balance MMP/TIMP au sein de la paroi aortique, qui vont entraîner une dégradation de l'élastine et du collagène, constituants la matrice extracellulaire et la mort des cellules musculaires lisses, empêchant la régénération de cette matrice extracellulaire.

1.6. Détection, prise en charge et chirurgie

1.6.1. Détection

Malgré le fait que quelques anévrysmes présentent des symptômes tels que des douleurs dans le bas du dos, au flanc ou au niveau abdominal [Upchurch, Jr. *et al.* 2006], la grande majorité des AAA sont asymptomatiques. Environ 30% des AAA asymptomatiques sont découverts par une masse au niveau abdominal lors d'autres examens de routine [Aggarwal *et al.* 2011]. La sensibilité de détection d'un AAA par un examen physique est comprise entre 22% et 96%. Cet écart provient du fait qu'il est par exemple plus facile de détecter un gros anévrisme chez une personne maigre qu'un petit anévrisme chez une personne corpulente [Chervu *et al.* 1995]. Le plus souvent, les AAA sont détectés lorsqu'un patient passe une échographie, un scanner, une tomodensitométrie (TDM) ou une imagerie par résonance magnétique (IRM) pour d'autres raisons. L'échographie par ultrasons est considérée comme étant la méthode la plus sensible (95 à 100%) et la plus spécifique (99%) pour détecter un AAA. De plus, c'est un examen sans danger et au coût relativement faible [LaRoy *et al.* 1989, Michel *et al.* 2011]. Un screening des populations à risque, c'est-à-dire principalement les hommes entre 65 et 74 ans, semble intéressant par rapport au coût de l'échographie [Thompson *et al.* 2009] et réduit le risque de mortalité à moyen et long termes de 50% [Lindholt *et al.* 2008], ainsi que la fréquence des opérations d'urgence en cas de rupture de 56% [Lindholt *et al.* 2010]. Le screening systématique des populations à risque semble donc acceptable selon les critères du Conseil Européen, mais la mise en application n'est effective qu'au Royaume-Uni [Lindholt *et al.* 2010]. De plus, cette technique présente tout de même certains inconvénients : elle est opérateur dépendante et les anévrysmes peuvent être cachés par les intestins ou une obésité dans 1 à 2% des cas [Scott *et al.* 1991]. La tomodensitométrie permet d'évaluer un anévrisme plus précisément que l'échographie, et permet d'observer la forme de l'anévrisme plus en détail. Les inconvénients de la TDM sont un coût élevé, la nécessité d'utiliser un produit de contraste, l'exposition aux radiations et dans certains cas des difficultés à localiser précisément les limites de l'anévrisme [Isselbacher 2005].

Enfin, l'IRM est plus précise que la TDM mais le coût est plus élevé et la technique nécessite un appareillage spécifique moins accessible [Petersen *et al.* 1995].

1.6.2. Prise en charge

La prise en charge d'un patient présentant un anévrisme se fait par un suivi du patient, des traitements permettant de réduire l'expansion de l'anévrisme et, dans certains cas, un traitement opératoire.

Dans le cas d'anévrismes de petite ou moyenne taille, les patients passent des échographies régulières afin de suivre la taille de l'anévrisme et sa vitesse d'expansion [Isselbacher 2005]. Le suivi médical consiste en un traitement médical accompagné d'une amélioration des conditions de vie visant à réduire les facteurs de risque cardiovasculaires. Par exemple, les patients présentant un anévrisme sont conseillés d'arrêter de fumer. En effet, fumer augmente la vitesse d'expansion de l'anévrisme de 20 à 25% [Powell *et al.* 2003]. Le traitement des patients par des statines a été montré comme pouvant présenter un intérêt bénéfique chez les patients suivis, ralentissant l'expansion de l'anévrisme [Sukhija *et al.* 2006] et réduisant les risques de mortalité chez les patients ayant subi une opération pour un anévrisme [Kertai *et al.* 2004]. L'utilisation de bêtabloquants a également été montrée comme réduisant la vitesse d'expansion des AAA [Gadowski *et al.* 1994]. Récemment, une étude a montré une baisse dans la formation et le développement des AAA par traitement à l'edaravone, inhibiteur des radicaux libres, dans un modèle de rat par perfusion d'élastase et application de chlorure de calcium [Morimoto *et al.* 2012]. Enfin, à cause de l'implication de la réponse inflammatoire et de possibles infections bactériennes, un traitement par des antibiotiques est également envisageable. En effet, une étude a montré une réduction dans le taux d'expansion des anévrismes entre des patients recevant un traitement aux antibiotiques et des patients recevant un placebo [Vammen *et al.* 2001]. Cependant, les effets à long terme d'un traitement aux antibiotiques n'étant pas très définis et pouvant entraîner des complications (comme une augmentation du risque de développement d'un cancer du sein [Velicer *et al.* 2004]), des études plus approfondies sont nécessaires avant que cette approche soit recommandée.

1.6.3. Chirurgie

En cas d'anévrisme de grosse taille ou présentant une expansion rapide, la rupture peut être évitée par une chirurgie. Deux chirurgies sont disponibles pour réparer une aorte anévrismale : l'opération par mise à plat (OAR) ou l'opération par voie endovasculaire (EVAR). L'opération de mise à plat a été la procédure standard pour un AAA pendant plus de 50 ans et consiste en un accès direct à l'aorte par une incision dans l'abdomen. Cette méthode a été établie comme « définitive » et ne nécessite pas de suivi radiologique. L'opération par voie endovasculaire, introduite au début des

années 1990, consiste à placer une prothèse dans la lumière de l'aorte, réduisant la pression exercée sur la paroi aortique et conduisant à une réduction de la taille de l'anévrisme. L'EVAR étant moins invasive et moins chère que l'OAR, elle est devenue l'opération la plus courante dans la plupart des pays, avec 2/3 d'EVAR pour 1/3 d'OAR. A court terme, le taux de succès de l'EVAR varie de 83 à plus de 95% [Blum *et al.* 1997, Criado *et al.* 2001, Elkouri *et al.* 2003] alors que le taux de mortalité de l'OAR dans les 30 jours après l'opération varie de 2,7 à 5,8% [Lederle *et al.* 2002, Lederle *et al.* 2009]. En effet, des études ont montré que les taux de mortalité et de morbidité étaient significativement plus faibles lors d'une EVAR que d'une OAR, avec, selon Lederle *et al.*, 1,6% pour l'EVAR et 4,6% pour l'OAR [Greenhalgh *et al.* 2004, Prinssen *et al.* 2004, Lederle *et al.* 2007]. L'EVAR offre aussi comme avantages des temps d'hospitalisation, de récupération du patient et de retour à la normale des capacités moins longs et une perte de sang moindre. Cependant, les bénéfices à long terme de l'EVAR n'ont pas pu être mis en évidence [Lederle *et al.* 2004], où la méthode semblerait présenter de plus hauts taux de mortalité. Cela pourrait être expliqué par le fait que les patients à haut risque après une OAR meurent plus souvent dans l'année suivant l'opération et par le fait que l'EVAR ne permet pas d'empêcher une rupture de l'anévrisme avant la diminution de sa taille [Lederle 2005].

En 2003, Brewster *et al.* [Brewster *et al.* 2003] ont émis une liste de recommandations pour l'indication de chirurgie en cas d'AAA :

- Une limite arbitraire pour tous les patients du diamètre de l'AAA incitant une opération n'est pas appropriée. La décision de réaliser l'opération doit être prise au cas par cas.
- Des études ont montré que le risque de rupture pour des anévrismes de diamètres inférieurs à 5 cm est faible, auquel cas un suivi régulier des patients est suffisant, sauf si la vitesse d'expansion de l'anévrisme dépasse 1 cm/an ou si des symptômes apparaissent.
- Un diamètre de 5,5 cm semble être, en moyenne, un bon seuil suggérant l'opération de l'anévrisme, que ce soit par OAR ou EVAR.
- Chez les femmes, ou dans le cas d'un anévrisme présentant de grands risques de rupture, l'opération est suggérée pour un diamètre supérieur à 4,5 cm.
- Pour les patients à haut risque, retarder l'opération au maximum est conseillé, surtout si l'EVAR est impossible.
- L'EVAR est préférable pour les patients les plus âgés ou présentant de hauts risques ou lors d'autres circonstances augmentant le risque en cas d'opération plus lourde, comme l'OAR. Sinon, l'OAR est préconisée, puisque l'EVAR nécessite un suivi plus lourd et que le taux de survie à long terme est problématique.

Introduction

- L'EVAR chez des patients anatomiquement incompatibles augmente le risque de complications, de devoir réopérer par OAR ou le risque de rupture.
- Lorsque le choix est possible entre l'OAR et l'EVAR, l'avis du patient bien informé est primordial.

1.7. Biomarqueurs actuels

Bien que la détection par échographie soit possible, la méthode idéale de détection d'un AAA serait par le biais de biomarqueurs spécifiques de cette pathologie. De nombreuses études ont cherché des biomarqueurs circulants associés au développement d'un AAA. Cependant, la plupart des biomarqueurs identifiés ne sont pas spécifiques de la pathologie anévrysmale et aucun n'a été prouvé comme suffisamment spécifique et sensible pour servir au diagnostic de l'AAA par analyse sanguine.

De plus, de nombreuses études ont montré des résultats contradictoires quant aux biomarqueurs potentiels de l'AAA. En 2008, Golledge *et al* [Golledge *et al.* 2008b] ont listé les biomarqueurs potentiels actuels et leurs taux dans le plasma ou le sérum de patients présentant un anévrysme par rapport à des patients sains ou avec athérosclérose et les ont classés selon les processus dans lesquels ils sont impliqués. La table 1 récapitule les résultats présentés.

Table 1. Récapitulatif des biomarqueurs associés à la présence d'un AAA

Biomarqueur potentiel	Nombre de patients dans l'étude (cas/témoins)	Association avec l'AAA	Référence
Protéines impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire			
PIIINP	95/83	Pas de différence	[Eugster <i>et al.</i> 2005]
	201/246	Pas de différence	[Wilmink <i>et al.</i> 2002]
	86/20	Augmenté	[Treska <i>et al.</i> 2000a]
	87/90	Augmenté	[Satta <i>et al.</i> 1995]
MMP-9	53/26	Augmenté	[Watanabe <i>et al.</i> 2006]
	95/83	Pas de différence	[Eugster <i>et al.</i> 2005]
	22/12	Pas de différence	[van Laake <i>et al.</i> 2005]
	45/10	Augmenté	[Sangiorgi <i>et al.</i> 2001]
	25/20	Augmenté	[Hovsepian <i>et al.</i> 2000]
	22/17	Augmenté	[McMillan <i>et al.</i> 1999]
Protéines impliquées dans la thrombose			
Activateur tissulaire du plasminogène	40/41	Pas de différence	[Skagius <i>et al.</i> 2008]
	42/100	Augmenté	[Wanhainen <i>et al.</i> 2007]
	89/98	Pas de différence	[Fowkes <i>et al.</i> 2006]
	23/20	Pas de différence	[Holmberg <i>et al.</i> 1999]

	40/200	Pas de différence	[Lee <i>et al.</i> 1996]
D-Dimère	40/41	Augmenté	[Skagius <i>et al.</i> 2008]
	89/98	Augmenté	[Fowkes <i>et al.</i> 2006]
	18/10	Augmenté	[Serino <i>et al.</i> 2002]
	36/25	Augmenté	[Yamazumi <i>et al.</i> 1998]
	40/200	Augmenté	[Lee <i>et al.</i> 1996]
	41/30	Augmenté	[Aramoto <i>et al.</i> 1994]
Fibrinogène	110/110	Augmenté	[Al Barjas <i>et al.</i> 2006]
	89/98	Augmenté	[Fowkes <i>et al.</i> 2006]
	36/68	Pas de différence	[Spring <i>et al.</i> 2006]
	337/6049	Augmenté	[Singh <i>et al.</i> 2001]
	23/20	Augmenté	[Holmberg <i>et al.</i> 1999]
	21/84	Pas de différence	[Blann <i>et al.</i> 1998]
	40/200	Augmenté	[Lee <i>et al.</i> 1996]
22/244	Pas de différence	[Franks <i>et al.</i> 1996]	
Protéines impliquées dans l'inflammation			
Interleukine-6	27/15	Augmenté	[Dawson <i>et al.</i> 2007]
	89/98	Augmenté	[Fowkes <i>et al.</i> 2006]
	74/30	Augmenté	[Treska <i>et al.</i> 2000b]
	50/80	Augmenté	[Juvonen <i>et al.</i> 1997]
Lipoprotéines			
Lipoprotéine a (Lp(a))	425/492	Pas de différence	[Jones <i>et al.</i> 2007]
	438/438	Augmenté	[Sofi <i>et al.</i> 2005]
	75/43	Augmenté	[Schillinger <i>et al.</i> 2002]
	29/274	Augmenté	[Papagrigrorakis <i>et al.</i> 1997]
	22/244	Pas de différence	[Franks <i>et al.</i> 1996]
	69/1460	Pas de différence	[Simoni <i>et al.</i> 1996]
Lipoprotéine de haute densité (HDL)	30/26	Diminué	[Rizzo <i>et al.</i> 2009]
	35/140	Diminué	[Wanhainen <i>et al.</i> 2007]
	206/252	Pas de différence	[Hobbs <i>et al.</i> 2003]
	337/6049	Diminué	[Singh <i>et al.</i> 2001]
	25/266	Pas de différence	[Naydeck <i>et al.</i> 1999]
	21/84	Diminué	[Blann <i>et al.</i> 1998]
	69/1460	Diminué	[Simoni <i>et al.</i> 1996]
114/57	Diminué	[Louwrens <i>et al.</i> 1993]	
Lipoprotéine de faible densité (LDL)	30/26	Pas de différence	[Rizzo <i>et al.</i> 2009]
	35/140	Pas de différence	[Wanhainen <i>et al.</i> 2007]
	206/252	Augmenté	[Hobbs <i>et al.</i> 2003]
	337/6049	Pas de différence	[Singh <i>et al.</i> 2001]
	25/266	Augmenté	[Naydeck <i>et al.</i> 1999]
	21/84	Pas de différence	[Blann <i>et al.</i> 1998]
	69/1460	Pas de différence	[Simoni <i>et al.</i> 1996]
114/57	Pas de différence	[Louwrens <i>et al.</i> 1993]	

Introduction

De nombreuses études récentes ont mis en évidence des biomarqueurs potentiels de l'AAA, la plupart nécessitant des analyses sur de larges populations pour être validées. Acosta-Martin *et al* ont par exemple comparé le plasma de patients avec ou sans anévrisme par spectrométrie de masse et ont identifié puis validé par western blot 5 protéines comme étant des biomarqueurs potentiels de l'AAA : l'adiponectine, la superoxyde dismutase extracellulaire, la kallistatine, la carboxypeptidase B2 et la protéine AMBP [Acosta-Martin *et al.* 2011].

Parmi les biomarqueurs potentiels, certains montrent une association à la taille de l'anévrisme, permettant potentiellement une détection précoce et un suivi des AAA. Golledge *et al* [Golledge *et al.* 2008b] a établi la liste des marqueurs liés à la taille de l'anévrisme en 2008. On y trouve ainsi les peptides de l'élastine [Lindholt *et al.* 2001b], l'élastase- α 1-antitrypsine [Lindholt *et al.* 2003a], la cystatine c [Lindholt *et al.* 2001a], les complexes plasmine-antiplasmine [Lindholt *et al.* 2001c], l'inhibiteur tissulaire du plasminogène [Lindholt *et al.* 2003b], l'homocysteine [Halazun *et al.* 2007], l'interferon- γ [Juvonen *et al.* 1997], l'inhibiteur de migration des macrophages [Pan *et al.* 2003], l'IgA anti-*Chlamydia pneumoniae* [Lindholt *et al.* 2003b] et la cotinine [Lindholt *et al.* 2003a]. Cependant, ces marqueurs ont été validés dans des cohortes de moins de 200 individus et ces analyses nécessitent d'être répliquées. Toujours selon Golledge *et al*, le propeptide du procollagène de type III (PIIINP) était en 2008 le seul marqueur lié à la taille de l'anévrisme retrouvé dans deux cohortes distinctes [Satta *et al.* 1997, Lindholt *et al.* 2001b]. Golledge *et al* listent également l'osteoprotégérine, glycoprotéine de la famille des TNF, comme étant validée dans une seule cohorte [Moran *et al.* 2005] mais cette protéine a été retrouvée associée à l'AAA dans une étude publiée récemment [Koole *et al.* 2012].

Des études plus récentes ont également identifié la protéine c-réactive, décrite comme un facteur de risque de l'athérosclérose [De Haro *et al.* 2012, Hellenthal *et al.* 2012] et la lipocaline associée à la gélatinase de neutrophiles [Ramos-Mozo *et al.* 2012], impliquées dans l'inflammation et la catalase [Ramos-Mozo *et al.* 2011] et la peroxiredoxine 1 [Martinez-Pinna *et al.* 2011], impliquées dans le stress oxydatif comme étant des biomarqueurs potentiels corrélés à la taille de l'anévrisme.

De nombreux marqueurs semblent donc corrélés à la présence ou à la taille d'un anévrisme, cependant, aucun des marqueurs décrit ne répond aux critères de spécificité et de sensibilité et certains nécessitent d'autres validations pour pouvoir être utilisé comme marqueur diagnostique de routine pour l'anévrisme de l'aorte abdominale.

2. Recherche de biomarqueurs

2.1. Généralités

D'un point de vue clinique, un biomarqueur est une caractéristique biologique mesurable liée à une pathologie. Il existe trois groupes de biomarqueurs : les biomarqueurs de dépistage, utilisés pour rechercher des pathologies asymptomatiques chez des patients, les biomarqueurs diagnostiques, utilisés pour confirmer une pathologie, et les biomarqueurs pronostiques, utilisés pour le suivi des patients. Dans le domaine cardiovasculaire, bien que de nombreux biomarqueurs diagnostiques et pronostiques soient disponibles, les biomarqueurs de dépistage ne sont pas toujours bien définis [Gerszten *et al.* 2008]. Dans le cas de l'anévrisme de l'aorte abdominale, des biomarqueurs de dépistage offriraient une alternative viable au dépistage par échographie, idéalement en détectant les anévrismes à des stades précoces de la maladie pour permettre un meilleur suivi des patients.

La découverte et la validation d'un biomarqueur peuvent être découpées en 5 phases, définies en premier lieu pour les biomarqueurs du cancer [Pepe *et al.* 2001] puis adaptées pour les maladies cardiovasculaires [Vasan 2006]. Ces 5 phases sont présentées dans la table 2.

Table 2. Phases du développement d'un biomarqueur

Phase	Description
Phase 1 : Découverte	Des études exploratoires identifient un biomarqueur potentiel
Phase 2 : Validation	Des études cliniques évaluent la capacité du biomarqueur à différencier les patients sains et malades
Phase 3 : Phase préclinique	Des études cliniques évaluent la capacité du biomarqueur à détecter la maladie avant le diagnostic par un autre moyen
Phase 4 : Phase prospective	Des études prospectives définissent la sensibilité et la spécificité du biomarqueur
Phase 5 : Impact	Des études à grande échelle définissent l'impact du dépistage sur la réduction du taux de mortalité

2.2. Protéomique

Les méthodes d'analyse disponibles pour l'étude d'une pathologie et la recherche d'un biomarqueur nous permettent d'étudier chaque niveau des processus cellulaires. La génomique nous permet d'étudier l'ADN et est essentielle à la compréhension des mécanismes physiopathologiques. Cependant, l'expression d'un gène, de par l'épissage alternatif et les modifications post-traductionnelles (MPT), pourra résulter en la synthèse de plusieurs protéines différentes, créant une plus grande diversité fonctionnelle. La caractérisation de ces produits d'expression nous apportera une meilleure compréhension de ces mécanismes physiopathologiques.

Introduction

L'ensemble des protéines à un temps donné forme le protéome, spécifique des types cellulaires, organes ou tissus, et qui pourra être modifié par des états physiologiques ou pathologiques. En effet, les protéines, étant impliquées dans toutes les fonctions cellulaires, sont souvent modifiées, en tant que cause ou effet, lors de pathologies [Arrell *et al.* 2001]. L'étude des changements d'expression des protéines, ou des modulations des modifications post-traductionnelles qu'elles vont subir entre un état physiologique et un état pathologique, offre donc un accès direct aux processus liés à la pathologie [Wang *et al.* 2008] et est une source potentielle de biomarqueurs.

Les analyses protéomiques peuvent avoir plusieurs objectifs et travailler à différentes échelles décrites en figure 3, inspirée de Mallick et Kuster [Mallick *et al.* 2010]. En effet, ces analyses peuvent être utilisées dans des buts de recherche de nouvelles protéines ou pour quantifier une protéine ou un groupe de protéines en particulier. Cette seconde approche est principalement utilisée pour mesurer des biomarqueurs afin de diagnostiquer certaines pathologies. En ce qui concerne l'approche découverte, elle peut être effectuée à différentes échelles. L'approche appelée "compréhensive" est qualitative et consiste en l'énumération d'un maximum de protéines d'un système biologique donné, comme par exemple pour le projet du protéome du plasma (PPP) de l'organisation sur le protéome humain (HUPO) qui a pour but l'identification de toutes les protéines et peptides du plasma humain. Ce genre d'études requiert plusieurs années et la collaboration de nombreux laboratoires [Omenn *et al.* 2005]. Les études à grande échelle visent à étudier de larges fractions du protéome, mais pas nécessairement le protéome entier (comme le phospho-protéome par exemple). Elles sont utilisées comme des outils de profilage pour mesurer qualitativement et quantitativement des variations suite à une perturbation (comme une pathologie) ou entre différents fonds génétiques [Rush *et al.* 2005, de Godoy *et al.* 2006]. Ces études requièrent également beaucoup de temps mais peuvent en principe être conduites par n'importe quel laboratoire suffisamment équipé. Enfin, les approches "concentrées" réduisent l'échelle à l'analyse des protéines d'un complexe ou des interactions entre des protéines, comme par exemple l'étude des protéines contractiles cardiaques. La difficulté de ce type d'approche n'est plus la complexité mais la sensibilité ou la quantité de matériel nécessaire à la détection des partenaires d'interaction qui peuvent être en très faible abondance [Muzio *et al.* 1996, Bouwmeester *et al.* 2004].

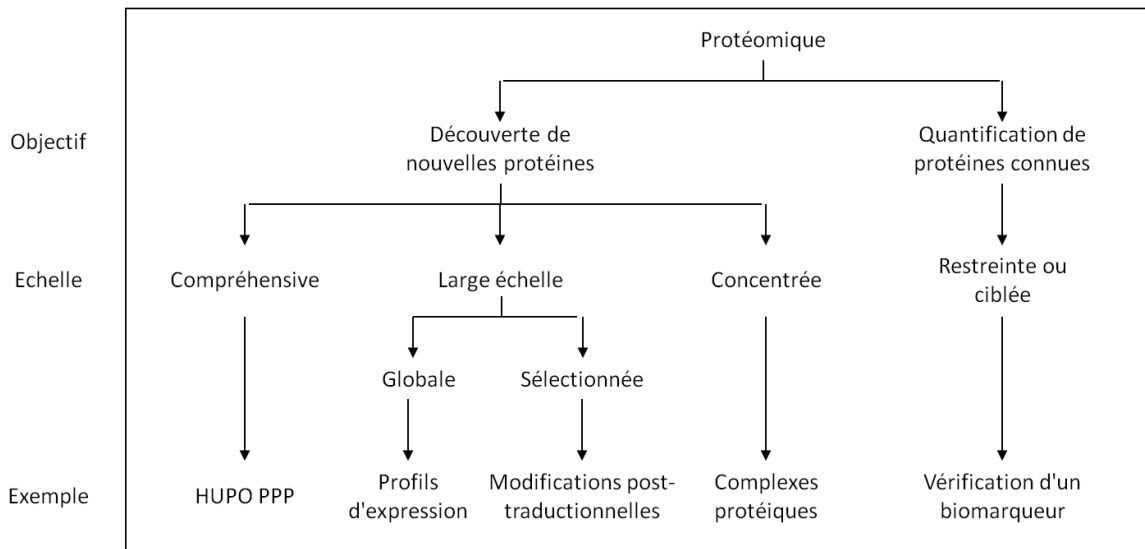


Figure 3. Organisation des différentes approches en protéomique

Mallick et Kuster ont proposé une synthèse des analyses protéomiques réalisées en fonction de la complexité de l'échantillon (figure 4). De manière simple, la complexité des analyses augmente lorsqu'on se déplace vers la droite et vers le bas du tableau. Les analyses en haut à gauche sont donc directes, alors que celles en bas à droite sont difficiles ou en développement [Mallick *et al.* 2010]. La réussite d'une analyse protéomique serait donc définie par le choix approprié d'un système biologique et d'une stratégie expérimentale adaptée (techniques, expertise).

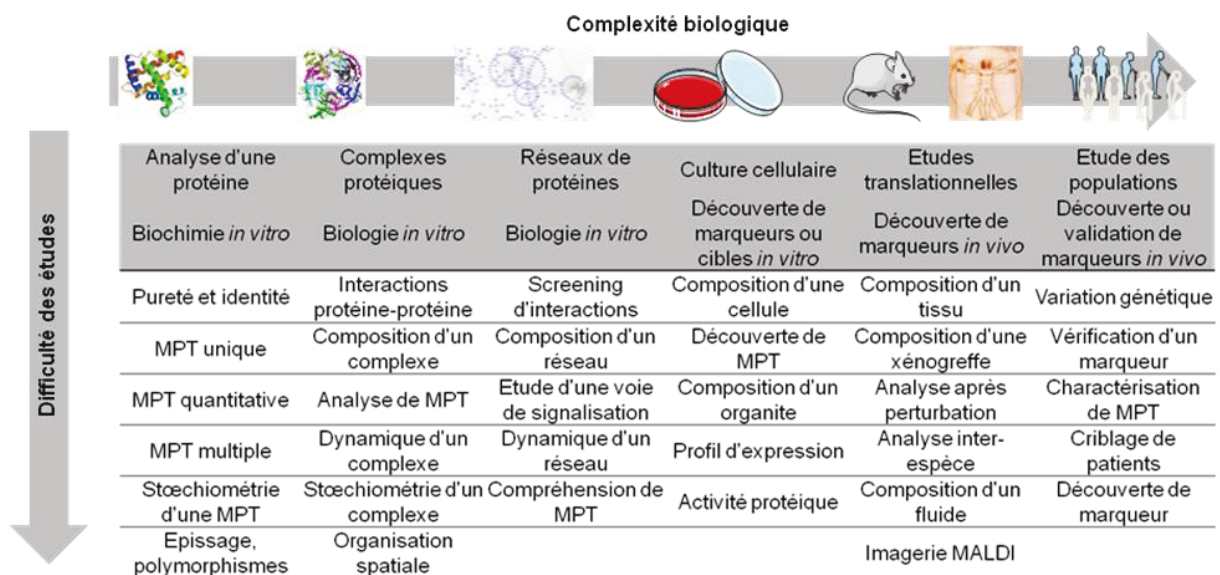


Figure 4. Application de la protéomique en fonction des systèmes biologiques

Dans le cas de l'anévrisme de l'aorte abdominale, nous réalisons des études visant à comparer les protéomes de patients présentant un anévrisme avec les patients sains. Plusieurs types d'échantillons sont donc adaptés à ces analyses.

2.3. Types d'échantillons

2.3.1. Modèles animaux

Une source possible d'obtention d'échantillons biologiques est l'utilisation possible de modèles animaux. En effet, ils permettent de recréer la pathologie étudiée chez un animal et ainsi d'avoir une source d'étude *in vivo*. Il existe plusieurs modèles expérimentaux d'anévrisme de l'aorte abdominale, mais aucun n'est parfaitement homologue à la pathologie humaine. La table 3 synthétise les modèles expérimentaux principalement utilisés et leurs avantages et inconvénients [Trollope *et al.* 2011].

2.3.2. Sérum, plasma

L'obtention d'échantillons d'origine humaine permet de s'affranchir des défauts des modèles animaux, mais ils sont plus difficiles à obtenir. Le plasma et le sérum sont des échantillons de choix, puisqu'ils sont facilement obtenus à partir du sang, et qu'ils permettent donc, dans le cas d'un biomarqueur, un dosage rapide. Le plasma est obtenu en présence d'un anticoagulant comme l'EDTA ou l'héparine, après centrifugation et élimination du culot contenant les cellules du sang. A l'inverse, le sérum est obtenu en l'absence d'anticoagulant, toujours après centrifugation. Le sérum est donc la partie liquide du sang coagulé et est composé du plasma moins les facteurs de coagulation dont principalement le fibrinogène [Schwarze *et al.* 2009]. Il est nécessaire lors de l'utilisation de plasma ou de sérum pour des analyses protéomiques de normaliser les prélèvements. La préparation du plasma étant plus simple, la reproductibilité entre les laboratoires est meilleure que pour le sérum, où l'élimination du coagulat peut entraîner la perte de protéines interagissant avec le réseau de fibrine [Issaq *et al.* 2007]. Cependant, l'utilisation de différents anticoagulants peut entraîner des différences dans les profils protéomiques [Banks *et al.* 2005]. Il est à noter que ces échantillons sont parmi les plus complexes [Anderson *et al.* 2002], avec 22 protéines majoritaires représentant 99% du protéome [Anderson *et al.* 2004]. Une déplétion de ces protéines majoritaires est donc nécessaire à l'analyse des milliers de protéines composant le pourcentage restant appelé « deep proteome » [Righetti *et al.* 2006].

En ce qui concerne l'anévrisme de l'aorte abdominale, la pathologie se développant au sein de la paroi aortique, l'analyse d'échantillons sanguins semble être un bon choix pour la recherche de biomarqueurs.

Table 3. Modèles animaux d'anévrisme de l'aorte abdominale

Type	Méthode	Détails	Avantages	Inconvénients	Histologie	Références
Induction chimique	Perfusion d'élastase	Une zone de l'aorte est isolée par clampage et perfusée 2h avec de l'élastase	Peut être utilisée dans tous les modèles animaux	Opération majeure et longue exposition à l'anesthésie	Dégradation de la média	[Anidjar <i>et al.</i> 1992]
				Moins bonne reproductibilité dans les gros animaux	Inflammation	
			Bonne reproductibilité dans les petits animaux	Peut causer des lésions nécrotiques intraluminales et dépôts de calcium		
				Anévrisme développé après 2 à 4 semaines		
	Application de chlorure de calcium	Un morceau de gaze traité au chlorure de calcium est placé sur l'adventice de l'aorte pendant 10 min	Peut être utilisée dans tous les modèles animaux	Opération majeure et longue exposition à l'anesthésie	Dégradation de la média	[Chiou <i>et al.</i> 2001]
				Anévrisme développé après 2 à 4 semaines	Inflammation	
Infusion d'angiotensine-II	Des micro-pompes sont placées de manière sous-cutanée et relâchent l'angiotensine-II		Opération mineure	Les pompes fonctionnent même après le développement de l'anévrisme	Inflammation	[Rush <i>et al.</i> 2009]
				Anévrisme développé rapidement	L'anévrisme est suprarénal, contrairement à infrarénal chez l'humain	Thrombus

			Possibilité de rupture d'anévrisme	Ne fonctionne pas chez toutes les souris	Athérosclérose	
Génétique	Souris KO	Après mutation d'un gène spécifique dans des cellules souches embryonnaires de souris, ces cellules sont injectées dans des blastocytes puis implantées dans l'utérus. La portée est ensuite génotypée pour vérifier la présence du mutant	<p>Outil très utile pour étudier des mécanismes spécifiques</p> <p>Peut être combiné à d'autres modèles (ex: infusion d'angiotensine-II)</p>	<p>Certains KO peuvent être létaux</p> <p>Le croisement de lignées peut être long</p>	Dégradation de la média	[Piedrahita <i>et al.</i> 1992]
Opérations	Flot turbulent	Une bande stenotique est placée pour réduire le diamètre de l'aorte, entraînant une dilatation en aval	Cause une altération de la média similaire à celle d'un anévrisme humain		<p>Inflammation</p> <p>Dégradation de la média</p> <p>Thrombus</p>	[Molacek <i>et al.</i> 2009]
	Patch vénal	Après clampage de l'aorte, une incision ou perforation est réalisée sur la paroi aortique puis réparée avec un patch extensible	Tous les animaux développent un anévrisme	Opération difficile sur les petits animaux	<p>Inflammation</p> <p>Dégradation de la média</p>	[Molacek <i>et al.</i> 2009]
	Xénogreffe	L'aorte infrarénale est retirée et remplacée par le même segment d'un animal d'une espèce différente	Peut être utilisée dans tous les modèles animaux	<p>Opération majeure et longue exposition à l'anesthésie</p> <p>Opération difficile</p>	<p>Inflammation</p> <p>Dégradation de la média</p>	[Allaire <i>et al.</i> 1994]

2.3.3. Urine

L'urine est un autre type d'échantillons qui a l'avantage d'être obtenu de manière non invasive. Bien que l'albumine, représentant plus de 50% des protéines du plasma, soit également la protéine majoritaire dans l'urine [Barratt *et al.* 2007], seulement 30% des protéines urinaires proviennent du sang, les 70% restants provenant des reins ou canaux urinaires [Decramer *et al.* 2008]. L'utilisation de l'urine lors de la recherche de biomarqueurs semble donc plus appropriée pour la néphrologie ou le cancer de la prostate [Decramer *et al.* 2008, Dihazi *et al.* 2007, Downes *et al.* 2007]. Cependant, Zimmerli *et al.* ont montré que des maladies cardiovasculaires pouvaient être diagnostiquées par l'analyse du protéome urinaire [Zimmerli *et al.* 2008].

Sachant que l'urine est riche en peptides [Decramer *et al.* 2008], il a été montré que la majorité des peptides urinaires ne proviennent pas des protéines majoritairement exprimées comme l'albumine, mais sont des produits de dégradation du collagène [Coon *et al.* 2008]. Le renouvellement de la matrice extracellulaire pourrait donc être à l'origine de ces peptides présents dans l'urine. Des changements dans ce renouvellement de matrice extracellulaire pourraient donc être observés par une analyse de l'urine [Decramer *et al.* 2008]. Étant donné qu'un des principaux mécanismes de l'anévrisme de l'aorte abdominale est la dégradation de cette matrice extracellulaire, l'analyse de l'urine pourrait permettre de détecter et de suivre l'évolution de cette pathologie.

2.3.4. Cellules anévrysmales

Une autre source d'échantillons d'origine humaine est la culture des cellules anévrysmales, qui permet d'étudier un type cellulaire particulier. De nombreuses études ont été réalisées au niveau de l'AAA à partir de culture cellulaire des types cellulaires impliqués dans cette pathologie. Les monocytes peuvent par exemple être isolés du sang et différenciés en culture cellulaire en macrophages et les cellules musculaires lisses peuvent être transférées directement depuis le tissu anévrysmal vers la culture cellulaire [Dupont *et al.* 2004, Dupont *et al.* 2005].

La limite de cette technique est que le protéome de cellules issues de culture dépend des conditions de culture et n'est donc pas identique au protéome dans une condition physiologique ou pathologique spécifique. De plus, ce protéome va changer au fur et à mesure que les cellules se multiplieront en culture suite au phénomène de dédifférenciation. Finalement, Acosta-Martin *et al.* ont montré que l'emploi de DNase, couramment utilisée lors de l'extraction de protéines en culture cellulaire, entraînait une modification phénotypique de ces protéines, introduisant donc un biais dans l'analyse protéomique [Acosta-Martin *et al.* 2009].

2.3.5. Tissus

Des échantillons de tissus biologiques peuvent également servir à réaliser des analyses protéomiques. Ils présentent l'avantage de pouvoir étudier les protéomes dans l'état physiologique ou pathologique dans lequel se trouve le tissu. Plusieurs analyses ont été réalisées sur des biopsies d'AAA récupérées lors d'une chirurgie de mise à plat, afin d'étudier les protéomes spécifiques du tissu anévrysmal entier [Munezane *et al.* 2010], du thrombus intraluminal ou des différentes couches de la paroi aortique, permettant l'identification de biomarqueurs potentiels de l'AAA [Coutard *et al.* 2010, Ramos-Mozo *et al.* 2011, Martinez-Pinna *et al.* 2011, Koole *et al.* 2012]. Cependant, l'analyse de tissu présente aussi ses inconvénients. En effet, la reproductibilité lors du prélèvement du tissu peut être problématique [Mallick *et al.* 2010] et l'analyse globale du protéome d'un tissu complet masque certains résultats qui sont obtenus en étudiant les protéomes spécifiques des types cellulaires le composant [Sho *et al.* 2005]. Ce dernier biais peut être évité grâce à la microdissection laser (LMD), permettant d'étudier les protéomes de zones enrichies en un type cellulaire extraites directement du tissu. Il existe deux procédés de microdissection laser : la microdissection laser par découpe et la microdissection laser par capture [Murray 2007]. La microdissection laser par découpe repose sur un laser ultraviolet qui va découper la périphérie de la zone d'intérêt et permettre son isolement du reste du tissu. Cette zone d'intérêt est ensuite récupérée par un système de catapultage, un système gravitationnel ou avec une aiguille. La microdissection laser par capture utilise une capsule spéciale posée sur le tissu et un laser infrarouge qui va coller la membrane de la capsule à la zone d'intérêt. La capsule est ensuite retirée avec la zone d'intérêt collée à celle-ci. Un laser ultraviolet peut être utiliser en plus du laser infrarouge pour découper la périphérie de la zone d'intérêt. Elle présente plusieurs avantages. Tout d'abord, c'est une technique très sensible qui permet d'isoler jusqu'à une cellule unique. De plus, la faible puissance nécessaire à l'utilisation des lasers permet de ne pas entraîner de modification phénotypique des éléments isolés [Murray 2007]. Le principal inconvénient est que la quantité de matériel récupéré est faible et limite donc les analyses réalisables.

Dans le cas de l'anévrysme de l'aorte abdominale, les principaux mécanismes étant la réponse inflammatoire et la dégradation de la paroi aortique, l'étude des protéomes des types cellulaires impliqués dans ces mécanismes est donc un bon choix pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques et pour la recherche de biomarqueurs.

2.4. Techniques d'analyses protéomiques

Afin d'étudier les protéomes des types cellulaires impliqués dans l'AAA, des analyses protéomiques vont être réalisées, afin de dresser les profils protéomiques de ces types cellulaires ou de les comparer. Ces analyses sont la combinaison d'une technique de fractionnement, qui va séparer les protéines d'un échantillon selon des critères physico-chimiques et d'une méthode d'identification qui, dans le cas d'une analyse sans *a priori*, est la spectrométrie de masse (MS). Une fois encore, différentes techniques sont disponibles pour le fractionnement et l'identification des protéines.

2.4.1. Fractionnement

Les techniques de fractionnement discutées ici vont permettre de diminuer la complexité d'un mélange protéique avant identification par spectrométrie de masse. Elles présentent également l'avantage d'éliminer les composés non-protéiques qui pourraient interférer avec la spectrométrie de masse. La plupart de ces méthodes peut s'utiliser seule, ou en tandem avec une autre, afin de réaliser un fractionnement en deux dimensions. Lorsque deux techniques présentent des mécanismes de séparation indépendants et présentent des profils de rétention différents, c'est-à-dire qu'elles vont séparer les échantillons protéiques selon des critères différents, on parle d'orthogonalité [Giddings 1995, Slonecker *et al.* 1996]. Plus l'orthogonalité sera grande, meilleur sera le fractionnement de l'échantillon.

On distingue deux groupes de méthodes de fractionnement : les méthodes « en gel » et les méthodes « hors gel ».

Méthodes en gel

Une première méthode de fractionnement de l'échantillon est l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes avec du sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE), qui va séparer les protéines selon leur masse moléculaire. En effet, les protéines vont migrer dans un réseau d'acrylamide/bisacrylamide sous un courant électrique plus ou moins rapidement. Le SDS permettant d'appliquer une même densité de charge (négative) à toutes les protéines, seule la masse moléculaire va jouer sur la vitesse de migration des protéines, les plus petites migrant plus rapidement que les plus grosses. Les bandes formées par les protéines seront visualisées par des colorations comme le bleu de Coomassie [Wilson 1983] ou le nitrate d'argent [Shevchenko *et al.* 1996] ou par fluorescence comme avec le SYPRO Ruby [Lopez *et al.* 2000] ou le Deep Purple [Chevalier *et al.* 2004].

Introduction

L'isoélectrofocalisation (IEF) est une autre technique permettant de séparer les protéines selon leur point isoélectrique (pI). Un gradient de pH est créé dans un gel grâce à des ampholytes. Un courant électrique va faire migrer les protéines chargées négativement vers l'anode et les protéines chargées positivement vers la cathode, jusqu'à ce qu'elles atteignent le point du gel où le pH est égal à leur pI. Leur charge nette sera alors nulle et elles cesseront de migrer. Les protéines pourront ensuite être colorées et identifiées en spectrométrie de masse. Cependant, l'IEF est souvent couplée à un second fractionnement par SDS-PAGE. On parle alors d'électrophorèse bidimensionnelle [Unlu *et al.* 1997].

L'électrophorèse bidimensionnelle est souvent utilisée pour séparer des échantillons protéiques complexes. Elle se compose d'une première dimension : l'IEF, qui est réalisée sur des gradients de pH immobilisés (IPG) sur un gel de polyacrylamide posé sur un support plastique (strip) [Righetti *et al.* 1987]. Les IPG présentent les avantages d'être plus stables et moins cassants que les gels capillaires précédemment utilisés, offrent une grande variété d'amplitude de pH et une meilleure reproductibilité. La strip est ensuite déposée sur un gel de polyacrylamide pour réaliser la seconde dimension SDS-PAGE. Bien que la complexité d'un échantillon protéique soit réduite par rapport à un fractionnement simple par SDS-PAGE ou IEF, la technique présente quelques inconvénients : les spots peuvent contenir plusieurs protéines différentes, la résolution est faible pour les protéines présentant un pI ou une masse extrême et on observe des problèmes de reproductibilité [Griffin *et al.* 2001, Beranova-Giorgianni 2003, Tannu *et al.* 2006]. En effet, il a été montré que la variabilité de l'électrophorèse bidimensionnelle due à la préparation de l'échantillon, aux réactifs, à l'expérimentateur et aux méthodes de coloration peut s'élever à 20 ou 30% [Molloy *et al.* 2003]. L'utilisation de tampons standardisés, des gradients de pH immobilisés et de grands gels de 2^{ème} dimension ont néanmoins permis de réduire ces inconvénients [Lilley *et al.* 2004].

Une variante de l'électrophorèse bidimensionnelle permet de s'affranchir de certains de ces inconvénients. L'électrophorèse bidimensionnelle différentielle (DIGE) élimine en effet la variabilité inter-gels en séparant simultanément 2 ou 3 échantillons protéiques marqués par des fluorochromes différents appelés cyanines (Cy2, Cy3, Cy5) sur un même gel [Unlu *et al.* 1997]. Les cyanines se fixent en général soit par un marquage minimal (une quantité limitante de cyanine marque 3% des lysines) ou par un marquage en saturation (sur l'ensemble des cystéines), mais d'autres marquages sont possibles [Ernst *et al.* 1989, Southwick *et al.* 1990, Mujumdar *et al.* 1993]. Les échantillons marqués par différentes cyanines (Cy3 et Cy5 pour les marquages en saturation utilisés au laboratoire) [Dupont *et al.* 2008] sont mélangés et déposés ensemble sur la strip d'IPG pour la 1^{ère} dimension. La strip est ensuite normalement déposée sur un gel SDS-PAGE pour la 2^e dimension. Les échantillons migrent donc selon leur pI au sein du même gradient de pH et selon leur masse au sein du même gel.

Les échantillons sont ensuite visualisés aux longueurs d'ondes spécifiques des cyanines (pour Cy3 une excitation à 550 nm pour une émission à 570 nm (vert) et pour Cy5 une excitation à 640 nm pour une émission à 670 nm (rouge)) [Ernst *et al.* 1989]. Les différences peuvent ensuite être analysées de manière qualitative (présence ou absence du spot) ou quantitative (intensité de la fluorescence). Il a été montré que des modifications d'expression de 20% pour les protéines les plus abondantes, et de 80% pour les protéines moins abondantes peuvent être détectées en DIGE [Tonge *et al.* 2001]. En plus de s'affranchir des problèmes de reproductibilité, la DIGE permet également de diminuer la quantité de matériel nécessaire. En effet, environ 500 µg d'un mélange protéique sont nécessaires pour réaliser une coloration au bleu de Coomassie, 100 µg pour une coloration à l'argent, 50 µg pour un marquage minimal et seulement 5 µg de protéines pour un marquage en saturation. La figure 5 présente un schéma du fonctionnement de la DIGE.

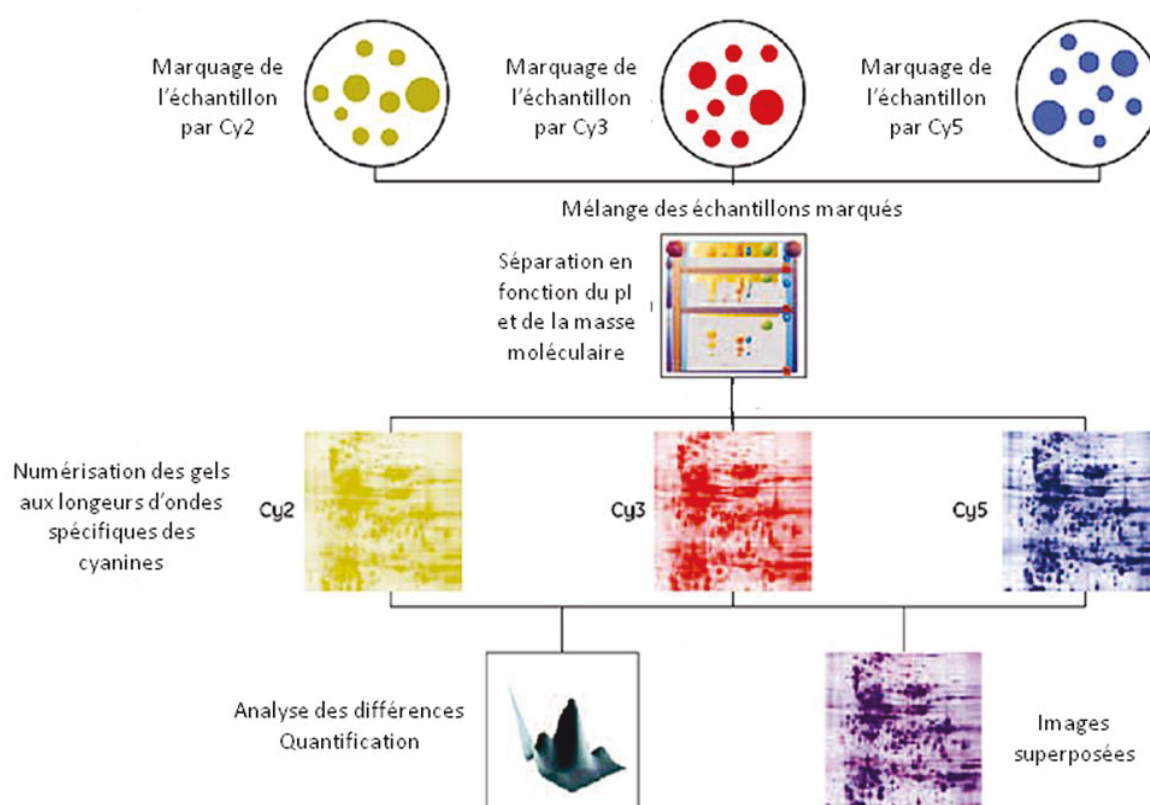


Figure 5. Schéma explicatif de la technique DIGE

Toutes ces méthodes vont nécessiter une extraction des protéines du gel avant l'analyse en spectrométrie de masse. Le plus souvent, les protéines sont digérées à l'intérieur du gel par une enzyme et les peptides sont extraits pour analyse.

Méthodes sans gel

La chromatographie en phase liquide peut également être utilisée pour séparer les protéines d'un échantillon. La chromatographie en phase liquide se définit par une phase stationnaire qui va plus ou moins retenir les protéines passant en phase liquide mobile en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. La phase stationnaire peut être sous forme de colonne, résine ou billes.

La chromatographie la plus utilisée est la chromatographie en phase inverse (RPLC). Ici, la phase stationnaire présente des chaînes carbonées, souvent 4 ou 8 carbones (C4, C8), et va retenir les protéines en fonction de leur hydrophobicité. L'élution se fait par un gradient de solvant organique volatile, ce qui en fait une bonne méthode de fractionnement avec la spectrométrie de masse [Molnar *et al.* 1976]. Elle peut également être couplée directement à certains spectromètres de masse afin de réaliser « online » le fractionnement et l'identification (LC-MS). Cependant, elle est incompatible avec l'utilisation de certains détergents utilisés lors de l'extraction de protéines (comme le triton X-100).

D'autres chromatographies sont également utilisées et peuvent être réalisées en amont de la LC-MS. Parmi elles, on trouve les chromatographies d'échange d'ions. La phase stationnaire est alors composée d'anions ou de cations, pour réaliser des chromatographies d'échange de cations fort (SCX), d'échange de cations faible (WCX), d'échange d'anions fort (SAX) et d'échange d'anions faible (WAX), ou des mélanges d'anions et de cations comme la chromatographie SCX-WAX [Fritz 2000]. Actuellement, la chromatographie la plus utilisée en amont de la LC-MS est la SCX, retenant les protéines chargées positivement [Paulo *et al.* 2012].

La chromatographie liquide d'interactions hydrophiles (HILIC) permet de séparer les protéines selon leur hydrophilicité. La phase stationnaire est composée de molécules polaires qui vont retenir les protéines chargées positivement ou négativement. L'HILIC présente une grande orthogonalité avec la RPLC et peut être utilisée comme première étape d'un fractionnement en 2 dimensions avant la RPLC-MS [Jandera *et al.* 2010].

La chromatographie par gel filtration consiste en des billes formant un maillage serré dans lesquelles seules les petites protéines vont pénétrer. Les grosses protéines vont donc passer rapidement entre les billes alors que les petites vont circuler plus lentement dans le maillage au sein des billes. Cette méthode peut également être utilisée pour fractionner un échantillon protéique [Porath *et al.* 1959]. Enfin, la chromatographie d'affinité peut également être utilisée pour isoler des protéines ou complexes protéiques spécifiques en présentant une molécule ayant une forte affinité pour une ou plusieurs protéines, comme un ligand par exemple [Zachariou 2008].

2.4.2. Identification

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse permettant l'identification de molécules en mesurant leur rapport masse sur charge (m/z). Ici, les protéines sont digérées avant (chromatographie) ou après (électrophorèse bidimensionnelle) le fractionnement par une enzyme, souvent la trypsine. Ce sont les peptides issus de la digestion qui sont analysés par le spectromètre de masse. Un spectromètre de masse peut se découper en trois parties : la source, qui va ioniser les molécules à analyser et leur permettre de passer en phase gazeuse, injectée dans l'analyseur. L'analyseur va séparer les ions selon leur m/z . Enfin, le détecteur va mesurer ce rapport m/z et transcrire les résultats en signal informatique. L'analyse d'un ensemble de peptides va donner un profil de m/z spécifique, correspondant à une protéine particulière : on parle alors d'analyse par empreinte de masse peptidique (PMF). L'analyse des données obtenues est généralement réalisée par interrogation de banques de données comme SEQUEST, Mascot ou ProFound. De nombreux types de spectromètres de masse sont disponibles pour réaliser des analyses protéomiques, différant en fonction de leur source et de leur analyseur. Deux exemples de spectromètres de masse couramment utilisés sont présentés en figure 6.

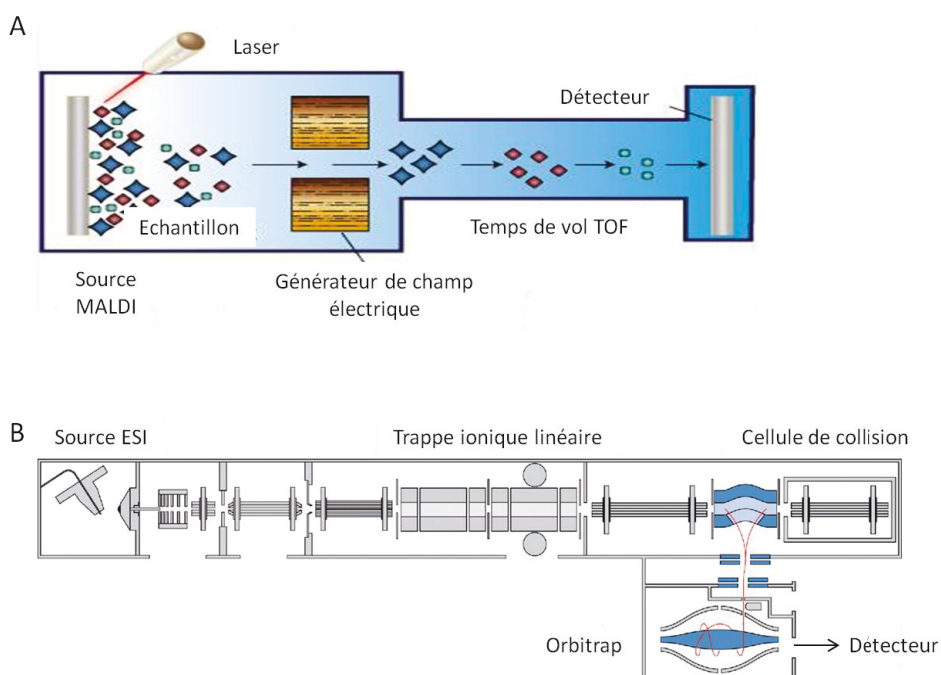


Figure 6. Exemples de spectromètres de masse. A : Schéma explicatif d'un MALDI-TOF, B : Schéma explicatif d'un spectromètre de masse en tandem ESI-LTQ-Orbitrap

Sources

Les deux principales sources utilisées en protéomique sont l'ionisation/désorption laser assistée par matrice (MALDI) et l'ionisation par électrospray (ESI).

Introduction

Dans le cas d'une source MALDI, l'échantillon peptidique est cristallisé avec une matrice organique sur un support métallique. La matrice va absorber l'énergie d'un laser pulsé et la transférer aux peptides, les chargeant et entraînant leur désorption en phase gazeuse vers l'analyseur. L'ionisation par MALDI va créer principalement des ions monochargés, ce qui facilite l'analyse. Cependant, l'ionisation va nécessiter plusieurs centaines d'impulsions laser pour créer un signal suffisant pour la détection [Pao-Chi Liao 1995] et la reproductibilité entre ces impulsions est faible, et l'analyse est fortement dépendant de la préparation de l'échantillon [Silvertand *et al.* 2008, Zheng *et al.* 2005].

Dans le cas d'une source ESI, l'échantillon passe sous forme liquide dans une aiguille au bout de laquelle il va former une goutte. Un courant électrique va alors charger les peptides de cette goutte en ion et les envoyer vers l'analyseur. Contrairement au MALDI, l'ESI va créer des ions multichargés. La sensibilité est dépendante du débit du liquide contenant l'échantillon, et elle a été améliorée avec l'apparition du micro-ESI et nano-ESI où le débit peut descendre jusqu'au nanolitre par minute [Griffin *et al.* 1991, Emmett *et al.* 1994]. Le gros avantage de la source ESI est la possibilité de la coupler de manière online à une colonne RPLC en amont [Emmett *et al.* 1994].

Analyseurs

Les analyseurs sont la partie du spectromètre de masse qui stocke et sépare les ions créés par la source en fonction de leur rapport m/z . Chaque analyseur a des propriétés spécifiques comme les masses minimales et maximales analysées, la vitesse d'analyse, la résolution, la sensibilité, la transmission des ions ou l'ordre d'amplitude. La précision d'un analyseur se mesure en parties par million (ppm), c'est-à-dire le nombre d'unités près à laquelle la mesure est effectuée pour une molécule d'un million d'unités.

L'analyseur par temps de vol (TOF) mesure le rapport m/z des ions en fonction de la vitesse à laquelle ils vont le traverser. Ils sont souvent utilisés avec une source MALDI (MALDI-TOF). C'est une méthode rapide et relativement simple, et présentant une bonne résolution et sensibilité et une précision d'environ 100 ppm. Le MALDI-TOF (figure 6A) est couramment utilisé pour identifier les protéines pures ou d'un mélange simple comme dans un spot d'électrophorèse bidimensionnelle par exemple [Della Corte *et al.* 2008].

Les autres analyseurs sont plus souvent couplés à une source ESI. Les principaux utilisés sont les quadripôles (QTrap) ou triples quadripôles (TQ) mesurant les m/z en fonction de la stabilité des ions, les trappes ioniques (IT), les orbitraps et les cyclotrons à résonance d'ions associés à une transformée de Fourier (FT-ICR) mesurant les m/z en fonction de leur fréquence de résonance. Ces méthodes présentent l'avantage de pouvoir être automatisées et offrent une bonne sensibilité allant

jusqu'à la femtomole, voire l'attomole [Yates *et al.* 2009]. Les TQ ont une vitesse d'analyse moyenne et une précision équivalente au TOF d'environ 100 ppm. Les IT sont plus rapides, présentent également une précision de 100 ppm et présentent l'avantage d'éjecter les ions de manière radiale, ce qui permet un meilleur couplage avec d'autres analyseurs (voir fragmentation) [Schwartz *et al.* 2002]. Les orbitraps et FT-ICR retiennent les ions en orbite autour d'un champ magnétique. Ils utilisent tous les deux la transformée de Fourier pour traduire des données de temps en m/z [Senko *et al.* 1996]. Pour une même précision d'environ 1 ou 2 ppm, les orbitraps sont plus rapides et plus rentables (prix d'achat et coût de maintenance) que les FT-ICR mais ces derniers offrent une amplitude de masse analysable plus grande et offrent la possibilité de réaliser des réactions en phase gazeuse en leur sein [Zubarev *et al.* 1998, Breuker *et al.* 2008].

Fragmentation

Une information de séquence de la protéine analysée peut être obtenue en spectrométrie de masse dite en tandem (MS/MS, figure 6B) par fragmentation des ions analysés. Les ions sont sélectionnés et envoyés dans une chambre de collision, dans laquelle ils vont entrer en collision avec un gaz neutre induisant leur fragmentation (CID) ou par transfert d'électrons avec des anions (ETD, cette deuxième méthode préservant les modifications post-traductionnelles). Les fragments sont ensuite envoyés dans un second analyseur où leur m/z sera à nouveau mesurée. La fragmentation d'un peptide va donner des ions correspondant plus ou moins aux acides aminés le composant et qui seront nommés selon la nomenclature proposée par Roepstorff et Fohlman [Roepstorff *et al.* 1984] et présentée en figure 7. Les ions seront nommés en fonction de la liaison rompue et du sens de la charge :

- a, b, et c correspondent aux ions chargés du côté N-terminal
- x, y et z correspondent aux ions chargés du côté C-terminal
- a et x correspondent à une coupure directement après la chaîne latérale
- b et y correspondent à une coupure entre les résidus
- c et z correspondent à une coupure avant la chaîne latérale

Les ions les plus souvent observés sont les ions b et y pour une CID et c et z pour une ETD. Les m/z des ions correspondant aux acides aminés permettront donc leur identification et le séquençage d'un peptide ou d'une protéine, fournissant une identification plus fiable. Une fragmentation par ETD peut également être utilisée pour localiser et identifier des modifications post-traductionnelles.

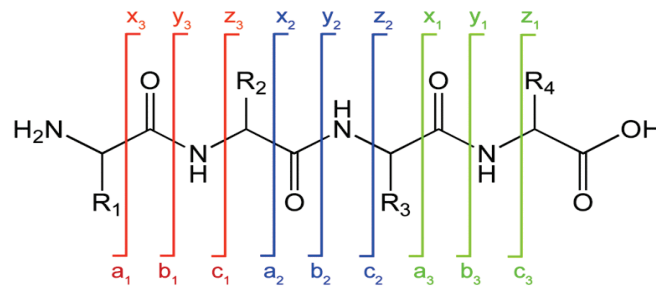


Figure 7. Nomenclature des ions fragments produits lors de la spectrométrie de masse en tandem

La figure 8 montre l'exemple de deux stratégies d'analyses protéomiques couramment utilisées. Dans le premier cas de figure (figure 8A), l'échantillon protéique est fractionné par électrophorèse bidimensionnelle. Les spots protéiques sont ensuite excisés et digérés à la trypsine. Les peptides obtenus sont analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF ou ESI-MS/MS. Les spectres obtenus sont confrontés à des banques de données afin d'obtenir l'identification de la protéine. Dans le second cas de figure (figure 8B), les extraits protéiques sont directement digérés par la trypsine avant d'être fractionnés. Le fractionnement se fait en 2 dimensions par une suite de deux chromatographies en phase liquide. La première chromatographie est souvent une SCX ou une HILIC et va donner des fractions qui seront chacune à nouveau séparées par RPLC. Cette seconde chromatographie est souvent couplée online à un spectromètre de masse ESI-MS/MS qui va permettre d'identifier à partir des spectres obtenus les différents peptides présents dans les fractions analysées et reconstituer les protéines initialement digérées.

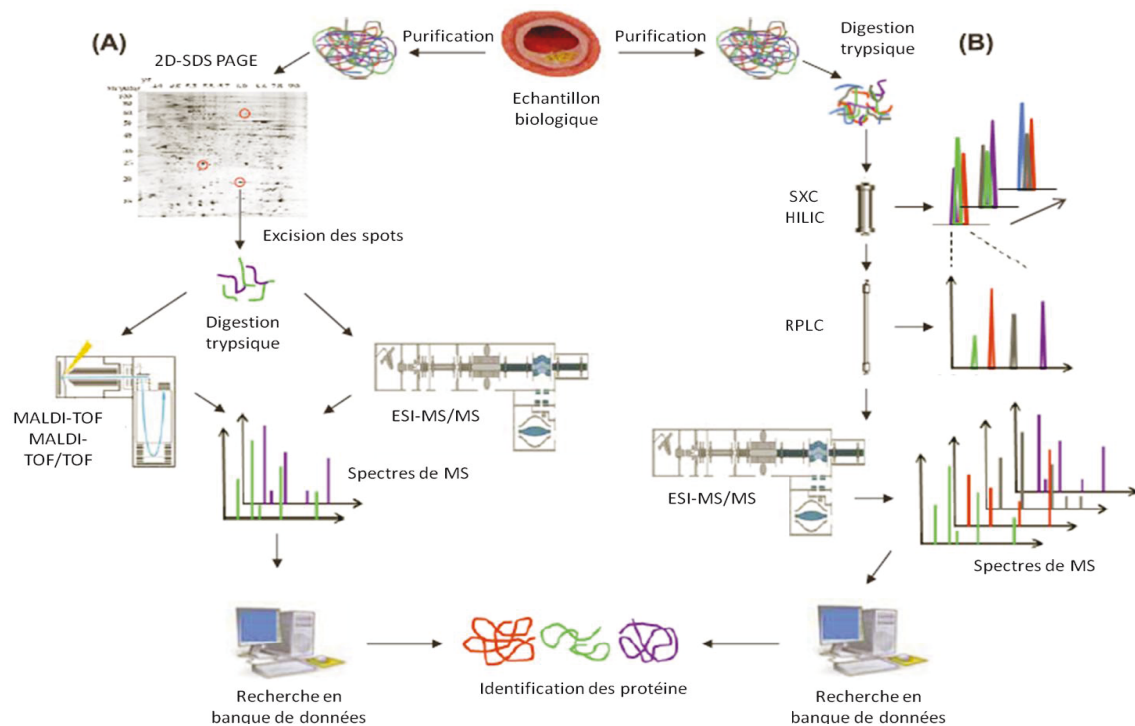


Figure 8. Exemples de stratégies expérimentales d'analyses protéomiques permettant l'identification des protéines à partir d'un échantillon biologique complexe

3. Stratégie expérimentale

Le caractère asymptomatique de l'anévrisme de l'aorte abdominale rendant sa détection difficile, la recherche de biomarqueurs spécifiques de cette pathologie est cruciale pour une meilleure prise en charge des patients. Sho *et al* ayant montré l'importance d'étudier séparément les types cellulaires présents dans un tissu [Sho *et al.* 2005], nous avons décidé d'utiliser la technique de microdissection laser pour isoler et étudier les types cellulaires impliqués dans l'AAA. Les principaux mécanismes de l'anévrisme de l'aorte abdominale étant la réponse inflammatoire et la dégradation de la matrice extracellulaire, nous nous sommes intéressés aux cellules de l'inflammation : neutrophiles, lymphocytes T, lymphocytes B, mastocytes et les deux sous-types de macrophages, ainsi qu'aux cellules musculaires lisses et aux cellules endothéliales.

Mon premier objectif a donc été la mise en place d'une banque d'échantillons d'AAA en collaboration avec le service du Professeur Stephan Haulon du CHRU de Lille, pour laquelle des biopsies de tissu anévrysmal ont été récupérées lors d'opérations de mise à plat. A partir de ces biopsies, j'ai cherché à localiser ces différents types cellulaires dans le tissu anévrysmal par des colorations et des marquages immunohistochimiques avec des anticorps dirigés spécifiquement contre ces types cellulaires.

Le but était ensuite d'isoler par microdissection laser des zones enrichies en ces types cellulaires pour effectuer leurs analyses moléculaires. La première étape était de valider l'isolement des zones enrichies dans chaque type cellulaire par microdissection laser. Pour cela, nous avons analysé soit les ARNm extraits par q-RT-PCR, soit les protéines extraites par western blot.

Nous avons ensuite sélectionné pour chaque type cellulaire une protéine décrite comme étant un biomarqueur potentiel de l'AAA exprimé par ces types cellulaires afin d'étudier son profil dans les zones enrichies microdisséquées. Ainsi, nous avons étudié la peroxiredoxine-1 dans les deux sous-types de macrophages M1 et M2 et ADAMTS5 dans les différents types de CML de la paroi aortique. En effet, ces deux protéines (peroxiredoxine-1 et ADAMTS5) avaient été sélectionnées par d'autres analyses protéomiques réalisées au laboratoire [Lamblin *et al.* 2010].

Enfin, la troisième étape consistait en l'étude du profil protéomique total des types cellulaires isolés par microdissection laser. Ceci a été réalisé pour les macrophages des deux sous-types M1 et M2 par 2D-DIGE et spectrométrie de masse MALDI-TOF.

RESULTATS

1. Objectifs

L'anévrisme de l'aorte abdominale étant une maladie asymptomatique, de nombreuses études ont étudié les mécanismes impliqués dans le développement de cette pathologie afin d'en identifier de nouveaux biomarqueurs, qui permettraient une prise en charge précoce et un meilleur suivi des patients. Des études comparatives du plasma de patients présentant ou non un AAA ont par exemple permis l'identification de biomarqueurs potentiels [Vega *et al.* 2009, Acosta-Martin *et al.* 2011]. Cependant, le plasma est un échantillon très complexe, avec 14 protéines majoritaires représentant 99% du protéome. Les sécrétomes, protéomes ou transcriptomes du tissu anévrysmal sont aussi de bonnes cibles pour l'identification de nouveaux biomarqueurs, à partir du tissu entier [Lenk *et al.* 2007, Choke *et al.* 2009, Munezane *et al.* 2010, Pahl *et al.* 2012, Hinterseher *et al.* 2013], à partir de couches isolées de la paroi anévrysmale [Coutard *et al.* 2010, Martinez-Pinna *et al.* 2011] ou à partir de cultures de cellules vasculaires d'origine anévrysmale [Lamblin *et al.* 2010]. Cependant, l'AAA est une pathologie complexe et l'analyse du tissu anévrysmal entier peut masquer certains résultats. En effet, Sho *et al.* ont montré que l'analyse spécifique des types cellulaires isolés du tissu anévrysmal montrait des résultats qui n'étaient pas retrouvés lors de l'analyse du tissu anévrysmal entier [Sho *et al.* 2005]. Nous avons donc décidé d'utiliser la technique de microdissection laser pour isoler et analyser spécifiquement les types cellulaires impliqués dans l'AAA.

Le but de mes travaux de thèse a donc été l'analyse des différents types cellulaires impliqués dans l'anévrisme de l'aorte abdominale isolés spécifiquement du tissu de la paroi aortique par microdissection laser. Afin de mener ces travaux, la première étape a été la constitution d'une banque d'échantillons de biopsies d'aortes anévrysmales et d'aortes saines. Ces biopsies ont d'abord été analysées macroscopiquement afin d'orienter le tissu (figure 9A) avant d'être disséqués en coupes transversales (figure 9B). Des analyses histologiques avec des colorations May-Grunwald Giemsa (MGG) ou Oil Red O (ORO) nous ont permis de repérer les zones cellulaires dans le tissu anévrysmal (figure 9C). Des marquages par immunohistochimie ont ensuite été réalisés afin de localiser les différents types cellulaires impliqués dans l'AAA, c'est-à-dire les cellules de l'inflammation (neutrophiles, lymphocytes T et B, mastocytes ainsi que les deux sous-types de macrophages M1 et M2), les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales (figure 9D). Nous avons ensuite utilisé la microdissection laser pour isoler à partir du tissu anévrysmal des zones enrichies en ces types cellulaires. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux macrophages M1 et M2, ainsi qu'aux cellules musculaires lisses (figure 9E). Une étape de validation de l'isolement des types cellulaires a été réalisée par des q-RT-PCR réalisées sur des gènes connus

Résultats

comme étant exprimés dans ces cellules (pour les macrophages, des gènes sur- ou sous-exprimés dans l'un ou l'autre des sous types de macrophages, figure 9F). L'étude des types cellulaires isolés par microdissection laser s'est ensuite faite sous deux approches. Une première approche ciblée sur l'étude d'une protéine d'intérêt spécifique présente dans ces types cellulaires (la peroxiredoxine-1 pour les macrophages et ADAMTS5 pour les CML) a été réalisée par des western blots dirigés contre ces protéines et dont les résultats ont été validés par colocalisation en immunohistochimie, immunofluorescence et dosages ELISA (figure 9G). La seconde approche sans *a priori* consiste en l'analyse du protéome total de ces types cellulaires par électrophorèse bidimensionnelle DIGE suivie d'une identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF (figure 9H).

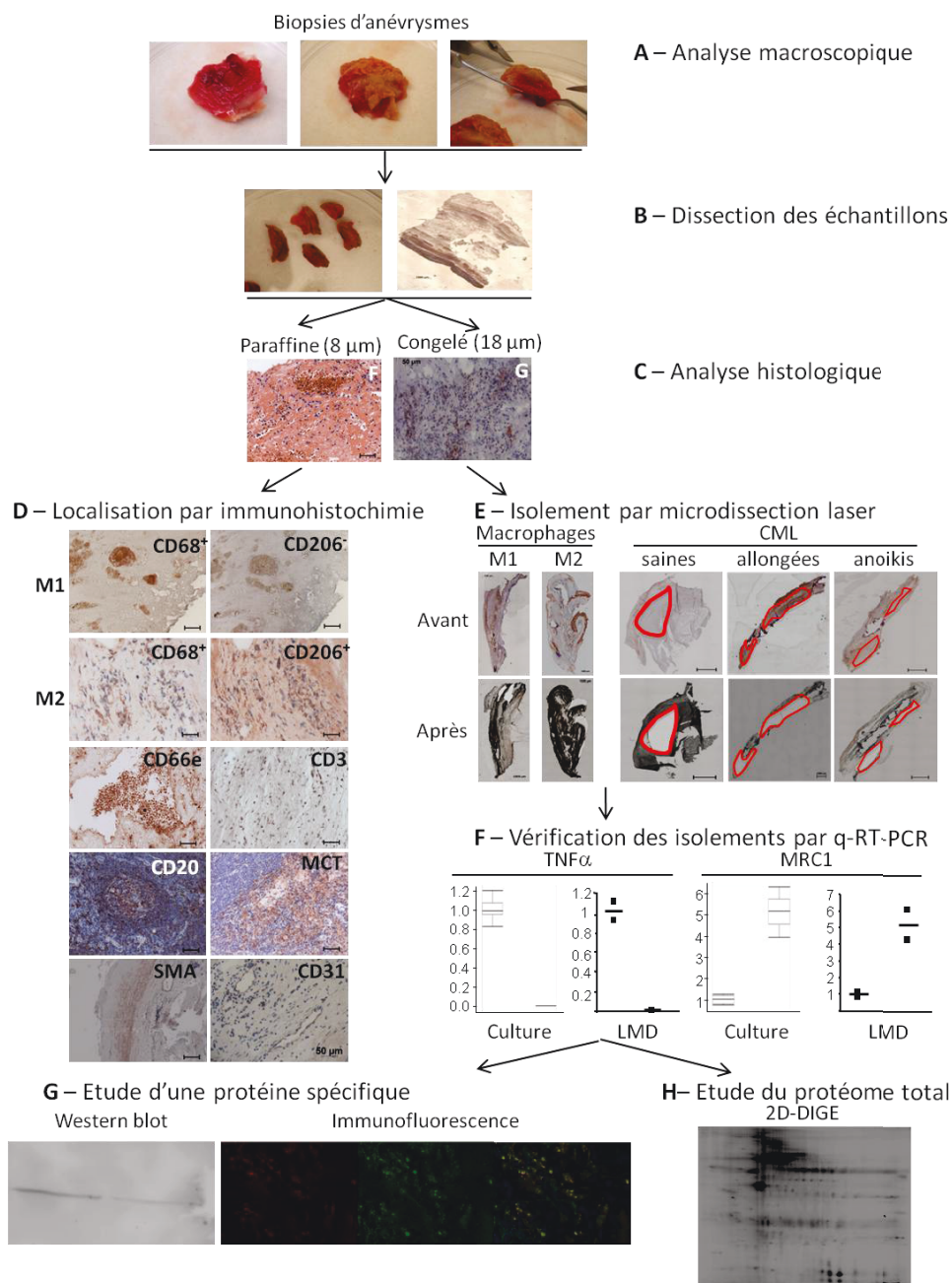


Figure 9 : Stratégie expérimentale de l'étude.

2. Constitution d'une banque d'échantillons

Le premier objectif de mon travail de thèse a donc été la constitution d'une banque d'échantillons de biopsies d'aortes anévrysmales appelés « Thromb ». Ainsi, en collaboration avec le service du Pr Stephan Haulon du CHRU de Lille, 20 échantillons ont été récupérés sur une période d'environ 2 ans lors d'une chirurgie programmée de mise à plat pour un anévrysme de diamètre supérieur à 50 mm. Les échantillons prélevés ont été conservés dans du sérum physiologique à 4°C jusqu'à récupération au laboratoire. Ces échantillons ont alors été analysés de manière macroscopique afin d'orienter le tissu anévrysmal de l'intima vers l'adventice (figure 10A, à gauche et au centre). Une fois orienté, les échantillons ont été disséqués en coupes transversales afin de pouvoir observer l'ensemble de la paroi aortique (figure 10A, à droite). Pour chaque échantillon, deux coupes ont été fixées au paraformaldéhyde 4% dans du PBS pendant 24h puis inclus en paraffine par déshydratation dans des bains successifs de PBS, alcool 70%, 90%, 95%, alcool absolu, xylène, mélange toluène/paraffine (V/V) puis paraffine et conservés à 4°C. Les autres coupes transversales ont été congelées dans l'azote liquide afin de préserver leur intégrité en vue des analyses protéomiques et transcriptomiques. Plus tard, un autre protocole accepté par l'agence de biomédecine (PFS 11-004) a été mis en place nous permettant d'obtenir des échantillons d'aortes « saines » appelés « Ao » (n=13) lors de prélèvements multi-organes sur des donneurs d'organes décédés (figure 10B). Les aortes ont été considérées « saines » car sans présence d'un AAA. Il faut cependant noter que certaines de ces aortes présentaient des plaques lipidiques ou des calcifications. Ces aortes ont été traitées de la même façon que les aortes anévrysmales.

Que ce soit au niveau des aortes anévrysmales ou des aortes saines, il est important de noter que les échantillons présentaient une grande hétérogénéité (taille, épaisseur, niveau de dégradation, présence de calcifications, couches de la paroi aortique plus ou moins présentes...). La table 4 liste les échantillons d'aortes anévrysmales et saines utilisés pour cette étude.

Résultats

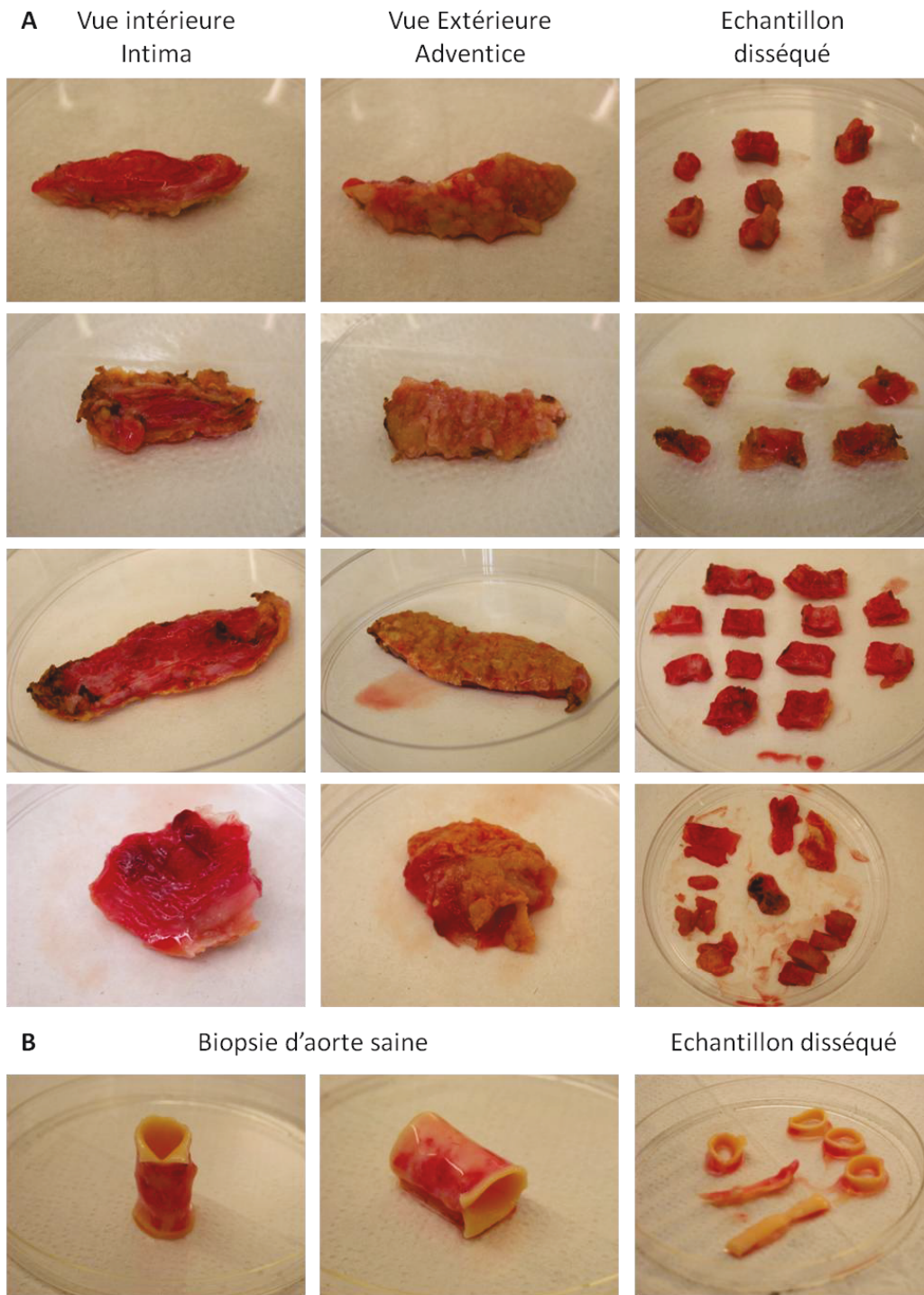


Figure 10 : Exemples de photos des biopsies d'aortes obtenues. A : Biopsies d'aortes anévrysmales. L'analyse macroscopique permet d'orienter le tissu de l'intima (à gauche) à l'adventice (au centre). Les échantillons sont ensuite découpés en coupes transversales (à droite). B : Biopsie d'aorte saine avant (à gauche et au centre) et après (à droite) dissection.

Table 4. Liste des biopsies d'aortes anévrysmales (Thromb) et saines (Ao) obtenues

Echantillon	Date d'obtention	Nombre de coupes transversales	Remarques
Thromb-1	05/11/2009	4	2 coupes d'adventice séparée
Thromb-2	27/05/2010	4	Echantillon fortement calcifié, 3 coupes d'adventice séparée
Thromb-3	27/05/2010	4	2 coupes d'adventice séparée
Thromb-4	31/05/2010	5	Echantillon fortement calcifié, 3 coupes d'adventice séparée
Thromb-5	16/06/2010	5	
Thromb-6	01/07/2010	4	
Thromb-7	06/07/2010	1	Petit échantillon
Thromb-8	11/08/2010	5	
Thromb-9	10/09/2010	4	
Thromb-10	28/09/2010	5	3 coupes d'adventice séparée
Thromb-11	07/10/2010	8	
Thromb-12	08/10/2010	12	
Thromb-13	25/10/2010	6	
Thromb-14	21/01/2011	7	Echantillon fortement calcifié, 4 coupes d'adventice séparée
Thromb-15	09/03/2011	8	Echantillon fortement calcifié
Thromb-16	09/03/2011	7	
Thromb-17	18/03/2011	11	
Thromb-18	23/03/2011	13	Tissu abimé
Thromb-19	30/03/2011	8	
Thromb-20	18/04/2011	6	
Ao-1	21/07/2011	11	Présence de calcification
Ao-2	22/08/2011	9	Présence de calcification
Ao-3	06/09/2011	5	3 coupes en anneau
Ao-4	17/11/2011	11	
Ao-5	04/12/2011	4	2 coupes en anneau
Ao-6	20/02/2012	6	2 coupes en anneau
Ao-7	11/03/2012	5	3 coupes en anneau
Ao-8	27/03/2012	6	
Ao-9	21/04/2012	5	4 coupes en anneau
Ao-10	06/07/2012	4	2 coupes en anneau
Ao-11	29/08/2012	6	Echantillon fortement calcifié
Ao-12	20/09/2012	4	2 coupes en anneau
Ao-13	12/10/2012	5	

3. Localisation des types cellulaires impliqués dans l'anévrisme de l'aorte abdominale

Les échantillons obtenus ont été colorés au May-Grunwald Giemsa (pour les coupes incluses en paraffine) ou à l'Oil Red O (pour les coupes congelées) afin d'obtenir une vue d'ensemble des coupes transversales et repérer les zones cellulaires ainsi que d'éventuels cristaux de cholestérol ou gouttelettes lipidiques. Une coloration de Perls-Van Gieson a également permis de repérer les dépôts ferriques présents dans les échantillons.

Nous avons ensuite localisé au sein du tissu anévrysmal les différents types cellulaires impliqués dans la pathologie anévrysmale. L'inflammation étant un facteur clé dans le développement de l'anévrisme, nous avons étudié la localisation des cellules inflammatoires présentes dans le tissu anévrysmal, c'est-à-dire les neutrophiles, les lymphocytes T, les lymphocytes B, les mastocytes et les deux sous-types de macrophages M1 et M2. Un deuxième mécanisme important du développement d'un anévrisme est la dégradation de la matrice extracellulaire et la mort des cellules musculaires lisses, cellules que nous avons également localisé dans la paroi anévrysmale. Enfin, nous nous sommes également intéressés aux cellules endothéliales composant normalement l'intima de la paroi aortique. Cette localisation a été effectuée par des marquages immunohistochimiques avec des anticorps dirigés spécifiquement contre ces types cellulaires (Table 5).

Table 5. Anticorps utilisés pour la localisation des types cellulaires impliqués dans l'AAA

Type cellulaire	Antigène	Protéine
Neutrophiles	CD66e	Molécule d'adhésion cellulaire
Lymphocytes T	CD3	Protéine du complexe TCR
Lymphocytes B	CD20	Protéine impliquée dans l'activation des lymphocytes
Mastocytes	Mast cell tryptase	Serine protéinase ; marqueur d'activation des mastocytes
Macrophages totaux	CD68	Marqueur d'activité phagocytaire
Macrophages M2	CD206	Récepteur au mannose
Cellules musculaires lisses	SMA	Actine de CML
	Desmine	Marqueur de cellules musculaires
Cellules endothéliales	Caspase 3	Marqueur d'apoptose
	CD31	Molécule d'adhésion plaquettaire

3.1. Article : Distribution et localisation des cellules inflammatoires dans l'anévrisme de l'aorte abdominale

L'inflammation est un des mécanismes clé du développement de l'AAA. En effet, des études ont montré une infiltration des cellules de l'inflammation au sein de la paroi aortique [Shimizu *et al.* 2006, Reeps *et al.* 2009]. Parmi elles, les neutrophiles [Fontaine *et al.* 2002, Eliason *et al.* 2005, Houard *et al.* 2009], les macrophages [Koch *et al.* 1990, Bobryshev *et al.* 2001, Michel *et al.* 2007], les lymphocytes T et B [Ocana *et al.* 2003, Duftner *et al.* 2005, Caligiuri *et al.* 2006] et les mastocytes [Sun *et al.* 2007, Tsuruda *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2011] ont été montrés comme impliqués dans le développement de l'AAA. Ces cellules vont en effet participer activement à la dégradation de la paroi aortique en synthétisant des métalloprotéases de matrices [Lacraz *et al.* 1994, Fontaine *et al.* 2002, Reeps *et al.* 2009, Swedenborg *et al.* 2011] et en amplifiant cette réponse inflammatoire [Chertov *et al.* 1997, Pagano *et al.* 2007]. De plus, il a été montré récemment que deux sous-types de macrophages aux propriétés opposées (M1 pro-inflammatoires et M2 anti-inflammatoires) étaient présents dans les plaques d'athérosclérose [Chinetti-Gbaguidi *et al.* 2011] et il est intéressant d'étudier la présence de ces deux sous-types de macrophages dans la paroi aortique anévrysmale et donc leur implication dans la pathologie anévrysmale. Tous ces types cellulaires sont donc de bonnes cibles pour l'étude des mécanismes impliqués dans le développement de l'AAA et représentent des sources possibles pour l'identification de biomarqueurs de cette pathologie. Nous nous sommes donc en premier lieu intéressés aux cellules inflammatoires présentes au sein de la paroi aortique anévrysmale.

Distribution and localization of inflammatory cells in human abdominal aortic aneurysm

Journal:	<i>International Journal of Experimental Pathology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Boytard, Ludovic; Inserm, U744 Spear, Rafaele; Inserm, U744 Acosta, Adelina; Inserm, U744 Amouyel, Philippe; Inserm, U744 Haulon, Stephan; Inserm, U1005 Pinet, Florence; Inserm U744, Institut Pasteur de Lille
Keywords:	abdominal aortic aneurysm, human, inflammatory cells, ATLO

**Distribution and localization of inflammatory cells in human abdominal aortic
aneurysms**

**Ludovic Boytard^{1,2,3}, Rafaele Spear^{1,2,3,4}, Adelina E. Acosta-Martin^{1,2,3}, Philippe
Amouyel^{1,2,3,4}, Stephan Haulon^{4,5}, Florence Pinet^{1,2,3,4}**

¹INSERM, U744, F-59000, Lille, France ;

²Institut Pasteur de Lille, F-59000, Lille, France ;

³Univ Lille Nord de France, IFR142, F-59000, Lille, France

⁴Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, F-59037, Lille, France ;

⁵INSERM, U1005, F-59006, Lille, France

Running title: Inflammatory cells in AAA

Corresponding author:

**Dr Florence PINET, INSERM U744-IPL , 1 rue du professeur Calmette, 59019 Lille
cedex, France**

Tel: (33) 3 20 87 72 15

Fax: (33) 3 20 87 78 94

e-mail: florence.pinet@pasteur-lille.fr

Total word count: 3938 words

Abbreviations

AAA: abdominal aortic aneurysm

ATLO: advanced tertiary lymphoid organ

MR: mannose receptor

Summary

Abdominal aortic aneurysm (AAA) are characterized by an increase of the aortic diameter (1.5 times) with a loss of parallelism of the wall. Inflammation is a key factor of aneurysmal pathology and the formation and growth of AAA depends on inflammatory cells.

The aim of the study was therefore to determine and characterize the distribution of inflammatory cells in human aneurysmal biopsies. Biopsy samples were dissected into transversal slides after orientation of the tissue from 20 patients undergoing elective repair of an AAA (diameter > 50 mm). Transversal sections were analyzed histologically (May-Grunwald Giemsa (MGG), Oil red O and Perls-Van Gieson) and by immunohistochemistry with specific antibodies against each inflammatory cell. The different layers of the aortic wall, adventitia, media and thrombus, were visualised and cholesterol crystals (MGG), lipids (Oil red O) and iron-containing deposits (Perls-Van Gieson) were located specifically in aneurysmal cells. No inflammatory cells were observed in the media. Adventitia predominantly contained proinflammatory $CD68^{+}MR^{-}$ macrophages as well as B lymphocytes and mast cells, organised as adventitial tertiary lymphoid organs, while the intraluminal portion of the thrombus consisted of $CD68^{+}MR^{+}$ macrophages, with mostly neutrophils and few T lymphocytes. The present results shows the complexity of aneurysmal aorta with an heterogeneity in inflammatory cells distribution, although the thrombus and adventitia appears to be the place of the inflammatory response.

Keywords: abdominal aortic aneurysm, human, inflammatory cells, adventitial tertiary lymphoid organs

Introduction

Abdominal aortic aneurysms (AAAs) are vascular diseases that affects primarily men older than 65 years, with a prevalence of 5% and ruptures responsible for 1-4% of total mortality. Moreover, 65-75% of these patients die before arriving at hospital (Brown and Powell 1999). This high mortality is largely due to the absence of symptoms before rupture in nearly all AAA patients (Moxon et al. 2010). It is thus important to identify biomarkers for AAA that can be detected easily in blood, before rupture, to enable systematic screening of the population at risk. Deciphering the targets (RNA, miRNA, proteins) specific to inflammatory cells present and involved in AAA may help in this search of biomarkers.

AAA is a complex disease resulting from many different physiological mechanisms, which is associated with marked changes in the cellular composition of aortic wall. One of them is smooth muscle cells (SMCs) apoptosis by matrix metalloproteases (MMP), resulting in a decrease of the elasticity and rigidity of the aortic wall (Thompson 2003). Inflammation is a key actor in aneurysmal pathology as they are the major source of MMP (Reeps et al. 2009) but also of cathepsins (Lohoefer et al. 2012). Numerous inflammatory cells are involved in AAA formation and growth (Reeps et al. 2009; Houard et al. 2009). Neutrophils are known to be involved in AAA (Chertov et al. 1997) as a potential initiator of this pathology by recruiting other inflammatory cells (Houard et al. 2009) or producing MMPs as MMP-9 (Fontaine et al. 2002). Lymphocytes are also implicated in AAA, but their role is more unclear. Studies have shown that T lymphocytes were predominant in AAA but B lymphocytes were also shown present in the aortic wall (Reeps et al. 2009). Another cell type that might be involved in AAA is mast cells. Indeed, Zhang *et al* (2011) showed no development of an aneurysm in mast cell deficient mice. Mast cells are also a source of

1
2
3
4 cytokines that attracts other inflammation cells and then amplify the immune response
5
6 (Krishnaswamy et al. 2006). Finally, macrophages also play a role in AAA. Interestingly, two
7
8 subtypes of macrophages, M1 and M2, with opposite functions have been described: the M1
9
10 subtype has proinflammatory properties and the M2 subtype anti-inflammatory properties
11
12 (Gordon 2003). The two subtypes are discriminated by the presence of mannose receptor
13
14 (MR) in the M2 macrophages corresponding to CD206 antigen (Stein et al. 1992). Chinetti-
15
16 Gbaguidi *et al* (2011) have demonstrated the differential involvement of these two subtypes
17
18 in human atherosclerotic plaques, showing that they were located in different parts of the
19
20 plaques and had different phenotypes.
21
22
23

24
25 All these inflammatory cells are potential targets of analysis and might help to identify
26
27 specific proteins that can be delivered into the blood and being potential biomarkers of AAA.
28
29 In this study, we identified and located the presence of inflammatory cells (neutrophils, B and
30
31 T lymphocytes, mast cells, and macrophages) in different layers of AAA. Molecular profiling
32
33 of each inflammatory cell in AAA may improve our understanding of the pathophysiological
34
35 mechanisms of this disease.
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Materials and Methods

Human aneurysmal abdominal aorta samples

Samples of human aneurysmal infrarenal aortic wall were obtained from 20 patients in Pr Haulon's vascular surgery unit (Hôpital Cardiologique, CHRU Lille, France). Our study conformed to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. We obtained informed consent in writing from each patient undergoing open surgery and recovered the biological samples as surgical waste, in accordance with French laws on medical ethics. The samples, each with an intra-luminal thrombus (ILT) were collected in normal saline solution and transported to the laboratory at 4°C. Each sample was dissected into transversal slides after orientation of the tissue by macroscopic analysis. Sections were either formalin-fixed, paraffin-embedded, and kept at 4°C for further analyses or snap-frozen in liquid nitrogen.

Histological analysis and immunohistochemistry

Histological and immunohistochemical analyses were performed on the 20 paraffin-embedded tissue samples to locate the different inflammatory cells except for Oil red O, performed on frozen sections. Routine histological staining was performed on 8- μ m sections with a May-Grunwald Giemsa kit (MM France) for a global view of the tissue and with Oil red O to detect lipids. A Perls-Van Gieson staining kit (MM France) was used to highlight the iron-containing cells. For immunohistochemical analyses, endogenous peroxidase activity was quenched and antigen retrieved by treating paraffin-embedded sections with sodium citrate 10 mmol/L, pH 6. We identified inflammatory cells with antibodies specific of each cell type: macrophages with mouse anti-CD68 (1/50, DAKO Corporation) antibody for the overall macrophage population and goat anti-CD206 (1/50, Santa Cruz Biotechnologies) antibody to discriminate between the CD68⁺MR/CD206⁻ (M1) and CD68⁺MR/CD206⁺ (M2) subtypes, neutrophils with mouse anti-CD66e (1/10, Novus) antibody, T lymphocytes with

1
2
3
4 mouse anti-CD3 (1/200, DAKO Corporation) antibody, B lymphocytes with mouse anti-
5
6 CD20 (1/50, Abcam) antibody and mast cells with mouse anti-mast cell tryptase (1/100,
7
8 Abcam) antibody. Immunostaining used the appropriate biotinylated secondary antibodies
9
10 (1/200, Vector laboratories), streptavidin-horseradish peroxidase (ABC kit, Vectastin) and the
11
12 AEC substrate-chromogen system (Sigma) for visualization. Finally, slides were mounted
13
14 with Glycergel (DAKO Corporation) and analyzed with an Axioplan 2 microscope, which
15
16 includes an HRc camera (AxioVision-Deconvolution 3D). Negative controls were performed
17
18 by omission of the primary antibody and substitution with an unrelated primary antibody.
19
20 Both controls gave negative results as expected. Semi-quantitative graduation distinguished
21
22 between various intensities from (-) no staining to (+++) high staining.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Results and discussion

Although aneurysms may develop throughout the length of the aorta, they are at least 5 times more prevalent in the abdomen than in the thorax (Dua and Dalman 2010). The aneurysmal aortic wall is a complex tissue composed of different cell types (e.g. inflammatory cells and SMCs) at different times during the disease course (Michel et al. 2011). Inflammation is not only associated with the clinical presence of AAA, but also plays a key role in the pathogenesis of the disease (McCormick et al. 2007). It was also recently associated to the aortic thrombus formation (Sagan et al. 2012). The aim of the study was therefore to determine the distribution of inflammatory cells in the different layers of human AAA.

Macroscopic and histological analyses of human AAA tissue

We looked for the presence and distribution of each inflammatory cell in human AAA, bearing in mind however that surgical specimens of human AAA collected from patients undergoing open surgery represent the end stage of the disease. Macroscopic analysis of the human AAA was performed to position the biopsy sample (thrombus *vs* external side) (Fig. 1A). Biopsies were then oriented before dissecting it into transversal sections (Fig. 1B, left panel). Samples were then stained by May-Grunwald Giemsa (MGG) to visualize the different layers of the aortic wall, that is, the adventitia, media and thrombus (Fig. 1B, right panel, Fig. 2A). The thrombus portions can be subcategorized as abluminal, intermediary and luminal (Fig. 1B). Histological staining was performed to characterize the cells present in the aortic area. MGG staining highlighted the presence of resident and abundant cells (Fig. 2B) and of cholesterol crystals (Fig. 2C). Oil red O staining detected lipids (Fig. 2D) and Perls-Van Gieson located iron-containing cells (Fig. 2E).

Distribution of inflammatory cells in the human aneurysmal aortic wall

Figure 2 depicts the distribution of the inflammatory cells towards the aneurysmal wall, namely neutrophils (CD66e staining), B lymphocytes (CD20 staining), T lymphocytes (CD3 staining), mast cells (mast cell tryptase staining) and the macrophage subtypes, M1 (CD68⁺MR⁻) and M2 (CD68⁺MR⁺) stained for CD68 antigen, a pan macrophage marker (Otto et al. 1994) and for the macrophage mannose receptor (Stein et al. 1992) discriminating the two subtypes. We found neutrophils present in both sides of the AAA, in the intraluminal thrombus and adventitia, as previously described by Houard *et al* (2009). We observed T lymphocytes in the intraluminal thrombus, but in only a few AAA samples. In contrast, B lymphocytes were detected predominantly in adventitia. Interestingly, we observed the two subtypes of macrophages in two distinct areas. Indeed, anti-inflammatory macrophages (CD68⁺MR⁺) were found in the luminal part of the intraluminal thrombus among inflammatory cells such as neutrophils, whereas proinflammatory macrophages (CD68⁺MR⁻) were located in the adventitial more degraded layer.

Our results showed a specific distribution of inflammatory cells towards the aneurysmal aortic wall. Not every AAA tissue sample contained every inflammatory cells: the individual AAA samples were heterogeneous from patient to patient and varied according to disease complexity. The table 1 summarizes the distribution of inflammatory cells in each AAA biopsy samples collected. As expected, we observed no inflammatory cells in the media, as reviewed by Michel *et al* (2007). In the adventitia, the proinflammatory CD68⁺MR⁻ macrophage subtype predominated, together with B lymphocytes and mast cells and the anti-inflammatory subtype CD68⁺MR⁺ macrophages predominated, together with neutrophils and T lymphocytes in the intraluminal thrombus.

Presence of adventitial tertiary lymphoid organs

Interestingly, in more than half the samples tested, we could observe in the adventitia, cells condensed into compacted structures, occupying the entire adventitial layer, accounting for a major part of the size of the aneurysm (Fig. 4A). These structures described as adventitial tertiary lymphoid organs (ATLO) (Bobryshev and Lord 2001) were mainly composed of B lymphocytes (Fig. 4B) and mast cells (Fig. 4C). The relative quantification of the thickness and area of ATLO showed that thickness ranged between 0.5 and 2 mm and could account from 9% to 42% of the total aneurysmal aortic wall area (Table 2).

Role of diverse distribution of inflammatory cells in AAA evolution

The great diversity of the aneurysmal aortic wall with not all the cell types present at the same time confirms the complexity of AAA pathology. Moreover, this diversity, the fact that some cells could have opposite functions, as proinflammatory (CD68⁺MR⁻) and anti-inflammatory (CD68⁺MR⁺) macrophages (Varin and Gordon 2009), and the possible development of adventitial tertiary lymphoid tissue showed the importance of studying AAA through isolated cell types instead of the whole tissue. Sho *et al* (2005) reported that analysis of isolated cells highlighted specific targets of interest that were hidden on whole-aorta tissue. The diversity found in distribution of inflammatory cells in AAA reinforces this fact. Recently, the various expression of several cathepsins in the cells within the aneurysmal aorta revealed their possible role in AAA (Lohoefer *et al.* 2012).

Our data combined with previous work, make it possible to draw an outline of the natural history of AAA as summarized in figure 5. It has been suggested that small, dense LDL associated with AAA (Rizzo *et al.* 2009), triggers its development (Hobbs *et al.* 2003), perhaps initiating inflammatory response by attracting cells such as neutrophils, which will enhance the inflammatory response (Swedenborg *et al.* 2011) by recruiting other cells as T

1
2
3
4 and B lymphocytes, mast cells, macrophages and other neutrophils (Chertov et al. 1997) and
5 releasing MMPs (Fontaine et al. 2002). Neutrophils might be an initiating factor in the
6 development of AAA. Indeed, a study showed that depletion in circulating neutrophils in an
7 elastase-induced model of AAA in mice inhibited AAA development (Eliason et al. 2005).
8
9 Moreover, a loss of the recruitment function of neutrophils prevented mice from developing
10 an AAA after elastase perfusion (Pagano et al. 2007). The abundance of mast cells observed
11 in adventitia is consistent with previous work showing that adventitial mast cells are involved
12 in inflammatory response and contribute to AAA pathogenesis (Tsuruda et al. 2008). Mast
13 cells are the main source of proteases, such as cathepsin G which contributes to SMC
14 apoptosis in AAA (Swedenborg et al. 2011) and tryptase, which regulates both inflammatory
15 cell migration and SMC apoptosis and is upregulated in AAA (Zhang et al. 2011). In
16 addition, B lymphocytes infiltrate the adventitial layer and aggregate into ATLO contributing
17 to the recruitment of other inflammatory cells. In an animal model of atherosclerosis, aged
18 ApoE^{-/-} mice, the chemokines CXCL13 and CCL21 were shown to trigger the development
19 of ATLOs (Gräbner et al. 2009). The cytokines thus produced might enhance the
20 upregulation of MMPs, responsible for the degradation of elastin and collagen, and the
21 apoptotic cell death of SMC in AAA. These combined events release reactive oxygen species
22 and induce oxidative stress (McCormick et al. 2007), leading to the activation of
23 proinflammatory (CD68⁺MR⁻) macrophages, which absorb the cell debris, turn into foam
24 cells (Ley et al. 2011) and create more oxidative stress, thus potentiating the cycle (Chertov
25 et al. 1997; McCormick et al. 2007), and reinforcing AAA development. At the same time,
26 anti-inflammatory (CD68⁺MR⁺) macrophages fight this “autoimmune” response by regulating
27 the presence of unwanted self cells.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 This study shows the importance to characterize and phenotype individually the different
5 inflammatory cells present in the human aneurysmal aortic wall. Omics (protein, miRNA)
6
7 approaches will help to provide a more detailed picture of the complex functional role of
8
9 these cells for a better understanding of the aneurysmal pathology.
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

ACKNOWLEDGMENTS

AE Acosta-Martin is a recipient of a fellowship from the “Société Française d’Hypertension Artérielle”.

We thank Jo Ann Cahn for improving our English.

All the authors declare no conflict of interest

Funding: European FAD grant (Health-F2-2008-200647)

For Peer Review

REFERENCES

- 1
2
3
4
5
6
7 Bobryshev Y.V. & Lord R.S. (2001) Vascular-associated lymphoid tissue (VALT)
8
9 involvement in aortic aneurysm. *Atherosclerosis* 154, 15-21.
10
11 Moxon J.V., Parr A., Emeto T.I., Walker P., Norman P. E., & Golledge J. (2010) Diagnosis
12
13 and monitoring of abdominal aortic aneurysm: current status and future prospects. *Curr.*
14
15 *Probl. Cardiol.* 35, 512-548.
16
17 Brown L.C. & Powell J.T. (1999) Risk factors for aneurysm rupture in patients kept under
18
19 ultrasound surveillance. UK Small Aneurysm Trial Participants. *Ann. Surg.* 230, 289-
20
21 296.
22
23 Chinetti-Gbaguidi G., Baron M., Bouhlef M.A., Vanhoutte J., Copin C, Sebti Y., Derudas B.,
24
25 Mayi T., Bories G., Tailleux A., Haulon S., Zawadzki C., Jude B. & Staels B. (2011)
26
27 Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling
28
29 but high phagocytosis because of distinct activities of the PPARgamma and LXRalpha
30
31 pathways. *Circ. Res.* 108, 985-995.
32
33 Chertov O., Ueda H., Xu L.L., Tani K., Murphy W.J., Wang J.M., Howard O.M.Z., Sayers
34
35 T.J. & Oppenheim J.J. (1997) Identification of human neutrophil-derived cathepsin G
36
37 and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils. *J.*
38
39 *Exp. Med.* 186, 739-747.
40
41
42
43
44 Dua M.M., & Dalman R.L. (2010) Hemodynamic influences on abdominal aortic aneurysm
45
46 disease: Application of biomechanics to aneurysm pathophysiology. *Vascul. Pharmacol.*
47
48 53, 11-21.
49
50
51 Eliason J.L., Hannawa K.K., Ailawadi G., Sinha I., Ford J.W., Deogracias M.P., Roelofs K.J.,
52
53 Woodrum D.T., Ennis T.L., Henke P.K., Stanley J.C., Thompson R.W. & Upchurch
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4 G.R. Jr.(2005) Neutrophil depletion inhibits experimental abdominal aortic aneurysm
5 formation. *Circulation* 112, 232-240.
6
7
8
9 Fontaine V., Jacob M.P., Houard X., Rossignol P., Plissonnier D., Angles-Cano E. & Michel
10 J.B. (2002) Involvement of the mural thrombus as a site of protease release and
11 activation in human aortic aneurysms. *Am. J. Pathol.* 161, 1701-1710.
12
13
14 Gordon S. (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 23-35.
15
16
17 Gräbner R., Lötzer K., Döpping S., Hildner M., Radke D., Beer M., Spanbroek R., Lippert
18 B., Reardon C.A., Getz .S., Fu Y.X., Hehlhans T., Mebius R.E., van der Wall M.,
19 Kruspe D., Englert C., Lovas A., Hu D., Randolph G.J., Weih F. & Habenicht A.J.
20 (2009) Lymphotoxin beta receptor signaling promotes tertiary lymphoid organogenesis
21 in the aorta adventitia of aged ApoE^{-/-} mice. *J Exp Med.* 206, 233-248.
22
23
24
25
26
27
28
29 Hobbs S.D., Claridge M.W., Quick C.R., Day N.E., Bradbury A. W & Wilmlink A.B.M.
30 (2003) LDL cholesterol is associated with small abdominal aortic aneurysms. *Eur. J.*
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- Houard X., Touat Z., Ollivier V., Louedec L., Philippe M., Sebbag U., Meilhac O., Rossignol P. & Michel J.B. (2009) Mediators of neutrophil recruitment in human abdominal aortic aneurysms. *Cardiovasc. Res.* 82, 532-541.
- Krishnaswamy G., Ajitawi O. & Chi D.S. (2006) The human mast cell: an overview. *Methods Mol. Biol.* 315, 13-34.
- Ley K., Miller Y.I. & Hedrick C.C. (2011) Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 1506-1516.
- Lohoefer F., Reeps C., Lipp C., Rudelius M., Zimmermann A., Ockert S., Eckstein H.H. & Pelisek J. (2012) Histological analysis of cellular localization of cathepsins in abdominal aortic aneurysm wall. *Int. J. Exp. Path* 93, 252-258.

- 1
2
3
4 McCormick M.L., Gavrilu D. & Weintraub N.L. (2007) Role of oxidative stress in the
5
6 pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 461-
7
8 469.
9
10
11 Michel J.B., Thauinat O., Houard X., Meilhac O., Caligiuri G. & Nicoletti A. (2007)
12
13 Topological determinants and consequences of adventitial responses to arterial wall
14
15 injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 1259-1268.
16
17
18 Michel J.B., Martin-Ventura J.L., Egidio J., Sakalihasan N., Treska V., Lindholt J., Allaire E.,
19
20 Thorsteinsdottir U., Cockerill G. & Swedenborg J. (2011) Novel aspects of the
21
22 pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans. *Cardiovasc. Res.* 90, 18-
23
24 27.
25
26
27 Otto C.M., Kuusisto J., Reichenbach D.D., Gown A.M. & O'Brien K.D. (1994)
28
29 Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis.
30
31 Histological and immunohistochemical studies. *Circulation* 90, 844-853.
32
33
34 Pagano M.B., Bartoli M.A., Ennis T.L., Wu X., Lambris J.D., Atkinson J.P., Thompson R.W.,
35
36 Hourcade D.E. & Pham C.T.N. (2007) Critical role of dipeptidyl peptidase I in neutrophil
37
38 recruitment during the development of experimental abdominal aortic aneurysms, *Proc.*
39
40 *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 2855-2860.
41
42
43 Reeps C., Pelisek J., Seidl S., Schuster T., Zimmermann A., Kuehnl A. & Eckstein H.H.
44
45 (2009) Inflammatory infiltrates and neovessels are relevant sources of MMPs in
46
47 abdominal aortic aneurysm wall. *Pathobiology* 76, 243-252.
48
49
50 Rizzo M., Krayenbuhl P.A., Pernice V., Frasheric A., Rinia G.B. & Berneisd K. (2009) LDL
51
52 size and subclasses in patients with abdominal aortic aneurysm. *Int. J. Cardiol.* 134,
53
54 406-408.
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4
5 Sagan A., Mrowiecki W., Mikolajczyk T.P., Urbanski K., Siedlinski M., Nosalski R., Korbut
6
7 abdominal aortic aneurysms 108, 1-12.
8
- 9 Sho E., Sho M., Nanjo H., Kawamura K., Masuda H., & Dalman R.L. (2005) Comparison of
10
11 cell-type-specific vs transmural aortic gene expression in experimental aneurysms. *J.*
12
13 *Vasc. Surg.* 41, 844-852.
14
- 15 Stein M., Keshav S., Harris N. & Gordon S. (1992) Interleukin 4 potently enhances murine
16
17 macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic
18
19 macrophage activation. *J. Exp. Med.* 176, 287-292.
20
- 21 Swedenborg J., Mayranpaa M.I. & Kovanen P.T. (2011) Mast cells: important players in the
22
23 orchestrated pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler. Thromb. Vasc.*
24
25 *Biol.* 31, 734-740.
26
- 27 Thompson M.M. (2003) Controlling the expansion of abdominal aortic aneurysms. *Br J.*
28
29 *Surg.* 90, 879-898.
30
- 31 Tsuruda T., Kato J., Hatakeyama K., Kojima K., Yano M., Yano Y., Nakamura K., Nakamura-
32
33 Uchiyama F., Matsushima Y., Imamura T., Onitsuka T., Asada Y., Nawa Y., Eto T. &
34
35 Kitamura K. (2008) Adventitial mast cells contribute to pathogenesis in the progression
36
37 of abdominal aortic aneurysm. *Circ. Res.* 102, 1368-1377.
38
39
- 40 Varin A. & Gordon S. (2009) Alternative activation of macrophages: immune function and
41
42 cellular biology. *Immunobiology* 214, 630-641.
43
44
- 45 Zhang J., Sun J., Lindholt J.S., Sukhova G.K., Sinnamon M., Stevens R.L., Adachi R., Libby
46
47 P., Thompson R.W. & Shi G.P. (2011) Mast cell tryptase deficiency attenuates mouse
48
49 abdominal aortic aneurysm formation. *Circ. Res.* 108, 1316-1327.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1. Distribution of inflammatory cells in the human aneurysmal aortic wall

Cellular type	Presence of cells (n=20)	Aneurysmal aortic wall*		
		ILT	Media	Adventitia
Neutrophils	7	+++	-	++
B lymphocytes	11	+	-	++ to +++
T lymphocytes	2	+	-	-
Mast cells	8	+	-	+++
Macrophages CD68 ⁺ MR ⁻	4	-	-	+++
Macrophages CD68 ⁺ MR ⁺	6	++	-	-

* taking into account the presence of cells in AAA biopsies.

ILT: Intraluminal thrombus

-: no expression; +: low; ++: intermediary; +++: high expression

Table 2. Quantification of ATLO thickness and area in the human aneurysmal aorta

Biopsies	Thickness (mm)		%	Area (mm ²)		%
	ATLO	Total		ATLO	Total	
6	2.1	6	35.0	3.9	25.0	15.6
8	1.4	3.3	42.4	3.5	12.8	27.3
11	0.7	4.5	15.6	0.5	30.5	1.6
13	0.5	5.5	9.1	0.4	20.3	2.0
15	0.5	2.4	20.8	0.4	62.1	0.6
19	2.2	5.8	37.9	5.3	29.5	18.0
20	1.7	4.4	38.6	5.1	19.6	26.0
Mean	1.3	4.6	28.5	2.7	28.5	9.6

ATLO: Adventitial tertiary lymphoid organ

Figure legends

Figure 1 Macroscopic analysis (A) and dissection (B) of AAA biopsies. A: Representative internal and external view of two AAA biopsies. B: Dissection of AAA biopsy after orientation. Transversal slides (left panel) were performed to prepare sections (right panel) of AAA tissue for histology and immunohistochemistry. This protocol was performed in every AAA sample collected and embedded in paraffin (n=20).

Figure 2 Histological analysis of AAA biopsies. Transversal sections were stained by May-Grunwald Giemsa Reagent (A-C) to visualize the different layers of the aortic wall from ILT (left) to adventitia (right) at low magnification (A). Higher magnification showed abundant resident cells (B) and cholesterol crystals indicated by * (C). Lipids were detected by Oil red O staining (D) and iron-containing deposits by Perls-Van Gieson staining (E). Histological analysis was performed in every AAA sample collected (n=20). Scale bar: 50 μ m unless otherwise indicated.

Figure 3 Distribution of inflammatory cells in AAA biopsies by immunostaining. Stained cells were analysed in intraluminal thrombus (left panels) and adventitia (right panels) of the aneurysmal aortic wall. The inflammatory cells visualized are neutrophils (anti-CD66e), B lymphocytes (anti-CD20), T lymphocytes (anti-CD3) and mast cells (anti-mast cell tryptase). Macrophages were stained with anti-CD68 antibody and the subtype M1 and M2 was discriminated and visualized with anti-macrophage mannose receptor antibody. Immunostaining analysis was performed in every collected AAA sample (n=20). Scale bar: 50 μ m.

1
2
3
4
5
6
7 **Figure 4** Characterization of adventitial tertiary lymphoid organ (ATLO) in AAA biopsies by
8 immunostaining. A: Representative AAA section with intraluminal thrombus (left) and
9 adventitia (right). B: B lymphocytes were stained with anti-CD20 antibody. C: Mast cells
10 were stained with anti-mast cell tryptase antibody. Scale bar: 50 μ m unless otherwise
11 indicated.
12
13
14
15
16
17

18
19
20 **Figure 5** Scheme of development of aneurysmal aorta (upper panel) and representation of
21 distribution of inflammatory cells throughout the different layers (lower panel) : intima,
22 media, adventitia and intraluminal thrombus. LDL is one of the triggering factor of
23 aneurysmal development, initiating inflammatory response and media degradation.
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

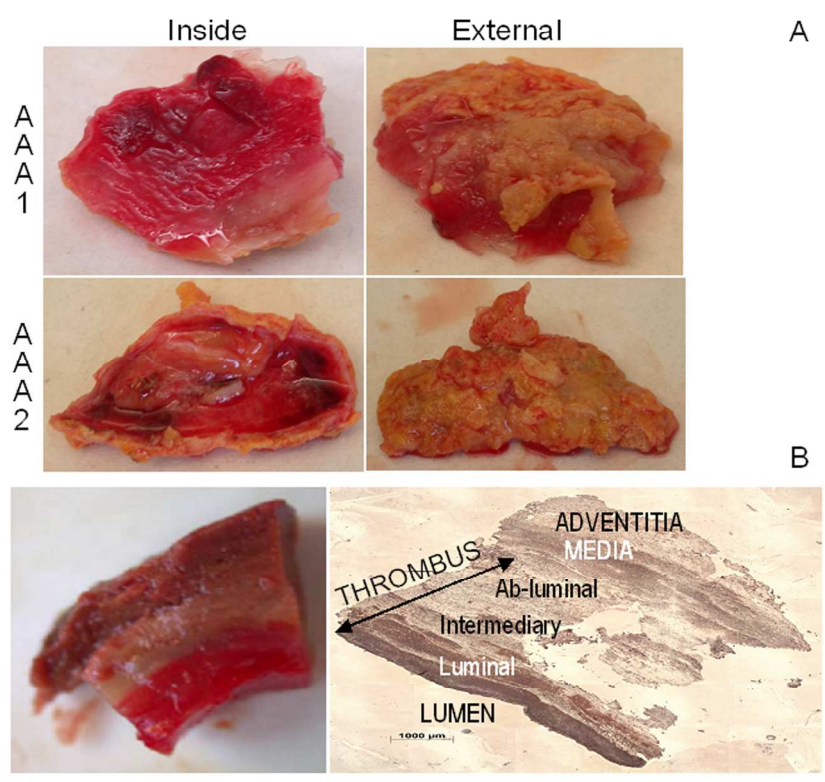


Figure 1

190x254mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

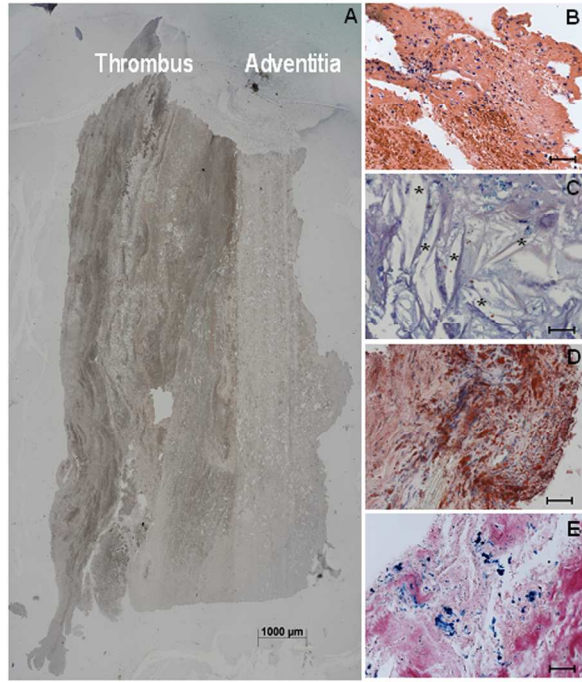


Figure 2

190x254mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

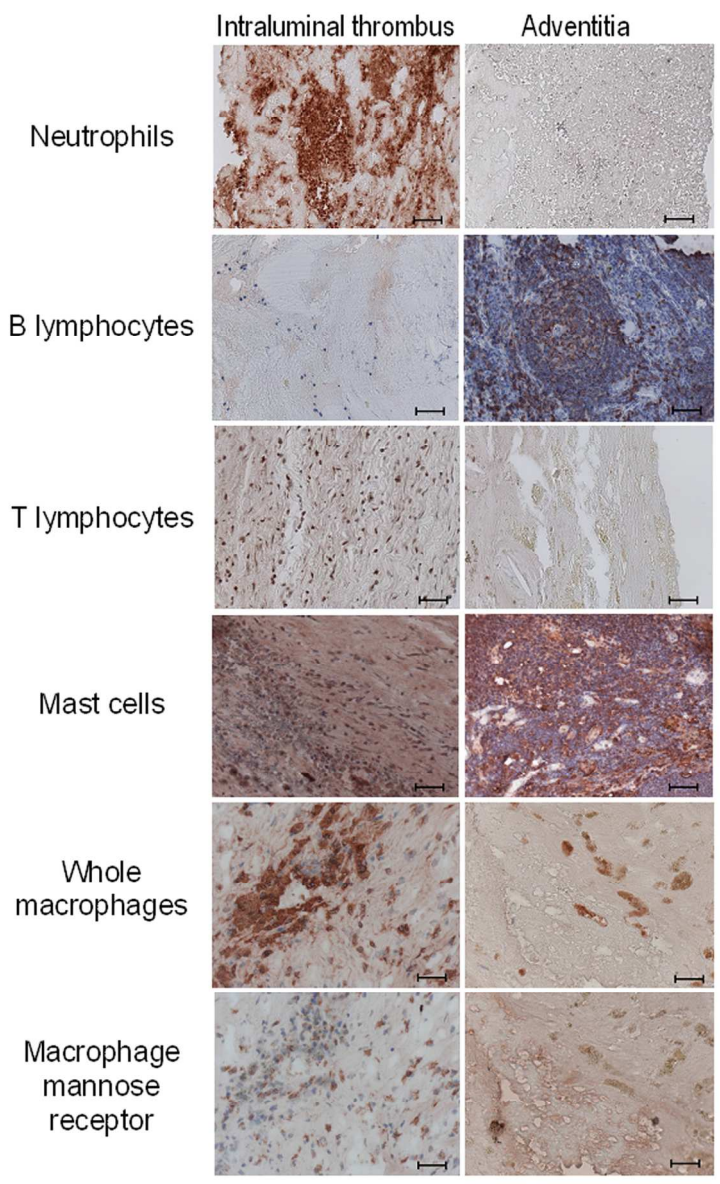


Figure 3

190x254mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

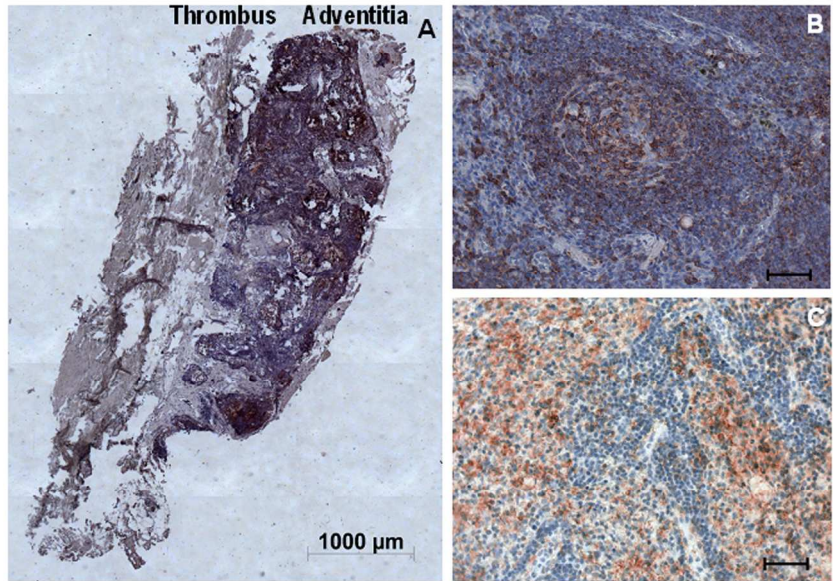


Figure 4

190x254mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

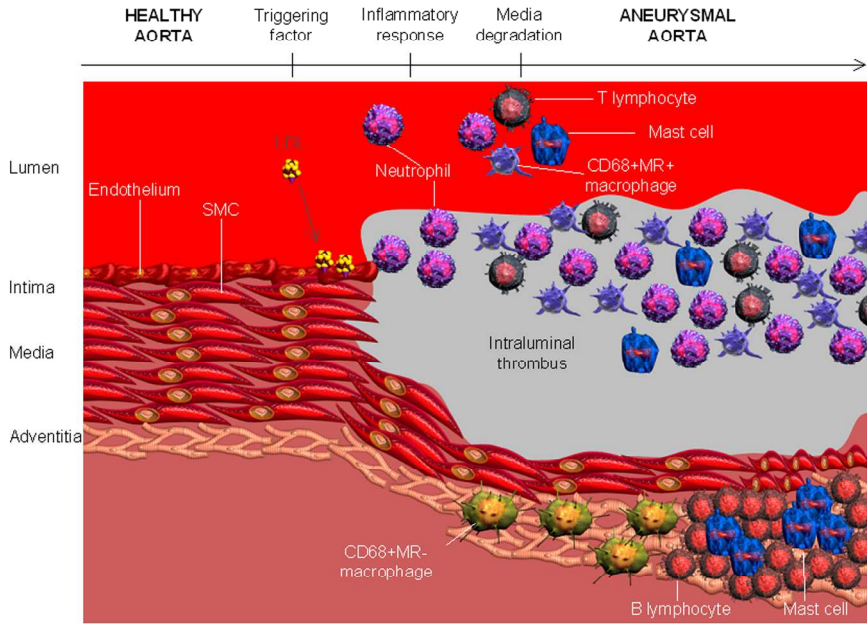


Figure 5

254x190mm (300 x 300 DPI)

Review

Conclusion de l'article

Avec cette étude, nous avons montré pour la première fois la présence des deux sous-types de macrophages au sein de la paroi aortique anévrysmale. De plus, ces deux sous-types de macrophages présentaient une localisation différente : les macrophages M1 pro-inflammatoires étaient localisés dans l'adventice alors que les macrophages M2 anti-inflammatoires étaient localisés dans la partie luminale du thrombus intraluminal, dans la même couche que d'autres cellules de l'inflammation. Nous avons également pu mettre en évidence deux zones distinctes riches en cellules de l'inflammation. En effet, bien qu'on observe une grande hétérogénéité au niveau de la distribution cellulaire entre les différents échantillons : aucune cellule de l'inflammation n'a été retrouvée dans la média, comme décrit précédemment [Michel *et al.* 2007], la partie luminale du thrombus intraluminal contenait des neutrophiles, lymphocytes T, mastocytes et les macrophages M2 et l'adventice contenait principalement des lymphocytes B, mastocytes et les macrophages M1. Nous avons enfin observé dans plus de la moitié des échantillons analysés une organisation des lymphocytes B et mastocytes en structures compactes décrites comme des tissus lymphoïdes tertiaires (ATLO) [Bobryshev *et al.* 2001].

L'étude protéomique de ces types cellulaires spécifiquement isolés par microdissection laser nous permettrait d'éclaircir les mécanismes de la réponse inflammatoire dans la pathologie anévrysmale. Il est intéressant de noter que l'absence de ces cellules inflammatoires dans la paroi aortique saine ne nous permettra pas de réaliser des analyses protéomiques différentielles entre les cellules anévrysmales et saines. L'analyse des cellules inflammatoires présentes dans la paroi aortique anévrysmale consistera donc en l'établissement de leur profils protéomiques et transcriptomiques. Une étude protéomique différentielle entre les macrophages des deux sous-types M1 et M2 nous permettra également de mieux comprendre leur rôle respectif dans l'AAA.

3.2. Localisation des cellules endothéliales

Nous nous sommes également intéressés aux cellules endothéliales présentes dans la paroi aortique. L'agression de l'endothélium par les LDL pouvant être un mécanisme déclencheur de l'AAA [Hobbs *et al.* 2003], l'étude des cellules endothéliales pourrait apporter des informations intéressantes quant aux mécanismes de développement de l'AAA. Ces cellules ont donc été recherchées dans les 20 échantillons de paroi anévrysmale par un marquage immunohistochimique avec un anticorps anti-CD31.

Dans une aorte saine, les cellules endothéliales sont localisées dans l'intima et forment l'endothélium, interface entre la paroi aortique et le sang. Cependant, dans le cas des aortes anévrysmales étudiées, l'endothélium n'a pas pu être observé. En effet, cet endothélium est dégradé dans l'AAA et on observe la formation d'un thrombus intraluminal le remplaçant [Coutard *et al.* 2010]. Des cellules endothéliales ont été observées dans la média et l'adventice de la paroi aortique, sur des sites de néovascularisation (figure 11). Cette néovascularisation a été observée dans 40% des échantillons étudiés.

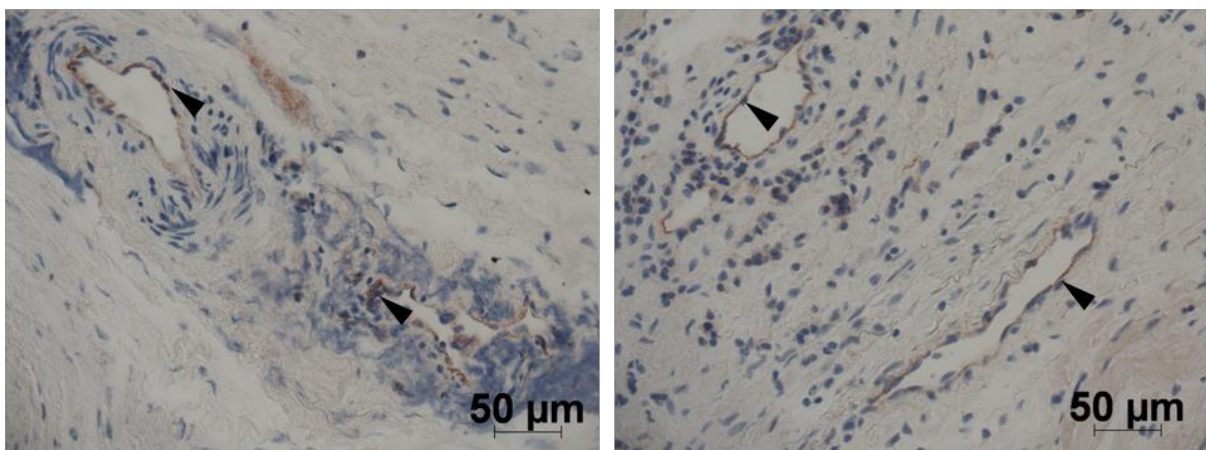


Figure 11. Observation de cellules endothéliales en périphérie de néovaisseaux par un marquage anti-CD31

La néovascularisation du tissu anévrysmal a été observée en 1995 par Holmes *et al.* [Thompson *et al.* 1995] et a été montrée comme étant corrélée avec le degré d'infiltration des cellules inflammatoires [Thompson *et al.* 1996] suggérant un passage des cellules inflammatoires présentes au sein de la paroi aortique par ces néovaisseaux. L'absence de néovaisseaux dans le thrombus intraluminal peut être expliquée par une forte activité protéolytique dans ce thrombus [Fontaine *et al.* 2004]. La présence de néovaisseaux dans les tissus observés provenant d'AAA d'un diamètre supérieur à 50 mm est cohérente avec les travaux de Choke *et al.* qui ont montré en 2006 que la néovascularisation était augmentée sur les sites de rupture de l'anévrysme [Choke *et al.* 2006].

Cependant, malgré le rôle que doivent jouer les cellules endothéliales dans le développement de l'AAA, l'absence d'endothélium et le faible nombre de cellules endothéliales observées ne nous permettra pas d'isoler suffisamment de matériel par microdissection laser pour réaliser des analyses protéomiques sur ce type cellulaire. Aussi, nous nous sommes concentrés sur les types cellulaires plus abondants comme les cellules de l'inflammation et les cellules musculaires lisses.

3.3. Localisation des cellules musculaires lisses

La dégradation de la média et la raréfaction des cellules musculaires lisses est également un mécanisme essentiel au développement de la pathologie anévrysmale [Lopez-Candales *et al.* 1997, Henderson *et al.* 1999, Liao *et al.* 2000, Satta *et al.* 2002]. En effet, c'est la dégradation de l'élastine et du collagène composant cette matrice qui va entraîner la perte d'élasticité et de rigidité de la paroi aortique. De plus, la mort des CML, qui sont les seules cellules capables de régénérer cette paroi en synthétisant l'élastine et le collagène, va amplifier la dégradation de la paroi aortique. Il est donc intéressant d'étudier ces CML au sein de la paroi aortique afin de mieux connaître les mécanismes entraînant leur mort. Ces CML ont donc été observées dans les échantillons d'aortes anévrysmales, mais également dans des aortes saines, grâce à des marquages immunohistochimiques avec un anticorps anti-actine de cellule musculaire (SMA), un marqueur de CML [Skalli *et al.* 1989].

Comme attendu, nous observons dans les aortes saines les CML organisées en couches et formant la média, qui représente la majeure partie de la paroi aortique (figure 12).

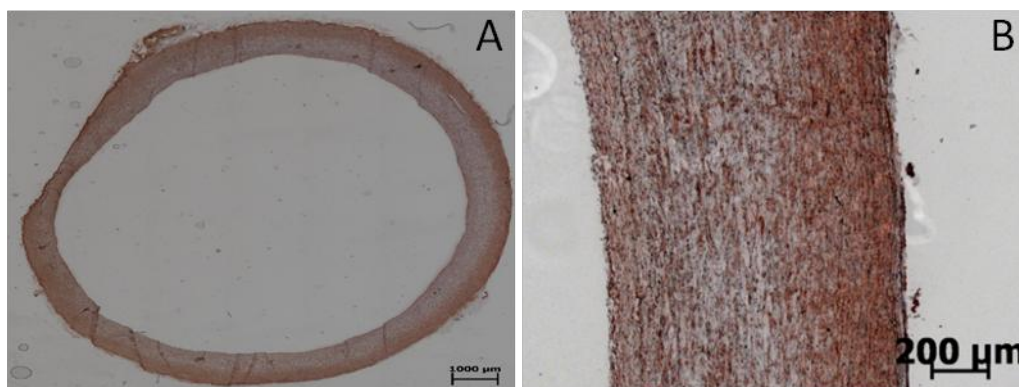


Figure 12 : Localisation des CML au sein de la paroi aortique saine par un marquage anti-SMA. A : Image représentative d'une coupe transversale d'aorte saine. B : Image représentative de la média d'une aorte saine. Echelle : 1000 µm à gauche, 200 µm à droite.

Dans le cas des aortes anévrysmales, une dégradation de la média est bien observée. En effet, dans 15% des échantillons, les CML n'ont pas pu être observées. Dans les autres cas, les CML étaient localisées en une mince couche de cellules désorganisées au niveau de la média (figure 13A et B). Dans de rares cas, des CML ont été retrouvées en périphérie de zones riches en cellules de

Résultats

l'inflammation (figure 13C). Enfin, des CML étaient également observées autour des sites de néovascularisation (figure 13D), comme précédemment décrit [Reeps *et al.* 2009].

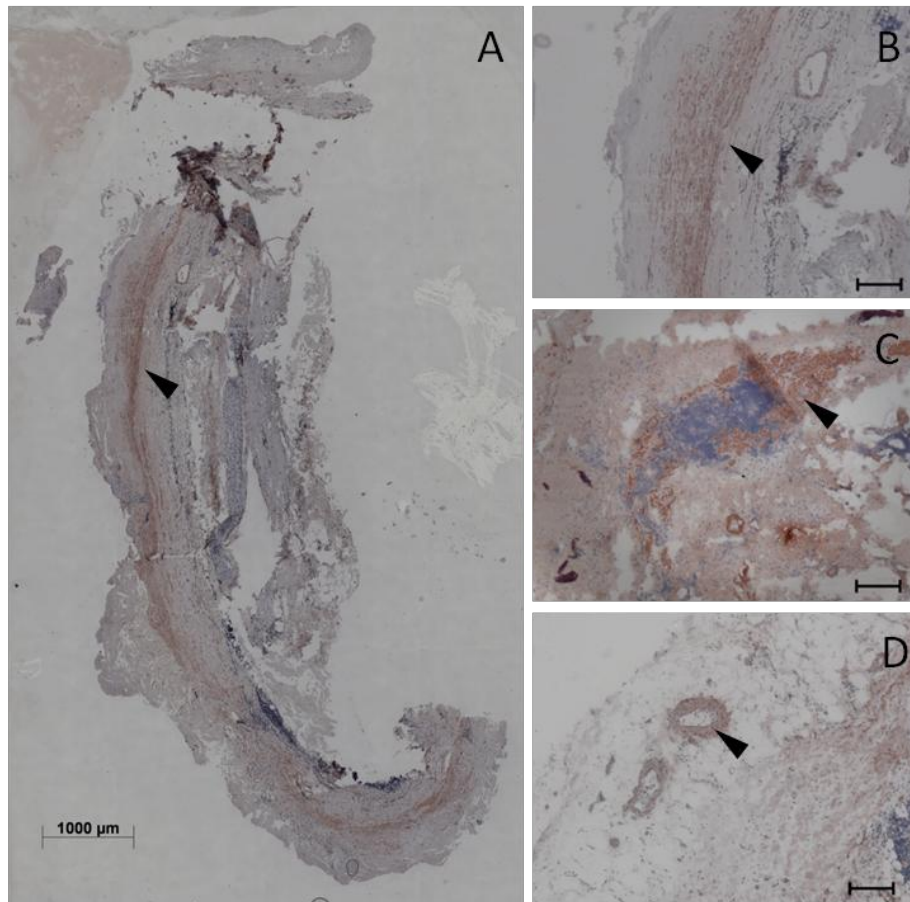


Figure 13. Localisation des CML au sein de la paroi aortique anévrysmale par un marquage anti-SMA. A : Image représentative d'une coupe transversale d'aorte anévrysmale. B : Image représentative de la média d'une aorte anévrysmale. C : CML en périphérie de zone inflammatoire. D : CML autour d'un site de néovascularisation. Echelle : 1000 µm à gauche, 200 µm à droite.

Le marquage par un anticorps anti-SMA nous a ainsi permis de localiser les CML principalement présentes dans la média. Les CML d'aortes saines étaient organisées en couches structurées comme observé sur la figure 14A. En ce qui concerne les CML d'aortes anévrysmales, de manière intéressante, nous avons pu observer deux types de CML différents. Certaines CML présentaient une forme allongée comme les CML d'aortes saines mais la média était moins organisée (figure 14B) alors que d'autres présentaient une forme arrondie et sans organisation précise (figure 14C).

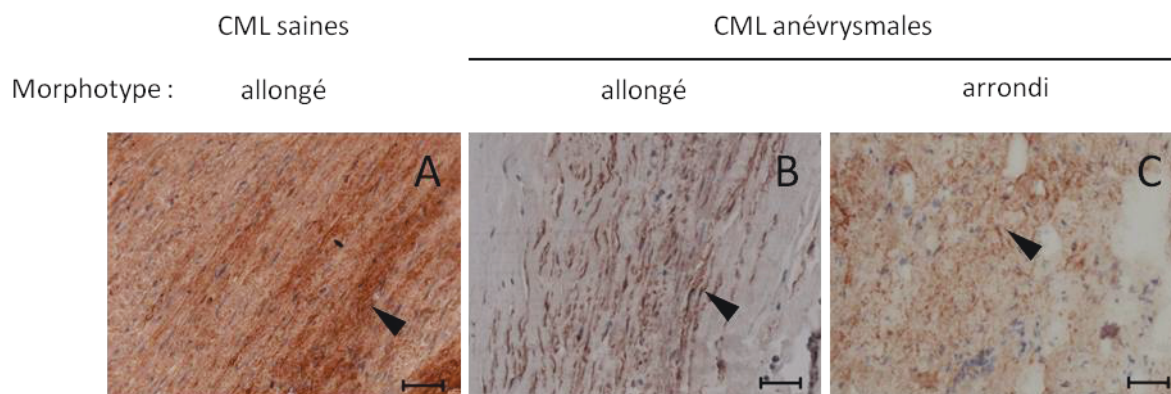


Figure 14 : Observation de différents types de CML par un marquage anti-SMA. A : CML d'aortes saines. B : CML d'aortes anévrysmales allongées. C : CML d'aortes anévrysmales arrondies. Echelle : 50 μ m.

Nous avons donc cherché à mieux caractériser les différences entre ces CML. Un marquage par un autre marqueur de CML, la desmine [Nachtigal *et al.* 1989, Paulin *et al.* 2004], nous a permis de discriminer les CML d'aortes saines qui exprimaient toutes la desmine (figure 15A) alors que dans les CML anévrysmales, cette expression n'était pas uniforme, certaines cellules l'exprimant faiblement alors que d'autres non (figure 15B et C). Une perte de l'expression de la desmine par les CML anévrysmales avait déjà été observée dans les CML d'anévrysmes rompus par Tanasković *et al* [Tanaskovic *et al.* 2010].

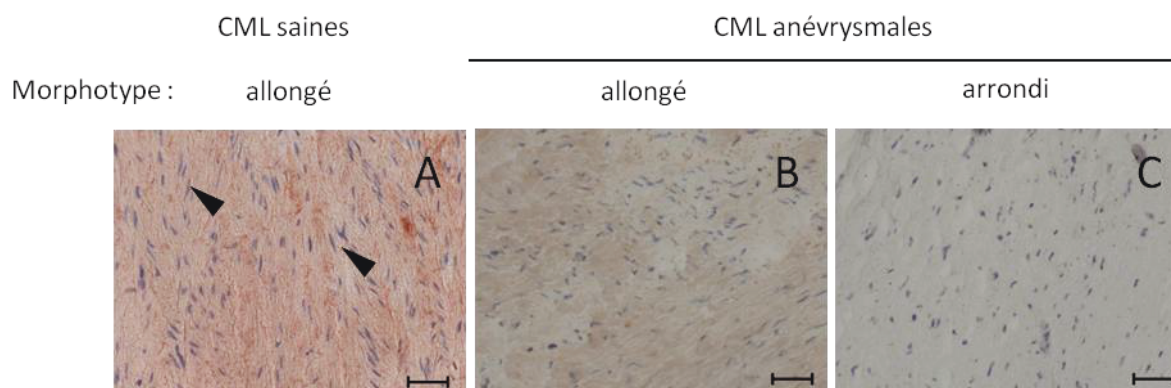


Figure 15 : Discrimination des CML d'aortes saines et anévrysmales par un marquage anti-desmine. A : CML d'aortes saines. B : CML d'aortes anévrysmales allongées. C : CML d'aortes anévrysmales arrondies. Echelle : 50 μ m.

Enfin, nous avons cherché à caractériser la différence observée entre les CML d'aortes anévrysmales de morphotype allongé et rond. Un changement du morphotype des CML ayant déjà été observé lors d'un AAA [Liao *et al.* 2000] et sachant que dans cette pathologie, on observe une augmentation de la mort des CML [Lopez-Candales *et al.* 1997, Satta *et al.* 2002], nous avons supposé que les CML présentant un phénotype arrondi pouvaient être en apoptose. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des marquages anti-caspase 3, une protéase impliquée dans

Résultats

l'apoptose [Cohen 1997] et déjà utilisée pour montrer l'apoptose des CML dans un modèle expérimental d'AAA chez le rat [Sinha *et al.* 2005]. Nous avons ainsi observé que les CML présentant un morphotype allongé, dans les aortes saines et dans les aortes anévrysmales, n'exprimaient pas la caspase 3 (figure 16A et B) alors que les CML présentant un morphotype arrondi l'exprimaient (figure 16C).

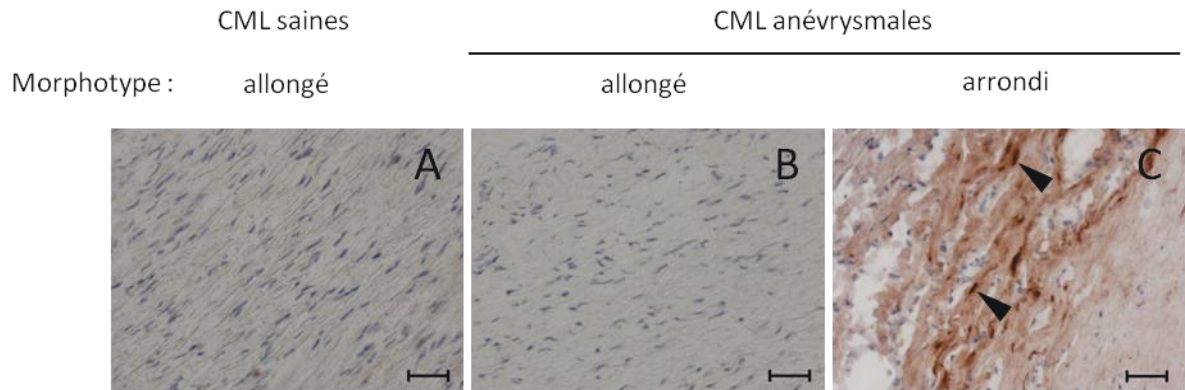


Figure 16 : Discrimination des morphotypes de CML allongées et arrondies par un marquage anti-caspase 3. A : CML d'aortes saines. B : CML d'aortes anévrysmales allongées. C : CML d'aortes anévrysmales arrondies. Echelle : 50 μ m.

Ces CML en apoptose sont appelées CML anoïkis [Michel 2003]. L'anoïkis est un terme qui désigne la mort programmée des cellules induite par la perte d'interaction entre la cellule et la matrice extracellulaire [Frisch *et al.* 1994]. Il a été montré que des CML en culture dérivées d'aortes anévrysmales présentaient un phénotype différent des CML saines, phénotype qui se caractérise par une perte de la morphologie allongée, une diminution de la prolifération et une augmentation de l'apoptose [Liao *et al.* 2000]. Nous retrouvons ici cette différence de phénotype mais observons également deux morphotypes différents parmi les CML de la paroi aortique anévrysmale. Ces trois types de CML pourraient refléter l'état d'avancement de la pathologie anévrysmale. Il est possible que le phénotype des CML anévrysmales soit modifié pour s'adapter au contexte de dégradation de la paroi aortique, que ce soit en cause ou en conséquence de cette dégradation avec pour finalité l'anoïkis des CML. Des études spécifiques des protéomes et transcriptomes de ces différents types de CML sont donc nécessaires pour élucider ces mécanismes.

4. Etude des deux types de macrophages M1 et M2 isolés du tissu anévrysmal par microdissection laser

Après avoir localisé les différents types cellulaires impliqués dans l'AAA, nous avons voulu les étudier spécifiquement. En effet, Sho *et al* ont montré que l'étude du tissu entier masque des résultats qui sont obtenus lors de l'analyse spécifique des types cellulaires le composant [Sho *et al.* 2005]. Cette analyse spécifique est importante dans un tissu complexe comme la paroi aortique anévrysmale dans laquelle nous avons observé des cellules aux propriétés parfois opposées (par exemple les macrophages pro- et anti-inflammatoires). Nous avons choisi de nous intéresser en premier lieu aux macrophages. En effet, nous avons pu observer la présence des deux sous-types de macrophages pro-inflammatoires M1 et anti-inflammatoires M2 dans des couches différentes de la paroi aortique, suggérant des rôles différents dans le développement de l'anévrysme. De nombreuses études ont déjà étudié le rôle des macrophages dans la pathologie anévrysmale, notamment au laboratoire où les profils protéomiques des macrophages en culture cellulaire ont été comparés entre les patients présentant ou non un AAA [Acosta-Martin *et al.* 2009, Lamblin *et al.* 2010]. Cependant, ces études n'ont pas pris en compte les différents sous-types de macrophages. Il est donc intéressant d'étudier ces sous-types de macrophages afin d'élucider leur rôle dans la pathologie anévrysmale. De plus, les protéines sécrétées par chaque sous-type de macrophages pourraient être des biomarqueurs potentiels de l'AAA.

Nous avons choisi deux approches pour l'analyse de ces macrophages. La première approche est une approche ciblée sur une protéine spécifique : la peroxiredoxine-1. Cette protéine a été décrite récemment comme étant un biomarqueur potentiel de l'AAA [Lamblin *et al.* 2010, Martinez-Pinna *et al.* 2011] et a été montrée comme étant surexprimée par les macrophages de patients présentant un AAA [Lamblin *et al.* 2010]. Nous avons donc cherché à déterminer si l'augmentation de la peroxiredoxine-1 chez les patients avec un AAA provenait plus particulièrement de l'un ou l'autre type de macrophage M1 ou M2.

Nous avons ensuite réalisé une approche sans *a priori* en identifiant les protéines différentiellement exprimées entre les deux sous-types de macrophages M1 et M2. Pour cela, nous avons comparé leur profil protéomique par 2D-DIGE puis identifié les spots différentiellement exprimés par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF.

4.1. Article : Rôle des macrophages pro-inflammatoires CD68⁺MR⁻ dans l'expression de peroxiredoxine-1 dans les anévrysmes de l'aorte abdominale chez l'homme

Nous nous sommes donc dans un premier temps intéressés à l'expression de la peroxiredoxine-1 dans les deux sous-types de macrophages isolés du tissu anévrysmal par microdissection laser. Pour cela, après avoir repéré des zones riches en macrophages des deux sous-types par marquages en immunohistochimie, nous avons isolé ces zones enrichies en macrophages par microdissection laser. Nous avons ensuite validé cet isolement en comparant par q-RT-PCR l'expression de gènes connus comme étant spécifiques des macrophages M1 ou M2 (TNF α , IL1 β , MRC1 et CCL18) entre les macrophages isolés du tissu anévrysmal et des macrophages différenciés en M1 ou M2 en culture cellulaire. Après cette étape de validation, nous avons étudié l'expression de la peroxiredoxine-1 dans les deux sous-types de macrophages isolés au niveau transcriptomique (par q-RT-PCR) et protéomique (par western blot). Des expériences de colocalisation en immunohistochimie, immunofluorescence et des dosages ELISA dans les deux sous-types de macrophages nous ont ensuite permis de valider les résultats obtenus.

Résultats complémentaires

En effectuant une analyse protéomique différentielle de monocytes différenciés en macrophages en culture cellulaire, il a précédemment été montré au laboratoire que la quantité de PRDX-1 était augmentée chez les patients présentant un AAA par rapport à des patients présentant une artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI) dans l'étude LILLe Aneurysmal Study (LILAS) [Lamblin *et al*, 2010]. Nous avons ici quantifié PRDX-1 et MMP-9 dans le plasma de plusieurs populations : une première population composée de patients ne présentant pas d'athérosclérose, de maladie cardiovasculaire ou d'AAA (contrôles négatifs, n=28), une seconde composée de patients AOMI présentant une athérosclérose mais pas d'AAA (contrôles AOMI, n=18) et une population composée de patients présentant à la fois une athérosclérose et un AAA (n=24). Les caractéristiques de base de ces populations sont présentées dans les tables supplémentaires 1 et 2. Les patients AAA étaient tous des hommes et étaient plus âgés que les patients contrôles. Un quart des patients contrôles et deux tiers des patients AAA avaient de l'hypertension. Ils ne présentaient pas d'autre différence significative pour les autres facteurs de risque cardiovasculaire, en particulier pour le tabagisme, le diabète ou des antécédents familiaux de maladies cardiovasculaires. Comme précédemment décrits, les patients AOMI et AAA ne différaient pas au niveau de leur traitement [Lamblin *et al*, 2010]. A l'inverse, les facteurs de risque cardiovasculaires étaient significativement différents entre les contrôles négatifs et les patients AOMI (table supplémentaire 2).

Afin de valider PRDX-1 en tant que biomarqueur potentiel circulant de l'AAA, nous avons comparé les concentrations plasmatiques de PRDX-1 et MMP-9 entre les patients avec ou sans AAA. Nous avons trouvé une concentration significativement plus élevée de PRDX-1 dans le plasma de patients AAA par rapport aux contrôles (médiane = 128 [88-203] contre 67 [27-127], $p = 0,005$, figure supplémentaire A), mais les concentrations de MMP-9 entre ces deux groupes ne présentaient pas de différence significative (médiane = 38 [31-56] contre 35 [17-59], $p = 0,80$, figure supplémentaire A). Nous avons ensuite séparé les hommes et les femmes chez les patients contrôles et avons observé que les concentrations en PRDX-1 étaient supérieures chez les hommes que chez les femmes ($p = 0,004$, figure supplémentaire B). Ces résultats n'ont pas été retrouvés avec les concentrations en MMP-9 (figure supplémentaire B). Nous avons ensuite comparé les hommes sains (contrôles négatifs) et les patients contrôles AOMI et observé une augmentation de PRDX-1 chez les patients AOMI (médiane = 110 [62-149] contre 71 [30-125], $p = 0,008$). Ces résultats montrent une augmentation graduelle de la concentration plasmatique de PRDX-1 entre les 4 groupes de sujets (tendance : $p = 0,001$, figure supplémentaire C et table supplémentaire 2). Une fois encore, ces résultats n'ont pas été observés pour la concentration plasmatique de MMP-9 (figure supplémentaire C). Enfin, afin d'étudier l'association indépendante entre AAA et la concentration

Résultats

plasmatique de PRDX-1, nous avons réalisé une analyse ajustée sur l'âge, le sexe et la consommation de tabac. Après ajustement, la concentration plasmatique de PRDX-1 a été trouvée significativement associée avec le sexe masculin ($p < 0,0001$) mais pas avec l'âge ($p = 0,07$) ni la consommation de tabac ($p = 0,25$).

Table supplémentaire 1. Caractéristiques des populations étudiées pour le dosage plasmatiques

	Contrôles (n=46)	AAA (n=24)	P Contrôles vs AAA
Age (années)	53 ± 12.4	68.0 ± 6.1	<0.0001
Sexe masculin (%)	38 (82.6)	24 (100)	0.04
Données anthropométriques			
Poids (kg)	76.2 ± 14.1	82.9 ± 11.6	0.05
Taille (cm)	173.2 ± 8.6	173.8 ± 5.4	0.77
Indice de masse corporelle (kg/m ²)	25.5 ± 3.8	27.4 ± 3.7	0.04
Diamètre de l'aorte (mm)	-	56.1 ± 2.3	NA
Facteurs de risque cardiovasculaire, n (%)			
Fumeurs	7 (15)	4 (17)	1.0
Ancien fumeurs	24 (52)	17 (71)	0.13
Hypercholestérolémie	17 (37)	14 (58)	0.09
Hypertension	11 (24)	15 (63)	0.002
Diabètes	5 (11)	4 (17)	0.48
Antécédent familial de maladie cardiovasculaire	12 (26)	4 (17)	0.37
AOMI, n (%)	18 (39)	24 (100)	< 0.0001

Table supplémentaire 2. Caractéristiques des femmes et des hommes de la population contrôle

	Sujets sains		AOMI Hommes (n=18)	P femmes vs hommes sains	P Sujets sains vs AOMI
	Femmes (n=8)	Hommes (n=20)			
Age (années)	48.8 ± 5.22	46.2 ± 13.3	62.3 ± 6.6	0.74	<0.0001
Données anthropométriques					
Poids (kg)	61.4 ± 12.3	79.8 ± 10.1	78.7 ± 15.1	0.001	0.40
Taille (cm)	162.8 ± 7.8	177.9 ± 6.3	172.6 ± 7.1	0.0005	0.58
Indice de masse corporelle (kg/m ²)	23.0 ± 3.6	25.3 ± 3.2	26.8 ± 3.9	0.01	0.03
Facteurs de risque cardiovasculaires, n (%)					
Fumeurs	1 (13)	2 (10)	4 (22)	1.0	0.41
Anciens fumeurs	2 (25)	9 (45)	13 (72)	0.42	0.03
Hypercholestérolémie	1 (13)	4 (20)	12 (67)	1.0	0.0008
Hypertension	1 (13)	0	10 (56)	0.29	<0.0001
Diabètes	0	0	5 (28)	1.0	0.006
Antécédents familiaux de maladies cardiovasculaires	4 (50)	6 (30)	2 (11)	0.40	0.09
AOMI, n (%)	0	0	18 (100)	NA	NA

NA : non applicable

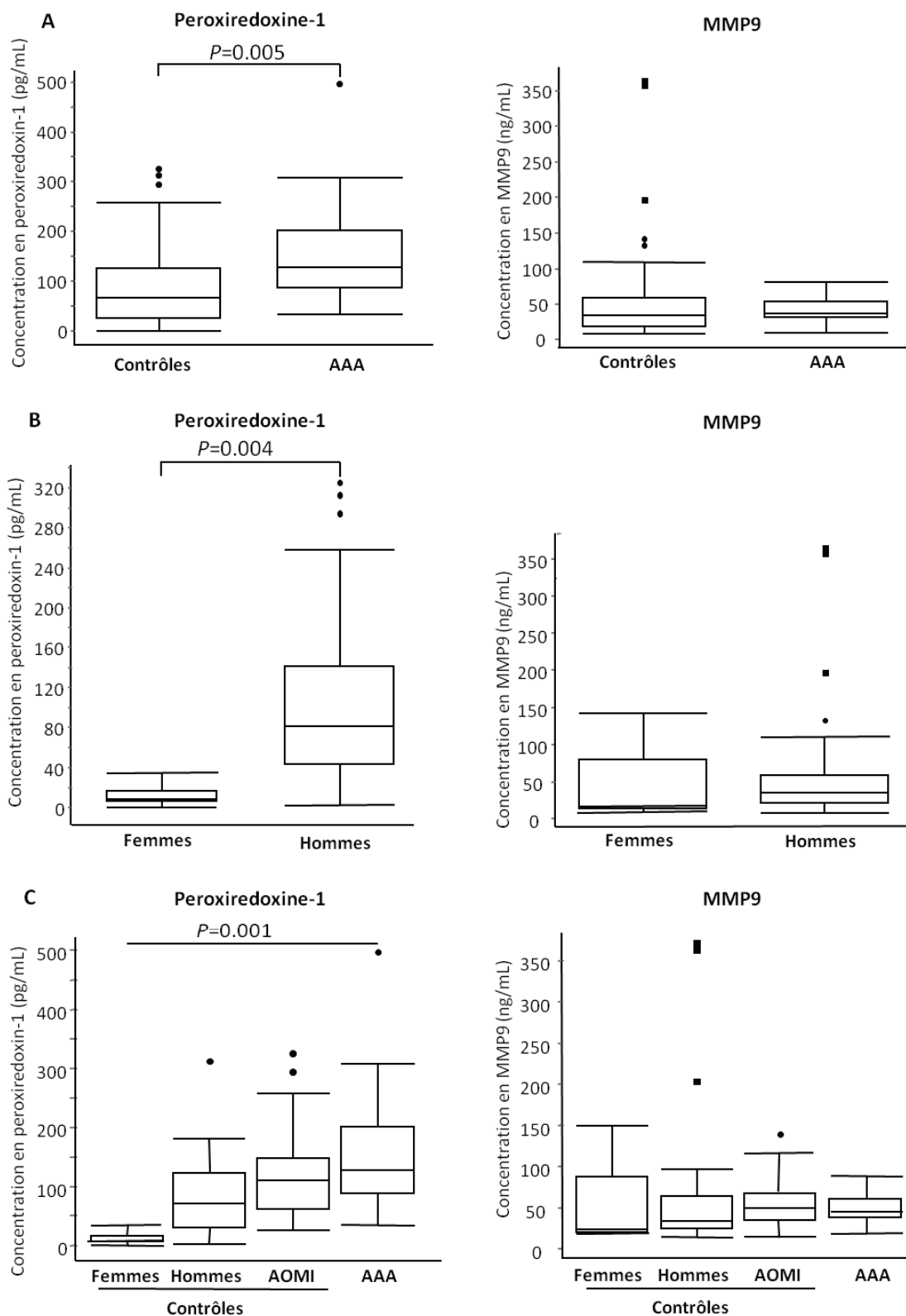


Figure supplémentaire : dosages de la peroxyredoxine-1 et de la MMP-9 dans le plasma de patients sains, AOMI et AAA. A : Comparaison des concentrations plasmatiques entre patients avec ou sans AAA. B : Comparaison des concentrations plasmatiques entre hommes et femmes. C : Comparaison des concentrations plasmatiques entre les 4 groupes de sujets : hommes, femmes, AOMI et AAA.

Conclusion de l'article

Notre stratégie consistant en l'isolement de zones enrichies en macrophages des sous-types M1 pro-inflammatoires et M2 anti-inflammatoires nous ont permis de montrer une surexpression de la peroxyredoxine-1 dans les macrophages M1. La peroxyredoxine-1 étant une protéine impliquée dans le stress oxydatif, ce résultat est cohérent avec le phénotype pro-inflammatoire des macrophages M1. Nos résultats ont donc montré que l'augmentation de peroxyredoxine-1 retrouvée dans le plasma de patients présentant un AAA provenait des macrophages M1. Nous avons également montré une expression plus faible de la peroxyredoxine-1 dans le plasma des femmes contrôles par rapport aux hommes contrôles et aux hommes avec athérosclérose ou présentant un AAA. Une étude approfondie dans une plus grande population est nécessaire afin de déterminer si l'utilisation potentielle de la peroxyredoxine-1 comme biomarqueur de l'AAA doit être différente entre les hommes et les femmes. Cette étude sur une grande population permettra aussi de déterminer si la concentration plasmatique en peroxyredoxine-1 est différente entre les patients présentant un AAA et les patients athérosclérotiques, différence qui n'a pas été observée ici.

A l'inverse de la peroxyredoxine-1, l'étude de la MMP-9, une métalloprotéase de matrice montrée comme étant principalement exprimée dans les macrophages lors de l'AAA [Thompson *et al.* 1995] n'a pas montré de différence d'expression entre les deux sous-types de macrophages isolés du tissu anévrysmal alors qu'elle était surexprimée dans les macrophages M1 par rapport aux M2 en culture cellulaire. Aucune différence significative n'a été retrouvée non plus entre les plasmas de patients présentant ou non un AAA.

Ces résultats montrent bien l'intérêt de la peroxyredoxine-1 comme biomarqueur potentiel de l'AAA et démontrent l'intérêt d'étudier séparément ces deux sous-types de macrophages en les isolant par microdissection laser. En effet, l'exemple de la peroxyredoxine-1 illustre le fait que des protéines dont l'expression est différentielle entre les deux types de macrophages peuvent être des biomarqueurs potentiels de l'AAA. Une étude globale des protéomes des deux sous-types de macrophages nous permettrait donc de mieux définir leur rôle respectif dans l'AAA, et l'étude des différences d'expression entre ces deux sous-types de macrophages pourrait permettre l'identification de nouveaux biomarqueurs potentiels de l'AAA.

4.2. Etude des profils protéomiques des deux types de macrophages M1 et M2

Après nous être intéressés à l'expression d'une protéine, la peroxiredoxine-1, nous avons donc voulu comparer les protéomes totaux des deux sous-types de macrophages. Une étude protéomique différentielle a donc été réalisée sur les macrophages isolés du tissu anévrysmal et caractérisés précédemment comme étant les deux sous-types M1 et M2. Pour cela, nous avons utilisé la technique de séparation 2D-DIGE et une analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF et MALDI-TOF/TOF. Cependant, la technique de 2D-DIGE a nécessité des mises au point pour être adaptée aux échantillons obtenus par microdissection laser, souvent obtenus en faible quantité.

4.2.1. Mise au point de la technique 2D-DIGE

Test de la sensibilité de la technique 2D-DIGE

Nous avons en premier lieu testé la quantité de protéines nécessaires pour réaliser un gel 2D-DIGE. Au laboratoire, un marquage des échantillons par saturation est couramment utilisé, avec 5 μg d'extrait protéique [Dupont *et al.* 2008]. Afin de déterminer la sensibilité de la technique DIGE, nous avons testé différentes quantités d'extraits protéiques issus de macrophages en culture : 5, 1 et 0,5 μg . Sur chaque gel obtenu, le nombre de spots détectés a été compté avec le logiciel *Image Master 2D Platinum*. Les résultats obtenus sont présentés en figure 17.

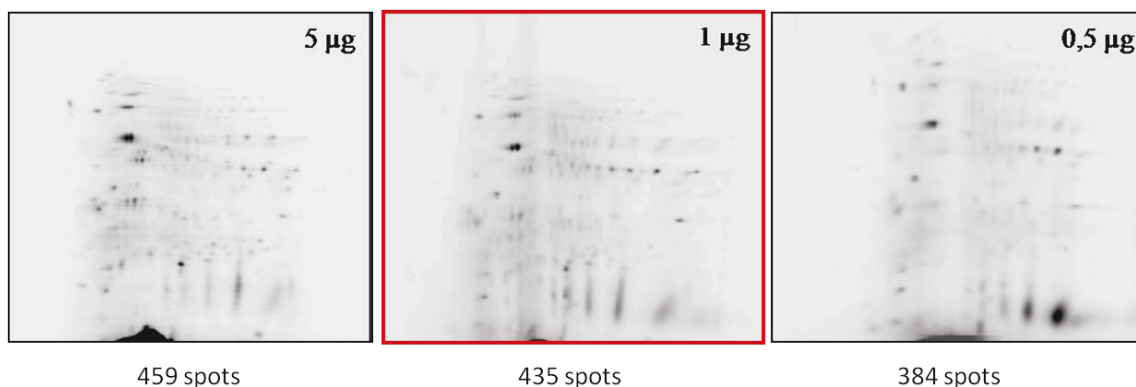


Figure 17. Images des gels 2D-DIGE obtenus avec 5, 1 et 0,5 μg de protéines. Le nombre de spots détectés avec *Image Master 2D Platinum* est indiqué sous chaque gel.

Ces résultats montrent une détection du nombre de spots équivalente entre les gels réalisés avec 5 μg et les gels réalisés avec 1 μg de protéines. En effet, 435 spots sont détectés avec 1 μg de protéines, soit presque 95% du nombre de spots détectés avec 5 μg (459 spots), quantité couramment utilisée avec un marquage en saturation. Cependant, nous n'observons plus que 384 spots en utilisant 0,5 μg de protéines, soit environ 83% du nombre de spots détectés avec 5 μg de protéines. Nous avons donc décidé de réaliser les analyses protéomiques à partir des extraits issus de microdissection laser à partir d'au moins 1 μg de protéines.

Mise au point du tampon d'extraction

Nous avons ensuite testé plusieurs tampons d'extraction afin de déterminer si la résolution des gels 2D-DIGE pouvait être améliorée sur des échantillons microdisséqués. Trois tampons d'extraction ont été testés : le tampon d'extraction classiquement utilisé au laboratoire composé d'urée 7 M, thiourée 2 M et CHAPS 4%, un tampon de même composition plus concentré en urée (9 M) et un tampon de même composition que le tampon classique avec ajout d'un détergent, le triton X-100 à 1%. Des gels 2D-DIGE ont été réalisés à partir de 4 coupes de tissu anévrysmal entières desquelles ont été extraites les protéines avec ces 3 tampons différents. L'extraction a consisté en une récupération des coupes dans le tampon de lyse, puis 10 min de vortex puis 5 min de sonication. Les résultats obtenus sont présentés en figure 18.

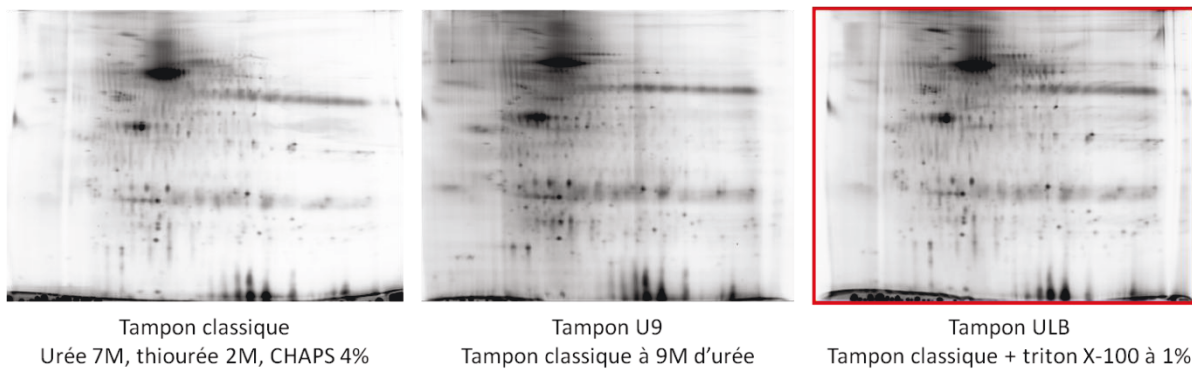


Figure 18. Images des gels 2D-DIGE obtenus à partir de coupes de tissu anévrysmal avec trois tampons d'extraction différents.

Nous observons ici une meilleure résolution dans les hauts poids moléculaires pour les gels réalisés à partir de protéines extraites dans le tampon ULB contenant le triton X-100. Nous avons donc choisi d'utiliser ce tampon pour réaliser nos analyses par 2D-DIGE. Cependant, l'ajout de triton X-100 ne nous permet pas de doser les échantillons obtenus afin de connaître précisément la quantité de protéines obtenus. En microdissection laser, il est courant d'utiliser la surface isolée comme unité de mesure de la quantité de matériel déposée. Wilson *et al* ont obtenu 20 μg de protéines à partir de 40 zones de 0,28 mm^2 , soit environ 11 mm^2 (Wilson KE, 2005) Des analyses ont montré qu'environ 1 mm^2 de surface microdisséquée correspond à environ 1 μg de protéines, mais cette quantité dépend grandement des surfaces découpées, de la densité cellulaire et de la qualité du tissu.

Ces mises au point nous ont permis d'établir que pour l'analyse en 2D-DIGE des profils protéomiques de types cellulaires isolés du tissu par microdissection laser, les gels peuvent être réalisés avec les protéines extraites dans du tampon de lyse contenant le détergent triton X-100 à 1% à partir d'au moins 1 mm^2 d'échantillon microdisséqué.

4.2.2. Comparaison des profils protéomiques des macrophages de type M1 et M2

4.2.2.1. Méthodes

Isolement par microdissection laser des macrophages M1 et M2

Des macrophages des deux sous-types M1 pro-inflammatoires et M2 anti-inflammatoires ont été extraits du tissu anévrysmal comme indiqué précédemment (voir 2.1. Rôle des macrophages pro-inflammatoires CD68⁺MR⁻ dans l'expression de peroxiredoxine-1 dans les anévrysmes de l'aorte abdominale chez l'homme). Cinquante mm² de chaque sous-type de macrophage a été extrait dans 50 µL de tampon de lyse contenant du triton X-100 à 1%, incubés 10 min, vortexés 10 min puis soniqués 5 min.

Electrophorèse bidimensionnelle DIGE

Le volume maximum recommandé par le fournisseur pour un marquage en saturation par les cyanines, soit 9 µL correspondant à 9 mm², a été prélevé pour chaque sous-type de macrophage et incubé avec 1 µL de Tris (2-CarboxyEthyl) Phosphine (TCEP) à 2 mM pendant 1h à 37°C puis avec 2 µL de cyanine (Cy3 ou Cy5 reconstituées à 2 mM) 30 min à 37°C afin de réduire et marquer l'échantillon protéique. La réaction est arrêtée par ajout d'un volume de tampon STOP (DTT 10%, pharmalytes 2% dans un tampon de chargement composé d'urée 7 M, thiourée 2 M et CHAPS 4%). Les échantillons marqués de macrophages M1 et M2 sont ensuite mélangés. Le volume total est ensuite ajusté à 450 µL avec du tampon de réhydratation (tampon de chargement, DTT 1%, pharmalytes 1%) et l'échantillon est déposé sur des strips de pH 3-10 de 24 cm, 24h à 20°C. La première dimension IEF est ensuite lancée avec le programme suivant : 3h à 300 V, augmentation à 1000 V en 6h, augmentation à 8000 V en 3h puis 3h à 8000 V. Les strips d'IEF sont ensuite équilibrées dans un tampon d'équilibration (urée 6 M, glycérol 30%, SDS 2%, Tris HCl 0,1 M pH 8, DTT 32 mM) pendant 10 min puis déposées sur un gel de polyacrylamide à 12,5% (Acrylamide/bis 12,5%, Tris HCl 0,38 M pH 8,8, SDS 0,1%, APS 0,07%, TEMED 0,01%). La migration est ensuite effectuée 1h à 80 V, puis sur la nuit à 150 V. La migration peut être accélérée jusqu'à 300 V jusqu'à la sortie du front de migration.

Les gels sont ensuite scannés à l'aide d'un scanner à fluorescence *Ettan DIGE Imager* (GE Healthcare) aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission correspondant aux cyanines utilisées (excitation 532 nm, émission 580 nm pour la Cy3 ; excitation 633 nm, émission 670 nm pour la Cy5) et analysés à l'aide du logiciel *Progenesis SameSpots v 2.0* (Nonlinear Dynamics).

Chaque gel a été réalisé en triplicat, en alternant les marquages par Cy3 et Cy5 des macrophages de type M1 et M2.

Identification des spots par spectrométrie de masse

Après analyse des spots différenciellement exprimés entre les macrophages de types M1 et M2, un gel 2D-DIGE dit préparatif a été réalisé à partir de 500 µg de protéines issues de macrophages en culture et scanné. Le gel est ensuite fixé dans un tampon composé d'éthanol 50% et d'acide phosphorique 2% deux fois 1 h. Ils sont ensuite lavés dans une solution d'acide phosphorique 2% puis incubés dans une solution de prétrempage composée de sulfate d'ammonium 1,1 M, d'acide phosphorique 2% et d'éthanol 17% pendant 20 min. Les gels sont finalement incubés dans la solution de coloration contenant 1 g de bleu de coomassie G250 (Sigma) dans 1 L de solution de prétrempage pendant 3 à 4 jours, ou jusqu'à ce que la coloration soit suffisante. Les gels sont alors rincés à l'eau. Les images obtenues en fluorescence et après coloration au bleu de coomassie sont utilisées pour repérer les spots à découper à l'aide du logiciel *Progenesis SameSpots*.

Les spots d'intérêt sont découpés manuellement sur le gel et décolorés dans du bicarbonate d'ammonium 50 mM. Les morceaux de gel sont ensuite lavés et déshydratés dans des solutions de bicarbonate d'ammonium 50 mM / acétonitrile (ACN) 50% puis d'ACN 100%. L'ACN est ensuite éliminé par aspiration et évaporation. Les protéines sont ensuite digérées par de la trypsine GOLD (Promega) à 40 µg/mL dans du *Surfactant ProteasMAX™ Trypsin Enhancer* (Promega) 0,025% dans une solution de bicarbonate d'ammonium 50 mM sur la nuit. L'élution est effectuée par du surfactant 0,01%, puis du surfactant 0,01%, TFA 1%. Les peptides sont déssalés sur des colonnes ZIP-TIP C18 (Millipore) et récupérés dans une solution d'ACN 50% / TFA 0,05% compatible avec la spectrométrie de masse.

Les peptides sont ensuite cristallisés sur une cible Anchorchip 600 avec une matrice d'acide α -cyano-4-hydroxy cinnamique (CHCA) et analysés par spectrométrie de masse avec MALDI-TOF/TOF Ultraflex II (Bruker Daltonics). La liste des pics obtenus est alors insérée dans le logiciel *Mascot* avec les paramètres suivants : analyse en *Peptide Mass Fingerprint* (pour la MS) ou *Ion Search* (pour la MS/MS) dans la base de données NCBI humaine après digestion tryptique, un clivage manqué autorisé, le marquage des cystéines par le fluorochrome Cy3 sur les cystéines comme modification fixe, l'oxydation des méthionines comme modification variable et un erreur de 75 ppm. Les résultats présentant un score supérieur à 61 pour la MS ou 26 pour la MS/MS sont considérés significatifs avec un $p < 0,05$.

4.2.2.2. Résultats

Les deux sous-types de macrophages M1 et M2 isolés du tissu anévrysmal dans le tampon ULB ont donc été analysés par 2D-DIGE. Chaque gel a été réalisé en triplicat avec 9 mm² de surface

microdisséquée. Les images obtenues avec le scanner *Ettan DIGE Imager* sont présentées en figure 19.

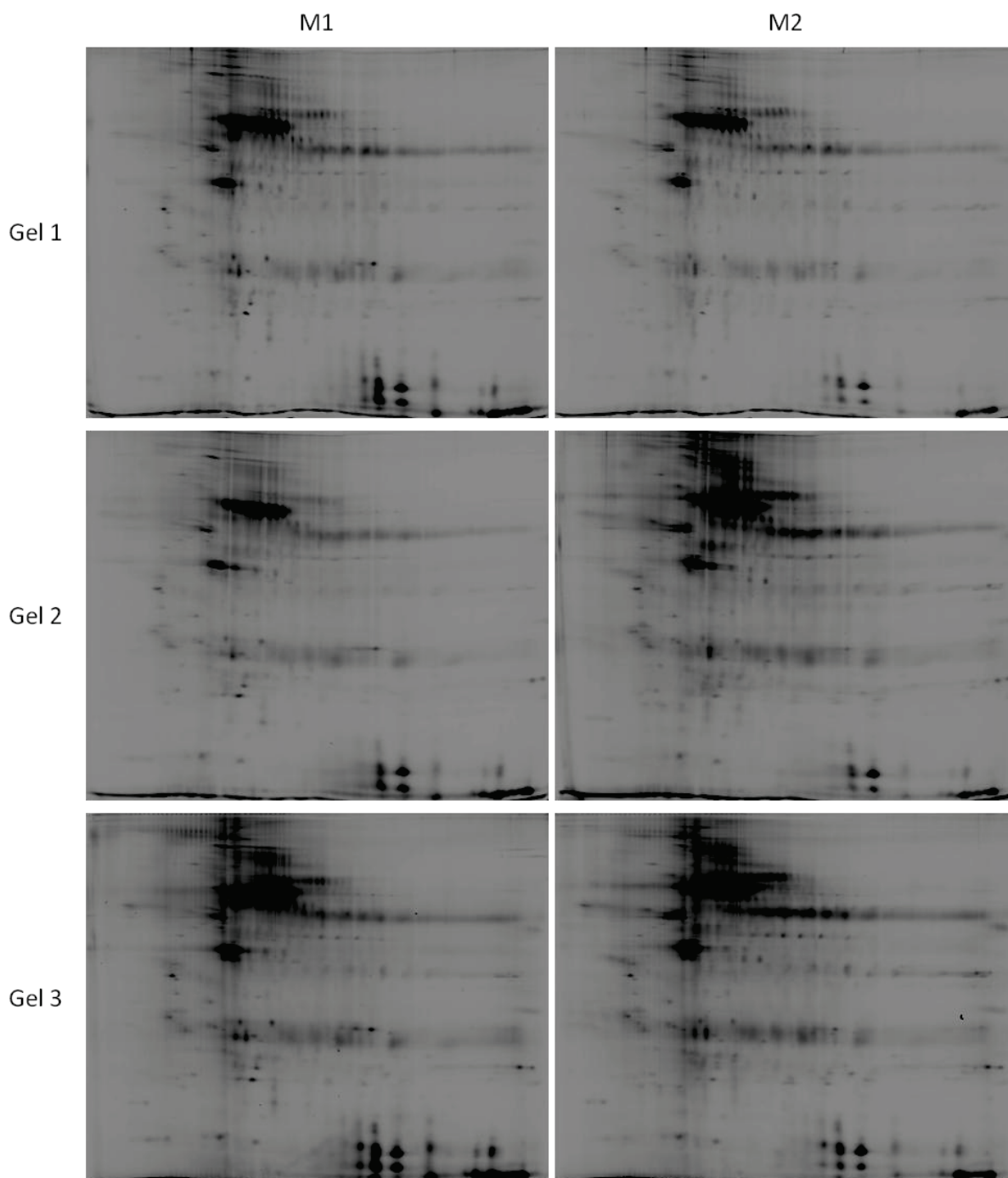


Figure 19 : Images des gels DIGE réalisés pour l'étude des macrophages de type M1 et M2.

Une analyse comparative des gels obtenus entre les sous-types M1 et M2 à l'aide du logiciel *Progenesis SameSpots* : après alignement des gels à l'aide du logiciel, celui-ci détermine les spots différentiellement exprimés entre les groupes définis comme les macrophages M1 et M2. Les spots sont ensuite vérifiés individuellement afin d'éliminer les artéfacts de détection. Nous avons ensuite

Résultats

retenu les spots différenciellement exprimés de manière significative ($p < 0,05$) ou à la limite de significativité (p compris entre 0,05 et 0,06) et présentant une différence d'expression de plus de 1,5. Nous avons ainsi repéré 52 spots différenciellement exprimés entre les macrophages de type M1 et de type M2, représentés sur la figure 20. Les images des 52 spots différenciellement exprimés sont présentées en annexe.

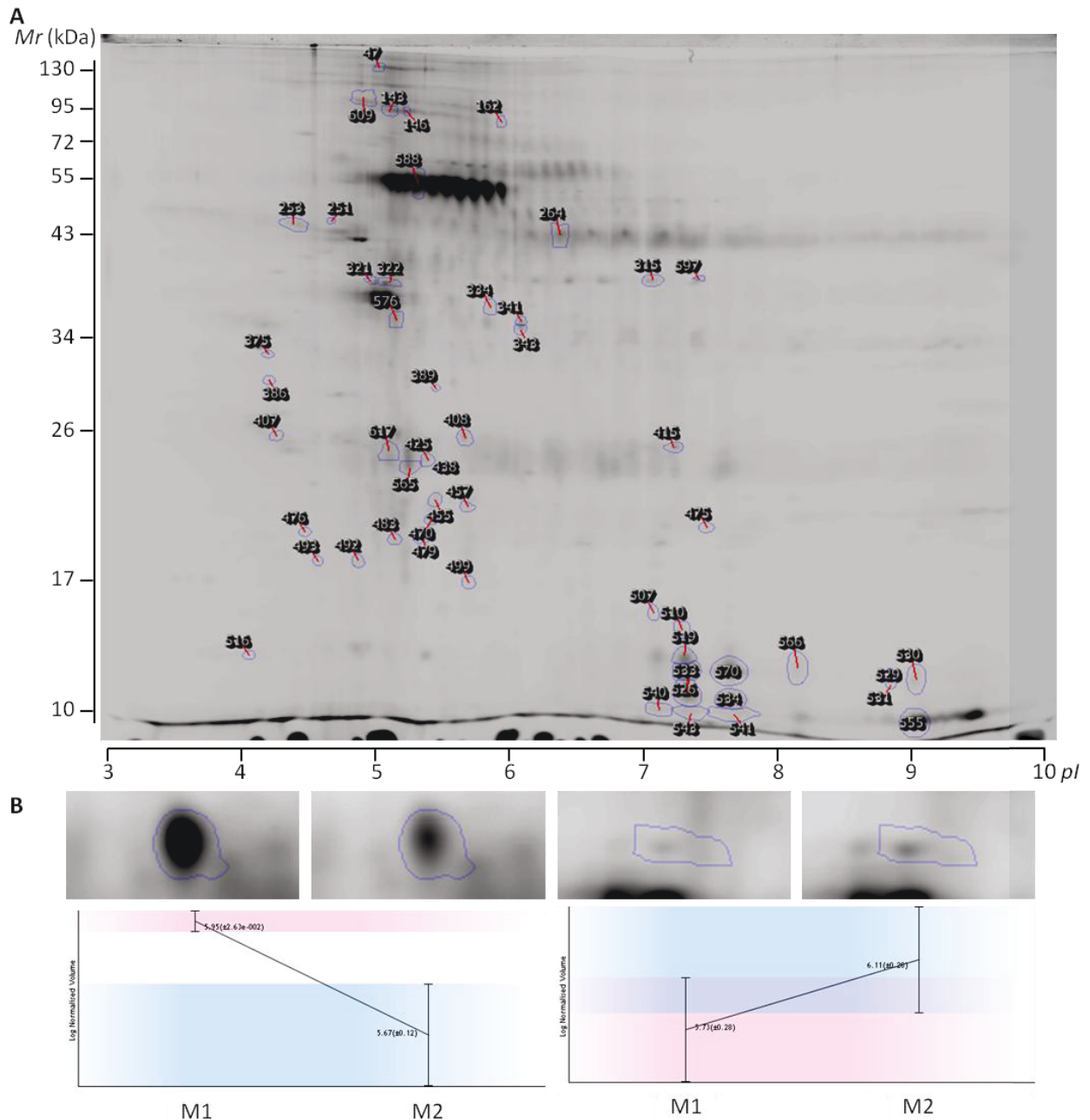


Figure 20 : Représentation des spots différenciellement exprimés entre les deux sous-types de macrophages M1 et M2. A : Image représentative d'un gel avec annotation des spots différenciellement exprimés. B : Exemples de spots surexprimés dans les macrophages M1 (à gauche) ou M2 (à droite).

La table 6 liste ces 52 spots différentiellement exprimés. Les numéros des spots correspondent à ceux présentés en figure 20. La valeur du test statistique réalisé par le logiciel *Progenesis SameSpots* est indiquée, ainsi que le ratio M1/M2. Les spots présentant un ratio positif sont donc plus exprimés dans les macrophages M1 que dans les M2 et les négatifs sont plus exprimés dans les macrophages M2 que dans les M1. Aucun spot n'a été trouvé uniquement exprimé par l'un ou l'autre des sous-types de macrophages.

Table 6. Liste des spots différentiellement exprimés entre les macrophages M1 et M2

N° du spot	Anova (p)	Ratio (M1/M2)	N° du spot	Anova (p)	Ratio (M1/M2)
540	0,0005	3,3	315	0,027	-1,5
470	0,0007	2,9	321	0,033	-2,9
415	0,0007	2,4	143	0,034	-1,8
541	0,001	3,2	516	0,034	2,3
407	0,001	-1,7	529	0,036	3
479	0,001	3,1	526	0,036	1,9
534	0,001	3,3	530	0,036	2,6
425	0,002	2	47	0,04	-3
476	0,002	1,7	341	0,043	-3,2
375	0,002	1,7	570	0,043	1,5
386	0,002	1,6	146	0,043	-2,4
483	0,003	2,4	617	0,043	1,6
389	0,003	2,8	264	0,044	-1,5
253	0,003	-1,8	343	0,046	-2,9
533	0,004	3,7	519	0,046	1,7
609	0,007	1,7	438	0,046	1,7
493	0,007	-2,7	475	0,047	-1,8
555	0,007	2,6	322	0,047	-2,4
457	0,009	-1,6	162	0,048	1,6
499	0,009	3,2	565	0,049	1,5
251	0,011	1,8	334	0,054	1,6
408	0,014	1,8	597	0,056	-1,8
566	0,016	3	510	0,057	1,9
543	0,016	4,2	531	0,058	2,6
455	0,017	1,5	507	0,058	2,1
576	0,021	1,5	492	0,059	-2,4

Une analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF et MALDI-TOF/TOF nous a permis d'identifier 7 spots parmi les 52 spots différentiellement exprimés. Il est important de noter que lors de l'identification de spots obtenus sur un gel d'électrophorèse bidimensionnelle, plusieurs spots protéiques peuvent correspondre à une même protéine pouvant porter différentes modifications post-traductionnelles. Les identifications sont considérées valides si le score donné par MASCOT est

Résultats

significatif, avec au moins 4 peptides qui matchent et un pourcentage de recouvrement d'au moins 15% ou une confirmation par fragmentation en MALDI-TOF/TOF. De plus, les masses moléculaires et points isoélectriques théoriques et expérimentaux sont comparés afin de conforter l'identification. La table 7 présente les résultats des identifications obtenues.

Table 7. Identification des spots différenciellement exprimés entre les deux sous-types de macrophages M1 et M2.

Numéro de spot	Numéro d'accession	Nom de la protéine	Mr thé / Mr exp	pI thé / pI exp	Méthode d'identification	Score	Nombre de peptides appariés	Pourcentage de recouvrement
321			41,7/40	5,2/5,1	MS	61,7	6	21,1
					MS/MS	84,1	2	6,9
322	P60709	Actine cytoplasmique 1 (Beta actine)	41,7/40	5,2/5,2	MS	79,7	2	6,9
					MS/MS	60,0	7	24,5
617			41,7/25	5,2/5,2	MS	59,9	5	18,4
					MS/MS	67,3	2	6,9
386	Q58FF7	Protéine de choc thermique HSP 90-beta-3	68,3/30	4,6/4,3	MS/MS	56,0	1	1,7
407	P63104	Protéine 14-3-3 zeta/delta	27,7/26	4,6/4,3	MS/MS	82,4	10	40,0
					MS	47,3	2	5,7
438	P78417	Glutathione S-transférase omega-1	27,5/25	6,3/5,6	MS/MS	121,1	2	10,0
576	P13796	Plastine-2	70,2/35	5,2/5,2	MS	84,1	13	26,5
					MS/MS	39,3	2	4,5

Les identifications grisées sont considérées incertaines à cause d'une différence entre les Mr et pI théoriques et expérimentaux.

4.2.3. Discussion, limitations et perspectives

L'étude des protéines différenciellement exprimées entre les macrophages des deux sous-types M1 pro-inflammatoires et M2 anti-inflammatoires, montrés comme étant présents dans des zones différentes de la paroi anévrysmale, pourrait nous permettre une meilleure compréhension de leur implication dans la pathologie anévrysmale et nous offrir des pistes vers l'identification de nouveaux biomarqueurs de cette pathologie.

Jusqu'ici, 7 spots sur les 52 différenciellement exprimés ont été identifiés correspondant à 5 protéines potentielles. Ce faible nombre d'identifications peut s'expliquer par le fait que le gel préparatif pour identifier les spots différentiels a été réalisé avec des macrophages issus de culture cellulaire et dont le profil protéomique ne correspondait pas exactement à ceux des macrophages isolés du tissu anévrysmal. Certains des spots découpés étaient peu visibles et présentaient une faible intensité et leur extraction a dû mener à une trop faible quantité de protéines pour l'identification par spectrométrie de masse. Nous avons donc décidé de réaliser un gel préparatif à partir de grandes quantités de macrophages isolés du tissu anévrysmal par microdissection laser, dont le profil correspondra aux spots différenciellement exprimés. Cependant, un gel préparatif nécessitant 500 µg de protéines, la surface de tissu à microdisséquer pour obtenir une quantité suffisante de matériel a été estimée à 500 mm². Ces isollements sont actuellement en cours au laboratoire.

Parmi les protéines identifiées, certaines présentaient, malgré un score d'identification significatif ou une confirmation par MS/MS, une masse moléculaire expérimentale plus faible que la masse moléculaire théorique. Cette différence de masse moléculaire pourrait être expliquée par le fait que le spot excisé et identifié correspond en réalité à un fragment protéolytique d'une protéine. En effet, une différence d'intensité entre deux spots d'un gel 2D peut s'expliquer par une surexpression ou une sous-expression de la protéine correspondante, mais également une modification de cette protéine, soit par des modifications post-traductionnelles, soit par une dégradation de cette protéine.

Les protéines identifiées ont ensuite été recherchées dans la base de données UniProtKB/SwissProt afin d'obtenir des informations sur les processus biologiques dans lesquelles elles sont impliquées et leur localisation subcellulaire et les résultats sont présentés en table 8.

Table 8. Implication des protéines identifiées dans les processus biologiques.

Numéro de spot	Numéro d'accession	Nom de la protéine	Fonction de la protéine	Localisation subcellulaire
GO:0007928 Mobilité cellulaire				
321				
322	P60709	Actine cytoplasmique 1	Impliquée dans plusieurs types de mobilité cellulaire et dans la coagulation	Cytosquelette
617				
GO:0051017 Assemblage des filaments d'actine				
576	P13796	Plastine-2	Lie l'actine. Impliquée dans l'activation des lymphocytes T, l'adressage des protéines et la régénération tissulaire	Cytoplasme, cytosquelette, expansions cellulaires
GO:0006950 Réponse au stress				
386	Q57FF7	HSP 90-beta-3	Protéine chaperonne	Cytoplasme
GO:0043066 Régulation négative de l'apoptose				
407	P63104	Protéine 14-3-3 zeta/delta	Impliquée dans l'adressage des protéines et la coagulation	Cytoplasme
GO:0044281 Métabolisme de petites molécules				
438	P78417	Glutathione S-transférase omega-1	Impliquée dans le métabolisme de l'acide L-ascorbique et les procédés d'oxydo-réduction	Cytoplasme

Parmi les spots identifiés, 3 spots ont permis l'identification de l'actine cytoplasmique 1 ou beta-actine. Parmi eux, 2 sont surexprimés dans les macrophages M2 et un dans les macrophages M1. Il est intéressant de noter que la masse moléculaire observée pour le spot 617, surexprimé dans les macrophages M1, est plus faible que la masse moléculaire théorique de la protéine. Il s'agirait donc d'un fragment de la beta-actine. La différence d'intensité entre les spots correspondant à l'actine pourrait donc être due en partie à une dégradation de cette actine dans les macrophages M1. Une étude récente a montré que *Porphyromonas gingivalis*, pouvant être associée au développement de l'AAA [Aoyama *et al.* 2011, Delbosc *et al.* 2011], produisait des enzymes capables de cliver l'actine [Kinane *et al.* 2012]. De plus, les filaments d'actine ont été montrés comme impliqués dans la

phagocytose [Groves *et al.* 2008]. En effet, une polymérisation de l'actine au niveau de la membrane plasmique serait nécessaire à la formation du phagosome.

Le spot 576 surexprimé dans les macrophages de type M1 correspond à la plastine-2. Une différence de masse entre les masses expérimentales et théorique est de nouveau observée pouvant également être expliquée par un éventuel clivage de la protéine. La plastine-2 a été montrée comme exprimée par les cellules inflammatoires dont les monocytes/macrophages [Matsushima *et al.* 1988] et est impliquée dans l'interaction avec l'actine, notamment au niveau des expansions cellulaires [Lin *et al.* 1993, Correia *et al.* 1999] retrouvées entre autres lors de la phagocytose [Messier *et al.* 1993, Jones *et al.* 1996]. La plastine-2 est également impliquée dans la régénération des organes et l'activation des lymphocytes T [Wabnitz *et al.* 2007], ce qui est cohérent avec les propriétés pro-inflammatoires des macrophages de type M1.

L'étude des modifications au niveau de l'actine et des protéines interagissant avec elle, dont la plastine, entre les deux sous-types de macrophages pourrait donc nous permettre de mieux comprendre les différences entre ces deux sous-types et leur rôle différent dans l'AAA. En effet, une sur- ou sous-expression de protéines impliquées dans la phagocytose entre ces deux sous-types pourrait refléter une différence dans leur capacité de phagocytose au sein de la paroi anévrysmale.

Le spot 386 surexprimé dans les macrophages M1 a été identifié comme étant la protéine de choc thermique de 90 kDa (HSP 90). Cette protéine est impliquée dans l'adressage des protéines et dans la réponse au stress.

Enfin, le spot 438 surexprimé dans les macrophages M1 a été identifié par MS/MS comme étant la glutathione S-transférase omega-1. La glutathione S-transférase est une enzyme avec des propriétés oxydo-reductase et transférase ubiquitaire, particulièrement exprimée dans certains types cellulaires dont les cellules de l'inflammation [Board *et al.* 2000]. Cette enzyme peut être impliquée dans la réponse aux corps étrangers dans l'organisme et dans le métabolisme de la vitamine C [Zakharyan *et al.* 2001]. Le métabolisme d'antioxydants comme la vitamine C est un mécanisme intervenant lors de l'activation de phagocytes (dont les macrophages) lors de la réponse inflammatoire, activation qui va entraîner une forte production de ROS et donc un stress oxydatif [Puertollano *et al.* 2011].

Pendant l'identification des autres protéines sur- ou sous-exprimées entre les macrophages de type M1 et M2, nous avons décidé de valider l'identification des 5 protéines identifiées. Pour cela, nous allons utiliser la q-RT-PCR pour rechercher les ARNm correspondant à ces protéines dans les macrophages isolés du tissu anévrysmal. En effet, la q-RT-PCR nécessite beaucoup moins de matériel qu'une électrophorèse bidimensionnelle ou qu'un western blot : des amplifications peuvent être réalisées à partir de très faibles quantités d'ARN jusqu'à 1 ng. Nous essaierons également de

Résultats

retrouver les modulations observées pour ces protéines dans des macrophages différenciés en M1 ou M2 en culture cellulaire afin de les relier à des mécanismes physiopathologiques pouvant être impliqués dans l'AAA. Par exemple, nous pourrions observer l'expression de la plastine-2 dans les deux sous-types de macrophages pendant la phagocytose. Nous rechercherons finalement les protéines validées dans le plasma de patients présentant ou non un AAA par western blot afin de déterminer si elles sont sécrétées et détectables à partir du sang pour une éventuelle utilisation en tant que biomarqueur.

5. Etude d'ADAMTS5, un biomarqueur potentiel de l'anévrisme de l'aorte abdominale dans les cellules musculaires lisses.

Lors de la localisation des types cellulaires impliqués dans l'AAA, nous avons mis en évidence des différences de phénotypes entre les cellules musculaires lisses de la paroi aortique. En effet, l'expression de la desmine par les CML nous a permis de discriminer les CML d'aortes saines et les CML d'aortes anévrysmales. De plus, deux morphotypes de CML ont été observés au sein de la paroi anévrysmale. Ces morphotypes ont été différenciés par l'expression ou non de la caspase-3, différenciant les CML au morphotype allongé des CML arrondies en anoikis. L'étude des modifications de phénotype des CML pendant le développement de l'AAA pourrait nous permettre de mieux comprendre l'évolution de la pathologie et pourrait mener à l'identification de nouveaux biomarqueurs de l'AAA, reflétant possiblement l'état d'avancement de la pathologie. Nous nous sommes donc intéressés aux trois types de CML qui ont été observés dans la paroi aortique : les CML saines, les CML anévrysmales allongées et les CML anévrysmales en anoikis. Pour cela, nous avons à nouveau décidé de réaliser deux approches : une première approche visant à étudier l'expression d'une protéine spécifique dans ces trois types de CML, puis une seconde approche sans *a priori* afin d'étudier les profils protéomiques totaux de ces trois types de CML par électrophorèse bidimensionnelle DIGE.

Afin de confirmer qu'il existe bien différents types de CML dans la paroi anévrysmale, nous avons donc dans un premier temps étudié l'expression dans ces CML d'une protéine spécifique : A Disintegrin-like And Metalloproteinase with Thrombospondin-1 motifs 5 (ADAMTS5). ADAMTS5 est une métalloprotéase décrite comme étant surexprimée dans le plasma et les CML de patients atteints d'un AAA et est un biomarqueur potentiel de l'AAA [Lamblin *et al.* 2010]. Afin d'étudier spécifiquement ces trois types cellulaires, nous avons utilisé la microdissection laser pour isoler des zones enrichies en CML des trois types décrits depuis du tissu sain ou anévrysmale. Cinquante mm² des trois phénotypes de CML (CML saines avec 8 coupes de 18 µm d'épaisseur, CML anévrysmales allongées et CML anévrysmales anoikis avec 16 coupes de 18 µm) ont ainsi été isolés par microdissection laser (figure 21).

Résultats

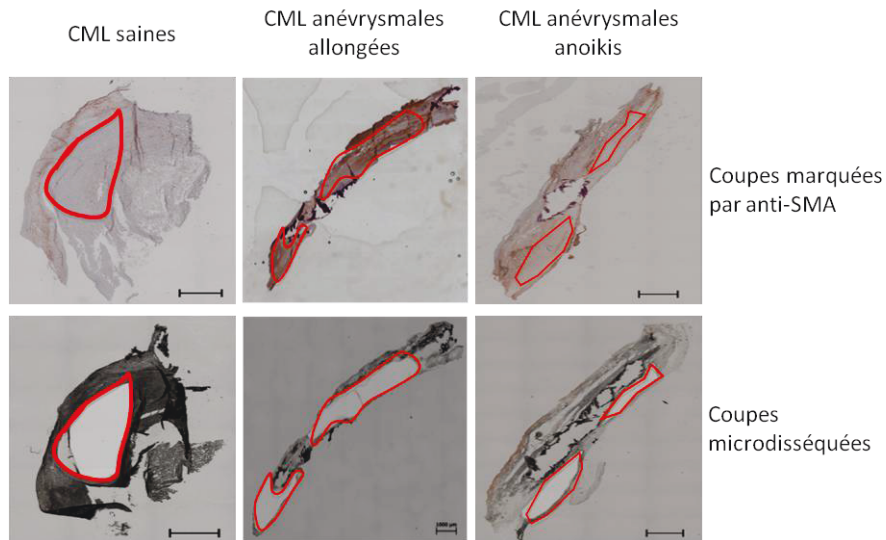


Figure 21 : Isolement de zones enrichies en les trois types de CML par microdissection laser

Afin de vérifier l'isolement de zones riches en CML, nous avons réalisé un western blot anti-CapZ. Les protéines de coiffe (capping proteins) sont des protéines se fixant à l'extrémité des filaments d'actine et empêchant leur élongation et leur dégradation [Pappas *et al.* 2008]. Deux variants existent chez les vertébrés : une forme cytoplasmique appelée Cap32/34 [Hartmann *et al.* 1990] et une forme trouvée dans les disques-Z des cellules musculaires appelée CapZ [Casella *et al.* 1987]. Afin de vérifier l'isolement de zones riches en CML, nous avons donc réalisé un western blot anti-CapZ, montrant une expression de cette protéine dans les 3 types cellulaires isolés (figure 22, bande à 34 kDa).

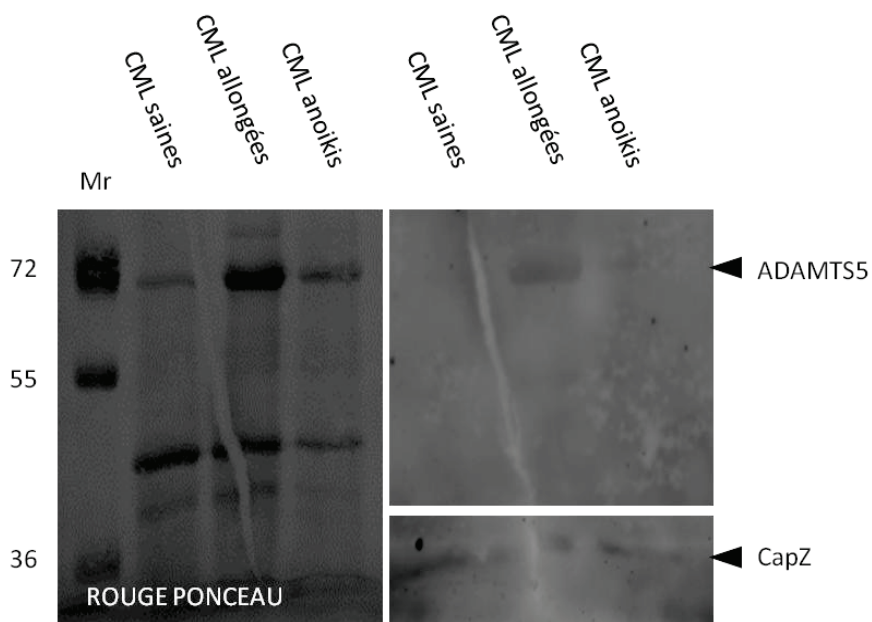


Figure 22 : Etude d'ADAMTS5 dans les 3 types de CML par western blot

Un western blot a ensuite été réalisé à partir de 40 µg de chacun de ces phénotypes afin d'étudier spécifiquement l'expression d'ADAMTS5. De manière intéressante, nous avons observé une expression d'ADAMTS5 dans les CML anévrysmales allongées et pas d'expression dans les CML saines et les CML anévrysmales en anoikis (figure 22).

Afin de confirmer l'expression d'ADAMTS5 dans les CML, nous avons réalisé des marquages par immunohistochimie avec des anticorps anti-SMA et anti-ADAMTS5. Les résultats ont montré un marquage des mêmes zones entre les CML et ADAMTS5 (figure 23), confirmant l'expression d'ADAMTS5 par ces CML.

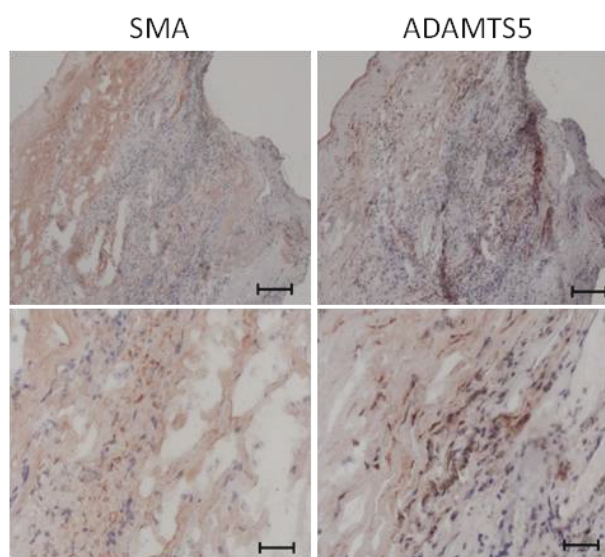


Figure 23 : Colocalisation des marquages anti-SMA et anti-ADAMTS5 par immunohistochimie.

Echelle : 200 µm en haut, 50 µm en bas.

ADAMTS5 est une enzyme impliquée dans la dégradation de protéoglycanes (composants de la matrice extracellulaire) dont les agrécanes (présents dans les complexes cartilagineux), les versicanes (présents dans de nombreux tissus comme les vaisseaux sanguins, la peau et le cœur), les brevicanes et les neurocanes (présents dans le cerveau) [Schaefer *et al.* 2010]. Nos résultats quant à la présence de plusieurs phénotypes de CML au sein de la paroi aortique et de l'expression d'ADAMTS5 combinés aux données de la bibliographie nous permettent d'établir une hypothèse sur l'évolution des CML lors du développement de la pathologie anévrysmale. Il est décrit que les CML de la paroi aortique peuvent répondre à un stress de la paroi (comme dans l'athérosclérose) en modifiant leur phénotype vers un phénotype plus proche des ostéoblastes et chondrocytes (cellules osseuses et cartilagineuses) [Steitz *et al.* 2001, Yang *et al.* 2004]. Tyson *et al.* montrent également que les CML vasculaires dans la paroi aortique saine expriment des protéines inhibitrices de la calcification, mais que ces protéines sont sous-exprimées dans les plaques athérosclérotiques, menant à la calcification et vont exprimer des protéines normalement synthétisées par les cellules

Résultats

osseuses [Tyson *et al.* 2003]. Parmi les changements phénotypiques dans ces cellules musculaires lisses, nous avons observé qu'ADAMTS5, normalement exprimée par les CML vasculaires [McCulloch *et al.* 2009], était surexprimée dans les CML anévrysmales. Cette surexpression en ADAMTS5, enzyme dégradant les aggrecanes, pourrait être une réponse à la calcification de la paroi aortique mais entraînerait également une dégradation des versicanes composant la matrice extracellulaire, d'autant plus qu'il existe des interactions entre aggrecanes et versicanes [Matsumoto *et al.* 2003]. La dégradation de la matrice extracellulaire par ADAMTS5, combinée à d'autres MMPs sécrétées par les CML et les cellules de l'inflammation, entraînerait alors une perte de l'adhésion des CML à cette matrice extracellulaire et les ferait entrer en anoikis [Frisch *et al.* 1994], où elles perdraient leur forme allongée ainsi que d'autres propriétés de CML dont l'expression d'ADAMTS5. En effet, il a été montré qu'il existe une corrélation entre le taux d'expression d'ADAMTS5, la dégradation des versicans et de la matrice extracellulaire et de la quantité, de la forme et de la contractilité des cellules [Hattori *et al.* 2011]. De plus, l'action d'ADAMTS5 sur les versicanes de la matrice extracellulaire libère les LDL interagissant avec [Didangelos *et al.* 2012], ce qui pourrait contribuer à l'accumulation de cellules spumeuses au sein de la paroi aortique.

Cependant, il reste à finaliser ces résultats. Pour cela, nous allons d'abord caractériser les types de CML isolés par microdissection laser afin de valider ces isollements. Des q-RT-PCR seront donc réalisées afin d'étudier l'expression de gènes qui nous permettront de discriminer les 3 types de CML. L'expression de ces gènes sera comparée entre les CML isolées du tissu anévrysmal et des CML issues de culture cellulaire. Parmi les gènes, nous étudierons l'« α -smooth muscle actine », la connexine-45, une protéine de jonction intercellulaire [Kruger *et al.* 2000, Ko *et al.* 2001], la cofiline, montrée comme impliquée dans la réponse au stress des CML [Lee *et al.* 2006] ou la chaîne lourde de la myosine pouvant être impliquée dans un changement phénotypique des CML vasculaires [Kawai-Kowase *et al.* 2007] comme marqueur de CML et la caspase-3 et Bax, une protéine pro-apoptotique membre de la famille des Bcl-2 [Geng 2001] qui a été montrée comme augmentée dans les CML d'anévrysmes de l'aorte thoracique [Durdu *et al.* 2012].

La disponibilité d'un dosage ELISA pour ADAMTS5 nous permettra de déterminer si ADAMTS5 est un marqueur biologique de la présence d'un anévrysmes. Des résultats préliminaires du dosage réalisé sur un faible nombre d'échantillons de patients présentant un AAA, une artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI) ou de patients contrôles (non AAA, non AOMI) montrent une sous-expression d'ADAMTS5 chez les patients présentant un AAA et un AOMI par rapport aux patients contrôles (figure 24). Ce résultat est étonnant puisque ADAMTS5 avait été observé en western blot uniquement dans les CML anévrysmales allongées, et pas dans les CML de tissu sain. Cependant, cela peut s'expliquer par le fait que nous ne connaissons pas l'état des CML chez les

patients étudiés. En effet, ADAMTS5 est plus exprimée dans les CML anévrysmales allongées que dans les CML anévrysmales en anévrisme et il est possible que cet effet soit masqué lors de l'analyse du plasma, reflétant un état global. De plus, les patients contrôles ne présentant pas d'AAA mais pourraient présenter une paroi aortique plus ou moins dégradée entraînant une augmentation de l'expression d'ADAMTS5. Il est également à noter que le nombre d'échantillons utilisés lors de ce dosage était relativement faible (21 patients présentant un AAA, 8 présentant un AOMI et 8 patients contrôles). Nous attendons actuellement une cohorte du Danemark comprenant 200 patients présentant un AAA et 200 patients athérosclérotiques en collaboration avec le Dr Jes Lindholt afin de doser ADAMTS5 dans une grande population afin de confirmer ces résultats.

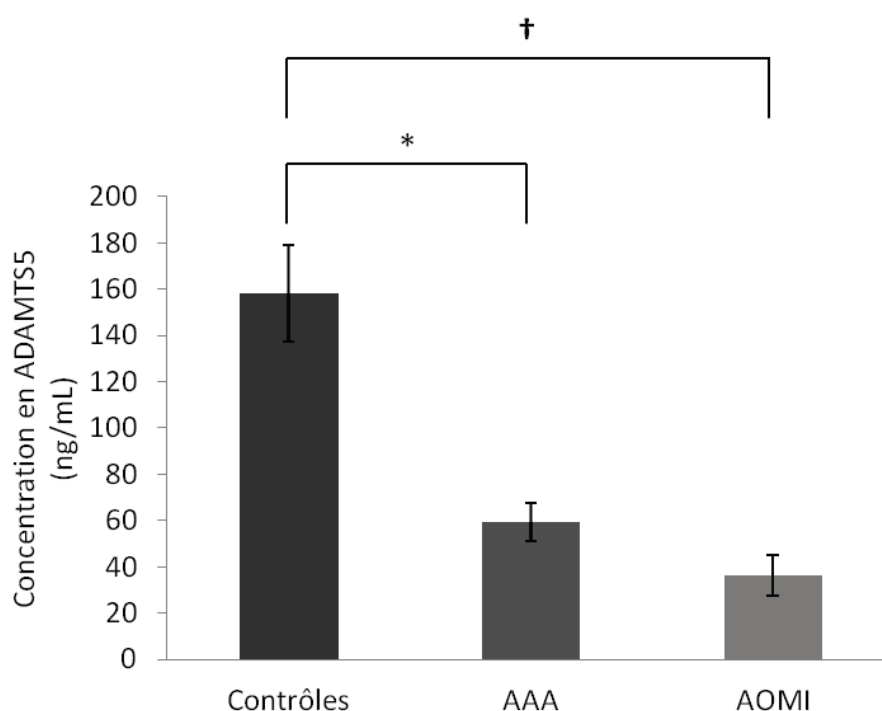


Figure 24 : Résultats préliminaires du dosage ADAMTS5 dans le plasma de patients présentant un AAA, un AOMI ou de patients contrôles. * : $p=1,75.10^{-5}$. † : $p=3.84.10^{-5}$

Enfin, une comparaison par 2D-DIGE des profils protéomiques des trois types de CML nous permettrait d'étudier plus amplement le changement de phénotype des CML lors du développement d'un AAA et d'améliorer notre compréhension des mécanismes favorisant ce développement. De plus, l'étude de ce changement de phénotype pourrait nous permettre d'identifier de nouveaux biomarqueurs de l'AAA possiblement liés à l'état d'avancement de la pathologie.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Mes travaux de thèse ont porté sur l'analyse des types cellulaires impliqués dans l'anévrisme de l'aorte abdominale. Suite aux travaux de Sho *et al* [Sho *et al.* 2005], nous avons choisi d'utiliser la technique de microdissection laser afin d'isoler des zones enrichies en différents types cellulaires impliqués dans l'AAA depuis le tissu anévrysmal afin de pouvoir réaliser des analyses protéomiques et transcriptomiques spécifiques de ces types cellulaires pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement de cette pathologie et en identifier de nouveaux biomarqueurs potentiels.

Afin d'utiliser la technique de microdissection laser sur ces types cellulaires pour réaliser des analyses protéomiques et transcriptomiques, nous avons en premier lieu étudié la localisation de ces types cellulaires au sein de la paroi aortique. Des zones cellulaires ont été observées dans 3 zones distinctes du tissu anévrysmal, correspondant aux différentes couches de la paroi aortique. Ainsi, les cellules de l'inflammation étaient principalement localisées dans la partie luminale du thrombus intraluminal et dans l'adventice de la paroi anévrysmale. La zone d'infiltration des cellules dans l'ILT contenait principalement des neutrophiles, des lymphocytes T, quelques mastocytes et les macrophages de type M2 anti-inflammatoires alors que l'adventice contenait principalement des macrophages M1 pro-inflammatoires, ainsi que des lymphocytes B et mastocytes organisés en ATLO. La média ne contenait pas de cellule de l'inflammation mais présentait des CML désorganisées. Deux morphotypes de CML ont été observés au sein de la paroi anévrysmale : un morphotype allongé se rapprochant des CML d'aortes saines et un morphotype arrondi correspondant à des CML en anoikis.

Les résultats obtenus lors de ce travail de localisation des types cellulaires nous ont permis de dresser une hypothèse sur les mécanismes de développement de l'AAA, schématisée dans la figure 25. Il a été montré que les LDL oxydés qui étaient associés à l'AAA [Rizzo *et al.* 2009] pouvaient être un facteur déclenchant de la pathologie [Hobbs *et al.* 2003]. L'agression par les LDL initierait la réponse inflammatoire en attirant premièrement des neutrophiles qui vont avoir une fonction de recrutement des autres cellules de l'inflammation [Chertov *et al.* 1997, Swedenborg *et al.* 2011], phase nécessaire au développement de l'anévrisme [Eliason *et al.* 2005, Pagano *et al.* 2007]. Les neutrophiles, lymphocytes T et mastocytes présents dans la partie luminale de la paroi aortique vont sécréter des protéines comme les MMP, les cathepsines, la tryptase ou des cytokines pro-inflammatoires [Fontaine *et al.* 2002, Henderson *et al.* 1999, Swedenborg *et al.* 2011, Zhang *et al.* 2011] qui vont dégrader cette paroi en entraînant la formation d'un thrombus intraluminal, la mort des cellules musculaires lisses et la formation de néovaisseaux. Au sein de la zone inflammatoire du thrombus intraluminal, les macrophages de type M2 vont combattre cette réaction « auto-immune »

en régulant la présence de cellules du soi non souhaitées et participer à la coagulation et l'expansion du thrombus intraluminal.

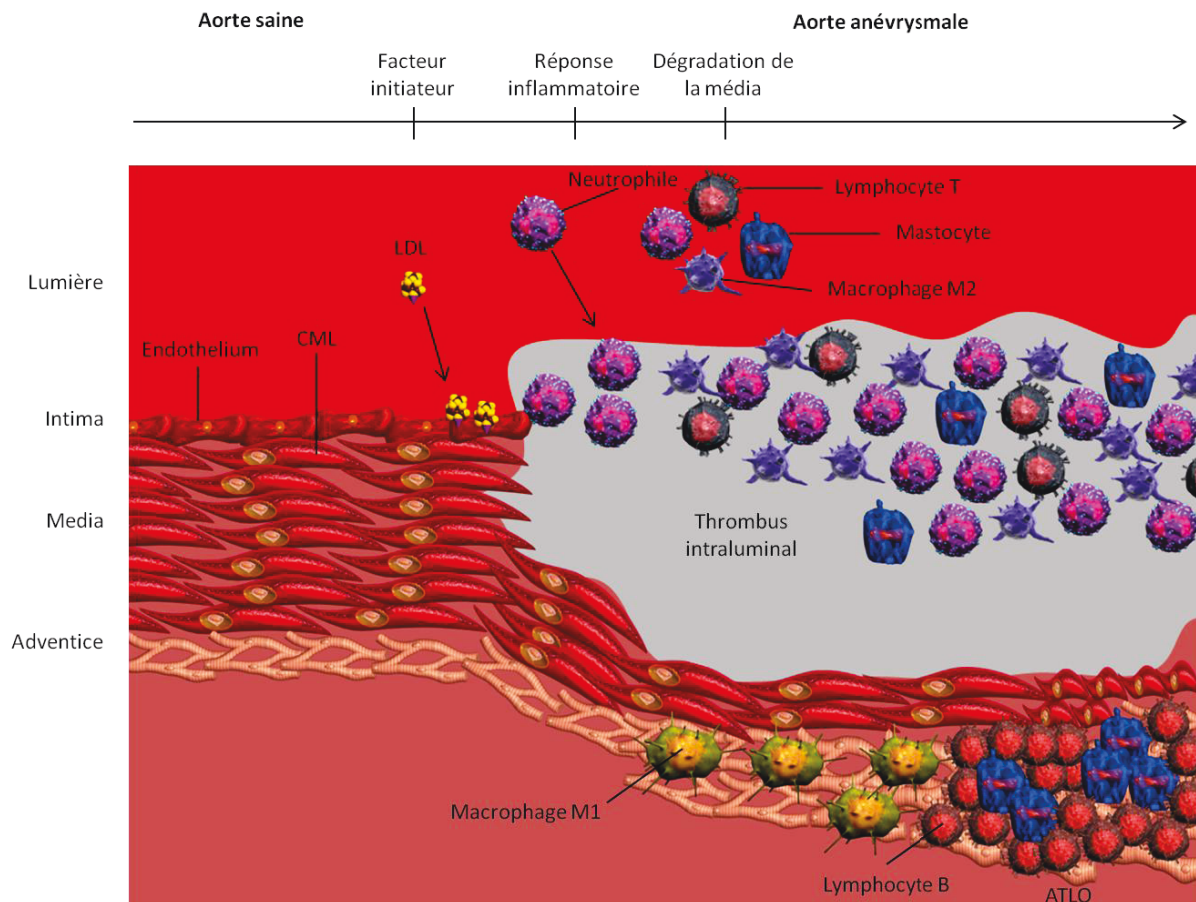


Figure 25 : Schéma récapitulatif du développement de l'anévrisme de l'aorte abdominale

Cette réponse inflammatoire et l'agression des cellules musculaires lisses composant la média vont entraîner une modification de leur phénotype [Tanaskovic *et al.* 2010]. Parmi les modifications phénotypiques, on observe alors la surexpression d'ADAMTS5 qui va participer à la dégradation de la matrice extracellulaire et faire entrer les CML en anoïkis [Frisch *et al.* 1994, Hattori *et al.* 2011].

Nous observons également une accumulation de cellules inflammatoires dans l'adventice, potentiellement grâce aux néovaisseaux formés [Thompson *et al.* 1996] dont les macrophages de type M1 pro-inflammatoires, les lymphocytes B et d'autres mastocytes. Les macrophages de type M1 vont être activés par le stress créé par la dégradation de la paroi aortique et vont participer activement à la réponse inflammatoire et au stress oxydatif [Chertov *et al.* 1997, McCormick *et al.* 2007, Ley *et al.* 2011]. Les macrophages et CML ont également été montré comme exprimant des protéines associées aux ostéoblastes et chondrocytes, participant à la formation de calcifications [Tyson *et al.* 2003]. Les mastocytes et lymphocytes B vont quant à eux s'organiser en structures lymphoïdes tertiaires, qui vont participer à la réponse inflammatoire.

Tous ces évènements créent un cycle allant dans le sens de l'augmentation de la réponse inflammatoire et de la dégradation de la paroi aortique, qui vont favoriser le développement de l'anévrisme.

Une fois les types cellulaires impliqués dans l'AAA localisés, nous avons décidé de réaliser des analyses protéomiques et transcriptomiques sur des zones enrichies en ces types cellulaires extraites directement du tissu anévrysmal par microdissection laser. Les résultats intéressants montrant une localisation différente des macrophages des deux sous-types M1 et M2 dans la paroi anévrysmale, et la présence de différents morphotypes de CML au sein de cette paroi nous ont amené à nous intéresser en premier lieu à ces types cellulaires en particulier. Pour chacun de ces types cellulaires, nous avons réalisé une approche ciblée afin d'étudier l'expression d'une protéine spécifique d'intérêt dans la pathologie anévrysmale avant de nous intéresser au protéome total de ces types cellulaires par une approche sans *a priori* par 2D-DIGE et spectrométrie de masse.

Ainsi, notre étude sur l'expression de la peroxiredoxine-1, un biomarqueur potentiel de l'AAA [Lamblin *et al.* 2010, Martinez-Pinna *et al.* 2011] nous a permis de montrer que l'augmentation de la concentration plasmatique de peroxiredoxine-1 chez les patients présentant un AAA provenait des macrophages de type M1 pro-inflammatoires, confirmant l'implication différente des deux sous-types de macrophages dans le développement de la pathologie anévrysmale et l'intérêt de les étudier indépendamment. De plus, là où l'étude des CML issues du tissu anévrysmal mises en culture avait montré un phénotype différent entre les CML anévrysmales et les CML saines [Liao *et al.* 2000], notre analyse a mis en évidence une différence de phénotype entre les CML au sein de la paroi anévrysmale. Cette différence a été confirmée par l'étude d'ADAMTS5, qui a été montrée comme surexprimée dans les CML d'aortes anévrysmales de morphotype allongé par rapport aux CML d'aortes anévrysmales en anoïkis et aux CML d'aortes saines. Ces résultats montrent bien l'intérêt d'étudier les types cellulaires impliqués dans l'AAA de manière spécifique en les isolant par microdissection laser depuis le tissu anévrysmal. En effet, l'étude ciblée de l'origine de molécules connues comme étant impliquées dans la pathologie anévrysmale nous permettrait d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes conduisant au développement de l'anévrisme. De plus, ces résultats montrant des différences d'expression des biomarqueurs potentiels de l'AAA entre certains types cellulaires présents dans la paroi aortique nous encourage à réaliser des analyses sans *a priori* afin d'identifier d'autres biomarqueurs de l'AAA.

Nous avons donc réalisé des analyses protéomiques différentielles entre les deux types de macrophages M1 et M2 isolés du tissu anévrysmal par 2D-DIGE et spectrométrie de masse et avons identifié pour le moment 5 protéines différentiellement exprimées, qui pourraient jouer un rôle dans la pathologie anévrysmale. Ces 5 protéines sont actuellement en cours de validation au laboratoire

par des analyses en q-RT-PCR sur les macrophages isolés du tissu anévrysmal. Les protéines validées seront ensuite recherchées dans le plasma de patients présentant ou non un AAA. D'autres isolements par microdissection laser sont actuellement en cours afin de réaliser un second gel d'électrophorèse bidimensionnelle qui nous permettrait d'identifier les autres protéines différenciellement exprimées entre les deux sous-types de macrophages.

Des isollements des 3 types de CML (CML d'aortes saines, d'aortes anévrysmales de morphotype allongé et d'aortes anévrysmales en anoikis) sont également en cours pour analyse par 2D-DIGE et spectrométrie de masse. En effet, une étude précise des différences de protéomes entre ces 3 types de CML pourrait nous permettre d'élucider la transition des CML depuis le phénotype « sain » vers le phénotype « anévrysmal » puis « anoikis » et nous offrirait des pistes quant à l'identification de biomarqueurs chronologiques de l'AAA.

Une autre étude sans *a priori* fait également l'objet d'un autre sujet de recherche au laboratoire. Cette étude porte sur l'analyse transcriptomique des micro-ARN (miARN) des types cellulaires impliqués dans l'AAA. Les miARN sont de courtes séquences nucléotidiques (environ 22 nucléotides) non codantes qui régulent l'expression des gènes en se fixant spécifiquement à des ARNm pour induire leur dégradation ou inhibition. Les miARN ont été montrés comme pouvant servir de biomarqueurs potentiels dans un grand nombre de pathologies, comme par exemple les cancers ou les maladies auto-immunes ou neuro-dégénératives [Ji *et al.* 2009, Buckley *et al.* 2010, Lai *et al.* 2011, Saal *et al.* 2009, Guerau-de-Arellano *et al.* 2011] mais également dans les maladies cardiovasculaires comme l'infarctus du myocarde, l'insuffisance cardiaque, les artériopathies [Wang *et al.* 2010, Tijssen *et al.* 2010, Fichtlscherer *et al.* 2010] ou encore les anévrysmes de l'aorte abdominale [Pahl *et al.* 2012]. L'étude des miARN spécifiques aux types cellulaires isolés du tissu anévrysmal nous permettra également d'améliorer nos connaissances des mécanismes conduisant au développement de l'AAA et à l'identification de biomarqueurs de l'AAA.

Enfin, une collaboration avec l'équipe du Pr Antonino Nicoletti, de l'unité INSERM U698 sur l'immunopathologie et l'immunomodulation dans les maladies cardiovasculaires, nous aidera à étudier l'implication des ATLO dans le développement de la pathologie anévrysmale. En effet, les ATLO ont été montrés comme impliqués dans l'AAA [Bobryshev *et al.* 2001], voire comme un mécanisme déclenchant des pathologies auto-immunes dans les parois artérielles [Wick *et al.* 1997]. Dans notre étude, nous avons observé ces ATLO dans plus de la moitié de nos échantillons, suggérant un rôle dans le développement de l'AAA, que leur étude pourra élucider. De plus, ces ATLO pourraient offrir une intéressante source de biomarqueurs potentiels de l'AAA.

En conclusion, notre étude montre l'intérêt d'analyser spécifiquement les types cellulaires impliqués dans la pathologie anévrysmale pour l'étude des mécanismes physiopathologiques conduisant au développement de l'anévrysme. En effet, les cellules présentes dans la paroi aortique anévrysmale peuvent posséder des propriétés différentes, voire opposées comme par exemple les macrophages pro- et anti-inflammatoires dont les effets seraient masqués lors de l'analyse globale du tissu anévrysmal. De plus, l'étude des cibles les plus pertinentes obtenues lors des analyses protéomiques et transcriptomiques de ces types cellulaires spécifiques pourrait permettre l'identification de nouveaux biomarqueurs de l'anévrysme de l'aorte abdominale.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Abdul-Hussien H, Soekhoe RG, Weber E, der Thusen JH, Kleemann R, Mulder A, van Bockel JH, Hanemaaijer R, Lindeman JH. Collagen degradation in the abdominal aneurysm: a conspiracy of matrix metalloproteinase and cysteine collagenases. *Am J Pathol.* 2007; **170**: 809-817.
- Acosta-Martin AE, Chwastyniak M, Beseme O, Drobecq H, Amouyel P, Pinet F. Impact of incomplete DNase I treatment on human macrophage proteome analysis. *Proteomics Clin Appl.* 2009; **3**: 1236-1246.
- Acosta-Martin AE, Panchaud A, Chwastyniak M, Dupont A, Juthier F, Gautier C, Jude B, Amouyel P, Goodlett DR, Pinet F. Quantitative Mass Spectrometry Analysis Using PACIFIC for the Identification of Plasma Diagnostic Biomarkers for Abdominal Aortic Aneurysm. *PLoS One.* 2011; **6**: e28698.
- Aggarwal S, Qamar A, Sharma V, Sharma A. Abdominal aortic aneurysm: A comprehensive review. *Exp Clin Cardiol.* 2011; **16**: 11-15.
- Ahimastos AA, Natoli AK, Lawler A, Blombery PA, Kingwell BA. Ramipril reduces large-artery stiffness in peripheral arterial disease and promotes elastogenic remodeling in cell culture. *Hypertension.* 2005; **45**: 1194-1199.
- Al Barjas HS, Ariens R, Grant P, Scott JA. Raised plasma fibrinogen concentration in patients with abdominal aortic aneurysm. *Angiology.* 2006; **57**: 607-614.
- Alcorn HG, Wolfson SK, Jr., Sutton-Tyrrell K, Kuller LH, O'Leary D. Risk factors for abdominal aortic aneurysms in older adults enrolled in The Cardiovascular Health Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996; **16**: 963-970.
- Allaire E, Guettier C, Bruneval P, Plissonnier D, Michel JB. Cell-free arterial grafts: morphologic characteristics of aortic isografts, allografts, and xenografts in rats. *J Vasc Surg.* 1994; **19**: 446-456.
- Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics.* 2002; **1**: 845-867.
- Anderson NL, Polanski M, Pieper R, Gatlin T, Tirumalai RS, Conrads TP, Veenstra TD, Adkins JN, Pounds JG, Fagan R, Lobley A. The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources. *Mol Cell Proteomics.* 2004; **3**: 311-326.
- Anidjar S, Osborne-Pellegrin M, Coutard M, Michel JB. Arterial hypertension and aneurysmal dilatation. *Kidney Int Suppl.* 1992; **37**: S61-66.
- Annabi B, Shedid D, Ghosn P, Kenigsberg RL, Desrosiers RR, Bojanowski MW, Beaulieu E, Nassif E, Moumdjian R, Beliveau R. Differential regulation of matrix metalloproteinase activities in abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2002; **35**: 539-546.
- Aoyama N, Suzuki J, Wang D, Ogawa M, Kobayashi N, Hanatani T, Takeuchi Y, Izumi Y, Isobe M. Porphyromonas gingivalis promotes murine abdominal aortic aneurysms via matrix metalloproteinase-2 induction. *J Periodontal Res.* 2011; **46**: 176-183.
- Aramoto H, Shigematsu H, Muto T. Perioperative changes in coagulative and fibrinolytic function during surgical treatment of abdominal aortic aneurysm and arteriosclerosis obliterans. *Int J Cardiol.* 1994; **47**: S55-S63.
- Arrell DK, Neverova I, Van Eyk JE. Cardiovascular proteomics: evolution and potential. *Circ.Res.* 2001; **88**: 763-773.

B

Baker AH, Zaltsman AB, George SJ, Newby AC. Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis. *J Clin Invest.* 1998; **101**: 1478-1487.

Bamford CV, Fenno JC, Jenkinson HF, Dymock D. The chymotrypsin-like protease complex of *Treponema denticola* ATCC 35405 mediates fibrinogen adherence and degradation. *Infect.Immun.* 2007; **75**: 4364-4372.

Banks RE, Stanley AJ, Cairns DA, Barrett JH, Clarke P, Thompson D, Selby PJ. Influences of blood sample processing on low-molecular-weight proteome identified by surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry. *Clin Chem.* 2005; **51**: 1637-1649.

Barratt J, Topham P. Urine proteomics: the present and future of measuring urinary protein components in disease. *CMAJ.* 2007; **177**: 361-368.

Bengtsson H, Bergqvist D, Ekberg O, Janzon L. A population based screening of abdominal aortic aneurysms (AAA). *Eur J Vasc Surg.* 1991; **5**: 53-57.

Beranova-Giorgianni S. Proteome analysis by two-dimensionnal gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. *TrAC, Trends Anal Chem.* 2003; **22**: 273-281.

Blanchard JF, Armenian HK, Friesen PP. Risk factors for abdominal aortic aneurysm: results of a case-control study. *Am J Epidemiol.* 2000; **151**: 575-583.

Blann AD, Devine C, Amiral J, McCollum CN. Soluble adhesion molecules, endothelial markers and atherosclerosis risk factors in abdominal aortic aneurysm: a comparison with claudicants and healthy controls. *Blood Coagul.Fibrinolysis.* 1998; **9**: 479-484.

Blum U, Voshage G, Beyersdorf F, Tollner D, Spillner G, Morgenroth A, Nagel G, Schlensack C, Langer M. Two-center German experience with aortic endografting. *J Endovasc.Surg.* 1997; **4**: 137-146.

Board PG, Coggan M, Chelvanayagam G, Easteal S, Jermiin LS, Schulte GK, Danley DE, Hoth LR, Griffor MC, Kamath AV, Rosner MH, Chrnyk BA, Perregaux DE, Gabel CA, Geoghegan KF, Pandit J. Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J Biol Chem.* 2000; **275**: 24798-24806.

Bobryshev YV, Lord RS. Vascular-associated lymphoid tissue (VALT) involvement in aortic aneurysm. *Atherosclerosis.* 2001; **154**: 15-21.

Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand PO, Bergamini G, Coughton K, Cruciat C, Eberhard D, Gagneur J, Ghidelli S, Hopf C, Huhse B, Mangano R, Michon AM, Schirle M, Schlegl J, Schwab M, Stein MA, Bauer A, Casari G, Drewes G, Gavin AC, Jackson DB, Joberty G, Neubauer G, Rick J, Kuster B, Superti-Furga G. A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol.* 2004; **6**: 97-105.

Brady AR, Thompson SG, Fowkes FG, Greenhalgh RM, Powell JT. Abdominal aortic aneurysm expansion: risk factors and time intervals for surveillance. *Circulation.* 2004; **110**: 16-21.

Breuker K, Jin M, Han X, Jiang H, McLafferty FW. Top-down identification and characterization of biomolecules by mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2008; **19**: 1045-1053.

Brewster DC, Cronenwett JL, Hallett JW, Jr., Johnston KW, Krupski WC, Matsumura JS. Guidelines for the treatment of abdominal aortic aneurysms. Report of a subcommittee of the Joint Council of the American Association for Vascular Surgery and Society for Vascular Surgery. *J Vasc Surg.* 2003; **37**: 1106-1117.

Brown LC, Powell JT. Risk factors for aneurysm rupture in patients kept under ultrasound surveillance. UK Small Aneurysm Trial Participants. *Ann Surg.* 1999; **230**: 289-296.

Brown PM, Zelt DT, Sobolev B. The risk of rupture in untreated aneurysms: the impact of size, gender, and expansion rate. *J Vasc Surg.* 2003; **37**: 280-284.

Buckley PG, Alcock L, Bryan K, Bray I, Schulte JH, Schramm A, Eggert A, Mestdagh P, De Preter K, Vandesomepele J, Speleman F, Stallings RL. Chromosomal and microRNA expression patterns reveal biologically distinct subgroups of 11q- neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 2010; **16**: 2971-2978.

C

Caligiuri G, Rossignol P, Julia P, Groyer E, Mouradian D, Urbain D, Misra N, Ollivier V, Sapoval M, Boutouyrie P, Kaveri SV, Nicoletti A, Lafont A. Reduced immunoregulatory CD31+ T cells in patients with atherosclerotic abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; **26**: 618-623.

Casella JF, Craig SW, Maack DJ, Brown AE. Cap Z(36/32), a barbed end actin-capping protein, is a component of the Z-line of skeletal muscle. *J Cell Biol.* 1987; **105**: 371-379.

Cassis LA, Gupte M, Thayer S, Zhang X, Charnigo R, Howatt DA, Rateri DL, Daugherty A. ANG II infusion promotes abdominal aortic aneurysms independent of increased blood pressure in hypercholesterolemic mice. *Am J Physiol Heart Circ.Physiol.* 2009; **296**: H1660-H1665.

Chertov O, Ueda H, Xu LL, Tani K, Murphy WJ, Wang JM, Howard OM, Sayers TJ, Oppenheim JJ. Identification of human neutrophil-derived cathepsin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils. *J Exp Med.* 1997; **186**: 739-747.

Chervu A, Clagett GP, Valentine RJ, Myers SI, Rossi PJ. Role of physical examination in detection of abdominal aortic aneurysms. *Surgery.* 1995; **117**: 454-457.

Chevalier F, Rofidal V, Vanova P, Bergoin A, Rossignol M. Proteomic capacity of recent fluorescent dyes for protein staining. *Phytochemistry.* 2004; **65**: 1499-1506.

Chinetti-Gbaguidi G, Baron M, Bouhlef MA, Vanhoutte J, Copin C, Sebti Y, Derudas B, Mayi T, Bories G, Tailleux A, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Staels B. Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling but high phagocytosis because of distinct activities of the PPARgamma and LXRalpha pathways. *Circ.Res.* 2011; **108**: 985-995.

Chiou AC, Chiu B, Pearce WH. Murine aortic aneurysm produced by periarterial application of calcium chloride. *J Surg.Res.* 2001; **99**: 371-376.

Choke E, Cockerill GW, Dawson J, Wilson RW, Jones A, Loftus IM, Thompson MM. Increased angiogenesis at the site of abdominal aortic aneurysm rupture. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; **1085**: 315-9.

Choke E, Cockerill GW, Laing K, Dawson J, Wilson WR, Loftus IM, Thompson MM. Whole genome-expression profiling reveals a role for immune and inflammatory response in abdominal aortic aneurysm rupture. *Eur J Vasc Endovasc.Surg.* 2009; **37**: 305-310.

Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 1997; **326**: 1-16.

Coon JJ, Zurbig P, Dakna M, Dominiczak AF, Decramer S, Fliser D, Frommberger M, Golovko I, Good DM, Herget-Rosenthal S, Jankowski J, Julian BA, Kellmann M, Kolch W, Massy Z, Novak J, Rossing K, Schanstra JP, Schiffer E, Theodorescu D, Vanholder R, Weissinger EM, Mischak H, Schmitt-Kopplin P. CE-MS analysis of the human urinary proteome for biomarker discovery and disease diagnostics. *Proteomics Clin Appl.* 2008; **2**: 964.

Cornuz J, Sidoti PC, Tevaearai H, Egger M. Risk factors for asymptomatic abdominal aortic aneurysm: systematic review and meta-analysis of population-based screening studies. *Eur J Public Health.* 2004; **14**: 343-349.

Bibliographie

Correia I, Chu D, Chou YH, Goldman RD, Matsudaira P. Integrating the actin and vimentin cytoskeletons. adhesion-dependent formation of fimbrin-vimentin complexes in macrophages. *J Cell Biol.* 1999; **146**: 831-842.

Coutard M, Touat Z, Houard X, Leclercq A, Michel JB. Thrombus versus wall biological activities in experimental aortic aneurysms. *J Vasc Res.* 2010; **47**: 355-366.

Criado FJ, Wilson EP, Fairman RM, Abul-Khoudoud O, Wellons E. Update on the Talent aortic stent-graft: a preliminary report from United States phase I and II trials. *J Vasc Surg.* 2001; **33**: S146-S149.

D

Dawson J, Cockerill GW, Choke E, Belli AM, Loftus I, Thompson MM. Aortic aneurysms secrete interleukin-6 into the circulation. *J Vasc Surg.* 2007; **45**: 350-356.

de Godoy LM, Olsen JV, de Souza GA, Li G, Mortensen P, Mann M. Status of complete proteome analysis by mass spectrometry: SILAC labeled yeast as a model system. *Genome Biol.* 2006; **7**: R50.

De Haro J, Acin F, Bleda S, Varela C, Medina FJ, Esparza L. Prediction of asymptomatic abdominal aortic aneurysm expansion by means of rate of variation of C-reactive protein plasma levels. *J Vasc Surg.* 2012; **56**: 45-52.

Decramer S, Gonzalez dP, Breuil B, Mischak H, Monsarrat B, Bascands JL, Schanstra JP. Urine in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2008; **7**: 1850-1862.

Delbosc S, Alsac JM, Journe C, Louedec L, Castier Y, Bonneure-Mallet M, Ruimy R, Rossignol P, Bouchard P, Michel JB, Meilhac O. Porphyromonas gingivalis participates in pathogenesis of human abdominal aortic aneurysm by neutrophil activation. Proof of concept in rats. *PLoS One.* 2011; **6**: e18679.

Della Corte A, Maugeri N, Pampuch A, Cerletti C, de Gaetano G, Rotilio D. Application of 2-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) to the study of thrombin-activated human platelet secretome. *Platelets.* 2008; **19**: 43-50.

Didangelos A, Mayr U, Monaco C, Mayr M. Novel role of ADAMTS-5 protein in proteoglycan turnover and lipoprotein retention in atherosclerosis. *J Biol Chem.* 2012; **287**: 19341-19345.

Dihazi H, Muller GA. Urinary proteomics: a tool to discover biomarkers of kidney diseases. *Expert.Rev Proteomics.* 2007; **4**: 39-50.

Downes MR, Byrne JC, Pennington SR, Dunn MJ, Fitzpatrick JM, Watson RW. Urinary markers for prostate cancer. *BJU Int.* 2007; **99**: 263-268.

Duftner C, Seiler R, Klein-Weigel P, Gobel H, Goldberger C, Ihling C, Fraedrich G, Schirmer M. High prevalence of circulating CD4+CD28- T-cells in patients with small abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; **25**: 1347-1352.

Dunn EJ, Ariens RA, Grant PJ. The influence of type 2 diabetes on fibrin structure and function. *Diabetologia.* 2005; **48**: 1198-1206.

Dupont A, Chwastyniak M, Beseme O, Guihot AL, Drobecq H, Amouyel P, Pinet F. Application of saturation dye 2D-DIGE proteomics to characterize proteins modulated by oxidized low density lipoprotein treatment of human macrophages. *J Proteome Res.* 2008; **7**: 3572-3582.

Dupont A, Corseaux D, Dekeyzer O, Drobecq H, Guihot AL, Susen S, Vincentelli A, Amouyel P, Jude B, Pinet F. The proteome and secretome of human arterial smooth muscle cells. *Proteomics.* 2005; **5**: 585-596.

Dupont A, Tokarski C, Dekeyzer O, Guihot AL, Amouyel P, Rolando C, Pinet F. Two-dimensional maps and databases of the human macrophage proteome and secretome. *Proteomics.* 2004; **4** : 1761-1778.

Durdu S, Deniz GC, Balci D, Zaim C, Dogan A, Can A, Akcali KC, Akar AR. Apoptotic Vascular Smooth Muscle Cell Depletion via BCL2 Family of Proteins in Human Ascending Aortic Aneurysm and Dissection. *Cardiovasc Ther.* 2012; **10**:5922.

E

Eliason JL, Hannawa KK, Ailawadi G, Sinha I, Ford JW, Deogracias MP, Roelofs KJ, Woodrum DT, Ennis TL, Henke PK, Stanley JC, Thompson RW, Upchurch GR, Jr. Neutrophil depletion inhibits experimental abdominal aortic aneurysm formation. *Circulation.* 2005; **112**: 232-240.

Elkouri S, Gloviczki P, McKusick MA, Panneton JM, Andrews JC, Bower TC, Noel AA, Sullivan TM, Canton LG, Harmsen WS, Hoskin TL, Cherry KJ. Endovascular repair of abdominal aortic aneurysms: initial experience with 100 consecutive patients. *Mayo Clin Proc.* 2003; **78**: 1234-1242.

Emmett MR, Caprioli RM. Micro-electrospray mass spectrometry: ultra-high-sensitivity analysis of peptides and proteins. *J.Am.Soc.Mass Spectrom.* 1994; **5**: 605-613.

Ernst LA, Gupta RK, Mujumdar RB, Waggoner AS. Cyanine dye labeling reagents for sulfhydryl groups. *Cytometry.* 1989; **10**: 3-10.

Eugster T, Huber A, Obeid T, Schwegler I, Gurke L, Stierli P. Aminoterminal propeptide of type III procollagen and matrix metalloproteinases-2 and -9 failed to serve as serum markers for abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc.Surg.* 2005; **29**: 378-382.

Evans J, Powell JT, Schwalbe E, Loftus IM, Thompson MM. Simvastatin attenuates the activity of matrix metalloprotease-9 in aneurysmal aortic tissue. *Eur J Vasc Endovasc.Surg.* 2007; **34**: 302-303.

F

Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, Weber M, Hamm CW, Roxel T, Muller-Ardogan M, Bonauer A, Zeiher AM, Dimmeler S. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ.Res.* 2010; **107**: 677-684.

Fitzgerald JR, Loughman A, Keane F, Brennan M, Knobel M, Higgins J, Visai L, Speziale P, Cox D, Foster TJ. Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* mediate activation of human platelets via fibrinogen and fibronectin bridges to integrin GPIIb/IIIa and IgG binding to the Fcγ3R receptor. *Mol Microbiol.* 2006; **59**: 212-230.

Folkesson M, Kazi M, Zhu C, Silveira A, Hemdahl AL, Hamsten A, Hedin U, Swedenborg J, Eriksson P. Presence of NGAL/MMP-9 complexes in human abdominal aortic aneurysms. *Thromb Haemost.* 2007; **98**: 427-433.

Fontaine V, Jacob MP, Houard X, Rossignol P, Plissonnier D, Angles-Cano E, Michel JB. Involvement of the mural thrombus as a site of protease release and activation in human aortic aneurysms. *Am J Pathol.* 2002; **161**: 1701-1710.

Fontaine V, Touat Z, Mtairag eM, Vranckx R, Louedec L, Houard X, Andreassian B, Sebbag U, Palombi T, Jacob MP, Meilhac O, Michel JB. Role of leukocyte elastase in preventing cellular re-colonization of the mural thrombus. *Am J Pathol.* 2004; **164**: 2077-2087.

Forsdahl SH, Singh K, Solberg S, Jacobsen BK. Risk factors for abdominal aortic aneurysms: a 7-year prospective study: the Tromso Study, 1994-2001. *Circulation.* 2009; **119**: 2202-2208.

Fowkes FG, Anandan CL, Lee AJ, Smith FB, Tzoulaki I, Rumley A, Powell JT, Lowe GD. Reduced lung function in patients with abdominal aortic aneurysm is associated with activation of inflammation and hemostasis, not smoking or cardiovascular disease. *J Vasc Surg.* 2006; **43**: 474-480.

Bibliographie

Franks PJ, Edwards RJ, Greenhalgh RM, Powell JT. Risk factors for abdominal aortic aneurysms in smokers. *Eur J Vasc Endovasc.Surg.* 1996; **11**: 487-492.

Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol.* 1994; **124**: 619-626.

Fritz JS. Recent developments in the separation of inorganic and small organic ions by capillary electrophoresis. *J Chromatogr.A.* 2000; **884**: 261-275.

G

Gadowski GR, Pilcher DB, Ricci MA. Abdominal aortic aneurysm expansion rate: effect of size and beta-adrenergic blockade. *J Vasc Surg.* 1994; **19**: 727-731.

Gadowski GR, Ricci MA, Hendley ED, Pilcher DB. Hypertension accelerates the growth of experimental aortic aneurysms. *J Surg.Res.* 1993; **54**: 431-436.

Gaetti-Jardim E Jr, Marcelino SL, Feitosa AC, Romito GA, Avila-Campos MJ. Quantitative detection of periodontopathic bacteria in atherosclerotic plaques from coronary arteries. *J Med Microbiol.* 2009; **58**: 1568-1575.

Geng YJ. Molecular signal transduction in vascular cell apoptosis. *Cell Res.* 2001; **11**: 253-264.

Gerszten RE, Wang TJ. The search for new cardiovascular biomarkers. *Nature.* 2008; **451**: 949-952.

Giddings JC. Sample dimensionality: a predictor of order-disorder in component peak distribution in multidimensional separation. *J Chromatogr.A.* 1995; **703**: 3-15.

Godin D, Ivan E, Johnson C, Magid R, Galis ZS. Remodeling of carotid artery is associated with increased expression of matrix metalloproteinases in mouse blood flow cessation model. *Circulation.* 2000; **102**: 2861-2866.

Golledge J, Karan M, Moran CS, Muller J, Clancy P, Dear AE, Norman PE. Reduced expansion rate of abdominal aortic aneurysms in patients with diabetes may be related to aberrant monocyte-matrix interactions. *Eur Heart J.* 2008a; **29**: 665-672.

Golledge J, Muller J, Daugherty A, Norman P. Abdominal aortic aneurysm: pathogenesis and implications for management. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; **26**: 2605-2613.

Golledge J, Tsao PS, Dalman RL, Norman PE. Circulating markers of abdominal aortic aneurysm presence and progression. *Circulation.* 2008b; **118**: 2382-2392.

Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003; **3**: 23-35.

Grayston JT, Campbell LA, Kuo CC, Mordhorst CH, Saikku P, Thom DH, Wang SP. A new respiratory tract pathogen: Chlamydia pneumoniae strain TWAR. *J Infect.Dis.* 1990; **161**: 618-625.

Greenhalgh RM, Brown LC, Kwong GP, Powell JT, Thompson SG. Comparison of endovascular aneurysm repair with open repair in patients with abdominal aortic aneurysm (EVAR trial 1), 30-day operative mortality results: randomised controlled trial. *Lancet.* 2004; **364**: 843-848.

Gretarsdottir S, Baas AF, Thorleifsson G, Holm H, den Heijer M, de Vries JP, Kranendonk SE, Zeebregts CJ, van Sterkenburg SM, Geelkerken RH, van Rij AM, Williams MJ, Boll AP, Kostic JP, Jonasdottir A, Jonasdottir A, Walters GB, Masson G, Sulem P, Saemundsdottir J, Mouy M, Magnusson KP, Tromp G, Elmore JR, Sakalihasan N, Limet R, Defraigne JO, Ferrell RE, Ronkainen A, Ruigrok YM, Wijmenga C, Grobbee DE, Shah SH, Granger CB, Quyyumi AA, Vaccarino V, Patel RS, Zafari AM, Levey AI, Austin H, Girelli D, Pignatti PF, Olivieri O, Martinelli N, Malerba G, Trabetti E, Becker LC, Becker DM, Reilly MP, Rader DJ, Mueller T, Dieplinger B, Haltmayer M,

Urbonavicius S, Lindblad B, Gottsater A, Gaetani E, Pola R, Wells P, Rodger M, Forgie M, Langlois N, Corral J, Vicente V, Fontcuberta J, Espana F, Grarup N, Jorgensen T, Witte DR, Hansen T, Pedersen O, Aben KK, de Graaf J, Holewijn S, Folkersen L, Franco-Cereceda A, Eriksson P, Collier DA, Stefansson H, Steinhorsdottir V, Rafnar T, Valdimarsson EM, Magnadottir HB, Sveinbjornsdottir S, Olafsson I, Magnusson MK, Palmason R, Haraldsdottir V, Andersen K, Onundarson PT, Thorgeirsson G, Kiemenev LA, Powell JT, Carey DJ, Kuivaniemi H, Lindholt JS, Jones GT, Kong A, Blankensteijn JD, Matthiasson SE, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. Genome-wide association study identifies a sequence variant within the DAB2IP gene conferring susceptibility to abdominal aortic aneurysm. *Nat Genet.* 2010; **42**: 692-697.

Griffin PR, Coffman JA, Hood LE, Yates JR. Structural analysis of proteins by capillary HPLC electrospray tandem mass spectrometry. *Int.J.Mass spectrom.Ion process.* 1991; **111**: 131-149.

Griffin TJ, Goodlett DR, Aebersold R. Advances in proteome analysis by mass spectrometry. *Curr Opin Biotechnol.* 2001; **12**: 607-612.

Groves E, Dart AE, Covarelli V, Caron E. Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci.* 2008; **65**: 1957-1976.

Guerau-de-Arellano M, Smith KM, Godlewski J, Liu Y, Winger R, Lawler SE, Whitacre CC, Racke MK, Lovett-Racke AE. Micro-RNA dysregulation in multiple sclerosis favours pro-inflammatory T-cell-mediated autoimmunity. *Brain.* 2011; **134**: 3578-3589.

H

Hackam DG, Thiruchelvam D, Redelmeier DA. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and aortic rupture: a population-based case-control study. *Lancet.* 2006; **368**: 659-665.

Haffner SM, Greenberg AS, Weston WM, Chen H, Williams K, Freed MI. Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation.* 2002; **106**: 679-684.

Hahn DL, Golubjatnikov R. Smoking is a potential confounder of the Chlamydia pneumoniae-coronary artery disease association. *Arterioscler Thromb.* 1992; **12**: 945-947.

Halazun KJ, Bofkin KA, Asthana S, Evans C, Henderson M, Spark JI. Hyperhomocysteinaemia is associated with the rate of abdominal aortic aneurysm expansion. *Eur J Vasc Endovasc.Surg.* 2007; **33**: 391-394.

Halme S, Juvonen T, Laurila A, Juvonen J, Mosorin M, Saikku P, Surcel HM. Chlamydia pneumoniae reactive T lymphocytes in the walls of abdominal aortic aneurysms. *Eur J Clin Invest.* 1999; **29**: 546-552.

Hartmann H, Schleicher M, Noegel AA. Heterodimeric capping proteins constitute a highly conserved group of actin-binding proteins. *Dev.Genet.* 1990; **11**: 369-376.

Hattori N, Carrino DA, Lauer ME, Vasanji A, Wylie JD, Nelson CM, Apte SS. Pericellular versican regulates the fibroblast-myofibroblast transition: a role for ADAMTS5 protease-mediated proteolysis. *J Biol Chem.* 2011; **286**: 34298-34310.

Helgadottir A, Thorleifsson G, Magnusson KP, Gretarsdottir S, Steinhorsdottir V, Manolescu A, Jones GT, Rinkel GJ, Blankensteijn JD, Ronkainen A, Jaaskelainen JE, Kyo Y, Lenk GM, Sakalihasan N, Kostulas K, Gottsater A, Flex A, Stefansson H, Hansen T, Andersen G, Weinsheimer S, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Shah SH, Quyyumi AA, Granger CB, Reilly MP, Austin H, Levey AI, Vaccarino V, Palsdottir E, Walters GB, Jonsdottir T, Snorraddottir S, Magnasdottir D, Gudmundsson G, Ferrell RE, Sveinbjornsdottir S, Hernesniemi J, Niemela M, Limet R, Andersen K, Sigurdsson G, Benediktsson R, Verhoeven EL, Teijink JA, Grobbee DE, Rader DJ, Collier DA, Pedersen O, Pola R, Hillert J, Lindblad B, Valdimarsson EM, Magnadottir HB, Wijmenga C, Tromp G, Baas AF, Ruigrok YM, van Rij AM, Kuivaniemi H, Powell JT, Matthiasson SE, Gulcher JR, Thorgeirsson G, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. *Nat Genet.* 2008; **40**: 217-224.

Bibliographie

Hellenthal FA, Pulinx B, Welten RJ, Teijink JA, Dieijen-Visser MP, Wodzig WK, Schurink GW. Circulating biomarkers and abdominal aortic aneurysm size. *J Surg.Res.* 2012; **176**: 672-678.

Henderson EL, Geng YJ, Sukhova GK, Whittemore AD, Knox J, Libby P. Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms. *Circulation.* 1999; **99**: 96-104.

Hinterseher I, Erdman R, Elmore JR, Stahl E, Pahl MC, Derr K, Golden A, Lillvis JH, Cindric MC, Jackson K, Bowen WD, Schworer CM, Chernousov MA, Franklin DP, Gray JL, Garvin RP, Gatalica Z, Carey DJ, Tromp G, Kuivaniemi H. Novel pathways in the pathobiology of human abdominal aortic aneurysms. *Pathobiology.* 2013; **80**: 1-10.

Hobbs SD, Claridge MW, Quick CR, Day NE, Bradbury AW, Wilmink AB. LDL cholesterol is associated with small abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc.Surg.* 2003; **26**: 618-622.

Holmberg A, Bergqvist D, Westman B, Siegbahn A. Cytokine and fibrinogen response in patients undergoing open abdominal aortic aneurysm surgery. *Eur J Vasc Endovasc.Surg.* 1999; **17**: 294-300.

Houard X, Touat Z, Ollivier V, Louedec L, Philippe M, Sebbag U, Meilhac O, Rossignol P, Michel JB. Mediators of neutrophil recruitment in human abdominal aortic aneurysms. *Cardiovasc Res.* 2009; **82**: 532-541.

Hovsepian DM, Ziporin SJ, Sakurai MK, Lee JK, Curci JA, Thompson RW. Elevated plasma levels of matrix metalloproteinase-9 in patients with abdominal aortic aneurysms: a circulating marker of degenerative aneurysm disease. *J Vasc Interv.Radiol.* 2000; **11**: 1345-1352.

I

Issaq HJ, Xiao Z, Veenstra TD. Serum and plasma proteomics. *Chem Rev.* 2007; **107**: 3601-3620.

Isselbacher EM. Thoracic and abdominal aortic aneurysms. *Circulation.* 2005; **111**: 816-828.

J

Jamrozik K, Norman PE, Spencer CA, Parsons RW, Tuohy R, Lawrence-Brown MM, Dickinson JA. Screening for abdominal aortic aneurysm: lessons from a population-based study. *Med J Aust.* 2000; **173**: 345-350.

Jandera P, Hajek T, Skerikova V, Soukup J. Dual hydrophilic interaction-RP retention mechanism on polar columns: structural correlations and implementation for 2-D separations on a single column. *J Sep.Sci.* 2010; **33**: 841-852.

Ji J, Wang XW. New kids on the block: diagnostic and prognostic microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2009; **8**: 1686-1693.

Jones A, Deb R, Torsney E, Howe F, Dunkley M, Ganeswaran Y, Gaze D, Nasr H, Loftus IM, Thompson MM, Cockerill GW. Rosiglitazone reduces the development and rupture of experimental aortic aneurysms. *Circulation.* 2009; **119**: 3125-3132.

Jones GT, van Rij AM, Cole J, Williams MJ, Bateman EH, Marcovina SM, Deng M, McCormick SP. Plasma lipoprotein(a) indicates risk for 4 distinct forms of vascular disease. *Clin Chem.* 2007; **53**: 679-685.

Jones SC, Saunders HJ, Pollock CA. High glucose increases growth and collagen synthesis in cultured human tubulointerstitial cells. *Diabet.Med.* 1999; **16**: 932-938.

Jones SL, Brown EJ. FcγRII-mediated adhesion and phagocytosis induce L-plastin phosphorylation in human neutrophils. *J Biol Chem.* 1996; **271**: 14623-14630.

Juvonen J, Juvonen T, Laurila A, Alakarppa H, Lounatmaa K, Surcel HM, Leinonen M, Kairaluoma MI, Saikku P. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in the walls of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 1997; **25**: 499-505.

K

Kaneko H, Anzai T, Horiuchi K, Kohno T, Nagai T, Anzai A, Takahashi T, Sasaki A, Shimoda M, Maekawa Y, Shimizu H, Yoshikawa T, Okada Y, Yozu R, Fukuda K. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme is a key mediator of abdominal aortic aneurysm development. *Atherosclerosis.* 2011; **218**: 470-478.

Karvonen M, Tuomilehto J, Pitkaniemi J, Naukkarinen A, Saikku P. Importance of smoking for *Chlamydia pneumoniae* seropositivity. *Int J Epidemiol.* 1994; **23**: 1315-1321.

Kaukoranta-Tolvanen SS, Laitinen K, Saikku P, Leinonen M. *Chlamydia pneumoniae* multiplies in human endothelial cells in vitro. *Microb.Pathog.* 1994; **16**: 313-319.

Kawai-Kowase K, Owens GK. Multiple repressor pathways contribute to phenotypic switching of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; **292**: C59-C69.

Kazi M, Thyberg J, Religa P, Roy J, Eriksson P, Hedin U, Swedenborg J. Influence of intraluminal thrombus on structural and cellular composition of abdominal aortic aneurysm wall. *J Vasc Surg.* 2003; **38**: 1283-1292.

Kertai MD, Boersma E, Westerhout CM, Klein J, Van Urk H, Bax JJ, Roelandt JR, Poldermans D. A combination of statins and beta-blockers is independently associated with a reduction in the incidence of perioperative mortality and nonfatal myocardial infarction in patients undergoing abdominal aortic aneurysm surgery. *Eur J Vasc Endovasc.Surg.* 2004; **28**: 343-352.

Kinane JA, Benakanakere MR, Zhao J, Hosur KB, Kinane DF. *Porphyromonas gingivalis* influences actin degradation within epithelial cells during invasion and apoptosis. *Cell Microbiol.* 2012; **14**: 1085-1096.

Knox JB, Sukhova GK, Whittemore AD, Libby P. Evidence for altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in human aortic diseases. *Circulation.* 1997; **95**: 205-212.

Ko YS, Coppens SR, Dupont E, Rothery S, Severs NJ. Regional differentiation of desmin, connexin43, and connexin45 expression patterns in rat aortic smooth muscle. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; **21**: 355-364.

Koch AE, Haines GK, Rizzo RJ, Radosevich JA, Pope RM, Robinson PG, Pearce WH. Human abdominal aortic aneurysms. Immunophenotypic analysis suggesting an immune-mediated response. *Am J Pathol.* 1990; **137**: 1199-1213.

Kol A, Sukhova GK, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase expression. *Circulation.* 1998; **98**: 300-307.

Koole D, Hurks R, Schoneveld A, Vink A, Golledge J, Moran CS, de Kleijn DP, van Herwaarden JA, de Vries JP, Laman JD, Huizinga R, Pasterkamp G, Moll FL. Osteoprotegerin is associated with aneurysm diameter and proteolysis in abdominal aortic aneurysm disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; **32**: 1497-1504.

Krishnaswamy G, Ajitawi O, Chi DS. The human mast cell: an overview. *Methods Mol Biol.* 2006; **315**: 13-34.

Kruger O, Plum A, Kim JS, Winterhager E, Maxeiner S, Hallas G, Kirchhoff S, Traub O, Lamers WH, Willecke K. Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. *Development.* 2000; **127**: 4179-4193.

Kuo CC, Gown AM, Benditt EP, Grayston JT. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. *Arterioscler Thromb.* 1993; **13**: 1501-1504.

L

Lacraz S, Isler P, Vey E, Welgus HG, Dayer JM. Direct contact between T lymphocytes and monocytes is a major pathway for induction of metalloproteinase expression. *J Biol Chem.* 1994; **269**: 22027-22033.

Lai CY, Yu SL, Hsieh MH, Chen CH, Chen HY, Wen CC, Huang YH, Hsiao PC, Hsiao CK, Liu CM, Yang PC, Hwu HG, Chen WJ. MicroRNA expression aberration as potential peripheral blood biomarkers for schizophrenia. *PLoS One.* 2011; **6**: e21635.

Lamblin N, Ratajczak P, Hot D, Dubois E, Chwastyniak M, Beseme O, Drobecq H, Lemoine Y, Koussa M, Amouyel P, Pinet F. Profile of macrophages in human abdominal aortic aneurysms: a transcriptomic, proteomic, and antibody protein array study. *J Proteome Res.* 2010; **9**: 3720-3729.

LaRoy LL, Cormier PJ, Matalon TA, Patel SK, Turner DA, Silver B. Imaging of abdominal aortic aneurysms. *AJR Am J Roentgenol.* 1989; **152**: 785-792.

Larsson E, Granath F, Swedenborg J, Hultgren R. A population-based case-control study of the familial risk of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg.* 2009; **49**: 47-50.

Lederle FA. Endovascular repair of abdominal aortic aneurysm--round two. *N Engl.J Med.* 2005; **352**: 2443-2445.

Lederle FA, Freischlag JA, Kyriakides TC, Padberg FT, Jr., Matsumura JS, Kohler TR, Lin PH, Jean-Claude JM, Cikrit DF, Swanson KM, Peduzzi PN. Outcomes following endovascular vs open repair of abdominal aortic aneurysm: a randomized trial. *JAMA.* 2009; **302**: 1535-1542.

Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE. Abdominal aortic aneurysm in women. *J Vasc Surg.* 2001; **34**: 122-126.

Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, Chute EP, Hye RJ, Makaroun MS, Barone GW, Bandyk D, Moneta GL, Makhoul RG. The aneurysm detection and management study screening program: validation cohort and final results. Aneurysm Detection and Management Veterans Affairs Cooperative Study Investigators. *Arch Intern.Med.* 2000; **160**: 1425-1430.

Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, Chute EP, Littooy FN, Bandyk D, Krupski WC, Barone GW, Acher CW, Ballard DJ. Prevalence and associations of abdominal aortic aneurysm detected through screening. Aneurysm Detection and Management (ADAM) Veterans Affairs Cooperative Study Group. *Ann Intern.Med.* 1997; **126**: 441-449.

Lederle FA, Kane RL, MacDonald R, Wilt TJ. Systematic review: repair of unruptured abdominal aortic aneurysm. *Ann Intern.Med.* 2007; **146**: 735-741.

Lederle FA, Wilson SE, Johnson GR, Reinke DB, Littooy FN, Acher CW, Ballard DJ, Messina LM, Gordon IL, Chute EP, Krupski WC, Busuttill SJ, Barone GW, Sparks S, Graham LM, Rapp JH, Makaroun MS, Moneta GL, Cambria RA, Makhoul RG, Eton D, Ansel HJ, Freischlag JA, Bandyk D. Immediate repair compared with surveillance of small abdominal aortic aneurysms. *N Engl.J Med.* 2002; **346**: 1437-1444.

Lee AJ, Fowkes FG, Carson MN, Leng GC, Allan PL. Smoking, atherosclerosis and risk of abdominal aortic aneurysm. *Eur Heart J.* 1997; **18**: 671-676.

Lee AJ, Fowkes FG, Lowe GD, Rumley A. Haemostatic factors, atherosclerosis and risk of abdominal aortic aneurysm. *Blood Coagul.Fibrinolysis.* 1996; **7**: 695-701.

Lee CK, Park HJ, So HH, Kim HJ, Lee KS, Choi WS, Lee HM, Won KJ, Yoon TJ, Park TK, Kim B. Proteomic profiling and identification of cofilin responding to oxidative stress in vascular smooth muscle. *Proteomics.* 2006; **6**: 6455-6475.

- Lenk GM, Tromp G, Weinsheimer S, Gatalica Z, Berguer R, Kuivaniemi H. Whole genome expression profiling reveals a significant role for immune function in human abdominal aortic aneurysms. *BMC Genomics*. 2007; **8**: 237.
- Ley K, Miller YI, Hedrick CC. Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011; **31**: 1506-1516.
- Li L, Mamputu JC, Wiernsperger N, Renier G. Signaling pathways involved in human vascular smooth muscle cell proliferation and matrix metalloproteinase-2 expression induced by leptin: inhibitory effect of metformin. *Diabetes*. 2005; **54**: 2227-2234.
- Liao S, Curci JA, Kelley BJ, Sicard GA, Thompson RW. Accelerated replicative senescence of medial smooth muscle cells derived from abdominal aortic aneurysms compared to the adjacent inferior mesenteric artery. *J Surg.Res*. 2000; **92**: 85-95.
- Liao S, Miralles M, Kelley BJ, Curci JA, Borhani M, Thompson RW. Suppression of experimental abdominal aortic aneurysms in the rat by treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Vasc Surg*. 2001; **33**: 1057-1064.
- Lilley KS, Friedman DB. All about DIGE: quantification technology for differential-display 2D-gel proteomics. *Expert.Rev Proteomics*. 2004; **1**: 401-409.
- Lin CS, Park T, Chen ZP, Leavitt J. Human plastin genes. Comparative gene structure, chromosome location, and differential expression in normal and neoplastic cells. *J Biol Chem*. 1993; **268**: 2781-2792.
- Lindholm L, Ejlertsson G, Forsberg L, Norgren L. Low prevalence of abdominal aortic aneurysm in hypertensive patients. A population-based study. *Acta Med Scand*. 1985; **218**: 305-310.
- Lindholt JS, Erlandsen EJ, Henneberg EW. Cystatin C deficiency is associated with the progression of small abdominal aortic aneurysms. *Br.J Surg*. 2001a; **88**: 1472-1475.
- Lindholt JS, Heickendorff L, Vammen S, Fasting H, Henneberg EW. Five-year results of elastin and collagen markers as predictive tools in the management of small abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc.Surg*. 2001b; **21**: 235-240.
- Lindholt JS, Jorgensen B, Fasting H, Henneberg EW. Plasma levels of plasmin-antiplasmin-complexes are predictive for small abdominal aortic aneurysms expanding to operation-recommendable sizes. *J Vasc Surg*. 2001c; **34**: 611-615.
- Lindholt JS, Jorgensen B, Klitgaard NA, Henneberg EW. Systemic levels of cotinine and elastase, but not pulmonary function, are associated with the progression of small abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc.Surg*. 2003a; **26**: 418-422.
- Lindholt JS, Jorgensen B, Shi GP, Henneberg EW. Relationships between activators and inhibitors of plasminogen, and the progression of small abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc.Surg*. 2003b; **25**: 546-551.
- Lindholt JS, Norman P. Screening for abdominal aortic aneurysm reduces overall mortality in men. A meta-analysis of the mid- and long-term effects of screening for abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc.Surg*. 2008; **36**: 167-171.
- Lindholt JS, Sorensen J, Sogaard R, Henneberg EW. Long-term benefit and cost-effectiveness analysis of screening for abdominal aortic aneurysms from a randomized controlled trial. *Br.J Surg*. 2010; **97**: 826-834.
- Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest*. 2002; **110**: 625-632.

Bibliographie

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

Lopez MF, Berggren K, Chernokalskaya E, Lazarev A, Robinson M, Patton WF. A comparison of silver stain and SYPRO Ruby Protein Gel Stain with respect to protein detection in two-dimensional gels and identification by peptide mass profiling. *Electrophoresis.* 2000; **21**: 3673-3683.

Louwrens HD, Adamson J, Powell JT, Greenhalgh RM. Risk factors for atherosclerosis in men with stenosing or aneurysmal disease of the abdominal aorta. *Int Angiol.* 1993; **12**: 21-24.

M

Mallick P, Kuster B. Proteomics: a pragmatic perspective. *Nat Biotechnol.* 2010; **28**: 695-709.

Martinez-Pinna R, Ramos-Mozo P, Madrigal-Matute J, Blanco-Colio LM, Lopez JA, Calvo E, Camafeita E, Lindholt JS, Meilhac O, Delbosc S, Michel JB, de Ceniga MV, Egado J, Martin-Ventura JL. Identification of peroxiredoxin-1 as a novel biomarker of abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; **31**: 935-943.

Matsumoto K, Shionyu M, Go M, Shimizu K, Shinomura T, Kimata K, Watanabe H. Distinct interaction of versican/PG-M with hyaluronan and link protein. *J Biol Chem.* 2003; **278**: 41205-41212.

Matsushima K, Shiroo M, Kung HF, Copeland TD. Purification and characterization of a cytosolic 65-kilodalton phosphoprotein in human leukocytes whose phosphorylation is augmented by stimulation with interleukin 1. *Biochemistry.* 1988; **27**: 3765-3770.

McCormick ML, Gavrilu D, Weintraub NL. Role of oxidative stress in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; **27**: 461-469.

McCulloch DR, Le Goff C, Bhatt S, Dixon LJ, Sandy JD, Apte SS. Adamts5, the gene encoding a proteoglycan-degrading metalloprotease, is expressed by specific cell lineages during mouse embryonic development and in adult tissues. *Gene Expr. Patterns.* 2009; **9**: 314-323.

McFarlane MJ. The epidemiologic necropsy for abdominal aortic aneurysm. *JAMA.* 1991; **265**: 2085-2088.

McMillan WD, Pearce WH. Increased plasma levels of metalloproteinase-9 are associated with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 1999; **29**: 122-127.

Messier JM, Shaw LM, Chafel M, Matsudaira P, Mercurio AM. Fimbrin localized to an insoluble cytoskeletal fraction is constitutively phosphorylated on its headpiece domain in adherent macrophages. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 1993; **25**: 223-233.

Michel JB. Anoikis in the cardiovascular system: known and unknown extracellular mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; **23**: 2146-2154.

Michel JB, Martin-Ventura JL, Egado J, Sakalihasan N, Treska V, Lindholt J, Allaire E, Thorsteinsdottir U, Cockerill G, Swedenborg J. Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans. *Cardiovasc Res.* 2011; **90**: 18-27.

Michel JB, Thauinat O, Houard X, Meilhac O, Caligiuri G, Nicoletti A. Topological determinants and consequences of adventitial responses to arterial wall injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; **27**: 1259-1268.

Michel JB, Touat Z, Houard X, Borges L, Fontaine V, Jondeau G. New concepts in human abdominal aortic aneurysm patho-physiology: comparison with ascending aortic and other locations. In: Sakalihasan N, Kuivaniemi H, Michel JB. Aortic aneurysms. New insights into an old problem. *Editions de l'Université de Liège.* 2008 ; 165-185.

Miller FJ, Jr., Sharp WJ, Fang X, Oberley LW, Oberley TD, Weintraub NL. Oxidative stress in human abdominal aortic aneurysms: a potential mediator of aneurysmal remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; **22**: 560-565.

Molacek J, Treska V, Kobr J, Certik B, Skalicky T, Kuntscher V, Krizkova V. Optimization of the model of abdominal aortic aneurysm--experiment in an animal model. *J Vasc Res.* 2009; **46**: 1-5.

Molloy MP, Brzezinski EE, Hang J, McDowell MT, VanBogelen RA. Overcoming technical variation and biological variation in quantitative proteomics. *Proteomics.* 2003; **3**: 1912-1919.

Molnar I, Horvath C. Reverse-phase chromatography of polar biological substances: separation of catechol compounds by high-performance liquid chromatography. *Clin Chem.* 1976; **22**: 1497-1502.

Moran CS, McCann M, Karan M, Norman P, Ketheesan N, Golledge J. Association of osteoprotegerin with human abdominal aortic aneurysm progression. *Circulation.* 2005; **111**: 3119-3125.

Morimoto K, Hasegawa T, Tanaka A, Wulan B, Yu J, Morimoto N, Okita Y, Okada K. Free-radical scavenger edaravone inhibits both formation and development of abdominal aortic aneurysm in rats. *J Vasc Surg.* 2012; **55**: 1749-1758.

Mujumdar RB, Ernst LA, Mujumdar SR, Lewis CJ, Waggoner AS. Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjug.Chem.* 1993; **4**: 105-111.

Munezane T, Hasegawa T, Suritala, Tanaka A, Okada K, Okita Y. Activation of transglutaminase type 2 for aortic wall protection in a rat abdominal aortic aneurysm formation. *J Vasc Surg.* 2010; **52**: 967-974.

Murray GI. An overview of laser microdissection technologies. *Acta Histochem.* 2007; **109**: 171-176.

Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell.* 1996; **85**: 817-827.

N

Nachtigal M, Nagpal ML, Greenspan P, Nachtigal SA, Legrand A. Characterization of a continuous smooth muscle cell line derived from rabbit aorta. *In Vitro Cell Dev.Biol.* 1989; **25**: 892-898.

Nakano K, Nemoto H, Nomura R, Inaba H, Yoshioka H, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T. Detection of oral bacteria in cardiovascular specimens. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; **24**: 64-68.

Nakano K, Wada K, Nomura R, Nemoto H, Inaba H, Kojima A, Naka S, Hokamura K, Mukai T, Nakajima A, Umemura K, Kamisaki Y, Yoshioka H, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T. Characterization of aortic aneurysms in cardiovascular disease patients harboring *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Dis.* 2011; **17**: 370-378.

Naydeck BL, Sutton-Tyrrell K, Schiller KD, Newman AB, Kuller LH. Prevalence and risk factors for abdominal aortic aneurysms in older adults with and without isolated systolic hypertension. *Am J Cardiol.* 1999; **83**: 759-764.

Nishimura K, Ikebuchi M, Kanaoka Y, Ohgi S, Ueta E, Nanba E, Ito H. Relationships between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in the wall of abdominal aortic aneurysms. *Int Angiol.* 2003; **22**: 229-238.

Norman PE, Davis TM, Le MT, Golledge J. Matrix biology of abdominal aortic aneurysms in diabetes: mechanisms underlying the negative association. *Connect.Tissue Res.* 2007; **48**: 125-131.

O

Ocana E, Bohorquez JC, Perez-Requena J, Brieva JA, Rodriguez C. Characterisation of T and B lymphocytes infiltrating abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis*. 2003; **170**: 39-48.

Olczak T, Simpson W, Liu X, Genco CA. Iron and heme utilization in *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Rev*. 2005; **29**: 119-144.

Omenn GS, States DJ, Adamski M, Blackwell TW, Menon R, Hermjakob H, Apweiler R, Haab BB, Simpson RJ, Eddes JS, Kapp EA, Moritz RL, Chan DW, Rai AJ, Admon A, Aebersold R, Eng J, Hancock WS, Hefta SA, Meyer H, Paik YK, Yoo JS, Ping P, Pounds J, Adkins J, Qian X, Wang R, Wasinger V, Wu CY, Zhao X, Zeng R, Archakov A, Tsugita A, Beer I, Pandey A, Pisano M, Andrews P, Tammen H, Speicher DW, Hanash SM. Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. *Proteomics*. 2005; **5**: 3226-3245.

P

Pagano MB, Bartoli MA, Ennis TL, Mao D, Simmons PM, Thompson RW, Pham CT. Critical role of dipeptidyl peptidase I in neutrophil recruitment during the development of experimental abdominal aortic aneurysms. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 2007; **104**: 2855-2860.

Pahl MC, Derr K, Gabel G, Hinterseher I, Elmore JR, Schworer CM, Peeler TC, Franklin DP, Gray JL, Carey DJ, Tromp G, Kuivaniemi H. MicroRNA expression signature in human abdominal aortic aneurysms. *BMC Med Genomics*. 2012; **5**: 25.

Pan JH, Lindholt JS, Sukhova GK, Baugh JA, Henneberg EW, Bucala R, Donnelly SC, Libby P, Metz C, Shi GP. Macrophage migration inhibitory factor is associated with aneurysmal expansion. *J Vasc Surg*. 2003; **37**: 628-635.

Pao-Chi Liao JA. Dissecting matrice assisted laser desorption/ionization mass spectra. *J.Mass Spectrom*. 1995; **30**: 763-766.

Papagrigrakis E, Iliopoulos D, Asimacopoulos PJ, Safi HJ, Weilbaecher DJ, Ghazzaly KG, Nava ML, Gaubatz JW, Morrisett JD. Lipoprotein(a) in plasma, arterial wall, and thrombus from patients with aortic aneurysm. *Clin Genet*. 1997; **52**: 262-271.

Pappas CT, Bhattacharya N, Cooper JA, Gregorio CC. Nebulin interacts with CapZ and regulates thin filament architecture within the Z-disc. *Mol Biol Cell*. 2008; **19**: 1837-1847.

Pathirana RD, O'Brien-Simpson NM, Veith PD, Riley PF, Reynolds EC. Characterization of proteinase-adhesin complexes of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology*. 2006; **152**: 2381-2394.

Paulin D, Li Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Exp Cell Res*. 2004; **301**: 1-7.

Paulo JA, Kadiyala V, Banks PA, Steen H, Conwell DL. Mass spectrometry-based proteomics for translational research: a technical overview. *Yale J Biol Med*. 2012; **85**: 59-73.

Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, Potter JD, Thompson ML, Thornquist M, Winget M, Yasui Y. Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2001; **93**: 1054-1061.

Petersen MJ, Cambria RP, Kaufman JA, LaMuraglia GM, Gertler JP, Brewster DC, Geller SC, Waltman AC, L'Italien GJ, Abbott WM. Magnetic resonance angiography in the preoperative evaluation of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 1995; **21**: 891-898.

Piedrahita JA, Zhang SH, Hagaman JR, Oliver PM, Maeda N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 1992; **89**: 4471-4475.

Porath J, Flodin P. Gel filtration: a method for desalting and group separation. *Nature.* 1959; **183** : 1657-1659.

Powell JT, Greenhalgh RM. Clinical practice. Small abdominal aortic aneurysms. *N Engl.J Med.* 2003; **348**: 1895-1901.

Prinssen M, Verhoeven EL, Buth J, Cuypers PW, van Sambeek MR, Balm R, Buskens E, Grobbee DE, Blankensteijn JD. A randomized trial comparing conventional and endovascular repair of abdominal aortic aneurysms. *N Engl.J Med.* 2004; **351**: 1607-1618.

Puertollano MA, Puertollano E, de Cienfuegos GA, de Pablo MA. Dietary antioxidants: immunity and host defense. *Curr Top.Med Chem.* 2011; **11**: 1752-1766.

R

Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 2008; **75**: 346-359.

Ramos-Mozo P, Madrigal-Matute J, Martinez-Pinna R, Blanco-Colio LM, Lopez JA, Camafeita E, Meilhac O, Michel JB, Aparicio C, Vega dC, Egido J, Martin-Ventura JL. Proteomic analysis of polymorphonuclear neutrophils identifies catalase as a novel biomarker of abdominal aortic aneurysm: potential implication of oxidative stress in abdominal aortic aneurysm progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; **31**: 3011-3019.

Ramos-Mozo P, Madrigal-Matute J, Vega dC, Blanco-Colio LM, Meilhac O, Feldman L, Michel JB, Clancy P, Golledge J, Norman PE, Egido J, Martin-Ventura JL. Increased plasma levels of NGAL, a marker of neutrophil activation, in patients with abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis.* 2012; **220**: 552-556.

Reeps C, Pelisek J, Seidl S, Schuster T, Zimmermann A, Kuehnl A, Eckstein HH. Inflammatory infiltrates and neovessels are relevant sources of MMPs in abdominal aortic aneurysm wall. *Pathobiology.* 2009; **76**: 243-252.

Righetti PG, Boschetti E, Lomas L, Citterio A. Protein Equalizer Technology : the quest for a "democratic proteome". *Proteomics.* 2006; **6**: 3980-3992.

Righetti PG, Gianazza E. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: theory and newer methodology. *Methods Biochem Anal.* 1987; **32**: 215-78.

Rizas KD, Ippagunta N, Tilson MD, III. Immune cells and molecular mediators in the pathogenesis of the abdominal aortic aneurysm. *Cardiol Rev.* 2009; **17**: 201-210.

Rizzo M, Krayenbuhl PA, Pernice V, Frasheri A, Battista RG, Berneis K. LDL size and subclasses in patients with abdominal aortic aneurysm. *Int J Cardiol.* 2009; **134**: 406-408.

Rizzo RJ, McCarthy WJ, Dixit SN, Lilly MP, Shively VP, Flinn WR, Yao JS. Collagen types and matrix protein content in human abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 1989; **10**: 365-373.

Roepstorff P, Fohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed.Mass Spectrom.* 1984; **11**: 601.

Rush C, Nyara M, Moxon JV, Trollope A, Cullen B, Golledge J. Whole genome expression analysis within the angiotensin II-apolipoprotein E deficient mouse model of abdominal aortic aneurysm. *BMC Genomics.* 2009; **10**: 298.

Rush J, Moritz A, Lee KA, Guo A, Goss VL, Spek EJ, Zhang H, Zha XM, Polakiewicz RD, Comb MJ. Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nat Biotechnol.* 2005; **23**: 94-101.

S

- Saal S, Harvey SJ. MicroRNAs and the kidney: coming of age. *Curr Opin Nephrol.Hypertens.* 2009; **18**: 317-323.
- Saikku P. The epidemiology and significance of Chlamydia pneumoniae. *J Infect.* 1992; **25 Suppl 1**: 27-34.
- Saikku P, Leinonen M, Mattila K, Ekman MR, Nieminen MS, Makela PH, Huttunen JK, Valtonen V. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet.* 1988; **2**: 983-986.
- Sakalihasan N, Delvenne P, Nusgens BV, Limet R, Lapiere CM. Activated forms of MMP2 and MMP9 in abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 1996; **24**: 127-133.
- Sangiorgi G, D'Averio R, Mauriello A, Bondio M, Pontillo M, Castelvechio S, Trimarchi S, Tolva V, Nano G, Rampoldi V, Spagnoli LG, Inglese L. Plasma levels of metalloproteinases-3 and -9 as markers of successful abdominal aortic aneurysm exclusion after endovascular graft treatment. *Circulation.* 2001; **104**: I288-I295.
- Satta J, Haukipuro K, Kairaluoma MI, Juvonen T. Aminoterminal propeptide of type III procollagen in the follow-up of patients with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 1997; **25**: 909-915.
- Satta J, Juvonen T, Haukipuro K, Juvonen M, Kairaluoma MI. Increased turnover of collagen in abdominal aortic aneurysms, demonstrated by measuring the concentration of the aminoterminal propeptide of type III procollagen in peripheral and aortal blood samples. *J Vasc Surg.* 1995; **22**: 155-160.
- Satta J, Mennander A, Soini Y. Increased medial TUNEL-positive staining associated with apoptotic bodies is linked to smooth muscle cell diminution during evolution of abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg.* 2002; **16**: 462-466.
- Schaefer L, Schaefer RM. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res.* 2010; **339**: 237-246.
- Schillinger M, Domanovits H, Ignatescu M, Exner M, Bayegan K, Sedivy R, Polterauer P, Laggner AN, Minar E, Kostner K. Lipoprotein (a) in patients with aortic aneurysmal disease. *J Vasc Surg.* 2002; **36**: 25-30.
- Schwartz JC, Senko MW, Syka JE. A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2002; **13**: 659-669.
- Schwarze ML, Shen Y, Hemmerich J, Dale W. Age-related trends in utilization and outcome of open and endovascular repair for abdominal aortic aneurysm in the United States, 2001-2006. *J Vasc Surg.* 2009; **50**: 722-729.
- Scott RA, Ashton HA, Kay DN. Abdominal aortic aneurysm in 4237 screened patients: prevalence, development and management over 6 years. *Br.J Surg.* 1991; **78**: 1122-1125.
- Senko MW, Canterbury JD, Guan S, Marshall AG. A high-performance modular data system for Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Commun.Mass Spectrom.* 1996; **10**: 1839-1844.
- Serino F, Abeni D, Galvagni E, Sardella SG, Scuro A, Ferrari M, Ciarafoni I, Silvestri L, Fusco A. Noninvasive diagnosis of incomplete endovascular aneurysm repair: D-dimer assay to detect type I endoleaks and nonshrinking aneurysms. *J Endovasc.Ther.* 2002; **9** : 90-97.
- Shantikumar S, Ajjan R, Porter KE, Scott DJ. Diabetes and the abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc.Surg.* 2010; **39**: 200-207.
- Shapiro SD, Kobayashi DK, Ley TJ. Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J Biol Chem.* 1993; **268**: 23824-23829.

- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*. 1996; **68**: 850-858.
- Shimizu K, Mitchell RN, Libby P. Inflammation and cellular immune responses in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; **26**: 987-994.
- Shiraya S, Miwa K, Aoki M, Miyake T, Oishi M, Kataoka K, Ohgi S, Ogihara T, Kaneda Y, Morishita R. Hypertension accelerated experimental abdominal aortic aneurysm through upregulation of nuclear factor kappaB and Ets. *Hypertension*. 2006; **48**: 628-636.
- Shiraya S, Miyake T, Aoki M, Yoshikazu F, Ohgi S, Nishimura M, Ogihara T, Morishita R. Inhibition of development of experimental aortic abdominal aneurysm in rat model by atorvastatin through inhibition of macrophage migration. *Atherosclerosis*. 2009; **202**: 34-40.
- Sho E, Sho M, Nanjo H, Kawamura K, Masuda H, Dalman RL. Comparison of cell-type-specific vs transmural aortic gene expression in experimental aneurysms. *J Vasc Surg*. 2005; **41**: 844-852.
- Silvertand LH, Torano JS, de Jong GJ, van Bennekom WP. Improved repeatability and matrix-assisted desorption/ionization - time of flight mass spectrometry compatibility in capillary isoelectric focusing. *Electrophoresis*. 2008; **29**: 1985-1996.
- Simoni G, Gianotti A, Ardia A, Baiardi A, Galleano R, Civalleri D. Screening study of abdominal aortic aneurysm in a general population: lipid parameters. *Cardiovasc Surg*. 1996; **4**: 445-448.
- Singh K, Bonna KH, Jacobsen BK, Bjork L, Solberg S. Prevalence of and risk factors for abdominal aortic aneurysms in a population-based study : The Tromso Study. *Am J Epidemiol*. 2001; **154**: 236-244.
- Sinha I, Sinha-Hikim AP, Hannawa KK, Henke PK, Eagleton MJ, Stanley JC, Upchurch GR, Jr. Mitochondrial-dependent apoptosis in experimental rodent abdominal aortic aneurysms. *Surgery*. 2005; **138**: 806-811.
- Skagius E, Siegbahn A, Bergqvist D, Henriksson AE. Fibrinolysis in patients with an abdominal aortic aneurysm with special emphasis on rupture and shock. *J Thromb Haemost*. 2008; **6**: 147-150.
- Skalli O, Pelte MF, Pecllet MC, Gabbiani G, Gugliotta P, Bussolati G, Ravazzola M, Orci L. Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *J Histochem.Cytochem*. 1989; **37**: 315-321.
- Slonecker PJ, Li X, Ridgway TH, Dorsey JG. Informational orthogonality of two-dimensional chromatographic separations. *Anal Chem*. 1996; **68**: 682-689.
- Sofi F, Marcucci R, Giusti B, Pratesi G, Lari B, Sestini I, Lo SP, Pulli R, Pratesi C, Abbate R, Gensini GF. High levels of homocysteine, lipoprotein (a) and plasminogen activator inhibitor-1 are present in patients with abdominal aortic aneurysm. *Thromb Haemost*. 2005; **94**: 1094-1098.
- Southwick PL, Ernst LA, Tauriello EW, Parker SR, Mujumdar RB, Mujumdar SR, Clever HA, Waggoner AS. Cyanine dye labeling reagents--carboxymethylindocyanine succinimidyl esters. *Cytometry*. 1990; **11**: 418-430.
- Spring S, van der LB, Krieger E, Amann-Vesti BR, Rousson V, Koppensteiner R. Decreased wall shear stress in the common carotid artery of patients with peripheral arterial disease or abdominal aortic aneurysm: relation to blood rheology, vascular risk factors, and intima-media thickness. *J Vasc Surg*. 2006; **43**: 56-63.
- Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebersold R, Schinke T, Karsenty G, Giachelli CM. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ.Res*. 2001; **89**: 1147-1154.

Bibliographie

Sukhija R, Aronow WS, Sandhu R, Kakar P, Babu S. Mortality and size of abdominal aortic aneurysm at long-term follow-up of patients not treated surgically and treated with and without statins. *Am J Cardiol.* 2006; **97**: 279-280.

Sun J, Sukhova GK, Yang M, Wolters PJ, MacFarlane LA, Libby P, Sun C, Zhang Y, Liu J, Ennis TL, Knispel R, Xiong W, Thompson RW, Baxter BT, Shi GP. Mast cells modulate the pathogenesis of elastase-induced abdominal aortic aneurysms in mice. *J Clin Invest.* 2007; **117**: 3359-3368.

Swedenborg J, Mayranpaa MI, Kovanen PT. Mast cells: important players in the orchestrated pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; **31**: 734-740.

T

Tanaskovic I, Mladenovic-Mihailovic A, Usaj-Knezevic S, Stankovic V, Aleksic A, Kastratovic T, Aleksic A, Lazic Z, Mladenovic-Bogdanovic Z, Zivanovic A, Djuric J, Jovicic U, Sorak M. [Histochemical and immunohistochemical analysis of ruptured atherosclerotic abdominal aortic aneurysm wall]. *Vojnosanit.Pregl.* 2010; **67**: 959-964.

Tannu NS, Hemby SE. Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis for comparative proteomics profiling. *Nat Protoc.* 2006; **1**: 1732-1742.

Tazume H, Miyata K, Tian Z, Endo M, Horiguchi H, Takahashi O, Horio E, Tsukano H, Kadomatsu T, Nakashima Y, Kunitomo R, Kaneko Y, Moriyama S, Sakaguchi H, Okamoto K, Hara M, Yoshinaga T, Yoshimura K, Aoki H, Araki K, Hao H, Kawasuji M, Oike Y. Macrophage-derived angiopoietin-like protein 2 accelerates development of abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; **32**: 1400-1409.

Thompson MM, Jones L, Nasim A, Sayers RD, Bell PR. Angiogenesis in abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc.Surg.* 1996; **11**: 464-469.

Thompson RW, Geraghty PJ, Lee JK. Abdominal aortic aneurysms: basic mechanisms and clinical implications. *Curr Probl.Surg.* 2002; **39**: 110-230.

Thompson RW, Holmes DR, Mertens RA, Liao S, Botney MD, Mecham RP, Welgus HG, Parks WC. Production and localization of 92-kilodalton gelatinase in abdominal aortic aneurysms. An elastolytic metalloproteinase expressed by aneurysm-infiltrating macrophages. *J Clin Invest.* 1995; **96**: 318-326.

Thompson SG, Ashton HA, Gao L, Scott RA. Screening men for abdominal aortic aneurysm: 10 year mortality and cost effectiveness results from the randomised Multicentre Aneurysm Screening Study. *BMJ.* 2009; **338**: b2307. doi: 10.1136/bmj.

Tijsen AJ, Creemers EE, Moerland PD, de Windt LJ, van der Wal AC, Kok WE, Pinto YM. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ.Res.* 2010; **106**: 1035-1039.

Tonge R, Shaw J, Middleton B, Rowlinson R, Rayner S, Young J, Pognan F, Hawkins E, Currie I, Davison M. Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics.* 2001; **1**: 377-396.

Tornwall ME, Virtamo J, Haukka JK, Albanes D, Huttunen JK. Life-style factors and risk for abdominal aortic aneurysm in a cohort of Finnish male smokers. *Epidemiology.* 2001; **12**: 94-100.

Treska V, Topolcan O. Plasma and tissue levels of collagen types I and III markers in patients with abdominal aortic aneurysms. *Int Angiol.* 2000a; **19**: 64-68.

Treska V, Topolcan O, Pecan L. Cytokines as plasma markers of abdominal aortic aneurysm. *Clin Chem Lab Med.* 2000b; **38**: 1161-1164.

Trollope A, Moxon JV, Moran CS, Golledge J. Animal models of abdominal aortic aneurysm and their role in furthering management of human disease. *Cardiovasc Pathol.* 2011; **20**: 114-123.

Tsuruda T, Kato J, Hatakeyama K, Kojima K, Yano M, Yano Y, Nakamura K, Nakamura-Uchiyama F, Matsushima Y, Imamura T, Onitsuka T, Asada Y, Nawa Y, Eto T, Kitamura K. Adventitial mast cells contribute to pathogenesis in the progression of abdominal aortic aneurysm. *Circ.Res.* 2008; **102**: 1368-1377.

Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, Zhang Q, Weissberg PL, Shanahan CM. Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; **23**: 489-494.

U

Unlu M, Morgan ME, Minden JS. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis.* 1997; **18**: 2071-2077.

Upchurch GR, Jr., Schaub TA. Abdominal aortic aneurysm. *Am Fam.Physician.* 2006; **73**: 1198-1204.

V

Vammen S, Lindholt JS, Ostergaard L, Fasting H, Henneberg EW. Randomized double-blind controlled trial of roxithromycin for prevention of abdominal aortic aneurysm expansion. *Br.J Surg.* 2001; **88**: 1066-1072.

van Laake LW, Vainas T, Dammers R, Kitslaar PJ, Hoeks AP, Schurink GW. Systemic dilation diathesis in patients with abdominal aortic aneurysms: a role for matrix metalloproteinase-9? *Eur J Vasc Endovasc.Surg.* 2005; **29**: 371-377.

Vardulaki KA, Walker NM, Day NE, Duffy SW, Ashton HA, Scott RA. Quantifying the risks of hypertension, age, sex and smoking in patients with abdominal aortic aneurysm. *Br.J Surg.* 2000; **87**: 195-200.

Vasan RS. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation.* 2006; **113**: 2335-2362.

Vega dC, Esteban M, Quintana JM, Barba A, Estallo L, de la FN, Vivien B, Martin-Ventura JL. Search for serum biomarkers associated with abdominal aortic aneurysm growth--a pilot study. *Eur J Vasc Endovasc.Surg.* 2009; **37**: 297-299.

Velicer CM, Heckbert SR, Lampe JW, Potter JD, Robertson CA, Taplin SH. Antibiotic use in relation to the risk of breast cancer. *JAMA.* 2004; **291**: 827-835.

W

Wabnitz GH, Kocher T, Lohneis P, Stober C, Konstandin MH, Funk B, Sester U, Wilm M, Klemke M, Samstag Y. Costimulation induced phosphorylation of L-plastin facilitates surface transport of the T cell activation molecules CD69 and CD25. *Eur J Immunol.* 2007; **37**: 649-662.

Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, Li Y, He J, Qin YW, Jing Q. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J.* 2010; **31**: 659-666.

Wang XL, Fu A, Spiro C, Lee HC. Clinical application of proteomics approaches in vascular diseases. *Proteomics Clin Appl.* 2008; **2**: 238-250.

Wanhainen A, Bergqvist D, Boman K, Nilsson TK, Rutegard J, Bjorck M. Risk factors associated with abdominal aortic aneurysm: a population-based study with historical and current data. *J Vasc Surg.* 2005; **41**: 390-396.

Wanhainen A, Bjorck M, Boman K, Rutegard J, Bergqvist D. Influence of diagnostic criteria on the prevalence of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg.* 2001; **34**: 229-235.

Wanhainen A, Nilsson TK, Bergqvist D, Boman K, Bjorck M. Elevated tissue plasminogen activator in patients with screening-detected abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg.* 2007; **45**: 1109-1113.

Bibliographie

Ward MR, Jeremias A, Huegel H, Fitzgerald PJ, Yeung AC. Accentuated remodeling on the upstream side of atherosclerotic lesions. *Am J Cardiol.* 2000; **85**: 523-526.

Wassef M, Baxter BT, Chisholm RL, Dalman RL, Fillinger MF, Heinecke J, Humphrey JD, Kuivaniemi H, Parks WC, Pearce WH, Platsoucas CD, Sukhova GK, Thompson RW, Tilson MD, Zarins CK. Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms: a multidisciplinary research program supported by the National Heart, Lung, and Blood Institute. *J Vasc Surg.* 2001; **34**: 730-738.

Watanabe T, Sato A, Sawai T, Uzuki M, Goto H, Yamashita H, Akamatsu D, Sato H, Shimizu T, Miyama N, Nakano Y, Satomi S. The elevated level of circulating matrix metalloproteinase-9 in patients with abdominal aortic aneurysms decreased to levels equal to those of healthy controls after an aortic repair. *Ann Vasc Surg.* 2006; **20**: 317-321.

Wick G, Romen M, Amberger A, Metzler B, Mayr M, Falkensammer G, Xu Q. Atherosclerosis, autoimmunity, and vascular-associated lymphoid tissue. *FASEB J.* 1997; **11**: 1199-1207.

Wilmink AB, Vardulaki KA, Hubbard CS, Day NE, Ashton HA, Scott AP, Quick CR. Are antihypertensive drugs associated with abdominal aortic aneurysms? *J Vasc Surg.* 2002; **36**: 751-757.

Wilmink TB, Quick CR, Day NE. The association between cigarette smoking and abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 1999; **30**: 1099-1105.

Wilson CM. Staining of proteins on gels: comparisons of dyes and procedures. *Methods Enzymol.* 1983; **91**: 236-47.

X

Xiong W, Knispel R, Mactaggart J, Baxter BT. Effects of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 deficiency on aneurysm formation. *J Vasc Surg.* 2006; **44**: 1061-1066.

Xiong W, Mactaggart J, Knispel R, Worth J, Zhu Z, Li Y, Sun Y, Baxter BT, Johanning J. Inhibition of reactive oxygen species attenuates aneurysm formation in a murine model. *Atherosclerosis.* 2009; **202**: 128-134.

Y

Yamazumi K, Ojiro M, Okumura H, Aikou T. An activated state of blood coagulation and fibrinolysis in patients with abdominal aortic aneurysm. *Am J Surg.* 1998; **175**: 297-301.

Yang H, Curinga G, Giachelli CM. Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro. *Kidney Int.* 2004; **66**: 2293-2299.

Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu.Rev Biomed.Eng.* 2009; **11**: 49-79.

Z

Zachariou M. Affinity chromatography: methods and protocols. Preface. *Methods Mol Biol.* 2008; **421**: vii-viii.

Zakharyan RA, Sampayo-Reyes A, Healy SM, Tsaprailis G, Board PG, Liebler DC, Aposhian HV. Human monomethylarsonic acid (MMA(V)) reductase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily. *Chem Res Toxicol.* 2001; **14**: 1051-1057.

Zhang J, Sun J, Lindholt JS, Sukhova GK, Sinnamon M, Stevens RL, Adachi R, Libby P, Thompson RW, Shi GP. Mast cell tryptase deficiency attenuates mouse abdominal aortic aneurysm formation. *Circ.Res.* 2011; **108**: 1316-1327.

Zheng J, Li N, Ridyard M, Dai H, Robbins SM, Li L. Simple and robust two-layer matrix/sample preparation method for MALDI MS/MS analysis of peptides. *J Proteome Res.* 2005; **4**: 1709-1716.

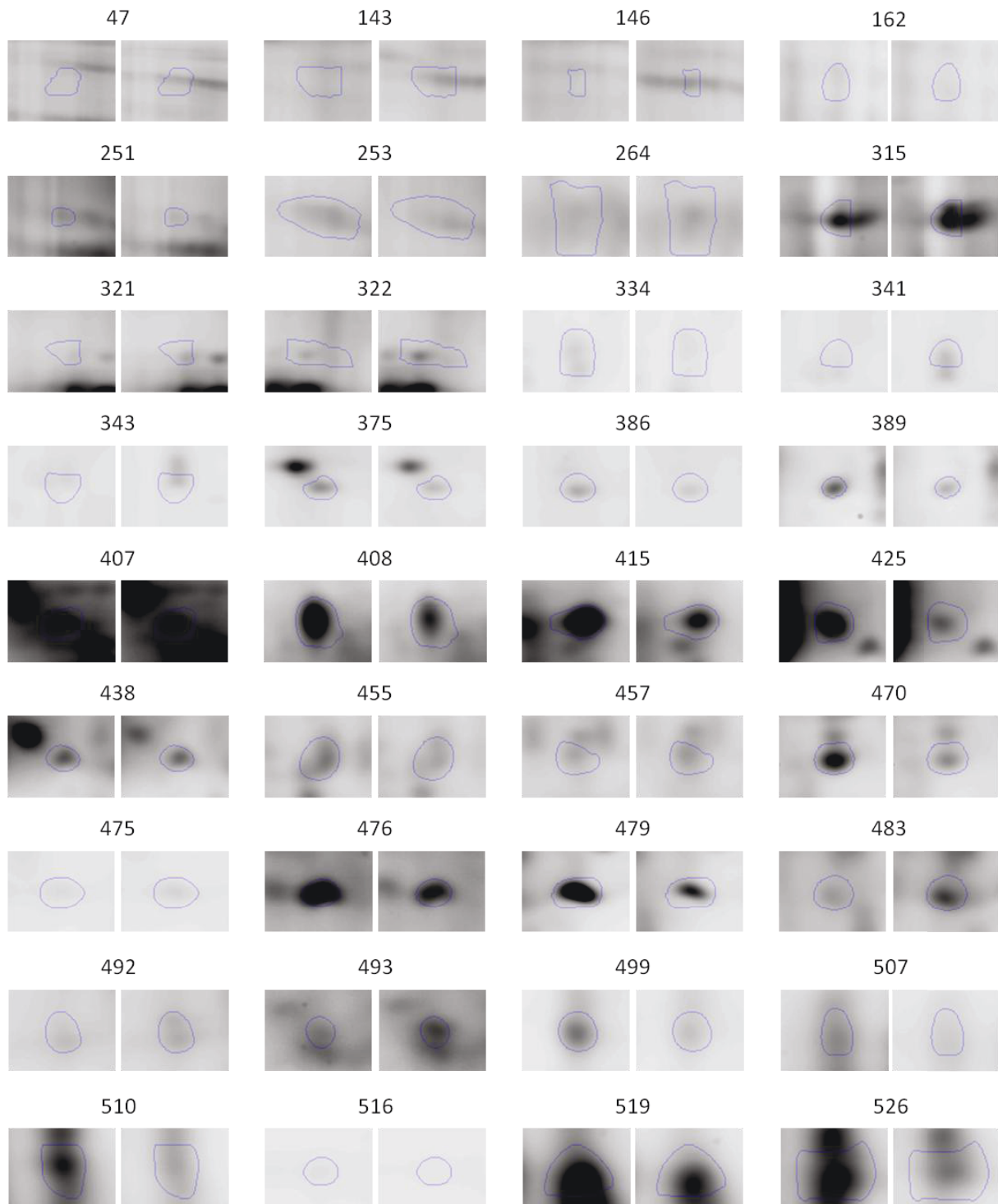
Zimmerli LU, Schiffer E, Zurbig P, Good DM, Kellmann M, Mouis L, Pitt AR, Coon JJ, Schmieder RE, Peter KH, Mischak H, Kolch W, Delles C, Dominiczak AF. Urinary proteomic biomarkers in coronary artery disease. *Mol Cell Proteomics.* 2008; **7**: 290-298.

Zubarev R. A, Kelleher N. L, Lafferty F. W. Electron capture dissociation of multiply charged protein cations. A nonergodic process. *J.Am.Chem.Soc.* 1998; **120**: 3265-3266.

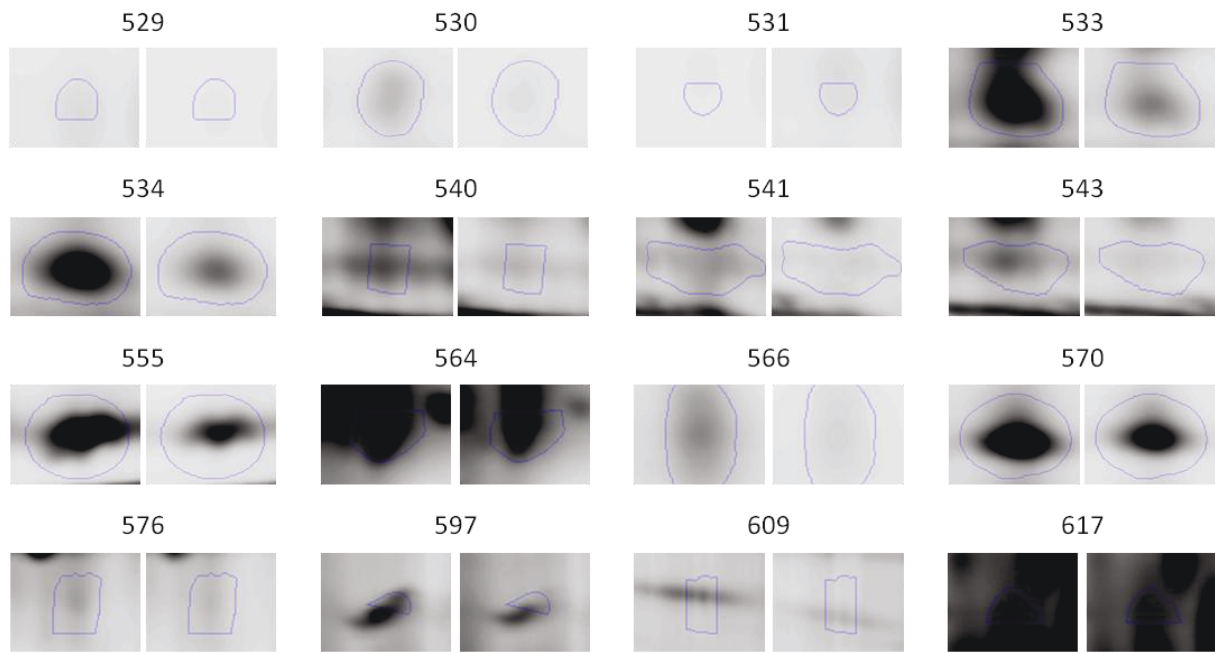
ANNEXES

1. Annexe 1 : Images des spots différentiellement exprimés entre les macrophages M1 et M2

Cette section présente les images des 52 spots différentiellement exprimés entre les macrophages de type M1 (à gauche) et M2 (à droite).



Annexes



2. Annexe 2 : Identification de protéines additionnelles en protéomique différentielle grâce à un réseau d'interactions des protéines

Cette section comporte les travaux soumis à publication des résultats obtenus lors d'une analyse différentielle par 2D-DIGE suivie d'une analyse bioinformatique des cellules musculaires lisses traitées ou non par la DNase I. Ces travaux soulignent l'effet de la DNase I sur la modification du protéome de cellules en culture et décrivent une approche bioinformatique basée sur la compilation des données de la littérature pour identifier les protéines interagissant avec les protéines différentiellement exprimées trouvées en DIGE.