

**MEMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu publiquement le 6 juin 2012
Par **Mme Charlotte ROMA, née LAVISSE**

Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990
tient lieu de

THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**PROFIL D'EXPRESSION DES MACROPHAGES M1 ET M2 DANS
L'ATHEROSCLEROSE HUMAINE ET MODULATION PAR LES
FACTEURS DE RISQUE CARDIOVASCULAIRE**

Membres du jury :

Président :

Monsieur le Professeur Patrick DUTHILLEUL
Professeur en Hématologie, Faculté de Pharmacie Lille
Chef de Pôle Biologie-Hygiène, CH Valenciennes

Assesseurs :

Madame le Professeur Brigitte JUDE
Professeur en Hématologie, Faculté de Médecine Lille
Chef de Pôle de Biologie, Centre de Biologie Pathologie, CHRU Lille
Directeur de l'équipe EA 2693

Madame le Professeur Anne MUHR-TAILLEUX
Professeur en Biochimie, Faculté de Pharmacie Lille
INSERM U1011

Directeur de Thèse :

Madame le Docteur Annabelle DUPONT
Maître de Conférences en Hématologie, Faculté de Médecine Lille
Laboratoire d'Hématologie, CH Valenciennes



Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



Université Lille 2
Droit et Santé

Université Lille 2 – Droit et Santé

Président :	Professeur Christian SERGHERAERT
Vice- présidents :	Madame Stéphanie DAMAREY Professeur Marie-Hélène FOSSE-GOMEZ Professeur Régis MATRAN Professeur Salem KACET Professeur Paul FRIMAT Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE Professeur Patrick PELAYO Madame Claire DAVAL Madame Irène LAUTIER Monsieur Larbi AIT-HENNANI Monsieur Rémy PAMART
Secrétaire général :	Monsieur Pierre-Marie ROBERT

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen :	Professeur Luc DUBREUIL
Vice-Doyen, 1 ^{er} assesseur :	Professeur Damien CUNY
Assesseurs :	Mme Nadine ROGER Professeur Philippe CHAVATTE
Chef des services administratifs :	Monsieur André GENY

Liste des Professeurs des Universités :

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BAILLEUL	François	Pharmacognosie
M.	BERTHELOT	Pascal	Chimie Thérapeutique 1
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Chimie Thérapeutique
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mlle	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie Générale
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie Générale
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mlle	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GESQUIERE	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques

Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie Générale
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY – MAILLOLS	Anne Catherine	Droit et déontologie pharmaceutique
Mlle	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique
M.	VION	Daniel	Droit et déontologie pharmaceutique

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M	BRUNET	Claude	Pharmacologie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
M.	DUBREUIL	Luc	Bactériologie et Virologie Cliniques
M.	DUTHILLEUL	Patrick	Hématologie
M.	GAMOT	André	Chimie Analytique
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LHERMITTE	Michel	Toxicologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	Chimie Organique (ICPAL)
M.	BONTE	Jean-Paul	Chimie Analytique et (ICPAL)

Liste des Maitres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie Générale
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
M.	BEGHYN	Terence	Chimie Thérapeutique 3
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BOUTILLON	Christophe	Chimie Organique
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARATO	Pascal	Chimie Thérapeutique 2
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mlle	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mlle	CHARTON	Julie	Chimie Organique
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie

M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mlle	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie
Mlle	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Melle	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	FARCE	Amaury	Chimie Thérapeutique 2
Mlle	FLAMENT	Marie-Pierre	Pharmacotechnie Industrielle
Mlle	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
Melle	GARAT	Anne	Toxicologie
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOFFARD	Anne	Virologie
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mlle	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique 1
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	LORIN-LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
Melle	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Pharmacie Galénique
Mme	POMMERY	Nicole	Toxicologie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Melle	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mlle	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
Mme	THUILLIER	Pascale	Hématologie
Mme	VANHOUTTE	Geneviève	Biochimie
Mme	VITSE	Annie	Parasitologie
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique
M.	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1
<hr/>			
M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)
M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)

Liste des Maitres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Clinique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et déontologie pharmaceutique

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeurs Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ABADIE	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique - Biomathématiques
M.	CREN	Yves	Information Médicale - Biomathématiques
M.	FIEVET	Pierre	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	WATRELOS	Michel	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques - Pharmacie virtuelle

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique



Université Lille Nord de France
Pôle de Recherche
et d'Enseignement Supérieur



Université Lille 2
Droit et Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

A mon Président de thèse,

Monsieur le Professeur Patrick DUTHILLEUL

Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie de Lille

Praticien Hospitalier, Unité d'hématologie-immunologie-cytogénétique

Chef de service et Chef de Pôle des laboratoires de biologie du Centre Hospitalier de Valenciennes

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Je tiens à vous exprimer mes remerciements pour votre enseignement de grande qualité et pour m'avoir fait tant aimer votre discipline qu'est l'Hématologie.

Je suis très heureuse de pouvoir prochainement travailler avec vous et je tiens à vous remercier pour la confiance que vous m'avez accordée en m'accueillant au sein de votre équipe.

Veillez trouver ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A mes juges,

Madame le Professeur Brigitte JUDE,

Professeur des Universités, Faculté de Médecine de Lille

Praticien Hospitalier, Laboratoire d'hémostase et Centre des maladies hémorragiques
et thrombotiques, CHRU de Lille

Chef de Pôle de Biologie pathologie génétique, CHRU de Lille

Directeur de l'équipe de recherche EA 2693 « interface sang vaisseaux et réparation
cardiovasculaire »

*Je tiens à vous remercier de m'avoir accueillie au sein de votre équipe d'accueil
EA2693 me permettant ainsi de découvrir le monde de la recherche lors de mon
Master 2 Recherche.*

*Merci de l'intérêt que vous avez porté à mon travail, que vous acceptez
maintenant de juger.*

Veillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de ma reconnaissance.

Madame le Professeur Anne Muhr-Tailleux,

Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie de Lille
Enseignant-Chercheur, Unité 1011, « Récepteurs nucléaires, maladies
cardiovasculaires et diabète », Institut Pasteur de Lille

Vous avez accepté avec gentillesse de juger ce travail.

Je suis sensible à l'attention que vous portez à ce travail.

Veillez trouver ici l'expression de ma sincère considération et de mes plus vifs remerciements.

A ma directrice de thèse,

Madame le Docteur Annabelle DUPONT,

Maître de Conférences des Universités, Faculté de Médecine de Lille, EA 2693
Praticien Hospitalier, Unité d'hématologie, Centre hospitalier de Valenciennes

Je vous remercie de la confiance que vous m'avez accordée en me confiant ce travail.

Vous m'avez fait profiter de vos nombreuses connaissances scientifiques et médicales. Votre professionnalisme, votre rigueur et vos conseils avisés m'ont permis d'apprendre beaucoup à vos côtés.

Merci de m'avoir accompagnée tout au long de ce travail et de m'avoir aidée à mener sereinement cette thèse.

J'ai été très heureuse de travailler avec vous et je tenais à vous remercier sincèrement pour votre encadrement, votre gentillesse et votre disponibilité.

J'espère que ce travail sera le début d'une grande collaboration professionnelle.

Veillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance la plus sincère et ma plus chaleureuse estime pour vous.

Aux personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail

Au Docteur Christophe Zawadzki,

Merci pour ta grande disponibilité au cours de mon M2R et pour tes précieux conseils en biologie moléculaire.

A Madjid Tagzirt,

Pour ton aide précieuse et ton partage de connaissances méthodologiques.

A Bertrand Vaast,

Pour tes précieux conseils et ton aide technique pour la réalisation des analyses de biologie moléculaire. Merci pour ta bonne humeur et ta sympathie.

Aux techniciennes de culture cellulaire, Véronique et Marie Pascale,

Qui m'ont fait profiter de leur expérience et pour leurs excellents conseils techniques. C'est toujours un plaisir de travailler avec vous.

Je vous remercie pour votre grande disponibilité et votre gentillesse.

A l'ensemble des membres de l'équipe de recherche EA 2693,

Pour leur accueil, leur sympathie et leur bonne humeur quotidienne.

Un merci tout particulier à Delphine Corseaux, pour ses excellents conseils scientifiques au cours des réunions de travail et sa grande disponibilité.

Ahmed, merci à toi, pour les corrections de résumés en anglais. Je risque de te solliciter prochainement pour l'article...

Aux chirurgiens cardiaques et vasculaires,

Merci au Pr André Vincentelli, au Dr Carlo Banfi ainsi qu'au Pr Stéphan Haulon et au Dr Richard Azzaoui pour leur temps accordé au recrutement des patients dans le protocole OPAL2.

Je tiens également à remercier les internes des services de chirurgie pour leur collaboration active dans les inclusions des patients et le renseignement des cahiers d'observation.

Aux Professeur Bart Staels et Docteur Giulia Chinetti,

Pour leur collaboration dans ce protocole clinico-biologique, et notamment à Giulia pour ses conseils dans la culture et différenciation des macrophages.

Au Professeur Claude Preudhomme,

Merci de m'avoir permis d'utiliser la plateforme de Biologie moléculaire du laboratoire.

Aux Docteurs Bernadette Hennache, Brigitte Onraed et Patrice Maboudou,
*Pour m'avoir permis d'effectuer les dosages immunométriques et chromatographiques
dans leur laboratoire du Pôle de Biochimie spécialisée.*

Aux enseignants, pharmaciens, biologistes et leurs équipes,
*Qui m'ont accompagnée, encadrée, et fait partager leur expérience professionnelle tout
au long de mon parcours.*
J'ai reçu une formation de qualité et je leur en suis très reconnaissante.

A ma famille et mes amis,

A mes parents,

Je profite de ces quelques lignes pour vous remercier de tout ce que vous avez fait pour moi, pour m'avoir donné les moyens de réussir.

Vous avez toujours eu confiance en moi et m'avez encouragée pendant ces longues années d'études. Votre amour et votre soutien m'ont permis d'avancer et de franchir à chaque fois de nouvelles étapes.

Si aujourd'hui, mon parcours est une réussite, c'est bien grâce à vous et je vous en serai éternellement reconnaissante.

A Alexandre, mon mari,

Pour ton amour et pour tous ces bons moments de joie et de surprise que tu me fais partager.

Merci d'être à mes côtés et de me soutenir dans mes choix.

Merci pour ta grande patience au cours de ces derniers mois.

A ma sœur Anne-Laure et mon beau frère Olivier,

Merci pour tous les moments de bonheur que nous partageons ensemble.

Je vous remercie sincèrement d'être toujours là pour moi.

A mes beaux-parents,

Merci de m'avoir accueillie parmi vous aussi chaleureusement.

A tous mes amies et amis

Merci pour tous les moments inoubliables partagés ensemble pendant nos années pharma, et ceux à venir...

A tous mes co-internes,

Avec qui j'ai passé des années d'internat formidables.

A Anne-France et Alice, pour nos années de fac et d'internat, passées ensemble.

A Pascaline pour ta grande gentillesse que j'ai pu apprécier lors de ton interCHU à Lille.

A Manue pour ta bonne humeur. Les 2 mois passés avec toi en cytométrie ont été super !

Une pensée pour notre « Dr Boyau », à qui je souhaite un prompt rétablissement.

Reviens nous vite !

A tous ceux,

Qui seront présents à la soutenance de ma thèse pour ce grand événement.

Un grand merci à tous...

ABBREVIATIONS

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

AFSSAPS : Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé

AGE : Advanced glycation end-product

Ag II : angiotensine II

AHA : American Heart Association

ALD : affection longue durée

AMAC-1 : alternative activated macrophage associated CC-Chemokine

AMI : artère mammaire interne

AOMI : artériopathie oblitérante des membres inférieurs

ARNm : Acide ribonucléique messager

AVC : accident vasculaire cérébral

CBP : Centre de Biologie Pathologie

CCPPRB : Comités consultatifs de protection des personnes dans la recherche biomédicale

CD : cluster de différenciation

CFU-GEMM : Colony forming unit-granulocyte/erythrocyte/ monocyte-macrophage/ megakaryocyte

CFU-GM : Colony forming unit-granulocyte/monocyte

CFU-M : Colony forming unit-monocyte/macrophage

CHRU : Centre Hospitalier Régional et Universitaire

CLHP : Chromatographie liquide haute performance

CMLV : cellule musculaire lisse vasculaire

CPP : comité de protection des personnes

CRP : protéine C réactive

CRPus : CRP ultrasensible

CSP : Code de la santé publique

Ct : Critical threshold

CV : cardiovasculaire

Cx : artère circonflexe

dNTP: désoxyribonucléotides

ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay

FT : facteur tissulaire

G-CSF : Granulocyte Colony Stimulating Factor

GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

HAS: Haute Autorité de Santé

HbA1c : hémoglobine A1 glyquée

HDL : high density lipoprotein

HLA: human leucocyte antigen

HLE: human leukocyte elastase

HTA : hypertension artérielle

ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule 1

IDM : Infarctus du myocarde

IEC : inhibiteur de l'enzyme de conversion

IFN- γ : interféron-gamma

IL : interleukine

IL-1RA: antagoniste du récepteur à l'IL-1 β

IMC : indice de masse corporelle

IRM : imagerie par résonance magnétique

IVA : artère intraventriculaire antérieure

LDL : low density lipoprotein

LDL-C : LDL cholestérol

LDLox : LDL oxydées

LPS : lipopolysaccharide

MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1

M-CSF : Monocyte Colony Stimulating Factor

MDM: macrophages dérivés des monocytes

MEC : matrice extracellulaire

MGG : May-Grünwald-Giemsa

MMP : matrix metalloprotease

MONICA : Multinational MONItoring of trends and determinants in CARdiovascular disease

MR : mannose receptor

MRC1 : mannose receptor C type 1

NCEP-ATP III : National Cholesterol Education Program-Adult treatment panel

NO : monoxyde d'azote

ObR : récepteur de la leptine

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OPAL-2 : OPTimized management of Atherosclerosis in various Localizations-2

OSP : ostéopontine

PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor-1

PBMC: Peripheral blood mononuclear cell

PBS : tampon phosphate salin

PCR: Réaction en chaîne de la polymérase

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PF4 : Platelet Factor 4

PGI₂ : prostacycline

PNN : polynucléaire neutrophile

PPAR α : peroxisome proliferator-activated receptor alpha

ROS : espèces réactives de l'oxygène

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium

RT: rétrotranscription

SA : sténose aortique

SMet : syndrome métabolique

TC : tronc commun

TFPI: Tissue Factor Pathway Inhibitor

TFPI-2: Tissue Factor Pathway Inhibitor 2

TG : triglycéride

TGF- β : Transforming Growth Factor beta

TIMP : Tissue inhibitor of metalloproteinases

TLR: Toll like receptor

TMB : tétraméthylbenzidine

TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha

t-PA : tissue Plasminogen Activator

u-PA : urokinase

VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule 1

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VLDL: very low density lipoprotein

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	3
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE	6
I. L'ATHEROSCLEROSE	7
I.1. Généralités	7
I.1.1. Définition	7
I.1.2. Epidémiologie	7
I.1.3. Traduction clinique de la maladie athéroscléreuse.....	9
I.1.4. Siège préférentiel des lésions	10
I.2. Structure de la paroi artérielle normale	11
I.3. Caractéristiques anatomo-pathologiques et classification histologique des lésions athéroscléreuses	12
I.4. L'athérogenèse	15
I.4.1. Principales théories physiopathologiques.....	15
I.4.2. Initiation	15
I.4.3. Progression	17
I.4.4. Vulnérabilité de la plaque	18
I.5. Techniques chirurgicales de revascularisation et prévention thérapeutique	20
I.5.1. Le pontage aorto-coronarien	20
I.5.2. L'angioplastie coronaire.....	21
I.5.3. L'endartériectomie carotidienne.....	21
I.5.4. Prévention : stabilisation de la plaque	22
II. LE MONOCYTE/MACROPHAGE : CELLULE CLE DE L'ATHEROSCLEROSE.....	23
II.1. Origine cellulaire.....	23
II.2. Fonctions physiologiques	24
II.3. Rôle du macrophage au sein de la plaque athéroscléreuse	25
II.3.1. Récepteurs membranaires	25
II.3.2. Substances sécrétées	25
II.4. Hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des macrophages	27
III. FACTEURS DE RISQUE CARDIOVASCULAIRE	30
III.1. Définition.....	30
III.2. Principaux facteurs de risque cardiovasculaire	30
III.2.1. Le sexe et l'âge	31
III.2.2. Les antécédents familiaux et personnels.....	31
III.2.3. Le diabète.....	31
III.2.4. Les dyslipidémies	32
III.2.5. L'hypertension artérielle	33
III.2.6. Le tabagisme	33
III.2.7. L'obésité viscérale	33
III.2.8. La sédentarité et le manque d'exercice physique.....	34
III.2.9. Autres	34
III.3. Prévention des facteurs de risque cardiovasculaire.....	35
IV. LA RECHERCHE BIOMEDICALE EN FRANCE	36
IV.1. Cadre légal et réglementaire.....	36
IV.2. Acteurs principaux de la recherche biomédicale	38
IV.3. Constitution du dossier de protocole de recherche clinique	39
CHAPITRE II : OBJECTIFS	40
CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES	42
I. PROTOCOLE OPAL-2.....	43
II. COHORTE DE PATIENTS	45
III. ECHANTILLONS	45
IV. METHODE	46

IV.1. Isolement des monocytes sanguins.....	46
IV.2. Différenciation <i>in vitro</i> des monocytes sanguins en macrophages.....	47
IV.3. Mesure de l'expression des gènes par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative de type TaqMan®.....	48
IV.3.1. Extraction des ARN totaux.....	48
IV.3.2. Transcription inverse des ARN totaux en ADNc.....	48
IV.3.3. PCR TaqMan® quantitative.....	49
IV.4. Dosages ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) dans les surnageants de macrophages.....	51
IV.5. Dosages biologiques des marqueurs circulants.....	53
IV.5.1. Exploration glycémique (glycémie, HbA1c et insulémie).....	53
IV.5.2. Bilan inflammatoire (CRPus et IL-6).....	53
IV.5.3. Exploration lipidique.....	54
IV.5.4. Marqueurs du syndrome métabolique.....	54
IV.6. Constitution d'une base de données clinico-biologiques des patients.....	54
IV.7. Exploitation statistique des données.....	55
CHAPITRE IV : RESULTATS.....	56
I. DESCRIPTION DE POPULATION.....	57
I.1. Données démographiques.....	57
I.2. Données cliniques.....	57
I.3. Principaux facteurs de risque cardiovasculaire.....	60
I.4. Données biologiques et traitements au moment de l'inclusion.....	60
II. VALIDATION DES ISOLEMENTS ET CULTURES CELLULAIRES.....	63
II.1. Isolement des PBMC.....	63
II.2. Validation de la culture des macrophages dérivés des monocytes (MDM).....	63
III. PROFIL D'EXPRESSION DES MACROPHAGES M1/M2.....	65
III.1. MDM de patients athéroscléreux.....	65
III.2. MDM de sujets sains.....	66
III.3. Profil de sécrétion des macrophages M1 et M2.....	67
IV. INFLUENCE DES PRINCIPAUX FACTEURS DE RISQUE CARDIOVASCULAIRE SUR L'EXPRESSION DES MEDIATEURS DE L'ATHEROSCLEROSE DANS LES M1/M2.....	69
IV.1. Diabète.....	69
IV.2. HTA et tabagisme.....	70
IV.3. Dyslipidémie.....	70
IV.4. Syndrome métabolique.....	71
IV.5. Sexe.....	73
IV.6. Age.....	73
IV.7. Marqueurs biologiques de l'inflammation.....	73
IV.8. Sévérité de la maladie coronarienne et/ou carotidienne.....	74
CHAPITRE V : DISCUSSION.....	75
CHAPITRE VI : CONCLUSION & PERSPECTIVES.....	89
BIBLIOGRAPHIE.....	94
INDEX FIGURES ET TABLEAUX.....	101
ANNEXES.....	105

INTRODUCTION GENERALE

Les maladies cardiovasculaires (CV), conséquences le plus souvent de l'athérosclérose, constituent aujourd'hui la première cause de mortalité dans le monde. L'athérosclérose se caractérise par une accumulation locale de lipides et par un processus inflammatoire chronique de la paroi artérielle engendrant des remaniements de celle-ci à l'origine de la plaque athéroscléreuse. L'athérosclérose peut conduire à des lésions obstruant la lumière des vaisseaux soit directement soit via des complications thrombotiques à l'origine d'accidents vasculaires aigus graves.

De nombreuses théories ont été mises en avant pour expliquer la pathogenèse de l'athérosclérose. L'hypothèse inflammatoire semble de plus en plus recevable; en effet de nombreuses études ont montré le rôle majeur de l'inflammation dans les différents stades de la maladie. Parmi les divers types cellulaires orchestrant ce processus inflammatoire, sont décrits les macrophages, dérivés des monocytes sanguins, recrutés et infiltrés au sein de la plaque d'athérosclérose.

Les macrophages jouent un rôle central dans le développement de la plaque d'athérosclérose et son devenir, notamment par leur capacité à produire et à sécréter de nombreuses substances impliquées dans ce processus. Cette population macrophagique se caractérise par une hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle distincte en réponse au microenvironnement tissulaire. Deux sous-populations macrophagiques majeures ont été identifiées dans les lésions athéroscléreuses: les macrophages M1 « classiques » proinflammatoires et les macrophages M2 « alternatifs » anti-inflammatoires impliqués dans le remodelage et la réparation du tissu endommagé. Bien que de nombreuses études aient permis une meilleure caractérisation de ces 2 sous-populations, leur rôle exact dans l'apparition et le développement des lésions athéroscléreuses est encore mal défini.

L'objectif de ce travail consiste, dans une première partie, à mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires conduisant à l'inflammation artérielle et à la fragilité de la plaque athéroscléreuse. Pour cela, nous avons analysé le niveau d'expression de médiateurs impliqués dans la physiopathologie de l'athérosclérose dans les macrophages M1 versus M2, dérivés des monocytes sanguins (MDM) isolés de patients athéroscléreux. Ces profils d'expression ont également été comparés à ceux obtenus chez des sujets sains.

Par ailleurs, l'athérosclérose est associée à de nombreux facteurs de risque CV. En effet, au cours de son évolution, la progression des lésions athéroscléreuses vers des

formes compliquées dépend de ces facteurs de risque. Leur connaissance et leur prévention est actuellement un enjeu de santé publique majeur. Dans un deuxième temps, nous nous sommes donc intéressés à l'influence des principaux facteurs de risque CV sur les profils d'expression des macrophages M1/M2 provenant de patients athéroscléreux.

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre d'un protocole clinico-biologique. Nous aborderons brièvement, dans la dernière partie de cette introduction, les dispositions légales et réglementaires qui encadrent la recherche biomédicale en France.

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE

I. L'ATHEROSCLEROSE

I.1. Généralités

I.1.1. Définition

L'athérosclérose a été précisément définie, par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 1958 : « l'athérosclérose est une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre, consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires, le tout s'accompagnant de modifications de la média ». Cette définition décrit quelques caractéristiques des lésions d'athérosclérose, notamment leur siège dans l'intima (tunique interne des artères), leurs territoires de prédilection (artères de gros et moyen calibre) et enfin leur retentissement sur la média (remaniements de celle-ci). Cependant cette description est celle des lésions évoluées, correspondant à la plaque fibrolipidique non compliquée ou plaque d'athérome et n'évoque pas les nouvelles notions de lésions initiales, de progression des lésions ni de complications. En effet, de récentes études ont montré que l'athérosclérose est un processus inflammatoire chronique, évolutif et dynamique, caractérisé par différents stades, décrits ultérieurement.

I.1.2. Epidémiologie

Les maladies cardiovasculaires (CV), engendrées le plus souvent par l'athérosclérose, sont de loin la première cause de morbi-mortalité dans le monde et figurent au deuxième rang des causes de décès en France après les cancers [1]. Les pathologies CV sont responsables d'environ dix-sept millions de décès par an dans le monde ; elles sont suivies par le cancer, les maladies respiratoires et le diabète [2]. L'athérosclérose constitue donc un réel enjeu de santé publique. La figure 1 précise la répartition des différentes causes de mortalité dans le monde selon des données moins récentes [3].

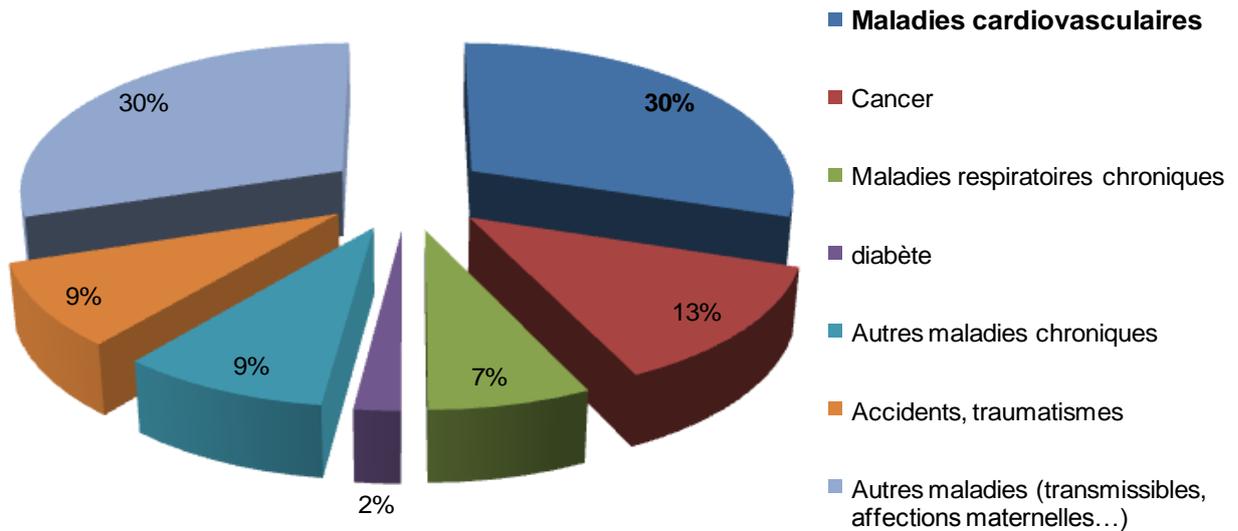


Figure 1 : Causes principales de décès dans le monde en 2005, tous âges confondus [3]

Les maladies cardiovasculaires nécessitent généralement un traitement chronique, elles représentent donc une part importante des dépenses de santé. En France, les remboursements liés à la prise en charge des ALD (affections de longue durée) CV s'élèvent à 18 milliards d'euros par an selon la Caisse Nationale de l'Assurance Maladie. La figure 2 rend compte de la répartition des coûts directs des maladies CV en France.

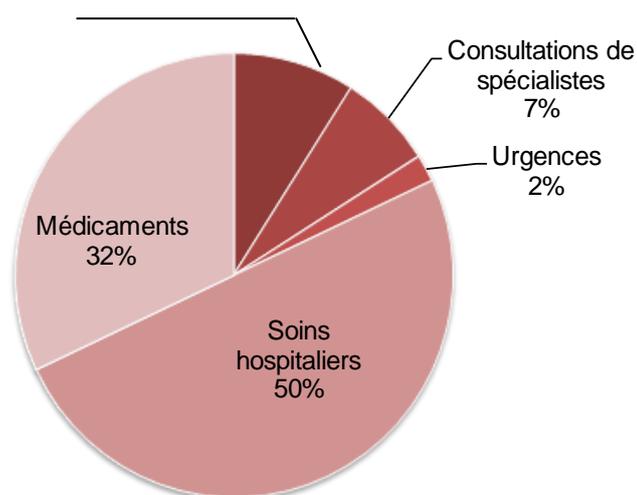


Figure 2 : Répartition des coûts directs des maladies cardiovasculaires en France en 2006, d'après [4]

Hormis le sexe masculin et l'âge, l'athérosclérose est favorisée par de nombreux autres facteurs de risque : antécédents CV familiaux et personnels, diabète, obésité, dyslipidémie, hypertension artérielle (HTA) dont certains sont évitables : tabagisme, sédentarité... Ces différents facteurs de risque sont décrits ultérieurement.

I.1.3. Traduction clinique de la maladie athéroscléreuse

La maladie athéroscléreuse peut se développer dès le stade fœtal. En effet, la strie lipidique, premier stade de la lésion athéroscléreuse, est retrouvée communément chez les nouveaux nés ainsi que chez les jeunes enfants [5]. Elle évolue ensuite lentement pendant plusieurs années le plus souvent de manière asymptomatique, en lésions complexes. Ces dernières peuvent progresser en plaques stables ou instables, susceptibles de se rompre et d'entraîner la formation d'un thrombus artériel obstruant la lumière vasculaire et responsable de graves complications.

Les présentations cliniques de l'athérosclérose sont nombreuses et fonction de l'artère atteinte (figure 3): en effet, cette maladie peut toucher les artères cérébrales, coronaires ou des membres inférieurs et être à l'origine respectivement des accidents vasculaires cérébraux (AVC), de cardiopathies ischémiques (angor instable ou infarctus du myocarde) et enfin d'artériopathie oblitérante des membres inférieurs.

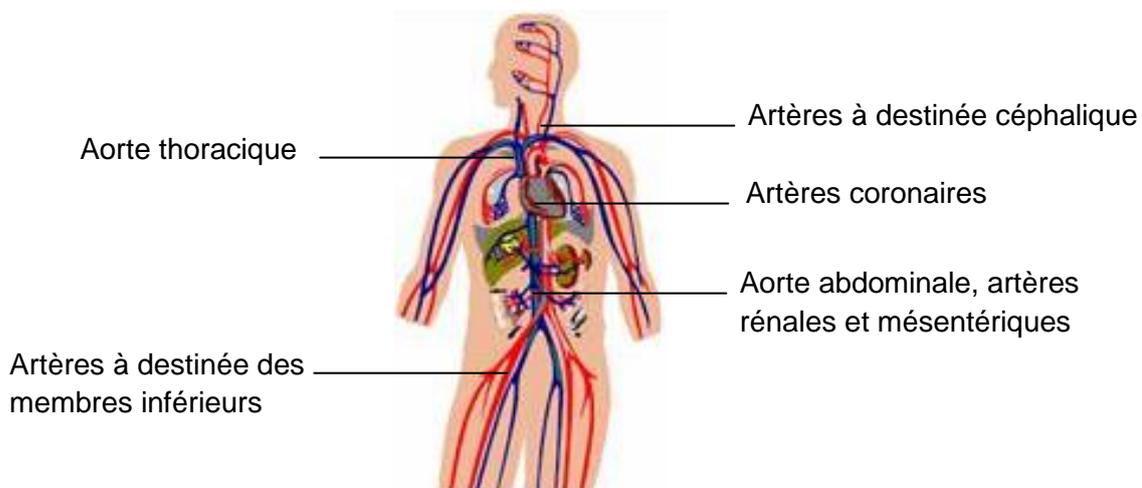


Figure 3 : L'athérosclérose, maladie des artères de gros et moyen calibre : schéma illustrant les différentes artères touchées

I.1.4. Siège préférentiel des lésions

Les lésions athéroscléreuses se développent dans certains sites privilégiés des artères de gros et moyen calibre, notamment au niveau des zones de bifurcations et de courbures.

Dans ces zones de forte contrainte mécanique, les forces de cisaillement ou « shear stress », paramètre hémorrhéologique déterminé par le flux sanguin, le diamètre des vaisseaux et la viscosité sanguine, sont très faibles et sont responsables de nombreuses modifications de l'expression génique, du métabolisme et de la morphologie des cellules endothéliales (figure 4). En effet, au contact d'un faible « shear stress », les cellules endothéliales présentent un phénotype proathérogène lié à une augmentation de l'expression de molécules d'adhésion et d'activation des monocytes et de la synthèse de molécules prothombogènes expliquant l'état procoagulant associé [6]. De plus dans ces zones, il existe une stase des éléments circulants et une exposition accrue de l'endothélium et de la paroi artérielle aux agents athérogènes, ce qui explique le développement préférentiel des lésions athéroscléreuses dans ces territoires [7].

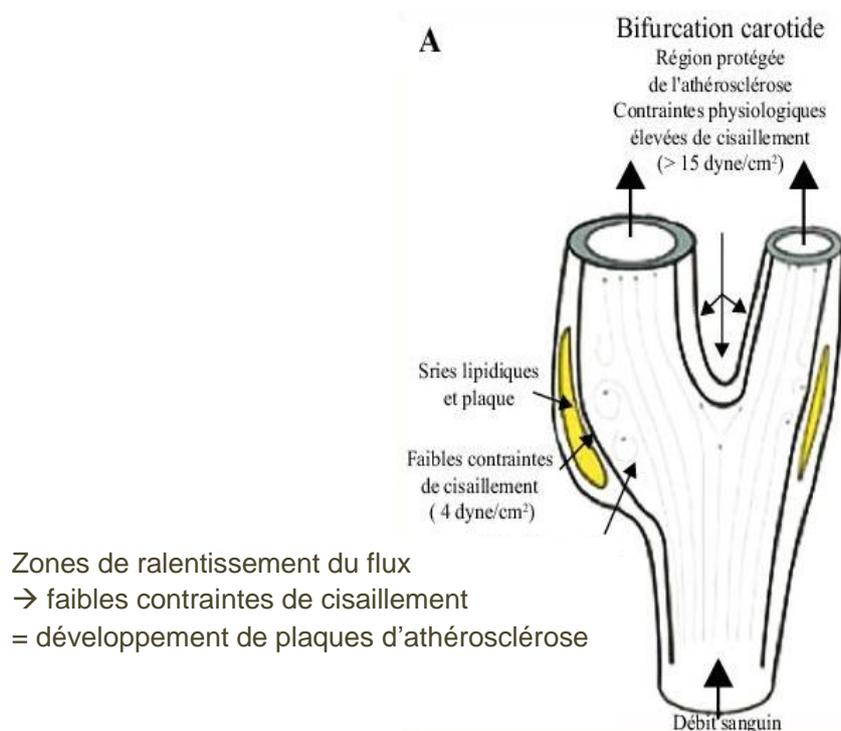


Figure 4 : Schéma représentatif de la localisation préférentielle des plaques d'athérosclérose au niveau de la paroi externe des bifurcations vasculaires en fonction des forces de cisaillement, d'après [6]

I.2. Structure de la paroi artérielle normale

La paroi artérielle est constituée de 3 couches concentriques morphologiquement distinctes appelées tuniques qui sont, de la lumière vers l'extérieur des artères : l'intima, la média et l'adventice (figure 5).

L'**intima** est la tunique la plus interne et la plus fine ; elle est constituée d'une monocouche continue de cellules endothéliales reposant sur une membrane basale.

L'endothélium vasculaire, interface physiologique entre le sang circulant et la paroi artérielle, joue un rôle important dans l'homéostasie vasculaire. Par exemple, il régule étroitement la vasorelaxation de par ses nombreuses propriétés vasorelaxantes [synthèse de facteurs tels que le monoxyde d'azote (NO) et la prostacycline (PGI₂)] et vasoprotectrices via le NO (effets anti-oxydant, anti-inflammatoire, inhibiteur de l'adhésion et de l'aggrégation plaquettaire, anticoagulant et profibrinolytique...). La dysfonction endothéliale, caractérisée par la perte des propriétés vasculoprotectrices endothélium-dépendantes, est impliquée de façon précoce dans la physiopathologie de l'athérosclérose et en est une étape clé.

Le sous-endothélium est composé de tissu conjonctif fibro-élastique et renferme quelques cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) et quelques cellules du système immunitaire tels que les macrophages dérivés des monocytes sanguins circulants. C'est à partir de cette couche sous-endothéliale que se développent les lésions athéroscléroseuses.

L'intima est séparée de la média par une lamelle élastique interne (limitante élastique interne).

La **média**, tunique intermédiaire et constituant principal de l'artère, est la plus épaisse des trois. Il s'agit de la partie musculaire de l'artère, elle contient essentiellement des CMLV et des constituants de la matrice extracellulaire (MEC) tels que des fibres élastiques, fibrilles d'élastine et de collagène.

La limitante élastique externe (lamelle élastique externe) sépare la média de l'adventice.

L'**adventice**, tunique la plus externe de la paroi vasculaire, est constituée de tissu conjonctif peu organisé (riche en collagène et en fibres élastiques) et de fibroblastes. Elle assure l'ancrage des artères aux structures avoisinantes. Elle est irriguée par des vaisseaux nourriciers, les *vasa vasorum*, système capillaire des vaisseaux de gros calibre, qui se prolongent dans la partie externe de la média.

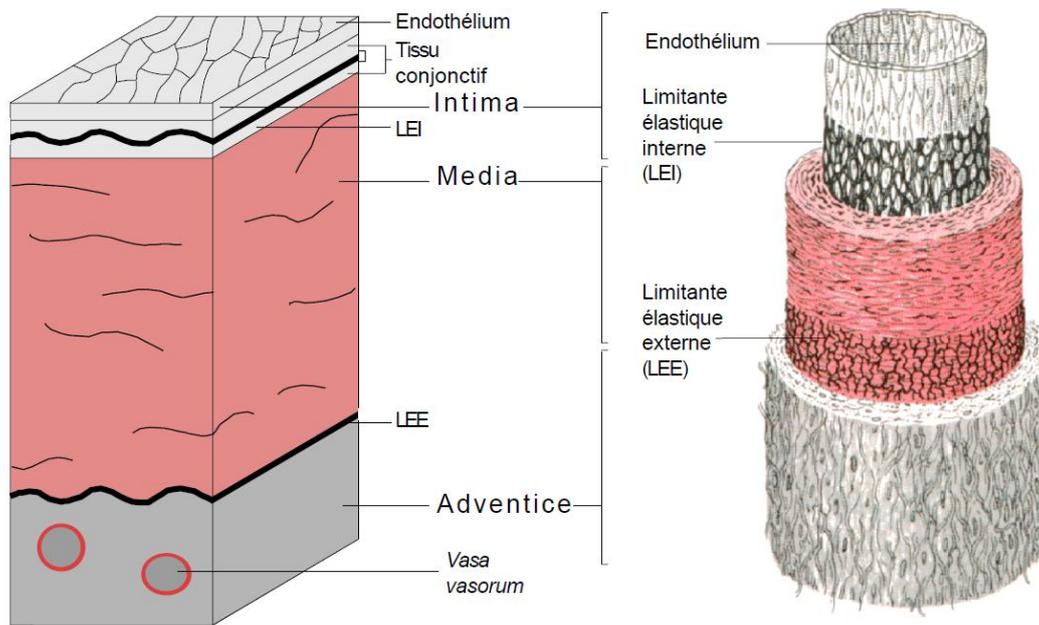


Figure 5 : Représentation schématique de la paroi artérielle saine [8]

I.3. Caractéristiques anatomo-pathologiques et classification histologique des lésions athéroscléreuses

L'athérosclérose est une inflammation chronique de l'intima des artères qui se caractérise par une accumulation locale de lipides associée à l'infiltration de différents types cellulaires dans l'intima, engendrant des remaniements de celle-ci et constituant la « plaque » athéroscléreuse (figure 6) [9].

Ces lésions qui se développent en plusieurs étapes ont été classées en tenant compte du caractère évolutif dynamique de l'athérosclérose mis en évidence par de nombreuses études anatomo-pathologiques. La classification de l'AHA (American Heart Association) reconnaît ainsi six principaux types lésionnels de gravité croissante (tableau 1), chacun étant l'évolution du précédent [10] ; elle a été modifiée plus récemment par Virmani *et coll.* et Naghavi *et coll.* (tableau 1) [11, 12].

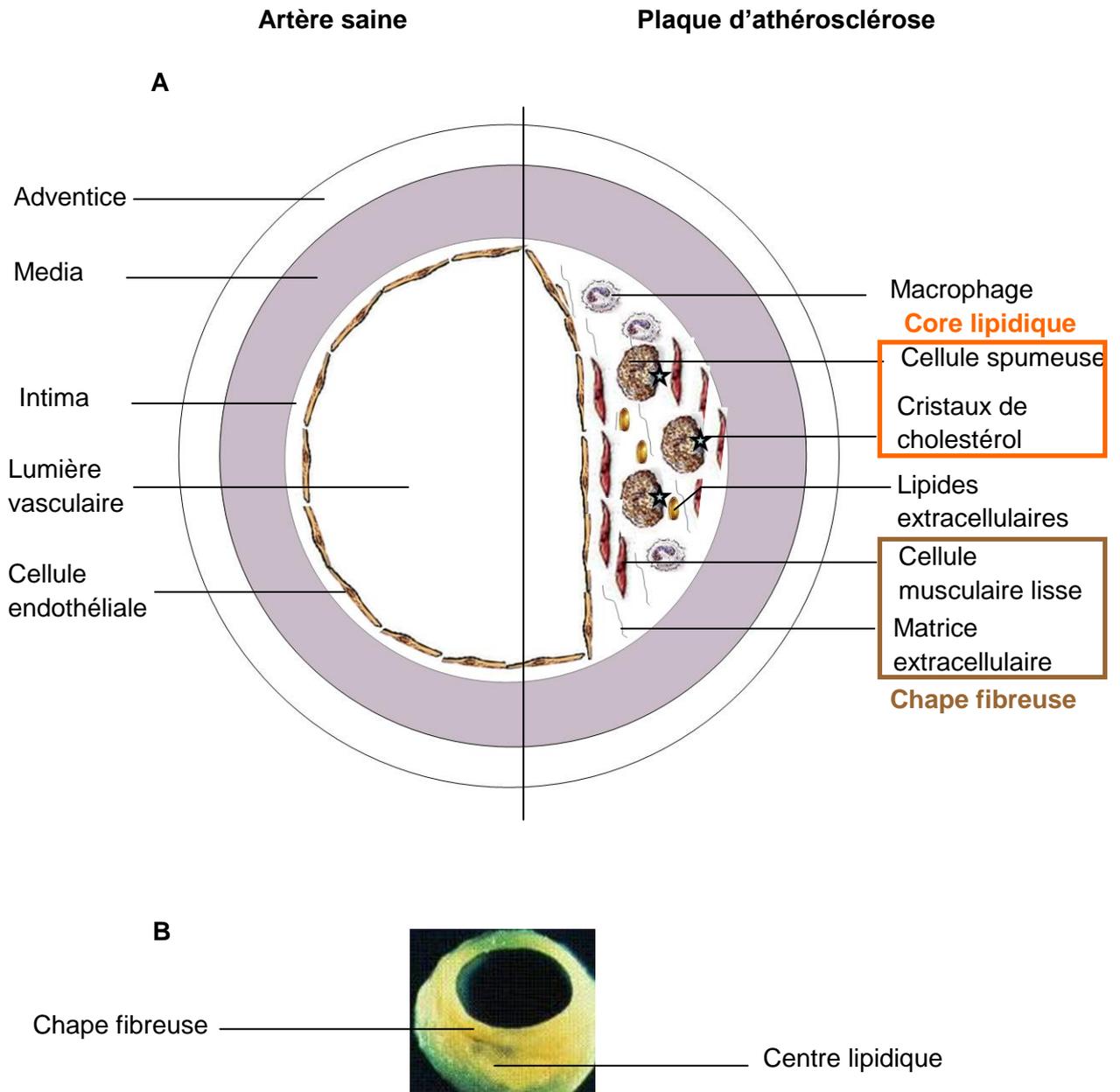


Figure 6 : **A** : Comparaison de la structure d'une artère saine et d'une artère lésée par l'athérosclérose, illustrant le remaniement de la paroi artérielle.
B : Coupe transversale d'une plaque d'athérosclérose fibrolipidique

Tableau 1 : Nomenclature et description des lésions d'athérosclérose aux différents stades évolutifs selon la classification de l'American Heart Association [13]

Type de lésions et descriptif			Age d'apparition	Clinique
Lésions précoces	I. Lésion initiale	Macrophages spumeux isolés (« foam cells »)	Dès les 1 ^{ères} semaines de vie - 15 ans	Asymptomatique
	II. Stries lipidiques	Accumulation de cellules spumeuses en amas dans la couche sous-endothéliale de l'intima		
	III. Pré-athérome	Cellules spumeuses +++ et apparition de lipides extracellulaires	après 20 ans	
Lésions avancées	IV. Athérome	Cœur lipidique (accumulation dense de lipides extracellulaires avec des fentes de cristaux de cholestérol) sans fibrose	après 20 ans	Symptomatique
	V. Fibrolipidique (Va) Vb: +calcifications Vc: cœur lipidique très réduit ou absent	cœur lipidique (accumulation de cellules spumeuses d'origine principalement macrophagique et de CMLV) et chape fibreuse (CMLV et MEC)	après 20 ans majorité d'individus après 40ans	
	VI. Fibro-athérome compliqué Vla : ulcération Vlb : hémorragie intraplaque Vlc : thrombose	Suite à une érosion ou une rupture de plaque		
	VII. lésion calcifiée	Nouvelle appellation de la lésion Vb		
	VIII. Lésion fibreuse	Nouvelle appellation de la lésion Vc		

I.4. L'athérogenèse

La formation de la plaque athéroscléreuse est un processus chronique complexe qui met en jeu différents acteurs cellulaires essentiellement les leucocytes inflammatoires et les CMLV. Elle est initiée par une inflammation locale en réponse à une agression des cellules endothéliales par différents mécanismes.

I.4.1. Principales théories physiopathologiques

Pendant très longtemps, la théorie lipidique a été mise en avant pour expliquer la pathogenèse de l'athérosclérose. Dès 1913, les travaux d'Anitschkov ont mis en évidence le rôle du cholestérol dans l'athérosclérose expérimentale. Ils ont montré que le lapin, soumis à un régime riche en lipides, développe des lésions d'athérosclérose, d'où l'hypothèse d'une infiltration et accumulation progressive et sténosante de lipides dans la paroi artérielle. Depuis les années 1970, une nouvelle théorie inflammatoire a émergé [14]. En effet, parmi les paradigmes récents concernant le développement de l'athérosclérose, l'inflammation est impliquée dans les différents stades de ce processus : dès l'initiation de la constitution de la plaque, à sa progression et à son instabilité responsable des complications aiguës telles que la rupture de plaque et les hémorragies [9]. Le rôle primordial des monocytes/macrophages et d'autres éléments cellulaires dans toutes les étapes de formation de la plaque athéroscléreuse, témoigne de l'importance des processus inflammatoires dans la pathogénie de l'athérosclérose.

I.4.2. Initiation

La dysfonction endothéliale est un événement précoce de la physiopathologie de l'athérosclérose [9]. L'endothélium peut être lésé par différents mécanismes biochimiques (lipoprotéines), hémodynamiques (cisaillement, HTA), toxiques (tabac, inflammation).

Durant la phase initiale de l'athérosclérose, s'observent des modifications de l'expression génique et du métabolisme des cellules endothéliales, induites notamment par les perturbations de flux sanguin au niveau des embranchements artériels. Ces modifications engendrent la perméabilisation de la paroi endothéliale. Les lipoprotéines de faible densité (LDL) s'accumulent dans l'espace sous-endothélial de l'intima des artères et subissent une étape d'oxydation, favorisant la dysfonction endothéliale.

L'endothélium, ainsi activé, va exprimer à sa surface des molécules d'adhésion (P-sélectine, ICAM-1) qui participent au recrutement des leucocytes inflammatoires (polynucléaires neutrophiles, lymphocytes T et monocytes). Après leur extravasation ou diapedèse et transmigration dans l'intima, sous l'influence de facteurs chimioattractants comme MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1), les monocytes circulants, sous l'action du M-CSF (Monocyte Colony Stimulating Factor), se différencient en macrophages. Ces derniers sont capables d'internaliser, de façon non régulée, les LDL oxydées (LDLox) via leurs récepteurs éboueurs (« scavenger »), SR-A et CD36 [15]. Ainsi, ces macrophages chargés massivement en lipides se transforment en cellules spumeuses (« foam cells ») qui participent à la constitution de la strie lipidique (« fatty streak »), premier stade de la lésion athéroscléreuse [16]. Ultérieurement, ces cellules spumeuses formeront le core lipidique de la plaque d'athérome (figure 7).

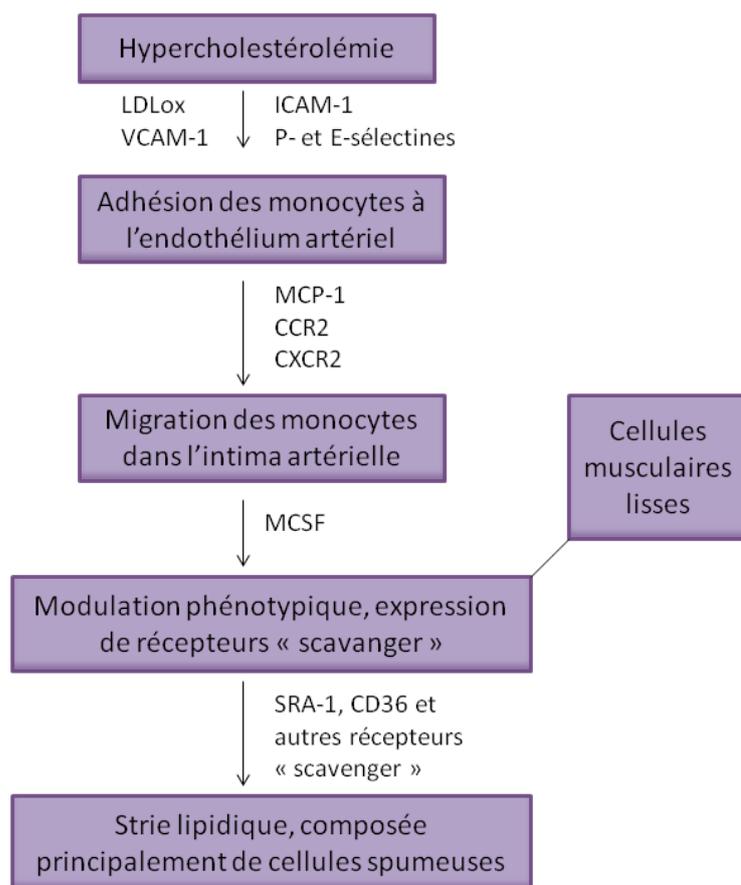


Figure 7 : Suite d'événements générant la strie lipidique, adapté de [15]

I.4.3. Progression

Toutes ces cellules infiltrées vont sécréter un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires telles que le $TNF\alpha$, les interleukines $IL-1\beta$, $IL-12$, qui amplifient la réponse inflammatoire locale et le recrutement *in situ* d'autres leucocytes. Ces cytokines inflammatoires vont générer à la fois la croissance de la plaque et sa fragilisation.

Les cellules infiltrées sécrètent également des facteurs de croissance tels que le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) qui stimulent la migration de l'intima vers la média et la prolifération des CMLV capables, elles aussi, de se transformer en cellules spumeuses (figure 8) [17].

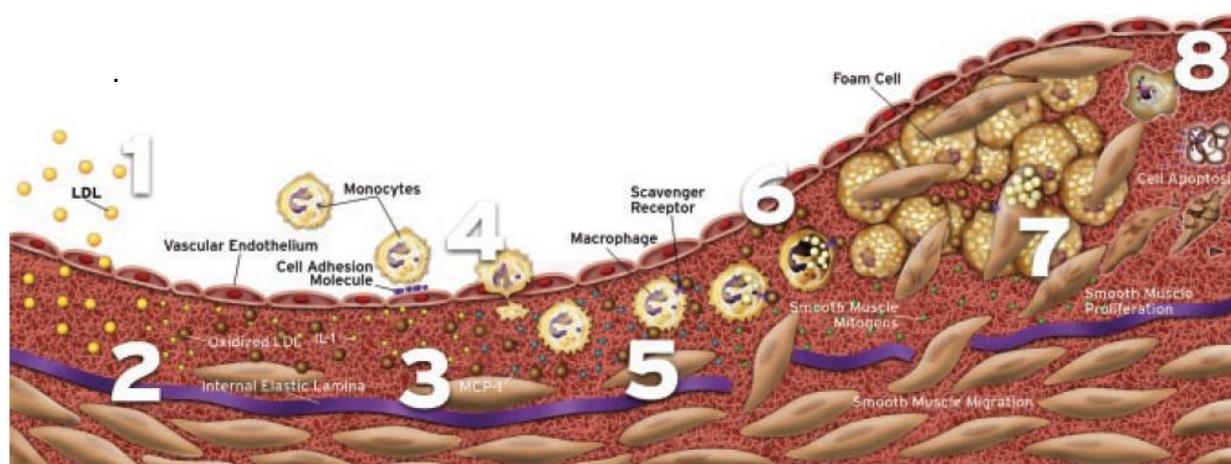


Figure 8 : Chronologie de la formation des lésions athérosclérotiques. Stades 1 et 2 : infiltration et oxydation des LDL, stades 3 et 4 : recrutement et infiltration des monocytes, stades 5, 6, 7 et 8 : transformation des macrophages gorgés de lipides en cellules spumeuses, migration et prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (Extrait de [18])

Sous l'action du PDGF, les CMLV acquièrent un phénotype sécrétoire et perdent progressivement leur capacité contractile. En effet, elles acquièrent la capacité de synthétiser des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) (fibrinogène, collagène), qui recouvrent la plaque athérosclérotique d'une chape fibreuse, jouant un rôle stabilisateur de la plaque. L'infiltrat macrophagique va également exprimer des métalloprotéases (MMP) participant au devenir de la plaque.

Les plaques athérosclérotiques peuvent être le siège d'intenses processus apoptotiques induits par l'inflammation locale avec la production de radicaux libres et par les LDLox toxiques accumulées [19]. L'apoptose des macrophages contribue à la croissance de la plaque lipidique par accumulation des corps apoptotiques pour former le corps lipidique et nécrotique. La taille du corps nécrotique est proportionnelle au risque de rupture.

La plaque d'athérosclérose évolue progressivement sur plusieurs années. C'est essentiellement le phénotype de plaque (stable ou instable) qui informe de sa gravité.

La plaque d'athérosclérose peut donc évoluer vers deux phénotypes :

- le phénotype « stable » non dangereux : la plaque évolue vers un état fibreux. L'épaisseur de la chape fibreuse consolide la plaque. De plus, l'élargissement ou le remodelage artériel compensateur permet de maintenir un calibre vasculaire de taille suffisante pour permettre une circulation sanguine satisfaisante [20].

- le phénotype « instable » ou « vulnérable » qui est beaucoup plus dangereux avec un risque accru d'accident aigu par rupture de plaque

I.4.4. Vulnérabilité de la plaque

Le concept de « plaque vulnérable » désigne la plaque athéroscléreuse susceptible de se rompre et d'entraîner la formation d'un thrombus ou d'évoluer très rapidement [12]. Les plaques vulnérables sont donc responsables de la majorité des accidents CV aigus.

Certains critères morphologiques permettent de définir les plaques vulnérables, plus facilement rompues qui sont caractérisées par un large infiltrat lipidique inflammatoire (constitué essentiellement de macrophages) recouvert d'une fine chape fibreuse qui le sépare de la lumière du vaisseau. Cette couche fibreuse constitue une barrière antithrombotique entre le core lipido-nécrotique fortement thrombogène (riche en facteur tissulaire) et les facteurs procoagulants circulants.

L'instabilité de la plaque est exacerbée par les phénomènes inflammatoires associés à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs de croissance et à l'activité d'enzymes lytiques telles que les MMP produites et libérées par divers types cellulaires de la plaque dont les macrophages/cellules spumeuses et les polynucléaires neutrophiles (PNN). La plupart des MMP sont connues pour leur capacité de dégradation et de remodelage des composants de la MEC, elles jouent donc un rôle important dans la fragilité de la plaque [21]. Au cours de l'athérosclérose, des taux élevés de MMP-9 plasmatique et tissulaire sont associés à l'instabilité de la plaque et constituent donc un risque plus élevé de syndromes coronariens aigus [22]. L'activité des MMP *in vivo* est contrôlée par des inhibiteurs endogènes spécifiques, les Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP) et par d'autres antiprotéases telles que l' α 2-macroglobuline [23] et le PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1), inhibiteur de l'activité protéolytique de la MMP-9. De plus, la faible proportion de

CMLV (chape fibreuse mince) observée dans les plaques « instables » ne permet pas assez de renouveler les constituants de la MEC dégradés par les macrophages.

Les plaques vulnérables sont également caractérisées par l'accumulation de cellules apoptotiques [19]. Des cycles inflammatoires répétés contribuent à l'apoptose de divers types cellulaires dont les macrophages, constituant ainsi, dans les lésions avancées, le core nécrotique qui déstabilise la plaque. De plus, l'apoptose des CMLV peut non seulement freiner leur extension et leur prolifération, limitant le développement sténosant de la plaque, mais aussi l'affaiblir en diminuant la synthèse fibreuse recouvrant et protégeant normalement cette plaque.

D'autres facteurs peuvent contribuer à l'instabilité de la plaque. Certaines forces ou contraintes mécaniques, telles que le « shear stress » et des vasospasmes, sont responsables de la fragilisation de la plaque et peuvent déclencher la rupture soudaine de celle-ci.

Enfin, la néoangiogenèse, processus permettant la formation et le développement de nouveaux vaisseaux souvent immatures, peut être responsable d'hémorragies intraplaques qui déstabilisent la plaque. Ces micro-hémorragies augmentent rapidement le volume et la pression dans la plaque et contribuent à la croissance du core lipidique par l'apport du cholestérol membranaire érythrocytaire [24]. Par ailleurs, cette néovascularisation participe également à l'exacerbation de la réponse inflammatoire en permettant le recrutement et l'infiltration de nouvelles cellules inflammatoires [25].

Lorsque la rupture de plaque survient, les molécules prothrombotiques telles que le facteur tissulaire, contenues dans la plaque, sont libérées et sont mises en contact avec les facteurs de la coagulation plasmatique, aboutissant à un processus thrombotique. Le thrombus formé peut oblitérer que partiellement la lumière vasculaire et être responsable, dans le territoire coronaire, de l'angine de poitrine instable. Malheureusement, dans certains cas, le thrombus obstrue complètement l'artère, responsable d'une ischémie aiguë du territoire en aval définissant ainsi, dans les coronaires, l'infarctus du myocarde (figure 9).

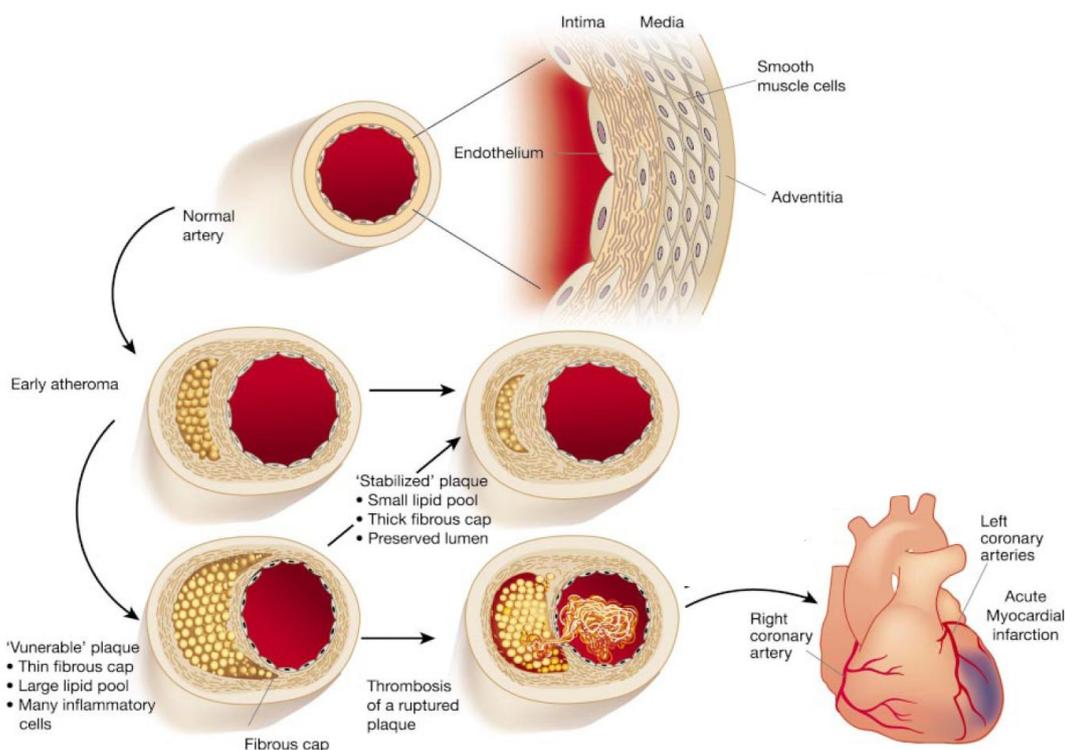


Figure 9 : Evolution progressive de la plaque d'athérosclérose vers un phénotype « stable » ou « vulnérable », adapté de [16]

I.5. Techniques chirurgicales de revascularisation et prévention thérapeutique

I.5.1. Le pontage aorto-coronarien

Il s'agit du traitement chirurgical des lésions athéroscléreuses coronariennes sténosantes mises en évidence par coronarographie. Il est proposé lorsque le traitement médicamenteux ne suffit pas à réduire les symptômes de l'insuffisance coronarienne. Il constitue donc le traitement chirurgical de choix pour la prévention de l'infarctus du myocarde.

Le pontage aorto-coronarien est réalisé lorsque les lésions sont nombreuses et/ou inaccessibles à une revascularisation par angioplastie ou lorsqu'il existe une obstruction de l'origine de l'artère coronaire gauche (tronc coronaire gauche), menaçant alors un territoire cardiaque de surface importante. Il consiste à contourner une artère coronaire dont la lumière est rétrécie par de l'athérome ou obstruée, en implantant un autre vaisseau en aval et en amont de cette dernière, afin de rétablir une circulation sanguine satisfaisante et d'éviter l'ischémie voire la mort du territoire cardiaque mal perfusé. Le pontage aorto-coronarien se fait soit par greffon veineux soit par greffon artériel (figure 10). Dans le

premier cas l'intervention consiste à prélever un segment de veine au niveau des membres inférieurs (le plus souvent saphène interne du patient lui-même) et à l'implanter en amont et en aval du rétrécissement coronarien, de façon à réaliser un "pont" entre l'aorte et le(s) artère(s) coronaire(s) malade(s).

Concernant les greffons artériels, l'artère radiale et l'artère mammaire interne (AMI) peuvent être utilisées. Les AMI donnent les meilleurs résultats à long terme. Elles sont généralement indemnes de maladie athéromateuse. Dans ce cas, l'AMI est dérivée de son parcours normal et est reliée directement à l'artère coronaire en aval du rétrécissement.

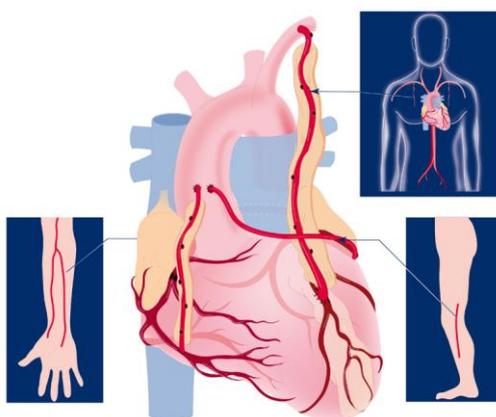


Figure 10 : Origine artérielle ou veineuse des greffons utilisés dans les pontages coronariens, [26]

1.5.2. L'angioplastie coronaire

L'angioplastie, ou dilatation, coronaire cherche au contraire à réparer le vaisseau obstrué afin qu'il fonctionne de nouveau. Elle consiste à éliminer la plaque d'athérome avec ses débris et ses caillots qui obstruent le vaisseau, associé le plus souvent à la pose d'un stent actif ou non, auto-expansible ou expansible sur ballonnet.

1.5.3. L'endartériectomie carotidienne

L'endartériectomie carotidienne est l'une des interventions vasculaires les plus fréquemment pratiquées. Elle consiste à enlever la plaque d'athérome qui obstrue la carotide (figure 11). Elle concerne les plaques sténosantes d'origine athéromateuse touchant le plus communément la bifurcation carotidienne. Ces lésions entraînent un rétrécissement artériel avec réduction du flux sanguin et parfois des migrations d'embols responsables des AVC.

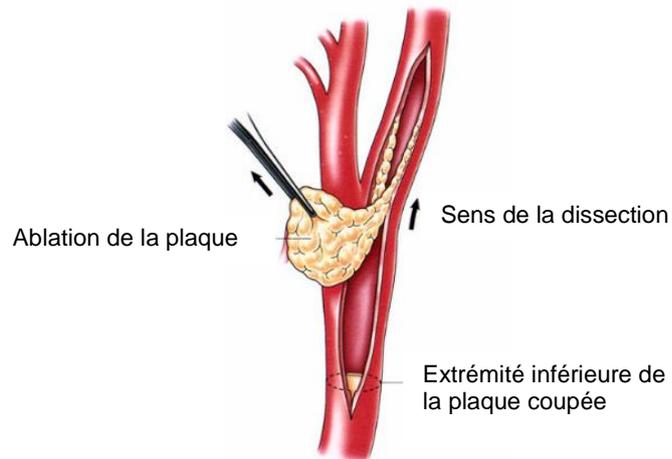


Figure 11 : Technique d'endartériectomie carotidienne, [27]

I.5.4. Prévention : stabilisation de la plaque

Différentes thérapeutiques existent pour prévenir les différents processus impliqués dans la physiopathologie de l'athérosclérose :

- prévenir l'ulcération en diminuant le contenu lipidique et la composante inflammatoire par les statines, molécules hypocholestérolémiante (action inhibitrice sur l'HMG-CoA réductase, enzyme clé de la synthèse de cholestérol).

- améliorer la fonction endothéliale par les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) et les statines

- prévenir la thrombose par les antiagrégants plaquettaires et les anticoagulants

- diminuer l'inflammation par l'aspirine et les statines

II. LE MONOCYTE/MACROPHAGE : CELLULE CLE DE L'ATHEROSCLEROSE

II.1. Origine cellulaire

Les monocytes font partie du système des phagocytes mononucléés. Ils proviennent de progéniteurs très indifférenciés (CFU-GEMM), plus différenciés (CFU-GM puis CFU-M) et de précurseurs médullaires. La différenciation des CFU-GEMM en monocytes médullaires se déroule sur plusieurs jours (environ 4-5 jours). Les monocytes médullaires résident dans la moelle osseuse pendant 24 heures puis migrent dans le sang périphérique où ils séjournent de quelques heures à quelques jours, avant de migrer dans les tissus par diapedèse et de se différencier en macrophages tissulaires de durée de vie plus longue (figure 12). Les monocytes représentent moins de 10% des leucocytes sanguins circulants humains.

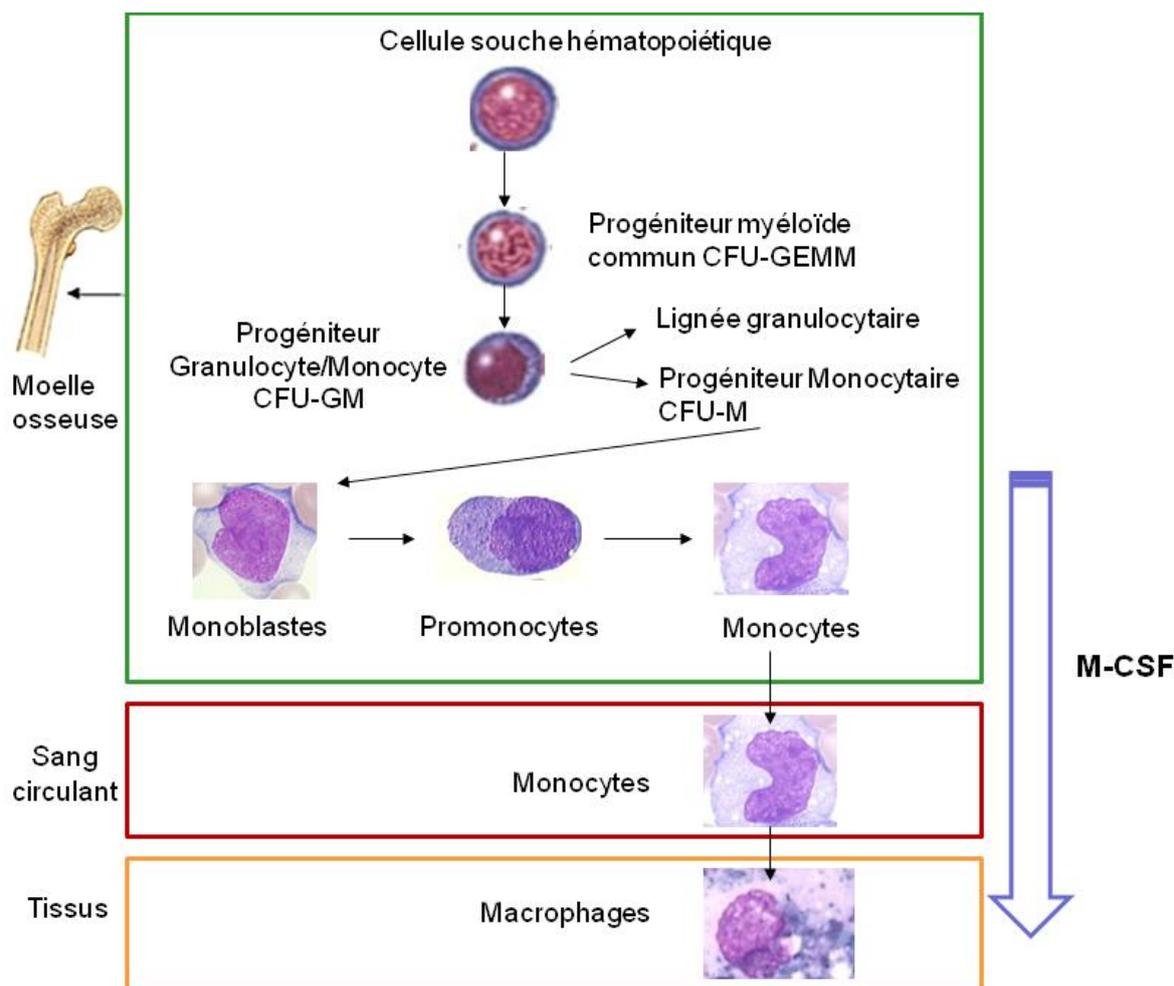


Figure 12 : Schéma de maturation médullaire du monocyte

II.2. Fonctions physiologiques

Les monocytes appartiennent aux cellules du système phagocytaire et jouent un rôle important dans les défenses innées et acquises de l'organisme.

Les macrophages présentent des morphologies et acquièrent des compétences différentes en fonction des organes en lien avec leurs interactions avec la MEC et les autres types cellulaires (figure 13).

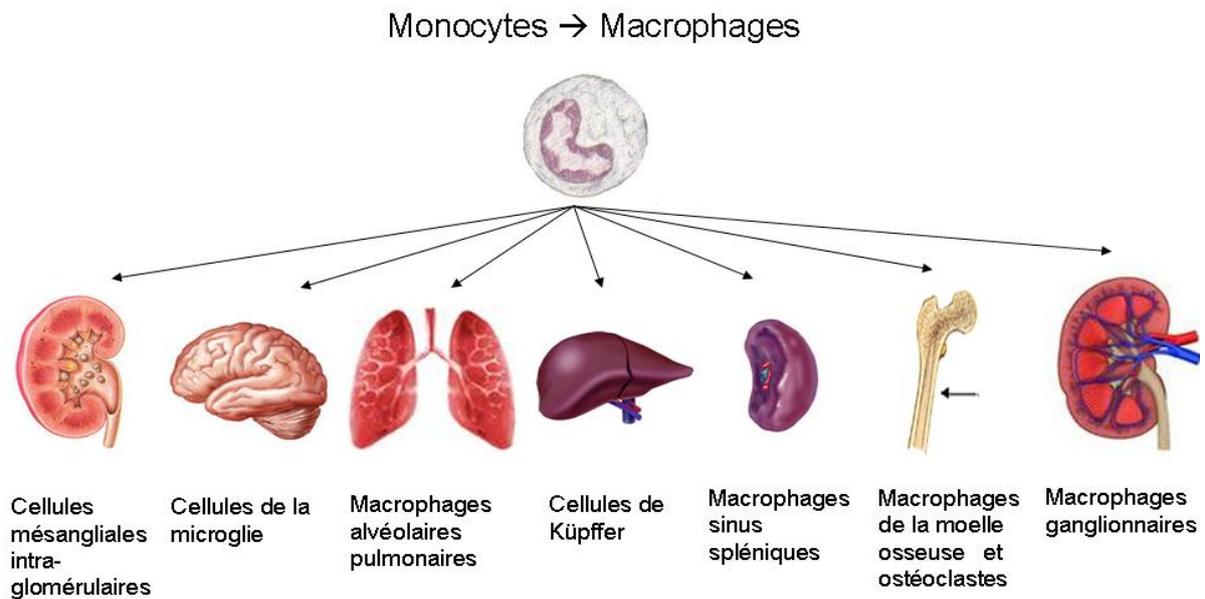


Figure 13 : Système des phagocytes mononucléés

Les macrophages participent à une multitude de fonctions physiologiques et de processus pathologiques. Ce sont des cellules immunitaires présentatrices d'antigènes via l'expression des molécules HLA de classe II, des cellules de lutte anti-infectieuse par libération d'agents bactéricides, des cellules « scavenger » par leur fonction de phagocytose et des cellules sources de nombreuses substances dont la sécrétion est souvent inducible par divers stimuli. Parmi ces substances, on trouve des cytokines (TNF α , IL-1, IL-6, IL-10, IL-12...), des chimiokines (MCP-1), des facteurs de croissance (G-CSF, GM-CSF, M-CSF...), des substances cytotoxiques dérivées de l'oxygène, des protéases (élastase, MMP...), du collagène, de la fibronectine et du facteur tissulaire, cette liste n'étant pas exhaustive.

II.3. Rôle du macrophage au sein de la plaque athéroscléreuse

Comme nous l'avons vu précédemment, les monocytes/macrophages sont les principales cellules inflammatoires impliquées dans les différentes étapes du développement des lésions athéroscléreuses [initiation, progression et instabilité (rupture de plaque)]. En effet, l'infiltration des monocytes dans l'espace sous-endothélial des artères, où ils se différencient en macrophages, est une étape clé de l'athérogenèse. Le rôle des macrophages dans l'athérosclérose peut s'expliquer par leur répertoire membranaire et sécrétoire (figure 14).

II.3.1. Récepteurs membranaires

Les macrophages possèdent à leur surface membranaire divers récepteurs impliqués dans différentes voies métaboliques :

- des « Toll like receptor » (TLR) impliqués dans la défense de l'hôte contre les microorganismes mais aussi dans le processus d'athérogenèse. L'expression macrophagique des TLR a été mise en évidence dans les lésions athéroscléreuses humaines et est accrue par les LDL oxydées [28].

- des récepteurs « scavenger » tels que le CD36 et le SR-A qui jouent un rôle dans la phagocytose et l'élimination des cellules apoptotiques. Par l'intermédiaire de ces récepteurs, les macrophages captent et internalisent massivement les LDL oxydées accumulées dans l'espace sous-endothélial, pour se transformer par la suite en cellules spumeuses. Ces récepteurs ne sont pas sous le contrôle du contenu intracellulaire en cholestérol [15].

II.3.2. Substances sécrétées

Les macrophages sécrètent diverses substances impliquées dans le développement de la plaque athéroscléreuse :

- des substances chimioattractantes telles que M-CSF et MCP-1 qui amplifient le recrutement d'autres monocytes au sein de la plaque,

- des facteurs de croissance tels que GM-CSF et M-CSF nécessaires au développement, à la prolifération et à la survie des macrophages et qui sont fortement surexprimés dans les plaques athéroscléreuses humaines [29].

Les monocytes/macrophages sont au centre de la réaction inflammatoire qui conduit à la formation de la plaque d'athérosclérose, comme en témoigne l'absence quasi-totale de lésions athéroscléreuses chez les souris ApoE^{-/-} déficientes en M-CSF, dépourvues de monocytes circulants [30].

- des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF α) et anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β) en fonction du stade pathologique. La réaction inflammatoire résultante active localement les cellules vasculaires et les macrophages et entraîne la croissance et la fragilisation des lésions.

- des acteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) conférant aux macrophages un rôle important dans l'angiogenèse et la réparation tissulaire [31].

- des acteurs de l'hémostase tels que le facteur tissulaire (FT) ou l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1).

Le FT est l'initiateur principal de la voie extrinsèque de la coagulation : il se lie au facteur VII pour activer le facteur X ce qui entraîne la formation de thrombine (IIa) à partir de la prothrombine (facteur II) permettant de convertir le fibrinogène en fibrine, principal composant du caillot sanguin [32]. La différenciation en macrophages est à l'origine de l'augmentation de la production et de la sécrétion de FT et donc de l'activité procoagulante [33]. Cette sécrétion est fortement amplifiée sous l'action d'endotoxines telles que le lipopolysaccharide (LPS). L'activité biologique du FT est régulée par les Tissue Factor Pathway Inhibitor, TFPI et TFPI-2. En plus de ses propriétés sur la coagulation, le FT participe aux phénomènes inflammatoires, de migration, de prolifération cellulaire et d'angiogenèse très présents au sein de la lésion.

Le PAI-1 est le principal inhibiteur de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et de l'urokinase (u-PA), les activateurs du plasminogène, impliqués dans la fibrinolyse, processus de lyse de la fibrine.

- des MMP (MMP-9) et autres enzymes protéolytiques (élastase) dégradant la MEC et responsables de l'instabilité des plaques athéroscléreuses [34].

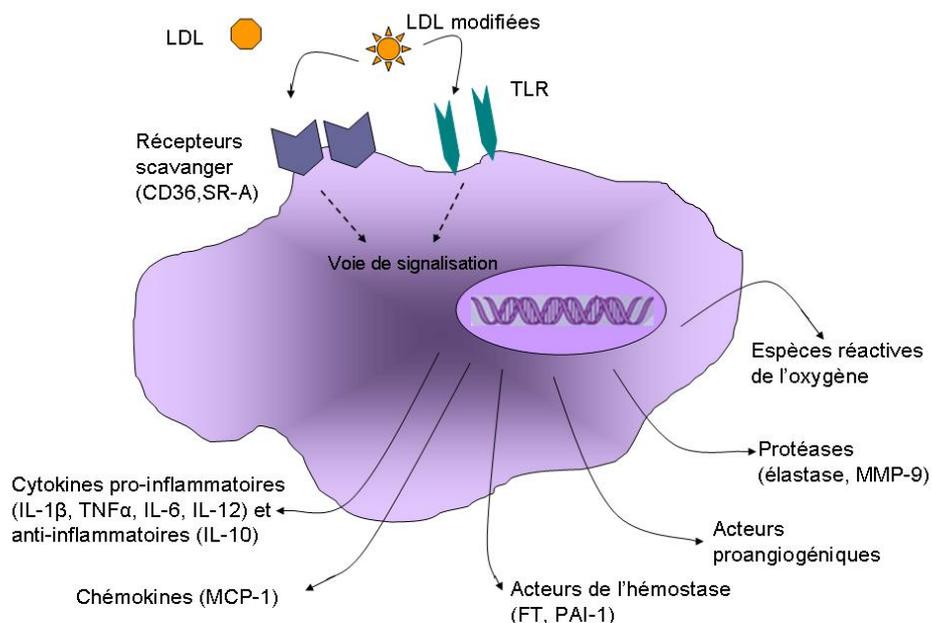


Figure 14 : Répertoire membranaire et sécrétoire du macrophage dans l'athérosclérose

II.4. Hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des macrophages

De récentes publications rendent compte de la diversité phénotypique et fonctionnelle de la population macrophagique en réponse à des signaux du microenvironnement (figure 15) [35, 36].

Les macrophages dit « classiques » ou M1 sont induits par des cytokines de type Th1, telles que l'interféron-gamma (IFN- γ) seul ou en association avec le LPS et l'IL-1 β . Ces macrophages sont des cellules effectrices de lutte contre les microorganismes et produisent principalement des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'IL-6 et l'IL-12... [37].

Une seconde population de macrophages (dits macrophages « alternatifs ») a été décrite pour la première fois il y a une vingtaine d'années par l'induction par l'IL-4 du récepteur au mannose (MR, CD206 ou MRC1) à la surface des macrophages [38]. Aujourd'hui, ces macrophages sont désignés sous le terme de macrophages M2 et l'IL-13 a été décrite comme un autre inducteur des macrophages M2. Actuellement, il existe plusieurs sous-types de M2 (M2a, M2b et M2c) en fonction des signaux inducteurs, que nous ne décrivons pas ici. Ces macrophages M2 présentent des propriétés anti-inflammatoires et produisent des facteurs tels que l'IL-10 et l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 β (IL-1RA).

Divers marqueurs de M2 ont été décrits : forte expression membranaire du récepteur au Mannose, du CD163, et d'autres récepteurs « scavenger », sécrétion d'IL-1RA et d'IL-10, production de chimiokines dont AMAC-1 [39].

Des études ont également montré que les macrophages « alternatifs » ou M2 produisent divers composés impliqués dans la synthèse de la MEC, dont la fibronectine, suggérant leur rôle dans le remodelage et la réparation tissulaire [40]. Ces macrophages seraient également impliqués dans l'angiogenèse. Enfin, quelques études montrent qu'ils seraient associés à un effet athéroprotecteur : la libération de TGF- β par les macrophages M2 inhiberait le recrutement des cellules inflammatoires au sein de la plaque d'athérosclérose [41]. De plus, le TGF- β joue un rôle important dans le contenu en collagène de la plaque et donc dans sa stabilité [42].

Très récemment, le phénotype M4 a été décrit. Ces macrophages sont induits par le PF-4 (platelet factor 4 ou CXCL4). Ils présentent un transcriptome unique, distinct de celui des M1 ou des M2, et sont impliqués dans la réponse immune et le métabolisme lipidique [43].

Par ailleurs, la plasticité des macrophages a été décrite pour la première fois en 2005 : ces cellules peuvent passer d'un phénotype M1 vers un phénotype M2 et vice versa, en fonction de signaux spécifiques [44]. Ce concept de plasticité a été étudié plus récemment dans un modèle d'athérosclérose expérimentale chez la souris [45].

L'existence et la fonction des différents sous-types de macrophages dans l'athérosclérose humaine sont peu connues.

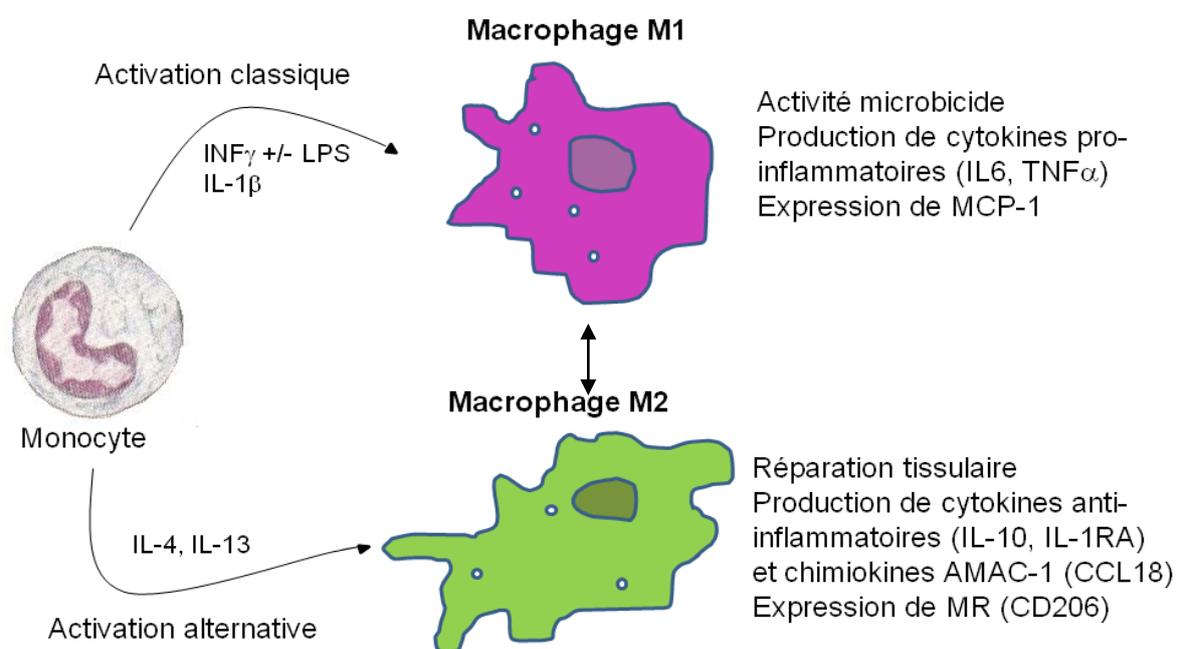


Figure 15 : Diversité fonctionnelle et phénotypique des macrophages

Récemment, il a été découvert que les sous-populations M1 et M2 coexistent dans la plaque athéroscléreuse humaine [46]. Les macrophages M2, identifiés par la présence du récepteur MR, sont localisés dans une zone distincte du core lipidique de la plaque. Cette information laisse supposer que l'athérosclérose est non seulement la conséquence d'une inflammation locale mais aussi celle d'une défaillance des mécanismes anti-inflammatoires de défense.

A notre connaissance, il existe peu de données dans la littérature concernant le phénotype des sous-populations macrophagiques M1/M2 en termes de médiateurs impliqués dans le développement et le devenir de la plaque d'athérosclérose.

III. FACTEURS DE RISQUE CARDIOVASCULAIRE

III.1. Définition

Un facteur de risque cardiovasculaire peut être défini comme « un état clinique ou biologique qui augmente le risque ou la probabilité de survenue d'un événement cardiovasculaire donné » selon l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANAES, 2004).

III.2. Principaux facteurs de risque cardiovasculaire

Les facteurs de risque de l'athérosclérose ont été déterminés à partir de l'observation de populations au cours d'enquêtes prospectives. Parmi celles-ci, l'étude internationale MONICA (Multinational MONItoring of trends and determinants in CARdiovascular disease), coordonnée par l'OMS, a permis une meilleure réflexion sur la prévention cardiovasculaire. De même, en France, 2 enquêtes de population ont été réalisées à 10 ans d'intervalle (de 1985 à 1987 et de 1995 à 1997) pour mesurer les facteurs de risque CV en Haute-Garonne, dans le Bas-Rhin et dans la région Lilloise. Ces enquêtes ont permis d'établir des corrélations entre l'évolution de l'incidence et de la mortalité des maladies CV et l'évolution des facteurs de risque CV et de mettre ainsi en évidence des éléments prédictifs de la survenue de complications liées à l'athérosclérose.

L'athérosclérose est une maladie multifactorielle, favorisée par différentes situations physiologiques (âge), génétiques (sexe, hérédité), pathologiques (HTA, diabète, dyslipidémie), environnementales ou comportementales (habitudes de vie : alimentation riche en graisses, tabagisme, sédentarité, stress...).

Ces différents facteurs de risque participent à la modulation de l'âge de survenue des lésions. De plus, la progression des lésions athéroscléreuses vers des formes compliquées dépend également de ces facteurs de risque CV. Par exemple, il a été montré une augmentation du contenu lipidique de l'athérome et de l'infiltration macrophagique dans le tissu coronaire issu de patients diabétiques, suggérant une vulnérabilité plus importante des plaques athéroscléreuses chez ces patients [47].

Certains facteurs peuvent être modifiables, ce qui les rend accessibles à des mesures de prévention. D'autres, comme l'âge, le sexe et les antécédents familiaux, ne sont pas modifiables.

➤ *les facteurs non modifiables*

III.2.1. Le sexe et l'âge

Il est clairement établi que l'homme est nettement plus exposé que la femme (en période d'activité génitale) aux accidents CV et que le risque CV augmente avec l'âge. Les recommandations de l'HAS de 2005 proposent de considérer l'âge comme un facteur de risque à partir de 45/50 ans chez l'homme et de 55/60 ans chez la femme. L'incidence est similaire pour les deux sexes à partir de 65 ans.

III.2.2. Les antécédents familiaux et personnels

Seuls les antécédents de maladie coronaire précoce sont à prendre en compte, c'est à dire les infarctus du myocarde ou mort subite, avant 55 ans chez le père, ou chez un parent du premier degré de sexe masculin ou avant 65 ans chez la mère, ou chez un parent du premier degré de sexe féminin.

➤ *Les facteurs modifiables*

III.2.3. Le diabète

Les diabètes insulino- (type 1) et non insulino-dépendants (type 2) constituent des facteurs de risque majeurs de l'athérosclérose. Le diabète de type 2 est le plus concerné puisqu'il est plus fréquent et touche des sujets en âge avancé pour lesquels d'autres facteurs de risque coexistent. En effet les patients avec un diabète de type 2 présentent le plus souvent d'autres perturbations (dyslipidémie, HTA...) entrant dans le cadre du syndrome métabolique associé à un excès de tissu adipeux abdominal.

Le diabète est défini par une glycémie à jeun supérieure à 1,26g/L, vérifiée à 2 reprises. L'hyperglycémie persistante du diabétique accélère la formation de produits de glycation avancés (AGE) responsables d'une inflammation artérielle favorisant ainsi le développement de l'athérosclérose [48]. Cette glucotoxicité se traduit également par l'induction du stress oxydatif impliqué dans l'oxydation des LDLs devenant ainsi plus athérogènes et par une production accrue de cytokines pro-inflammatoires [16].

Plusieurs études ont montré que les patients diabétiques présentent un risque plus élevé de complications CV que les sujets non diabétiques (figure 16) [49, 50].

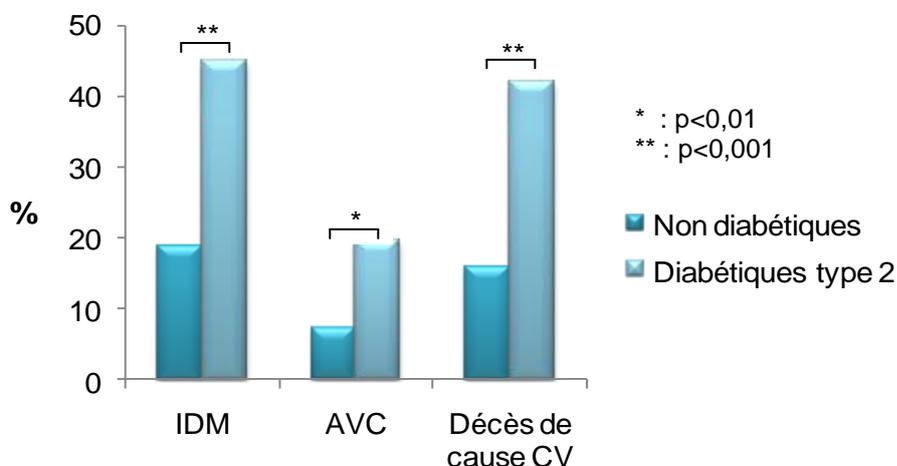


Figure 16 : Incidence de diverses manifestations cliniques de l'athérosclérose : infarctus du myocarde (IDM) et accident vasculaire cérébral (AVC) et de la mortalité d'origine CV à 7 ans chez des patients diabétiques (n=1059) versus non diabétiques (n=1373), d'après [49]

III.2.4. Les dyslipidémies

Les lipides, en particulier le cholestérol, sont transportés dans la circulation sanguine, par différentes lipoprotéines classées selon leur densité, les VLDL et LDL (Very Low et Low Density Lipoprotein) et les HDL (High Density Lipoprotein). Ce sont les LDL, à forte teneur en cholestérol, qui sont pro-athérogènes ; elles sont responsables, sous leur forme oxydée, de l'initiation de l'inflammation lors de l'athérosclérose. En effet, elles s'accumulent dans l'intima et subissent une dégradation oxydative expliquant leur toxicité directe sur l'endothélium. On comprend alors pourquoi l'hypercholestérolémie est un facteur de risque majeur de l'athérosclérose et principalement le LDL-cholestérol (LDL-C).

L'hypercholestérolémie est définie chez l'adulte par un taux de cholestérol sanguin supérieur à 1,4 g/L et un taux de LDL-C dont les objectifs à atteindre sont fonction des autres facteurs de risque associés. La compréhension des mécanismes moléculaires qui régulent la synthèse du cholestérol a permis le développement d'une classe de médicaments hypocholestérolémiants, les statines. Elles réduisent efficacement le taux de cholestérol plasmatique et significativement les risques de mortalité liés aux pathologies CV.

III.2.5. L'hypertension artérielle

L'HTA est un autre facteur de risque principal de l'athérosclérose et est un problème majeur de santé publique. Sa prévalence a été estimée à 31% de la population française [51]. Elle est définie par une tension artérielle supérieure aux seuils de 140/90 mm Hg (systole/diastole).

Les effets de la pression artérielle sur la paroi vasculaire sont complexes ; un des mécanismes proathérogènes peut être expliqué par l'angiotensine II (Ang II). En plus de ses propriétés vasoconstrictrices, l'Ang II augmente l'expression de cytokines proinflammatoires telles qu'IL-6 dans les CMLV ainsi que de la molécule d'adhésion VCAM-1 sur les cellules endothéliales [9].

III.2.6. Le tabagisme

Le mécanisme d'action du tabac dans l'athérogenèse est complexe (figure 17). Les divers composés de la fumée de cigarette (monoxyde d'azote, nicotine...) ont un effet toxique direct sur l'endothélium artériel. Ils induisent un stress oxydatif important qui entraîne une peroxydation lipidique (modification oxydative des LDL) et un dysfonctionnement endothélial [52]. Par ailleurs, le tabac est un puissant facteur pro-thrombogène favorisant l'activation et l'agrégabilité plaquettaire et la libération du thromboxane A₂.

III.2.7. L'obésité viscérale

Historiquement, la surcharge pondérale, caractérisée par l'accumulation de tissu adipeux, est définie par des catégories d'indice de masse corporelle (IMC = poids/taille²) :

- IMC de 20 à 25 kg/m² : poids normal
- IMC de 25 à 30 kg/m² : surcharge pondérale
- IMC > 30 kg/m² : obésité
- IMC > 40 kg/m² : obésité morbide

Actuellement, l'obésité viscérale est appréciée par la mesure du tour de taille (>102cm chez l'homme et > 88cm chez la femme). Ce critère du syndrome métabolique,

plus spécifique, présente aujourd'hui un impact plus important sur le risque CV que la surcharge pondérale seule.

L'obésité prédispose non seulement à la résistance à l'insuline et donc au diabète mais aussi à la dyslipidémie. Elle est associée à un risque accru de développement de pathologies CV d'origine athéroscléreuse. Le tissu adipeux est capable de sécréter de nombreuses adipokines dont la leptine et l'adiponectine ainsi que des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α et l'IL-6 (figure 17) [53].

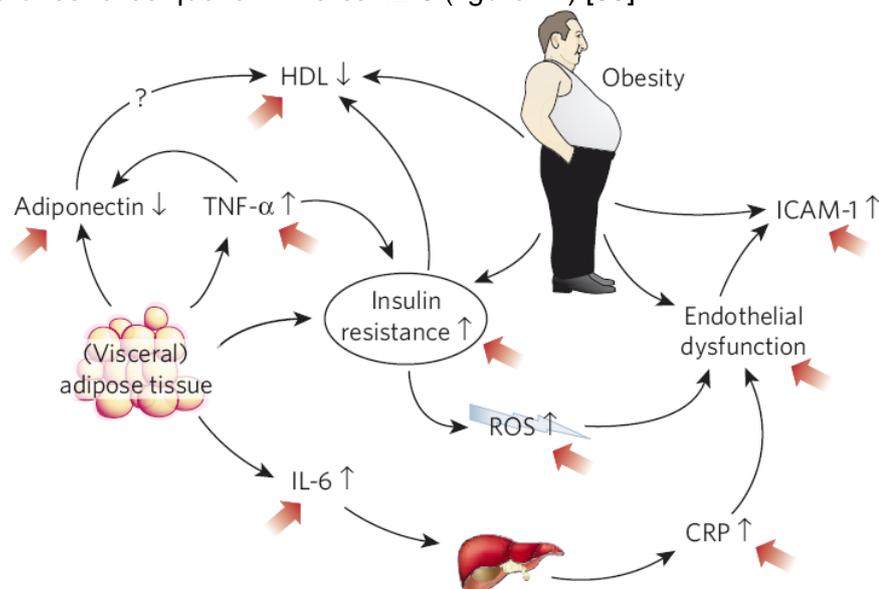


Figure 17 : Implication de l'obésité (flèches noires) et du tabagisme (flèches rouges) dans le développement des maladies CV [53]

III.2.8. La sédentarité et le manque d'exercice physique

Nombreuses sont les études démontrant que la pratique d'activité physique est inversement proportionnelle à l'incidence des maladies CV.

III.2.9. Autres

D'autres facteurs de risque CV sont étudiés, notamment l'hyperhomocystéinémie et le taux de CRP plasmatique :

- l'hyperhomocystéinémie : le taux d'homocystéinémie sérique est plus élevé chez les sujets porteurs d'artériopathie ou de coronaropathie que chez les sujets sains,
- la CRP et autres molécules de l'inflammation (IL-6).

Dans ce travail, nous avons choisi de nous intéresser aux facteurs de risque CV principaux, utilisés dans plusieurs outils de calcul permettant d'évaluer le risque de décès des patients d'une pathologie CV dans les 10 ans [54].

III.3. Prévention des facteurs de risque cardiovasculaire

Les mesures de prévention sont destinées à diminuer l'incidence de survenue ultérieure d'accident CV. On distingue la prévention primaire, qui concerne les individus indemnes de toute pathologie cardiaque ou vasculaire, cliniquement décelable, de la prévention secondaire. Cette dernière s'adresse aux patients ayant déjà présenté un accident CV et a pour objectif d'éviter la récurrence d'accident chez le patient mais aussi de dépister les autres localisations de la maladie athéroscléreuse.

Les actions de prévention sont nombreuses : sevrage tabagique ; traitement et contrôle de l'HTA, du diabète, des dyslipidémies ; maîtrise du poids ; reprise d'une activité physique régulière...

IV. LA RECHERCHE BIOMÉDICALE EN FRANCE

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre d'un protocole clinico-biologique.

La recherche biomédicale est devenue indispensable pour l'amélioration des connaissances en matière de santé humaine. Longtemps cantonnée au domaine thérapeutique de façon à permettre la mise sur le marché de nouvelles molécules, elle a été étendue à d'autres objectifs : cognitif, diagnostique et épidémiologique ; elle permet en effet une meilleure compréhension de la physiopathologie des maladies humaines et sert à développer la prévention, le diagnostic et le traitement de ces maladies.

IV.1. Cadre légal et réglementaire

Les dispositions légales et réglementaires encadrant la recherche biomédicale sur la personne humaine trouvent leur fondement dans la loi n°88-1138 du 20 décembre 1988, dite loi Huriet-Sérusclat (du nom des co-rapporteurs de la loi au Sénat).

La loi Huriet-Sérusclat, relative à la protection des personnes qui se prêtent à des recherches biomédicales, fut la première loi de bioéthique en matière de recherche et a constitué un tournant majeur dans l'encadrement des recherches biomédicales en France. Cette loi a proclamé la primauté de la protection des personnes et a affirmé l'obligation d'un consentement libre et éclairé. Elle a par ailleurs défini le statut des 2 acteurs principaux de cette recherche biomédicale : le promoteur et l'investigateur et a institué les Comités Consultatifs de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale (CCPPRB), depuis remplacés par les Comités de Protection des Personnes (CPP).

La modification majeure apportée à cette loi résulte de la loi n°2004-806 du 9 août 2004 relative à la politique de santé publique et publiée au Journal Officiel le 11 août 2004. Elle rappelle que l'intérêt des personnes qui se prêtent à la recherche biomédicale doit prévaloir sur les intérêts de la science et de la société. Elle renforce les rôles des autorités compétentes.

La recherche biomédicale est définie par le Code français de la Santé Publique (CSP) comme « une recherche organisée et pratiquée sur l'être humain en vue du développement des connaissances biologiques ou médicales ». Elle est autorisée en France, sous réserve du respect des dispositions des articles L.1121-1 et suivants du CSP.

- **Conditions d'expérimentation**

Une recherche ne peut être envisagée sur l'être humain que si certaines conditions sont réunies :

- la recherche doit se fonder sur le dernier état des connaissances scientifiques et sur une expérimentation préclinique suffisante,
- le risque prévisible encouru par les personnes qui se prêtent à la recherche doit être hors de proportion avec le bénéfice escompté pour ces personnes ou l'intérêt de cette recherche,
- la recherche doit viser à étendre la connaissance scientifique de l'être humain et les moyens susceptibles d'améliorer sa condition,
- la recherche doit avoir été conçue de telle façon que soient réduits au minimum la douleur, les désagréments ou tout autre inconvénient prévisible lié à la maladie ou à la recherche,
- le promoteur du protocole clinico-biologique doit recevoir un avis favorable du CPP et l'autorisation de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (AFSSAPS),
- la personne qui se prête à la recherche doit donner son consentement écrit après avoir reçu l'information sur cette étude. Cette information doit être adaptée à sa capacité de compréhension. Elle doit concerner l'objectif, la méthodologie, la durée de l'étude, les bénéfices attendus et les contraintes ; le droit de refuser de participer à cette recherche ou de retirer à tout moment son consentement, l'interdiction de participer simultanément à une autre étude et la période d'exclusion de participation (article L.1122-1 du CSP). Ces informations communiquées doivent être reprises dans un document écrit remis à la personne dont le consentement est sollicité.

IV.2. Acteurs principaux de la recherche biomédicale

- La **personne qui se prête à la recherche** est la personne qui accepte de participer à l'étude.
- Le **promoteur** est la personne physique ou morale (établissement public) qui prend l'initiative d'une recherche biomédicale sur l'être humain, qui en assure la gestion et qui vérifie que son financement est prévu.
- L'**investigateur** est la personne physique qui dirige et surveille la réalisation de la recherche. Celle-ci peut être confiée à plusieurs investigateurs.
- **Les comités de protection des personnes (CPP)**

Les CPP, qui remplacent désormais les CPPRB, sont des acteurs majeurs du nouveau dispositif d'encadrement de la recherche biomédicale. La loi du 9 août 2004 leur confie, en effet, un rôle de co-décideur dans l'autorisation des recherches biomédicales. L'article L.1123-6 du code de la santé publique informe ainsi qu' « avant de réaliser une recherche biomédicale sur l'être humain, le promoteur est tenu d'en soumettre le projet à l'avis du CPP compétent pour le lieu où l'investigateur exerce son activité ». Ainsi, toute recherche ne peut être mise en œuvre qu'après l'avis favorable des autorités compétentes (CPP et AFSSAPS).

Ces comités, agréés par le ministre de la santé au niveau régional, rendent leur avis « sur les conditions de validité de la recherche, notamment au regard de la protection des personnes, l'exhaustivité et l'intelligibilité des informations écrites à fournir ainsi que la procédure à suivre pour obtenir le consentement éclairé, la pertinence de la recherche, l'adéquation entre les objectifs poursuivis et les moyens mis en œuvre »... (article L.1123-7 du code de la santé publique).

Ils sont composés de manière « à garantir leur indépendance et la diversité des compétences dans le domaine biomédical et à l'égard des questions éthiques, sociales, psychologiques et juridiques », comme le précise l'article L.1123-2 du CSP.

Les comités sont également sollicités en cas de constitution d'une collection d'échantillons biologiques humains.

- **L'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (AFSSAPS)**

Il s'agit de l'autorité compétente qui délivre l'autorisation de débiter une recherche biomédicale. C'est à cette autorité que doit être déclarée toute collection d'échantillons biologiques humains (article L.1123-8 et L.1123-12 du CSP).

IV.3. Constitution du dossier de protocole de recherche clinique

Le dossier, soumis aux autorités compétentes précédemment citées, doit contenir différentes informations :

- titre complet de la recherche
- identité et coordonnées du promoteur
- liste du ou des investigateurs (*Curriculum vitae* mentionnant le n° d'inscription à l'ordre des médecins, qualifications...)
- justification et rationnel de l'étude
- hypothèse principale de l'étude et objectifs
- description de l'étude :
 - ❖ méthodologie
 - ❖ lieux et durée de l'étude
 - ❖ modalités de recrutement des personnes (critères d'inclusion et d'exclusion) et procédure mise en œuvre afin d'informer et de recueillir le consentement de ces personnes ou de leurs représentants légaux
 - ❖ nombre prévu de personnes à inclure dans la recherche
 - ❖ procédures d'investigation menées
 - ❖ bénéfices escomptés et risques prévisibles liés aux procédures d'investigation de la recherche
- responsabilités légales : le promoteur doit souscrire un contrat d'assurance garantissant sa responsabilité civile et celle de tout intervenant à l'étude, conformément à l'article L.1121-10 du CSP
- moyens financiers prévus pour la recherche.

CHAPITRE II : OBJECTIFS

Même si différentes théories ont émergé pour expliquer la physiopathologie de l'athérosclérose, il est maintenant clairement établi que les monocytes/macrophages jouent un rôle clé dans l'apparition des lésions athéroscléreuses et leur devenir. Cependant, les mécanismes moléculaires complexes impliqués dans ce processus pathologique restent à être précisés.

Récemment, les sous-populations de macrophages M1 et M2 ont été décrites dans les plaques d'athérosclérose humaines mais leurs fonctions respectives ne sont pas encore bien définies. Notre hypothèse est que ces sous-populations de macrophages infiltrés exercent, selon leur polarisation, des propriétés pro- et/ou anti-athérogènes, qui affectent l'évolution de la pathologie et la survenue d'événements CV.

Bien que de nombreuses études aient permis une meilleure caractérisation de ces 2 sous-populations, peu de données sont disponibles sur les profils d'expression des macrophages M1/M2 pour des acteurs et médiateurs prépondérants de l'athérosclérose.

Par ailleurs, l'athérosclérose est une pathologie chronique évolutive, dont la progression vers des lésions instables plus sévères dépend largement des facteurs de risque CV du patient. A notre connaissance, il existe peu de données dans la littérature concernant l'impact des différents facteurs de risque CV sur le phénotype des sous-populations macrophagiques M1/M2 dans le cadre de l'athérosclérose.

Dans un tel contexte, les objectifs de ce travail sont :

- d'analyser le niveau d'expression et/ou de sécrétion de différents médiateurs impliqués dans la physiopathologie de l'athérosclérose : cytokines inflammatoires (IL-1 β) et anti-inflammatoires (IL-10), acteurs de la coagulation (FT et ses inhibiteurs TFPI et TFPI-2, PAI-1), médiateurs pro-angiogéniques (VEGF) et protéases (MMP-9), au sein des 2 sous-populations macrophagiques M1 et M2 afin de mieux les caractériser. Les macrophages sont différenciés *in vitro* et dérivent des monocytes isolés de prélèvements sanguins issus de 2 populations distinctes de sujets (sujets sains vs patients athéroscléreux).
- d'étudier l'influence des principaux facteurs de risque CV sur ces profils d'expression des macrophages M1/M2 dans l'athérosclérose.

La réalisation de ce travail devrait nous permettre de mieux comprendre l'hétérogénéité fonctionnelle des macrophages dans l'athérosclérose et de déterminer l'impact du phénotype cardiométabolique des patients athéroscléreux sur ces sous-populations macrophagiques M1/M2.

CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES

I. Protocole OPAL-2

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre du protocole clinico-biologique OPAL-2 (Optimized management of Atherosclerosis in various Localizations), approuvé par le Comité de Protection des Personnes (CPP11-15 n°2010-A01401-38) et dont le promoteur et l'investigateur principal sont respectivement, le CHRU de Lille et le Professeur B. Jude.

Cette étude pilote monocentrique, réalisée dans les services de Chirurgie Vasculaire et de Chirurgie Cardiaque du CHRU de Lille, permet l'inclusion de patients majeurs volontaires devant bénéficier respectivement d'une endartériectomie carotidienne (groupe plaque carotidienne, C) et/ou d'un pontage aorto-coronaire (groupe artère mammaire, M). L'étape d'inclusion, débutée en 2011, est prévue sur 3 ans.

- *Inclusion des patients*

Elle est réalisée par les chirurgiens vasculaires et cardiaques de l'Hôpital Cardiologique du CHRU de Lille. Lors de la consultation chirurgicale préopératoire (visite d'inclusion), les patients reçoivent les informations nécessaires portant sur l'étude et leur consentement écrit est recueilli. Les critères de non inclusion à cette étude sont les suivants : patient mineur, objectifs et contraintes de l'étude non expliqués au patient, refus de signer le consentement éclairé de participation à l'étude, patient participant déjà à une recherche biomédicale, femmes enceintes, allaitantes ou parturientes, personnes privées de liberté par une décision judiciaire ou administrative, personnes hospitalisées sans consentement et enfin personnes majeures faisant l'objet d'une mesure de protection légale ou incapable d'exprimer leur consentement.

Un cahier d'observation anonymisé est rempli par le chirurgien qui réalise le geste et par l'investigateur. Ce cahier recueille les principales données clinico-biologiques d'intérêt pour notre étude, décrites ultérieurement (exemplaire du cahier de recueil individuel en annexe 1).

- *Prélèvement et traitement des échantillons biologiques*

Prélèvements sanguins

Les échantillons sanguins sont prélevés après le consentement du patient, le jour du geste opératoire, avant anesthésie et à jeun. Divers dosages biologiques sont réalisés (figure 18). La numération formule sanguine, le dosage du fibrinogène, le bilan lipidique ainsi que la glycémie sont réalisés le jour même dans divers laboratoires du Centre

de Biologie Pathologie (CBP) du CHRU de Lille. Le reste des prélèvements sanguins est aliquoté et conservé à -80°C pour analyse ultérieure par séries.

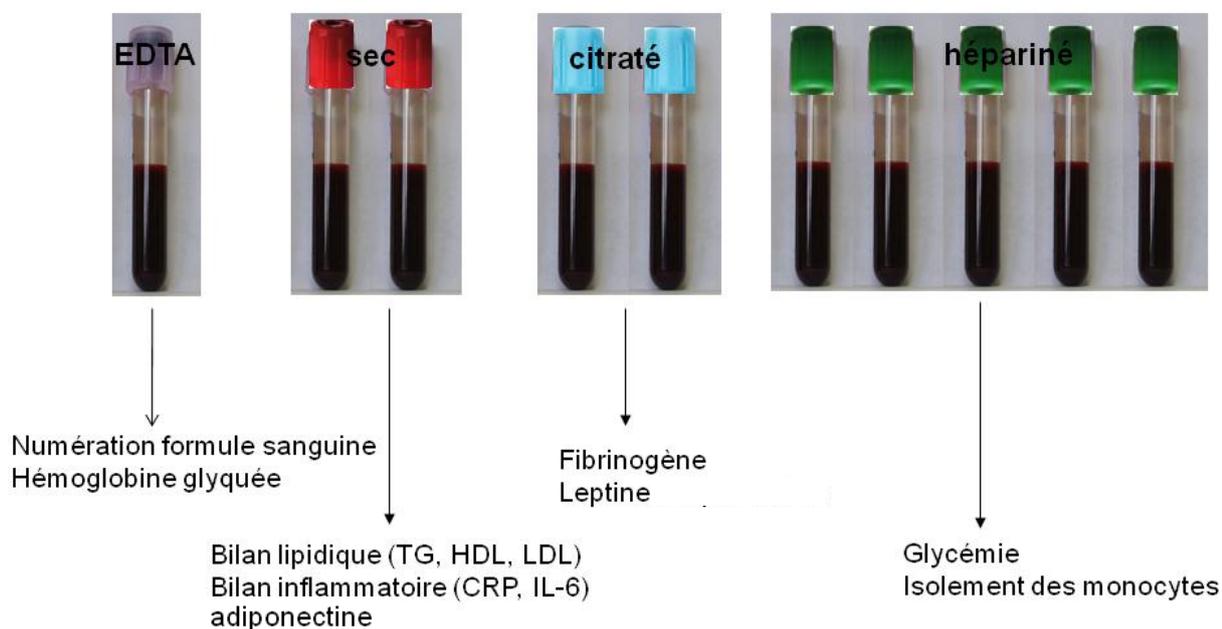


Figure 18 : Nature des prélèvements sanguins du protocole OPAL-2 et dosages biologiques réalisés

Pièces opératoires

Les pièces d'endartériectomie carotidienne et/ou les résidus d'artères mammaires utilisés pour le pontage sont répartis dans des tubes spécifiques (figure 19) :

- congélation dans l'azote liquide pour l'isolement ultérieur des macrophages et des CMLV par microdissection laser (en collaboration avec l'UMR 1011, B. Staels) et l'extraction des ARN,
- incubation dans du sérum physiologique pour la mise en culture puis conservation des CMLV.

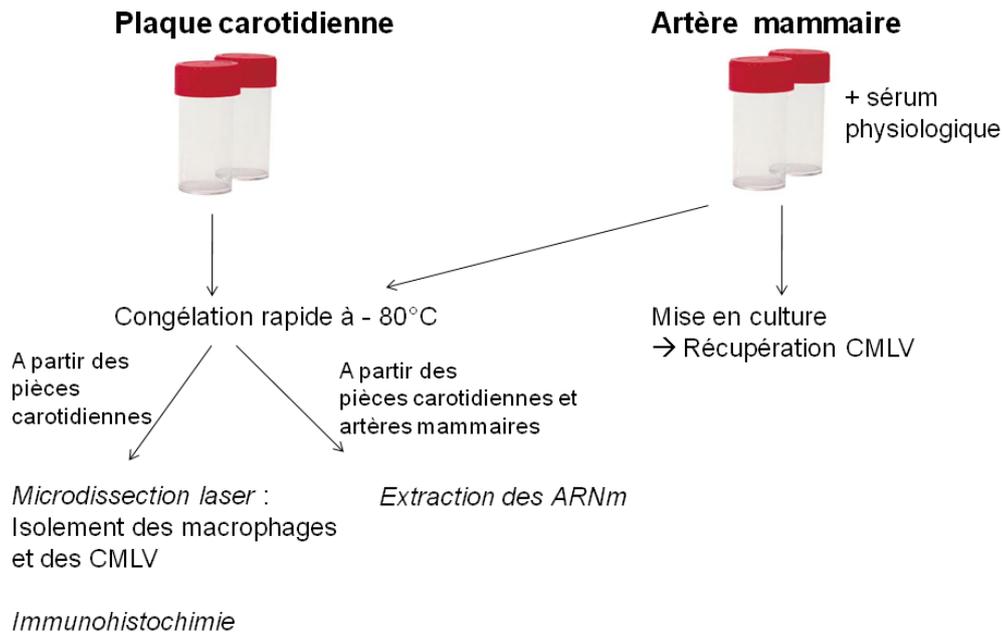


Figure 19 : Nature des prélèvements opératoires et techniques prévues

II. Cohorte de patients

Notre étude a concerné une majorité de patients athéroscléreux pris en charge par les services de chirurgie cardiovasculaire du CHRU de Lille et inclus dans le protocole OPAL-2 au cours de la première année. Une deuxième cohorte de sujets adultes a été étudiée en parallèle : il s'agit de volontaires sains ne prenant pas de traitement médicamenteux et ayant donné leur consentement éclairé autorisant la réalisation de prélèvements sanguins à des fins de recherche.

III. Echantillons

Echantillons sanguins

Les échantillons sanguins prélevés sur tubes héparinés, dédiés à la culture cellulaire, (environ 15ml) sont obtenus des patients athéroscléreux inclus dans le protocole OPAL-2. Le prélèvement sanguin a lieu avant la chirurgie à jeun. Concernant notre population témoin (volontaires sains), le prélèvement a également été réalisé à jeun.

Echantillons d'endartériectomie

Les pièces opératoires sont rapidement (dans les 15 minutes après l'endartériectomie), congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

IV. Méthode

IV.1. Isolement des monocytes sanguins

La technique de préparation des monocytes est dérivée de celle de Boyum [55]. Les PBMC (Peripheral blood mononuclear cell) ou cellules lympho-monocytaires sont isolées à partir de 15ml de sang périphérique dilué au demi dans du PBS 1X (Gibco,BRL)/EDTA 0,1% (Sigma), par centrifugation sur Ficoll (d=1,077, Eurobio), selon un gradient de densité (figure 20).

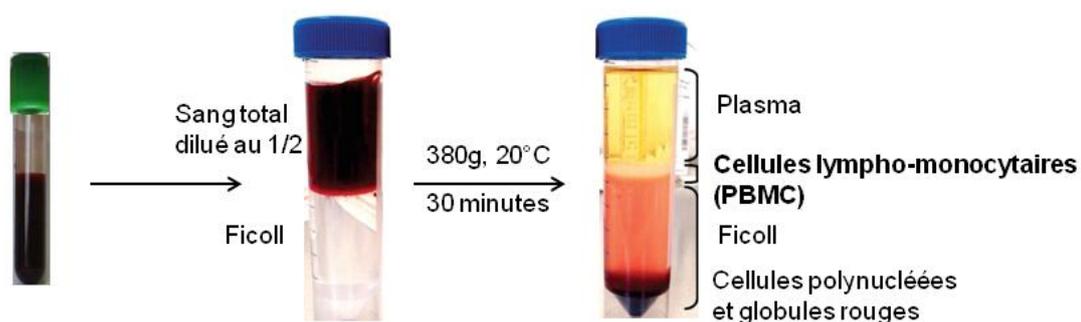


Figure 20 : Etape d'isolement des PBMC par centrifugation sur Ficoll

Après récupération de l'anneau de PBMC et deux lavages successifs en PBS 1X/EDTA 0,1% et en PBS 1X à 370g, 10 minutes, à 20°C, le culot de cellules mononucléées est mis en suspension dans du milieu RPMI 1640 (Gibco) dit de base [avec du tampon Hepes 25 mM (Gibco), supplémenté en L-Glutamine 2mM (Gibco, BRL), pénicilline 20U/ml (Gibco, BRL), streptomycine 20µg/ml (Gibco, BRL) et pyruvate de sodium 1mM (Gibco, BRL)].

La numération des monocytes est réalisée par coloration Giemsa et la viabilité des cellules est évaluée sur cellule de Malassez par la méthode d'exclusion au bleu Trypan (Invitrogen). La pureté cellulaire est vérifiée après dépôt de la suspension de PBMC sur lame de verre par cytocentrifugation (250tr/min, 3min). Les lames sont ensuite colorées au May-Grünwald-Giemsa (MGG) et lues au grossissement x500 et les différentes populations

cellulaires (polynucléaires neutrophiles, éosinophiles, basophiles, lymphocytes et monocytes) sont identifiées sur critères morphologiques.

Les PBMC sont ensuiteensemencées à raison de 500 000 monocytes par puits dans 1ml de milieu RPMI de base sur un support plastique traité Primaria® (plaques 24 puits, Invitrogen) qui favorise l'adhérence des monocytes. Les cellules sont laissées en contact avec le support pendant 1h30, à 37°C, sous une atmosphère humide à 5% de CO₂, temps nécessaire à l'adhésion des monocytes. Après l'incubation d'1h30, les cellules non adhérentes sont éliminées par deux lavages en PBS 1X.

IV.2. Différenciation *in vitro* des monocytes sanguins en macrophages.

La différenciation des monocytes sanguins en macrophages est induite immédiatement après isolement par divers milieux de culture (figure 21). Les conditions étudiées sont réalisées en duplicate. Les différenciations M1 et M2 sont induites respectivement par l'IL-1 β (Peprotech) et l'IL-4 (Peprotech) à la concentration finale dans le puits de 10ng/ml dans du RPMI+10% sérum humain AB.

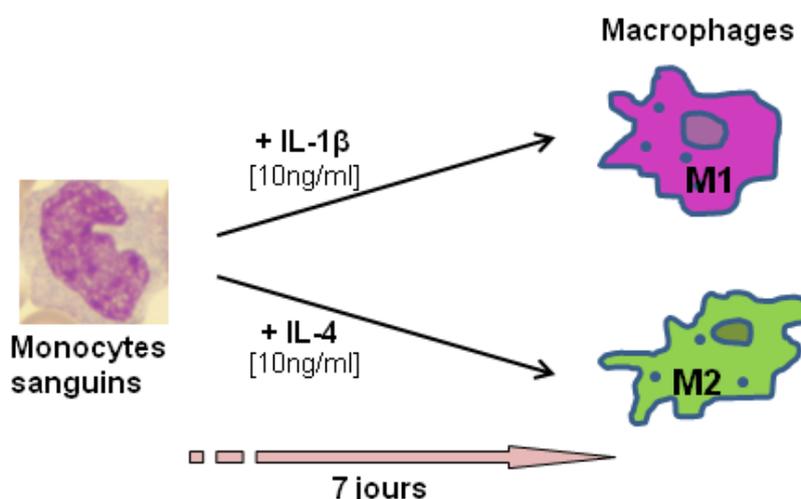


Figure 21 : Conditions de culture et de différenciation des monocytes en macrophages

Après 7 jours de culture, les cellules sont réincubées avec 1ml de RPMI de base (sans sérum) pendant 24 heures.

A J8, les surnageants sont récupérés, ultracentrifugés à 12 000g pendant 12 minutes, aliquotés puis congelés à -80°C. Un puits de chaque duplicate est mis en présence de 1ml de RPMI de base, condition « état basal », l'autre puits est mis en présence de LPS (Sigma) à la concentration finale dans le puits de 100ng/ml, condition « activation ». Après 1h30 d'activation, les surnageants sont récupérés, ultracentrifugés, aliquotés puis congelés à -80°C (figure 22). Les cellules sont ensuite traitées avec 1ml de TRIZOL® (Invitrogen) puis congelées à -80°C pour l'extraction d'ARN.

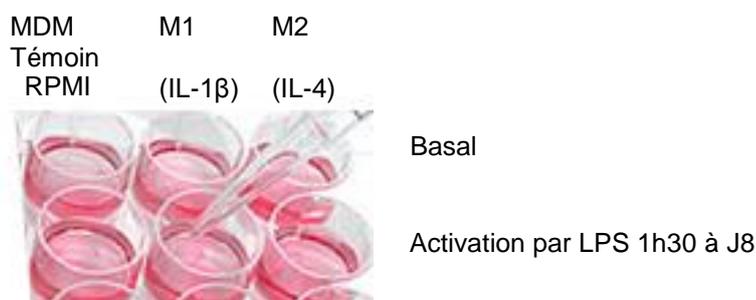


Figure 22 : Schéma de plaque

IV.3. Mesure de l'expression des gènes par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative de type TaqMan®

IV.3.1. Extraction des ARN totaux

Après lyse des macrophages avec 1ml de Trizol® (Invitrogen) et ajout de 0,2ml de chloroforme, le mélange est soigneusement vortexé puis centrifugé à 12 000g à 4°C pendant 15 minutes. Les ARN totaux, recueillis dans la phase aqueuse supérieure, sont précipités par ajout de 0,5 ml d'isopropanol. Après incubation à -20°C pendant au moins 2 heures et centrifugation à 12 000g à 4°C pendant 30 minutes, les culots d'ARN sont lavés dans 1ml d'éthanol à 75% froid, centrifugés à 7500g à 4°C pendant 5 minutes, séchés à l'air libre puis dissous dans 12,5 μ l d'eau traitée par RNase inhibitor. Les ARN sont ensuite utilisés pour la transcription inverse ou conservés à -80°C.

IV.3.2. Transcription inverse des ARN totaux en ADNc

L'ADN complémentaire (ADNc) est obtenu à partir de 4 μ l d'extrait d'ARN totaux par reverse transcription (coffret High Capacity cDNA, Applied Biosystems).

Pour chaque échantillon, un mélange est préparé à base de tampon RT 10X (4 μ l), de dNTP (désoxyribonucléotides) à 100mM (1,6 μ l), d'amorces aléatoires 10X (4 μ l), de transcriptase inverse à 50U/ μ l (2 μ l) et d'eau dans un volume final de 40 μ l. Quatre microlitres d'ARN totaux sont ajoutés au 20 μ l du mélange et incubés à 25°C pendant 10 minutes puis à

37°C pendant 2 heures. Les ADNc sont ensuite dilués au 1/2,5 dans de l'eau stérile et utilisés immédiatement pour la PCR quantitative ou conservés à -20°C.

IV.3.3. PCR TaqMan® quantitative

La PCR quantitative est basée sur la mesure en temps réel de l'émission de fluorescence proportionnelle à la quantité d'amplicons générés au cours de la PCR, reflet de la quantité d'ARN présente initialement dans l'échantillon. Le signal de fluorescence devient significativement supérieur à celui du bruit de fond à partir d'un nombre de cycles d'amplification qui définit un seuil ou Ct (Critical Threshold ou seuil critique), et suffisamment bas pour que les courbes d'amplification soient en phase exponentielle. Le Ct est inversement proportionnel à la quantité d'ADNc spécifique du gène d'intérêt et permet d'évaluer le taux d'expression du gène.

Cette technique est réalisée par un automate TaqMan® (7900HT Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems).

Principe : il repose sur l'utilisation d'une sonde spécifique oligonucléotidique couplée en 5' à un fluorophore émetteur (reporter) et en 3' à un suppresseur (quencher) qui inhibe l'émission du reporter lorsqu'ils sont proches dans l'espace : c'est une sonde TaqMan® initialement non fluorescente. Ces sondes doublement marquées ainsi que les amorces spécifiques utilisées s'hybrident à une séquence cible. Le couplage des amorces sens et anti-sens ainsi que l'action de la Taq polymérase vont permettre d'amplifier l'ADNc par formation d'ADN double brin. La Taq polymérase, de par son activité 5'→3' exonucléasique, hydrolyse la sonde hybridée à sa cible spécifique lors de l'étape d'élongation des amorces. Ce clivage libère le fluorophore, qui émet un signal de fluorescence à chaque cycle d'amplification (figure 23).

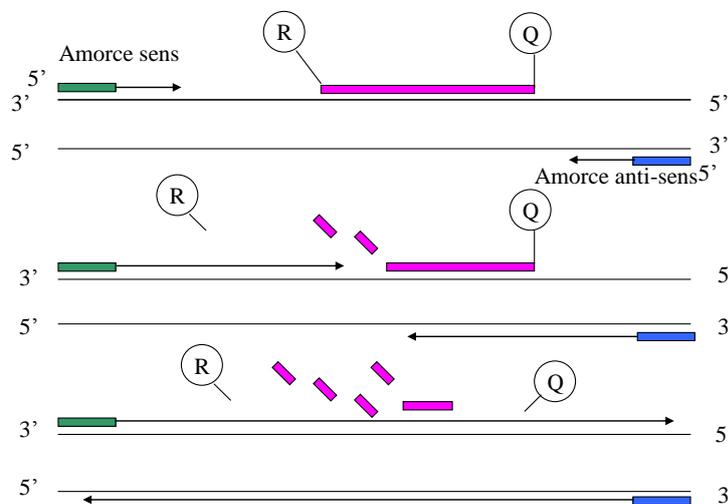


Figure 23: Principe de la PCR quantitative par la méthode TaqMan® (R: reporter, Q: quencher)

Les oligonucléotides constituant les sondes de nos gènes d'intérêt ont été choisis en tenant compte du fait que la sonde s'hybride sur deux exons successifs empêchant l'amplification d'ADN génomique (tableau 2).

Méthodologie : Quatre microlitres de produit de RT sont déposés dans chaque puits d'une plaque de 96 puits en présence de 16µl d'un mélange composé de 10µl de Master Mix contenant la Taq polymérase, le MgCl₂ et les dNTP (Applied Biosystems), de 1µl de mélange commercial (Applied Biosystems) contenant les amorces sens et anti-sens et la sonde TaqMan®, spécifiques du gène d'intérêt et de 5µl d'eau.

L'amplification est réalisée selon le protocole suivant :

- 50°C, 2 minutes
- 95°C, 10 minutes
- 50 cycles comprenant une étape de dénaturation (95°C, 15 secondes) puis une étape combinant hybridation et élongation réalisée à une température identique (60°C, 1 minute), la sonde ne pouvant être clivée lors de l'extension des amorces que lorsqu'elle est hybridée à son brin complémentaire.

Les réactions de PCR sont réalisées en duplicate et une moyenne des Ct est calculée pour chaque échantillon.

Tableau 2 : liste des amorces et sondes TaqMan® utilisées

Gène testé	Référence ou séquence amorces + sonde (5' – 3')	Fournisseur
TNFα	Hs00174128_m1	Applied Biosystems
IL-6	Hs00985639_m1	
IL-1RA	Hs00893625_m1	
MR	Hs00267207_m1	
IL-1β	Hs01555410_m1	
IL-10	Hs00961622_m1	
MMP-9	Hs00234579_m1	
FT	Hs00175225_m1	
PAI-1	Hs01126604_m1	
TIMP-1	Hs00171558_m1	
TFPI	Amorce sens : GACTCCGCAATCAACCAAGGT Amorce anti-sens : CTGTCTGCTGGAGTGAGACACC Sonde : FAM-CAGCCTTTTTGAATTCACGGTCCCTCA-MBG	
TFPI-2	Amorce sens : GCAACGCCAACAATTTCTACAC Amorce anti-sens : CGGCAAACCTTTGGGAACTTTT Sonde : FAM-TTGCGACGATGCTTGCTGGAGG-TAMRA	
VEGF	Amorce sens : TTGGGTGCATTGGAGCCT Amorce anti-sens : GCTGCGCTGATAGACATCCAT Sonde : FAM-CCATGCCAAGTGGTCCCACGCT-TAMRA	
Abelson	Amorce sens : TGGAGATAAACTCTAAGCATAACTAAAGGT Amorce anti-sens : GATGTAGTTGCTTGGGACCCA Sonde : FAM-CCATTTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT-TAMRA	Eurogentec

Normalisation de l'expression des résultats : la quantification de l'expression des gènes est calculée par la méthode comparative des Ct. Elle permet de comparer, à la fois pour le gène de référence, gène constitutif (Abelson) et pour le gène d'intérêt, les valeurs de Ct des échantillons patients versus les Ct du calibrateur, correspondant ici à un échantillon patient qui est repris à chaque série pour se prémunir de toute variabilité inter-séries et permettant de comparer les échantillons entre eux.

Les résultats sont exprimés sous la forme : $2^{-\Delta\Delta Ct}$ où $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{échantillon})} - \Delta Ct_{(\text{calibrateur})}$

$\Delta Ct_{(\text{échantillon})}$ correspond à une valeur de Ct pour chaque échantillon rapportée au gène de référence et le $\Delta Ct_{(\text{calibrateur})}$ correspond à la valeur de Ct du calibrateur rapportée au gène de référence.

IV.4. Dosages ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) dans les surnageants de macrophages

Ces dosages immunoenzymatiques sont basés sur les interactions spécifiques antigène – anticorps, en utilisant 2 anticorps dirigés contre des épitopes différents de la protéine à doser. Les surnageants de macrophages sont incubés avec l'anticorps primaire coaté sur les parois d'une microplaque de 96 puits. Après élimination du surnageant et plusieurs lavages, l'anticorps secondaire polyclonal couplé à la peroxydase est ajouté. L'activité de la peroxydase est révélée par le substrat chromogène TMB (tétraméthylbenzidine). La réaction est stoppée par l'ajout d'une solution d'acide sulfurique 1M et l'intensité de coloration est évaluée par mesure de l'absorbance à 450nm à l'aide d'un spectrophotomètre (figure 24). La concentration de la protéine d'intérêt est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée à partir de dilution d'un standard de concentration connue en protéine.

Les concentrations de TFPI et de PAI-1 dans les surnageants de culture des macrophages M1 et M2 ont été déterminées à l'aide de trousse commerciales Quantikine® (R&D Systems Inc.) suivant les instructions du fournisseur. Les produits de la réaction ont été lus avec un spectrophotomètre lecteur de microplaques (ELx808, BioTek). Les kits utilisés ont un seuil de détection de 2,2 pg/ml et de 0,06 ng/ml pour respectivement le TFPI et le PAI-1.

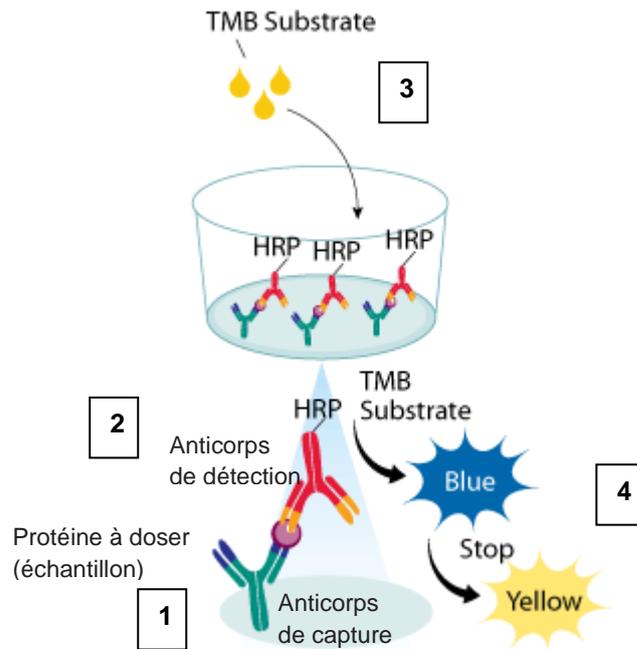


Figure 24 : Principe du dosage ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), selon R&D Systems Inc.

Concernant le dosage de la MMP-9 active, nous avons utilisé la trousse commerciale Fluorokine® (R&D Systems Inc.), basée sur la protéolyse d'un substrat spécifique par l'enzyme active, à doser. Ce clivage libère du quencher, le fluorophore qui émet un signal de fluorescence mesuré par un fluorimètre (MFX, Dynex technologies, Inc.) (figure 25). Ce kit a un seuil de détection moyen de 0,005 ng/ml (0,002 - 0,01).

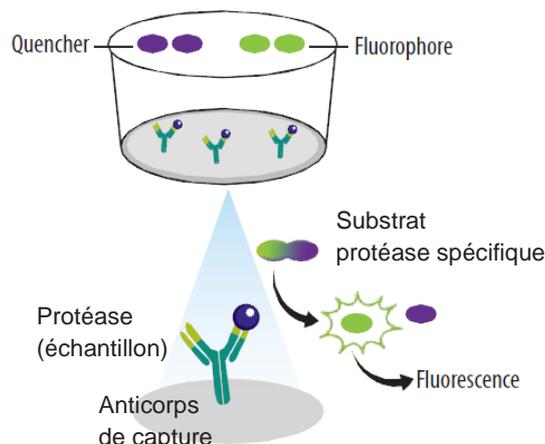


Figure 25 : Principe de la technologie Fluorokine®, selon R&D Systems Inc.

IV.5. Dosages biologiques des marqueurs circulants

IV.5.1. Exploration glycémique (glycémie, HbA1c et insulinémie)

La glycémie à jeun a été déterminée le jour du prélèvement par la technique enzymatique de référence (hexokinase) avec détection spectrophotométrique sur Modular (Roche Diagnostic) dans le service de Biochimie automatisée du CBP du CHRU de Lille.

L'hémoglobine A1 glyquée (HbA1c) a été dosée, à partir de sang EDTA total, par la technique CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) en échange d'ions (VARIANT™ II TURBO, Biorad) dans le laboratoire de Biochimie, secteur des protéines du CBP. Elle constitue le reflet de la glycémie moyenne des 2 à 3 mois précédant le prélèvement, il s'agit donc du paramètre le plus objectif du contrôle glycémique à moyen terme.

L'insulinémie est dosée dans le sérum par technique ELISA à l'aide d'une trousse commerciale Quantikine® (R&D Systems Inc.).

IV.5.2. Bilan inflammatoire (CRPus et IL-6)

La CRPus (ultra-sensible) sérique est dosée par technique néphélométrique sur automate (BN™ II, Siemens) dans le secteur des protéines du laboratoire de Biochimie. Le dosage de la CRP dans les valeurs basses au cours de l'inflammation chronique à bas bruit, générée notamment par les phénomènes d'athérogenèse, trouve son intérêt dans le dépistage et l'évaluation du risque CV en prévention primaire. Un taux de CRPus < 1 mg/ml est associé à un risque faible, un taux compris entre 1 et 3 mg/ml à un risque modéré et un taux > 3 mg/ml est associé à un risque élevé. Par ailleurs, l'association de ce dosage à d'autres facteurs de risque (bilan lipidique) augmente sa valeur prédictive. En revanche, sa valeur pronostique dans le suivi de patients ayant subi un accident CV, donc en prévention secondaire, comme c'est le cas dans notre étude (patient athéroscléreux) est en cours d'évaluation.

Les taux circulants d'IL-6 sont déterminés par technique ELISA à l'aide d'une trousse commerciale Quantikine® (R&D Systems Inc.).

IV.5.3. Exploration lipidique

Les concentrations sériques des triglycérides (TG), du cholestérol total et du HDL-cholestérol (HDL-C) ont été déterminées par méthode enzymatique colorimétrique en point final à la lipase pour les TG et à la cholestérol estérase pour le cholestérol. Ces analyses ont été réalisées sur automate Architect® (Abbott) dans le secteur des lipides du laboratoire de Biochimie. Le taux sérique de LDL-C a été calculé à partir des valeurs des 3 paramètres précédents selon la formule de Friedwald.

IV.5.4. Marqueurs du syndrome métabolique

L'adiponectine et la leptine, 2 adipokines, ont été dosées, respectivement, à partir de sérums et de plasmas citratés par technique ELISA sur plaque à l'aide d'une trousse commerciale Quantikine® (R&D Systems Inc.).

IV.6. Constitution d'une base de données clinico-biologiques des patients

Pour chacun des patients inclus dans le protocole OPAL-2, diverses données biologiques sont accessibles concernant les bilans inflammatoire, glycémique et lipidique. Ces données ont été extraites du logiciel informatique Molis V4 des laboratoires du Centre de Biologie Pathologie du CHRU de Lille.

Concernant les données d'intérêt pour notre étude, à savoir les données démographiques (sexe, âge), cliniques (symptomatologie artérielle ischémique AVC, coronopathie, artériopathie des membres inférieurs), les facteurs de risque CV (antécédents CV familiaux et personnels du patient, tabagisme, diabète, dyslipidémie, HTA...) et les informations sur le traitement médicamenteux suivi par le patient, elles sont recueillies lors de l'inclusion, la veille du geste chirurgical, par le chirurgien dans un cahier d'observation anonymisé. Toutes ces informations issues des cahiers d'observation ont été vérifiées et complétées par la consultation des dossiers cliniques des patients, puis récoltées pour constituer la base de données clinico-biologiques de ce protocole. Une partie de ces données a été exploitée dans le cadre de ce travail.

IV.7. Exploitation statistique des données

Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne (écart-type) ou de nombre (pourcentage) selon le type de variables. L'étude statistique des résultats est réalisée à l'aide de tests statistiques non paramétriques, le test de Wilcoxon pour les échantillons appariés, de Mann-Whitney pour les variables quantitatives et de Kruskal-Wallis pour la comparaison de plusieurs groupes entre eux (plus de 2 groupes). Les corrélations entre les différentes variables continues sont évaluées à l'aide du coefficient de corrélation de Spearman. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel Statview (version 4.5). Les tests sont considérés comme statistiquement significatifs lorsque $p < 0,05$. Les graphiques sont réalisés avec le logiciel GraphPad Prism 5.02 ou Excel 2007.

CHAPITRE IV : RESULTATS

I. DESCRIPTION DE POPULATION

Notre cohorte de patients athéroscléreux, décrite ci-dessous, est constituée de 35 patients inclus dans le protocole OPAL-2. Nous avons analysé, en parallèle, 10 échantillons sanguins de sujets sains qui constituent dans cette étude le groupe contrôle.

I.1. Données démographiques

- Age lors de l'inclusion

La moyenne d'âge des patients lors de leur inclusion est de 64 ± 9 ans. Le sujet inclus le plus jeune est âgé de 47 ans et le plus âgé de 84 ans. Comme nous pouvons l'observer sur la figure 26, près de 60% des patients inclus ont moins de 65 ans.

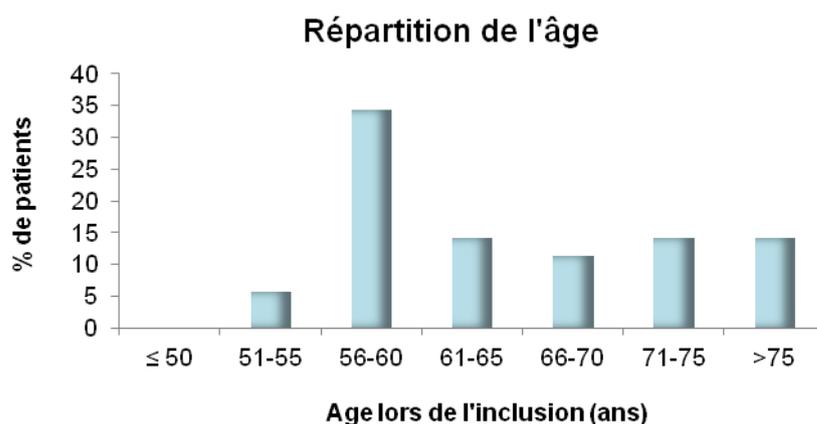


Figure 26 : Répartition de l'âge des patients lors de l'inclusion dans le protocole OPAL-2

- Sexe

Les femmes ne représentent que 20% des sujets inclus ce qui est en accord avec les données de la littérature qui soulignent que les hommes sont plus fréquemment touchés que les femmes par la maladie athéroscléreuse.

I.2. Données cliniques

- Répartition par service

Parmi ces patients inclus, hospitalisés dans des services de chirurgie cardiaque ou vasculaire, 24 sujets (69%) ont bénéficié d'un pontage aorto-coronarien et 13 (37%) sujets

ont bénéficié d'une endartériectomie carotidienne ; parmi ces patients, 2 ont subi une double intervention et ont séjourné dans le service de chirurgie cardiaque (figure 27).

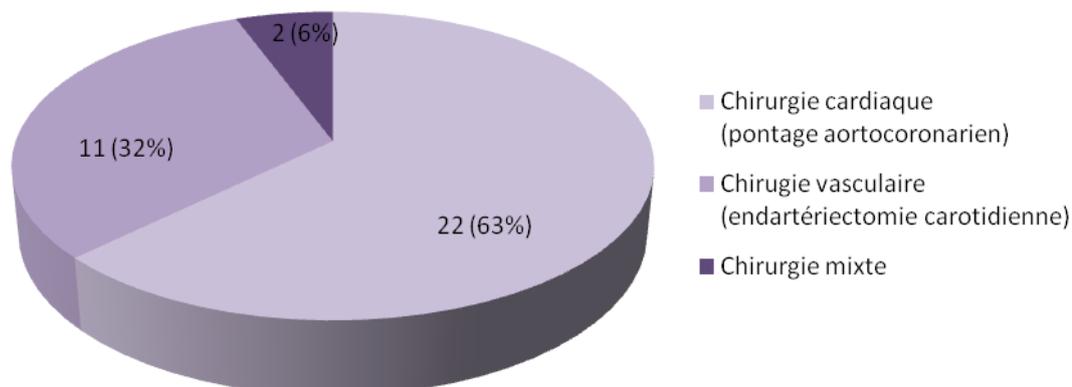


Figure 27 : Répartition des sujets inclus dans le protocole OPAL-2 par type de chirurgie

- Groupe « carotide » : patients bénéficiant d'une endartériectomie carotidienne (n=13)

Dans ce groupe, seulement 2 patients ont présenté une symptomatologie liée à la présence de lésions athéroscléreuses carotidiennes (AVC). Les plaques étaient asymptomatiques pour les autres patients inclus dans ce groupe.

Concernant la carotide ayant fait l'objet de l'endartériectomie carotidienne, il s'agit dans 8 cas sur 13 de la carotide droite. L'imagerie (échographie ou IRM des troncs supraaortiques) a permis de déterminer le pourcentage de sténose, évaluée en moyenne à 78% et d'apprécier l'aspect morphologique des lésions carotidiennes : thrombus, calcification ou resténose. Ces dernières données ne sont pas disponibles pour tous les patients. Il sera possible lors de l'étude macroscopique et immunohistochimique ultérieure des plaques de préciser les caractéristiques des lésions.

Quatre patients (soit 31%) ont déjà été opérés de la carotide controlatérale qui présentait souvent les mêmes caractéristiques morphologiques.

Dans la moitié des cas environ (6/13, 46%), ces patients ont des antécédents coronariens. Parmi ces patients, un tiers sont suivis pour infarctus du myocarde (IDM), un patient a bénéficié d'un pontage coronaire et 3 d'une angioplastie.

Enfin, près de la moitié (6 patients) souffrent d'artériopathies oblitérantes des membres inférieurs (AOMI).

- Groupe « Mammaire » : patients bénéficiant d'un pontage aorto-coronarien (n=24)

Certains des patients inclus dans ce groupe ont des antécédents d'IDM (9 cas), déjà traités par angioplastie (dans 56% des cas).

Le pontage aorto-coronarien est programmé pour tous les patients inclus. Il est indiqué dans plusieurs situations pathologiques : ischémie silencieuse (46%), angor stable (38%) ou instable (16%).

La coronarographie a permis de mettre en évidence le nombre de vaisseaux sténosés et leur localisation avant le geste chirurgical. Les patients de ce groupe ont été regroupés en fonction de la sévérité de leur maladie athéroscléreuse, notamment en fonction du nombre de vaisseaux sténosés (tableaux 3 A et B). Sept patients soit 30% des patients ont une fraction d'éjection du ventricule gauche réduite ($\leq 50\%$).

Tableau 3 : Répartition des patients selon les données coronarographiques

A : nombre de vaisseaux sténosés,

B : nature des vaisseaux sténosés (IVA : artère intraventriculaire antérieure, Cx : artère circonflexe, Dte : artère coronaire droite, TC : tronc commun)

A

<i>Sévérité de l'athérosclérose</i>	<i>Nombre de vaisseaux sténosés</i>	<i>Nombre de patients (%)</i>
modérée	1	5 (21)
	2	5 (21)
sévère	3	12 (50)
	4	2 (8)

B

<i>Nature des vaisseaux sténosés</i>	<i>Nombre de patients (%)</i>
IVA	23 (96)
Cx	16 (67)
Dte	13 (54)
TC Gauche	4 (17)

I.3. Principaux facteurs de risque cardiovasculaire

Les principaux facteurs de risque d'athérosclérose ont été recherchés chez les patients inclus. Leur fréquence est rapportée dans le tableau 4. En général, les patients cumulent plusieurs facteurs de risque.

Tableau 4 : Fréquence des principaux facteurs de risque CV chez les 35 patients inclus dans le protocole OPAL-2

Facteurs de risque cardiovasculaire	n (% de patients)
Diabète	15 (43)
HTA	27 (77)
Tabagisme (actif ou sevré)	26 (74)
Dyslipidémie	29 (83)
Obésité	
IMC > 30 kg/m ²	11 (31)
Tour de taille > 102cm (n=21)	10 (55)
Syndrome métabolique	18 (51)

Tous les patients diabétiques inclus sont de type 2.

Les patients sont divisés en 2 groupes selon la présence ou non d'un syndrome métabolique (Smet) dans chacun des groupes (Mammaire ou Carotide) : groupes M1 et C1 présentant un Smet et groupes M2 et C2 ne présentant pas de Smet. Les patients définis comme Smet+ doivent présenter au moins 3 des 5 critères suivants : un tour de taille >102 cm (hommes)/>88 cm (femmes), une glycémie à jeun $\geq 1,1$ g/l ou un diabète traité, un taux de triglycérides $\geq 1,5$ g/l, un taux d'HDL-cholestérol $< 0,4$ g/l (hommes)/ $< 0,5$ g/l (femmes) ou une dyslipidémie traitée, une pression artérielle $\geq 130/85$ mmHg ou une HTA traitée (selon le NCEP-ATP III).

I.4. Données biologiques et traitements au moment de l'inclusion

- Marqueurs de l'équilibre glycémique

Nous retrouvons bien des taux d'HbA1c plus importants chez les patients diabétiques (figure 28), suggérant un traitement peu équilibré. Les recommandations de l'HAS, en vigueur dans la stratégie thérapeutique des patients diabétiques, ont retenu un objectif d'HbA1c $\leq 6,5\%$. Ces patients sont pour la majorité d'entre eux traités par voie orale par

biguanide seul ou en association avec un sulfamide hypoglycémiant ou une glitazone. Une minorité (13%) est traitée par insuline injectable.

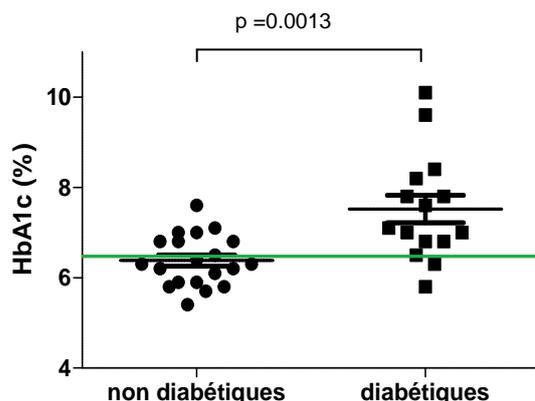


Figure 28 : Taux d'HbA1C selon la présence ou non d'un diabète.
L'objectif d'HbA1c recommandé par l'HAS figure sous la forme d'un trait vert

Nous observons des taux de glucose sanguin et d'hémoglobine glyquée plus élevés chez les patients présentant un syndrome métabolique (groupes M1 et C1) (figure 29). Rappelons que l'hyperglycémie à jeun ($\geq 1,1$ g/L) est un des critères du Smet.

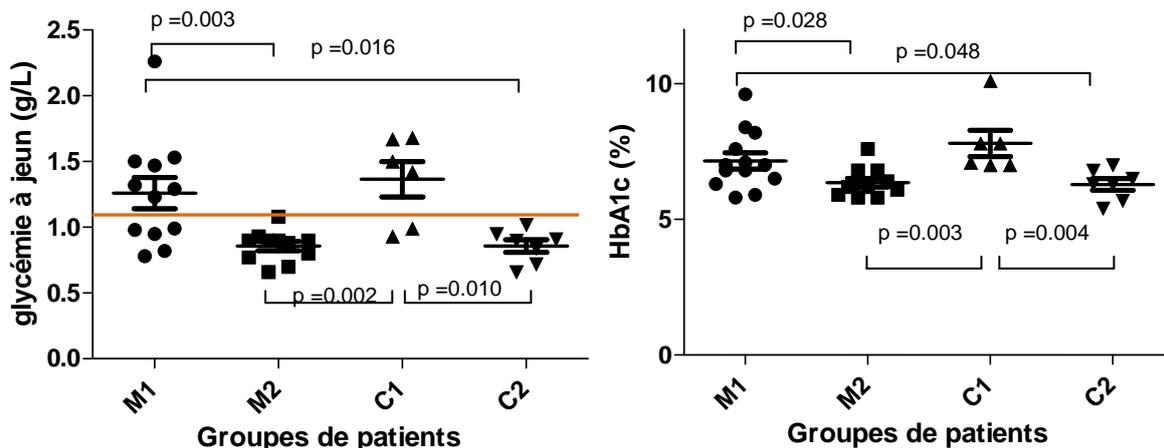


Figure 29 : Marqueurs de l'équilibre glycémique selon les groupes de patients, M : Mammaire, C : Carotide, 1 : Smet+, 2 : Smet-
Le seuil de 1,1g/L de glycémie est représenté par un trait orange

- Marqueurs de dyslipidémie

Nous n'observons pas de différence significative pour les taux sanguins de triglycérides et d'HDL-C entre les différents groupes de patients (figure 30).

Parmi les thérapeutiques hypolipémiantes disponibles, les statines sont les plus souvent prescrites en monothérapie ; de rares associations avec les fibrates (agonistes des récepteurs nucléaires PPAR α , action principalement hypotriglycéridémiant) et l'Ezetrol® (inhibiteur de l'absorption intestinale du cholestérol) ont été observées dans notre cohorte de patients athéroscléreux. Dans certains cas, les statines sont utilisées en prévention primaire.

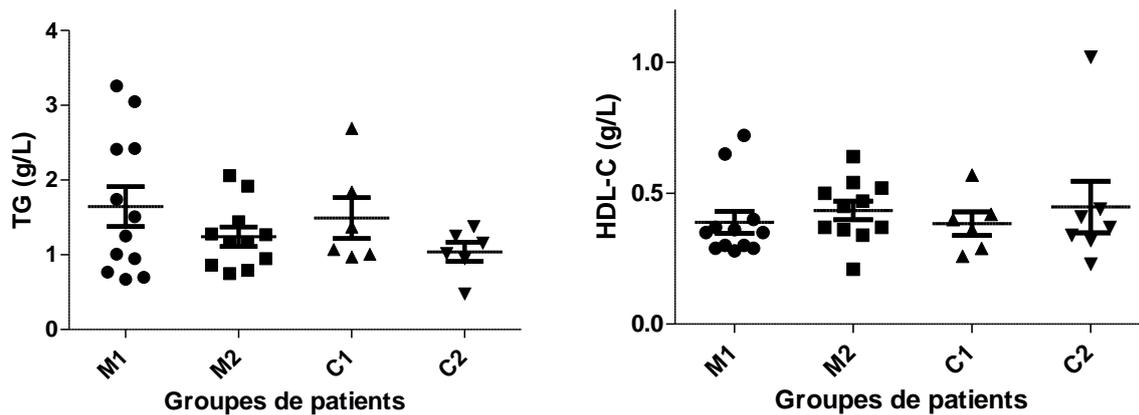


Figure 30 : Marqueurs lipidiques selon les groupes de patients, M : Mammaire, C : Carotide, 1 : SMet+, 2 : SMet-, test de Kruskal-Wallis, $p=0,64$ (TG), $p=0,48$ (HDL-C)

- Marqueurs du syndrome métabolique

Les taux des 2 principales adipocytokines, l'adiponectine et la leptine sont semblables entre les différents groupes de patients (respectivement, $p = 0,73$ et $p = 0,48$, test de Kruskal-Wallis) (figure 31).

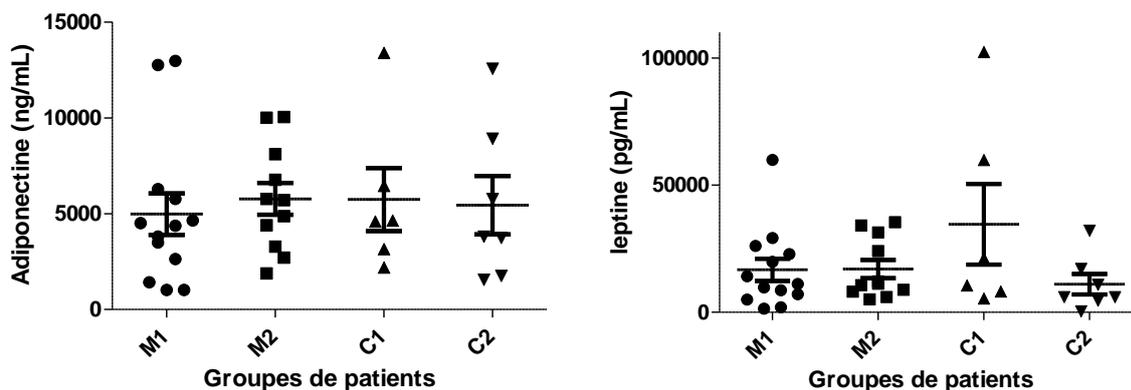


Figure 31 : Marqueurs du syndrome métabolique selon les groupes de patients, M : Mammaire, C : Carotide, 1 : SMet+, 2 : SMet-,

- Hypertension artérielle

Chez les patients souffrant d'HTA, différentes thérapeutiques sont utilisées : les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) chez 69% d'entre eux, les bêtabloquants (85%), les Sartans, antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (27%), les inhibiteurs calciques (23%) et/ou diurétiques (27%). Dans la majorité des cas (60%), le traitement consiste en une bithérapie dont la plus utilisée est l'association d'un IEC avec un bêtabloquant.

II. VALIDATION DES ISOLEMENTS ET CULTURES CELLULAIRES

II.1. Isolement des PBMC

Concernant l'isolement des PBMC, la technique, mise en place au cours de mon Master 2, nous permet d'obtenir une viabilité supérieure à 94%, une pureté cellulaire supérieure à 90% et un rendement de plus de 58%, ce qui est satisfaisant.

II.2. Validation de la culture des macrophages dérivés des monocytes (MDM)

Selon les données de la littérature, différents stimuli peuvent induire *in vitro* la différenciation M1/M2 des macrophages. Nous avons choisi les plus couramment utilisés, soit l'IL-1 β et l'IL-4, pour induire respectivement les phénotypes M1 et M2.

Pour l'IL-4, nous avons choisi une concentration de 10ng/ml correspondant à la concentration la plus utilisée dans la littérature. Pour l'IL-1 β nous avons testé différentes concentrations et avons choisi une concentration de 10ng/ml. C'est à cette concentration que nous avons obtenu à J8 le ratio (expression du TNF α , marqueur M1/ expression de l'IL1-RA, marqueur M2) le plus élevé (figure 32).

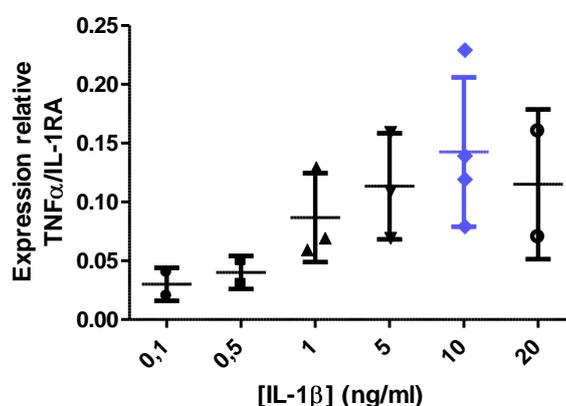


Figure 32 : Ratio de l'expression des marqueurs M1 (TNF α) et M2 (IL-1RA) dans les cultures de macrophages dérivés des monocytes différenciés par différentes concentrations d'IL-1 β , n=2 à 4

Nous réalisons systématiquement à la fin des cultures de MDM un contrôle morphologique et phénotypique de nos cellules.

- Contrôle morphologique des MDM

A J7, nous observons des morphologies compatibles avec les descriptions de la littérature à savoir pour les macrophages M1 des cellules allongées alors que pour les M2 nous observons des cellules plus rondes, granuleuses et présentant des spicules (figure 33).

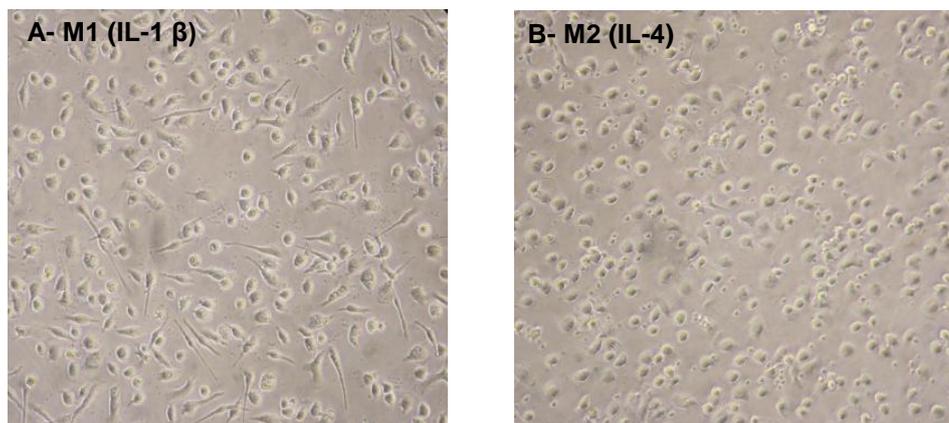


Figure 33: Photos prises au microscope à contraste de phase (Gx200) des MDM après incubation de 7j dans du milieu additionné d'IL-1 β [10ng/ml] (A) ou d'IL-4 [10ng/ml] (B)

- Contrôle phénotypique des MDM :

L'étude d'expression des marqueurs de caractérisation M1/M2 en biologie moléculaire nous a permis de valider les profils M1/M2 (figure 34).

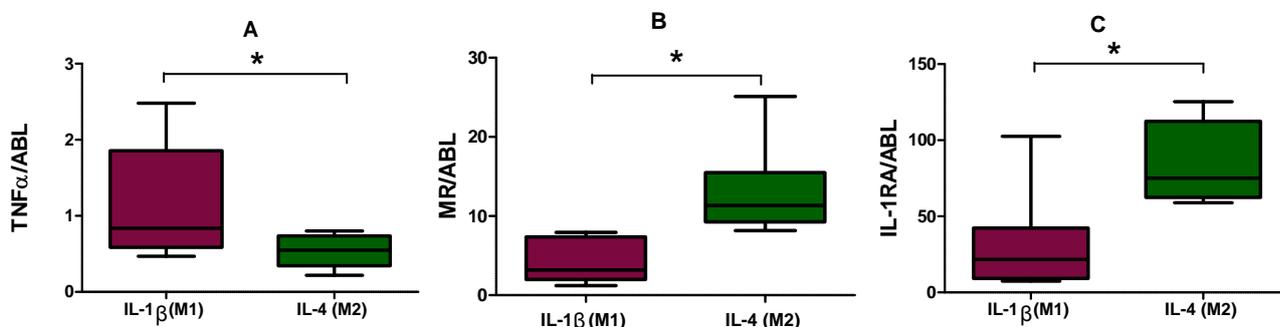


Figure 34: Expression relative à J8 des marqueurs M1 (TNF α) (A) et M2 (MR (B) et IL-1RA (C)) par les MDM différenciés par l'IL-1 β [10ng/ml] ou l'IL-4 [10ng/ml], n=8, * : p<0,05.

III. PROFIL D'EXPRESSION DES MACROPHAGES M1/M2

III.1. MDM de patients athéroscléreux

L'expression de différents médiateurs impliqués dans la physiopathologie de l'athérosclérose a été étudiée au sein des 2 sous-populations macrophagiques M1 et M2, différenciées *in vitro* à partir des monocytes sanguins de patients athéroscléreux inclus dans le protocole OPAL-2 (tableau 5).

Tableau 5 : Expression relative de différents médiateurs de l'athérosclérose dans les macrophages M1 et M2, induits *in vitro*, à partir des monocytes sanguins de patients athéroscléreux, n=35

Marqueurs / types de macrophages		M1	M2	p
Marqueurs de caractérisation				
M1	TNF α	4,1 (4,8)	3,2 (5,1)	0,002
M2	MR	8,9 (5,9)	14 (11)	0,0002
	IL-1RA	40 (44)	86 (45)	<0,0001
Médiateurs de l'athérosclérose				
Equilibre inflammatoire	IL-1β	2,7 (4,0)	1,6 (4,8)	<0,0001
	IL-10	0,38 (0,33)	1,3 (1,1)	<0,0001
Acteurs de l'hémostase	FT basal	4,0 (7,0)	2,4 (2,1)	0,04
	FT (+LPS)	19 (34)	8,4 (11,4)	0,001
	TFPI	2,6 (1,3)	3,2 (1,9)	0,003
	FT/TFPI	2,2 (2,9)	1,1 (1,3)	0,001
	PAI-1	10 (11)	4,4 (5,3)	<0,0001
Angiogenèse	VEGF	0,52 (0,24)	0,78 (0,37)	0,0001
	TFPI-2	0,04 (0,08)	0,01 (0,01)	0,003
	VEGF/TFPI-2	61 (101)	345 (307)	0,0009
	FT/TFPI-2	240 (260)	2190 (4350)	<0,0001
Protéolyse MEC	MMP-9	460 (370)	29 (55)	<0,0001
	TIMP-1	58 (30)	29 (21)	<0,0001
	MMP-9/TIMP-1	12 (11)	1,66 (2,77)	<0,0001
	MMP-9/TFPI-2	38800 (38800)	11800 (16500)	0,003
	MMP-9/PAI-1	74 (76)	13 (27)	<0,0001

Nous observons que parmi les médiateurs étudiés, ceux significativement plus fortement exprimés dans les macrophages M1 sont l'IL-1 β , le facteur tissulaire (avant et après activation par le LPS), le PAI-1, le TFPI-2, la MMP-9 et le TIMP-1, son principal inhibiteur ainsi que les ratios de la MMP-9 rapportée à ses divers inhibiteurs physiologiques MMP-9/TIMP-1, MMP-9/TFPI-2 et MMP-9/PAI-1.

En ce qui concerne les macrophages M2, l'IL-10, le TFPI et le VEGF sont significativement plus fortement exprimés dans ce sous-type de macrophages et les ratios VEGF/TFPI-2 et FT/TFPI-2 y sont augmentés.

Pour comprendre ces différences d'expression retrouvées dans ces 2 types de macrophages et savoir si ces profils d'expression sont spécifiques de la maladie athéroscléreuse, nous avons étudié l'expression de ces mêmes médiateurs dans les macrophages M1 et M2, dérivés de monocytes sanguins de sujets sains.

III.2. MDM de sujets sains

Nous avons donc analysé de la même manière les MDM de sujets sains (tableau 6).

Les macrophages M1 des sujets sains, expriment les mêmes marqueurs que ceux retrouvés dans les M1 des patients athéroscléreux (IL1 β , PAI-1, TFPI-2, MMP-9 et ses différents ratios) hormis la voie du facteur tissulaire à l'état basal (FT et ratio FT/TFPI). En effet, après activation par le LPS, les M1 des sujets sains expriment significativement plus de facteur tissulaire que les M2.

De la même façon, les macrophages M2 des sujets sains expriment plus fortement le VEGF (et augmentation des ratios VEGF/TFPI-2 et FT/TFPI-2) par rapport aux macrophages M1, tout comme ceux des patients athéroscléreux. Cependant, chez ces sujets sains, nous ne notons pas de différence significative d'expression de l'IL-10 et du TFPI entre les macrophages M1 et M2, à la différence des patients athéroscléreux.

Tableau 6 : Comparaison de l'expression relative de différents médiateurs de l'athérosclérose dans les macrophages M1 vs M2, induits *in vitro*, à partir de monocytes sanguins issus de sujets sains, n=10

Marqueurs		p (M1 vs M2)	Expression préférentielle
Marqueurs de caractérisation			
M1	TNF α	0,04	M1
M2	MR	0,005	M2
	IL-1RA	<0,005	M2
Médiateurs de l'athérosclérose			
Equilibre inflammatoire	IL-1β	0,005	M1
	IL-10	0,14	
Acteurs de l'hémostase	FT	0,58	
	FT (après activation par LPS)	0,04	M1
	TFPI	0,88	
	FT/TFPI	0,33	
	PAI-1	0,04	M1
Angiogenèse	VEGF	0,005	M2
	TFPI-2	0,008	M1
	VEGF/TFPI-2	0,008	M2
	FT/TFPI-2	0,01	M2
Protéolyse MEC	MMP-9	0,005	M1
	TIMP-1	0,05	M1
	MMP-9/TIMP-1	0,005	M1
	MMP-9/TFPI-2	0,02	M1
	MMP-9/PAI-1	0,005	M1

III.3. Profil de sécrétion des macrophages M1 et M2

Afin de confirmer les résultats obtenus en ARN, nous avons réalisé, dans les surnageants de culture des 2 sous-types de MDM de patients athéroscléreux, les dosages protéiques de certains médiateurs, notamment ceux impliqués dans l'hémostase (PAI-1 et TFPI) et le remodelage extracellulaire (MMP-9).

Nous observons une sécrétion de PAI-1 et de MMP-9 plus importante par les M1 vs M2 à J8, soit après 24h en présence de milieu de culture sans sérum après 7 jours de culture ($p= 0,0001$, pour les 2). Le TFPI, quant à lui, est significativement plus fortement sécrété par les M2 à J8 ($p=0,02$) (figure 35).

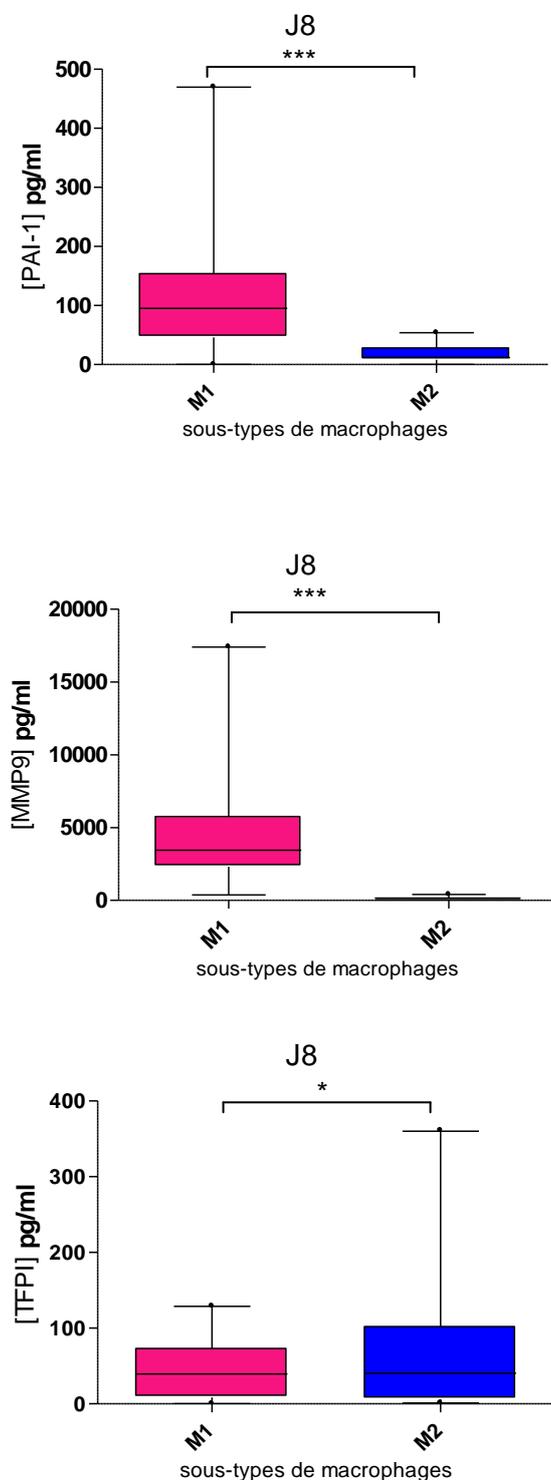


Figure 35: Production et libération du PAI-1, MMP-9 et TFPI dans les surnageants de culture des macrophages différenciés à partir des monocytes sanguins, $n=22$, test de Wilcoxon, * : $p<0,05$; *** : $p<0,001$

IV. INFLUENCE DES PRINCIPAUX FACTEURS DE RISQUE CARDIOVASCULAIRE sur l'expression des médiateurs de l'athérosclérose dans les M1/M2

Nous avons choisi de nous intéresser aux 6 principaux facteurs de risque CV : diabète, dyslipidémie, HTA, tabagisme, sexe et âge [54] ainsi qu'au Smet regroupant plusieurs de ces facteurs de risque.

IV.1. Diabète

Tous les médiateurs étudiés dans les M1 et M2 de patients athéroscléreux ont été comparés entre les sujets diabétiques et les sujets non diabétiques. Parmi ces médiateurs, seuls ceux, dont l'expression est modulée par le diabète, figurent dans le tableau 7.

Nous observons que les macrophages M2 des patients diabétiques expriment plus faiblement l'IL-1RA, marqueur de caractérisation de cette sous-population. Chez les sujets diabétiques, le TFPI-2 est significativement plus faiblement exprimé dans les M1 par rapport aux sujets non diabétiques. De plus, les ratios VEGF/TFPI-2 et MMP-9/TFPI-2 sont plus élevés dans les M1 des diabétiques par rapport aux M1 de sujets non diabétiques.

Tableau 7 : Association entre le diabète et l'expression relative de certains médiateurs de l'athérosclérose dans les 2 sous-populations macrophagiques M1 et M2, n=35

Marqueur	Sous-population	DIABETE		
		-	+	p
IL-1RA	M2	100 (47)	68 (36)	0.05
TFPI-2	M1	0.060 (0.010)	0.012 (0.009)	0.02
VEGF/TFPI-2	M1	26 (21)	120 (150)	0.01
MMP-9/TFPI-2	M1	35100 (46400)	44600 (22600)	0.03

Nous avons voulu connaître si les différences entre les M1 et M2 observées chez les sujets diabétiques étaient reliées aux marqueurs biologiques de ce facteur de risque.

Corrélation entre l'expression des médiateurs significatifs dans le diabète et les marqueurs biologiques de l'équilibre glycémique

Nous observons une corrélation positive entre le ratio MMP-9/TFPI-2 dans les M1 et l'hémoglobine glyquée (figure 36).

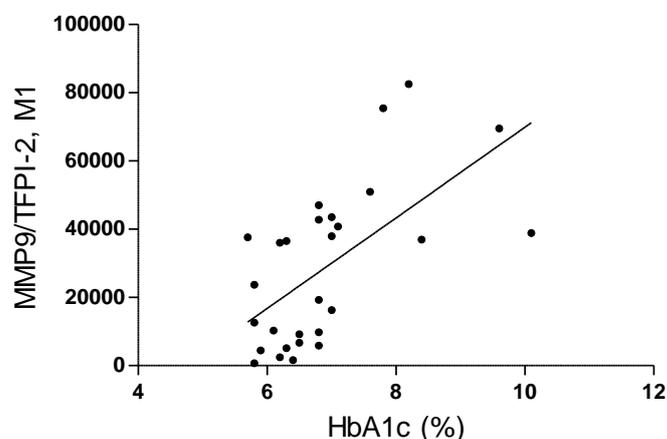


Figure 36: Corrélation entre le ratio MMP-9/TFPI-2 dans les macrophages M1 et l'hémoglobine glyquée, selon le test de Spearman, $n=35$, $\rho=0,411$ et $p=0,024$

De plus, nous observons une tendance concernant une corrélation positive entre l'insulinémie et l'expression du TFPI-2 dans les M1 ($\rho=0,311$, $p=0,0847$).

Nous ne retrouvons pas, par ailleurs, de lien entre l'expression des divers médiateurs au sein des M1 et M2 et la glycémie à jeun des patients.

IV.2. HTA et tabagisme

Nous ne mettons pas en évidence de relation entre ces 2 facteurs de risque CV et les profils d'expression des M1 et M2.

IV.3. Dyslipidémie

La dyslipidémie, définie dans notre étude, regroupe diverses anomalies quantitatives du profil lipidique (hypoHDL, hyperLDL et /ou hyperTG). Lorsque l'on distingue les patients athéroscléreux selon la dyslipidémie telle que définie précédemment, nous n'observons pas de différence significative d'expression des divers médiateurs étudiés au sein des M1 et M2, entre les patients non dyslipidémiques et les patients présentant une dyslipidémie.

Cependant, nous montrons plusieurs corrélations entre l'expression de certains médiateurs et certains paramètres biologiques de l'équilibre lipidique dont l'hypercholestérolémie de type LDL et l'hypertriglycéridémie (tableau 8).

Tableau 8 : Corrélation entre l'expression des médiateurs de l'athérosclérose et les marqueurs biologiques de l'équilibre lipidique, selon le test de Spearman, n=35

Marqueur	Sous-population	HyperLDL	
		rho	p
TNF α	M2	0,420	0,02
TFPI-2	M2	-0,389	0,05
FT/TFPI-2	M2	0,424	0,04

Marqueur	Sous-population	HyperTG	
		rho	p
TFPI	M1	0,502	0,004
	M2	0,437	0,01
TIMP-1	M1	0,334	0,05
	M2	0,417	0,02

IV.4. Syndrome métabolique

Les médiateurs étudiés ont été comparés en fonction de la présence ou non d'un Smet. Seuls les médiateurs dont l'expression est significativement différente entre les 2 sous-groupes de patients figurent dans le tableau 9.

Tableau 9 : Association entre le syndrome métabolique et l'expression relative de certains médiateurs de l'athérosclérose dans les 2 sous-populations macrophagiques M1 et M2, n=35

Marqueur	Sous-population	Syndrome métabolique		
		-	+	p
TFPI-2	M1	0,065 (0,104)	0,013 (0,010)	0,02
FT/TFPI-2	M1	180 (220)	310 (280)	0,04
VEGF/TFPI-2	M1	26 (21)	100 (140)	0,02
MMP-9/TFPI-2	M1	30800 (42900)	48500 (31800)	0,01
IL-10	M2	1,6 (1,4)	0,94 (0,68)	0,03
IL-1RA	M2	100 (49)	69 (34)	0,03
MR	M2	18 (13)	11 (5,7)	0,06

Le SMet est donc associé à des modifications d'expression des divers acteurs de l'athérosclérose. Nous observons, chez les patients présentant un Smet, une expression significativement plus importante dans les macrophages M1, des acteurs de l'angiogenèse (ratios FT/TFPI-2 et VEGF/TFPI-2 plus élevés) et protéolytiques (MMP-9/TFPI-2) alors que leurs macrophages M2 expriment moins d'IL-1RA et d'IL-10.

Outre le diabète, la dyslipidémie et l'HTA (facteurs de risque déjà étudiés séparément), l'obésité viscérale (notamment un tour de taille augmenté) est un des critères du syndrome métabolique.

Le poids des patients, leur tour de taille ainsi que l'IMC sont très bien corrélés entre eux (tableau 10).

Tableau 10 : Corrélations entre les différents paramètres cliniques de l'obésité

	Poids	IMC
Tour de taille	Rho=0,85, p=0,0002	Rho=0,75, p=0,0008
IMC	Rho=0,86, p<0,0001	
Poids		

Le poids des patients est corrélé à l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α dans les M1 (rho=0,356, p=0,04) et inversement corrélé à l'expression de l'IL-10, cytokine anti-inflammatoire, dans les M2 (rho=-0,337, p=0,05). De même, nous retrouvons une corrélation positive entre l'expression du TNF α dans les M1 et l'IMC (rho=0,406, p=0,02) ainsi qu'une corrélation négative entre l'expression de cytokines anti-inflammatoires (IL-10) dans les M2 et le tour de taille (rho=-0,480, p=0,03). Ainsi le surpoids modifie le phénotype inflammatoire des macrophages.

Concernant les adipokines, cytokines sécrétées par le tissu adipeux, nous montrons que le taux circulant de leptine est corrélé à l'expression du TNF α dans les M1 et les M2 (respectivement, rho=0,376, p=0,03 et rho=0,399, p=0,02). Aucune relation entre le taux circulant d'adiponectine et les profils d'expression des M1/M2 n'a été mise en évidence dans notre étude.

IV.5. Sexe

Seule l'expression de l'IL-10 dans les macrophages M2 diffère selon le sexe des patients. En effet, les macrophages M2 des femmes expriment significativement plus de cytokines anti-inflammatoires (IL-10) par rapport aux M2 des patients masculins (2,14 +/- 2,10 vs 1,03 +/- 0,59 ; p=0,05).

IV.6. Age

Concernant l'âge des patients lors de l'inclusion, seule l'expression du TFPI dans les macrophages M1 est inversement corrélée à cette variable (figure 37). Aucune corrélation n'a été retrouvée entre les autres médiateurs de l'athérosclérose étudiés et l'âge des patients.

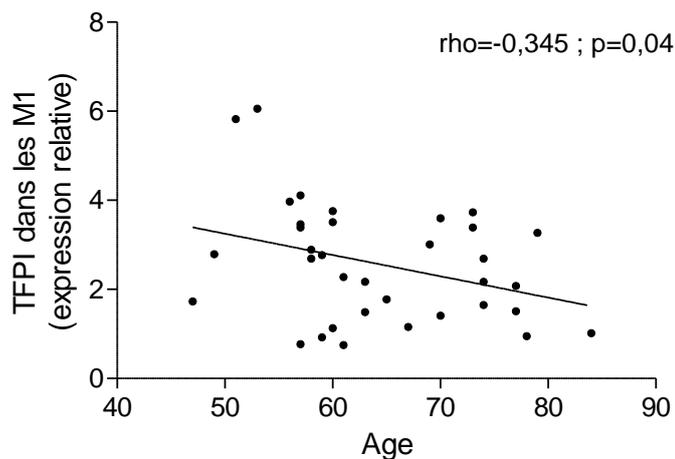


Figure 37 : Corrélation entre l'âge des patients et l'expression du TFPI dans les M1, n=35

IV.7. Marqueurs biologiques de l'inflammation

Nous avons comparé l'expression relative des différents médiateurs impliqués dans la physiopathologie de l'athérosclérose au sein des macrophages M1 et M2, en fonction de l'état inflammatoire (IL-6 sérique et fibrinogène) et du risque cardiovasculaire (CRPus) des patients. Ces marqueurs inflammatoires semblent corrélés à l'expression de certains médiateurs d'athérosclérose (tableau 11).

Tableau 11 : Corrélation entre l'expression des médiateurs de l'athérosclérose et les marqueurs biologiques de l'inflammation, selon le test de Spearman, n=35

Marqueur	Sous-population	CRPus		IL-6 sérique		fibrinogène	
		Rho	p	rho	p	rho	p
FT	M2		ns	-0,363	0,037		ns
TFPI	M1	0,329	0,05		ns	0,380	0,026
VEGF	M2		ns		ns	0,354	0,038
MMP-9	M2		ns	-0,449	0,01		ns
MMP-9/PAI-1	M2		ns	-0,362	0,037		ns

Plus l'IL-6 circulante est importante, moins les M2 expriment de FT et de métalloprotéases telles que la MMP-9.

L'expression de TFPI dans les M1 est corrélée aux taux de CRPus et de fibrinogène.

Concernant le VEGF dans les M2, il est plus fortement exprimé chez les patients présentant un fibrinogène plus élevé.

IV.8. Sévérité de la maladie coronarienne et/ou carotidienne

Les patients ont été regroupés en fonction de la sévérité de leur maladie athéroscléreuse, notamment en fonction du nombre de vaisseaux sténosés pour le groupe « Mammaire » (n=24). L'expression de chaque médiateur dans les M1/M2 a été comparée au sein de chaque groupe de patients.

Nous ne retrouvons pas de lien entre l'expression des divers médiateurs de l'athérosclérose au sein des M1/M2 et la sévérité de la maladie coronarienne des patients.

De la même façon, nous n'avons pas mis en évidence de lien entre les profils d'expression des M1/M2 et le pourcentage de sténose dans le groupe « Carotide ».

CHAPITRE V : DISCUSSION

Les macrophages sont des cellules centrales dans le développement de l'athérosclérose car ils infiltrent la paroi artérielle et peuvent contribuer à un environnement favorable à la progression de la lésion via l'expression et la sécrétion de divers cytokines et médiateurs. Nos objectifs étaient donc d'étudier, dans une population de patients athéroscléreux, le profil d'expression et de sécrétion de médiateurs de l'athérosclérose dans les macrophages M1/M2 et leur modulation par les facteurs de risque CV.

Des étapes d'optimisation des isolements cellulaires et de validation des différenciations cellulaires ont été nécessaires pour la mise en place de ce protocole. Ces étapes ont été réalisées au cours de mon Master 2 Recherche, et ont permis d'obtenir des puretés et viabilités des suspensions cellulaires (PBMC) très satisfaisantes au minimum, respectivement, de 90% et 94%. Nous avons également testé différentes concentrations d'interleukines pour induire les phénotypes macrophagiques d'intérêt puis réalisé différents contrôles morphologiques d'une part et phénotypiques d'autre part pour valider les marqueurs de caractérisation de nos sous-populations macrophagiques par biologie moléculaire. Les marqueurs retenus sont pour les macrophages M1, le TNF α et pour les macrophages M2, le MR et l'IL1-RA. Il s'agit de marqueurs très couramment utilisés dans la littérature pour caractériser le phénotype des macrophages M1 et M2.

Population étudiée

La cohorte étudiée, constituée de 35 patients, est représentative d'une population de patients athéroscléreux puisque les caractéristiques de notre population sont semblables à celles retrouvées dans la littérature en ce qui concerne l'âge moyen des patients, le sex ratio en faveur d'une prédominance masculine et la prévalence de sujets diabétiques [56].

Les patients inclus, sont hospitalisés dans les services de chirurgie cardiaque ou vasculaire, pour subir un pontage aorto-coronarien ou une endartériectomie carotidienne. Notons que le nombre d'inclusions dans le groupe « Mammaire » (chirurgie cardiaque) est plus important que dans le groupe « Carotide » (n=24 vs n=11).

Concernant ce dernier groupe, la majorité des plaques sont asymptomatiques malgré des lésions avancées (sténose, thrombus, calcification) pour certaines, pouvant s'expliquer par une lumière vasculaire suffisante pour permettre une circulation sanguine satisfaisante. Dans la moitié des cas, les patients présentent d'autres manifestations cliniques de l'athérosclérose notamment des IDM et AOMI. Ceci est en accord avec le fait que l'athérosclérose est une pathologie chronique qui peut toucher divers territoires artériels.

Dans le groupe « Mammaire », nous retrouvons une sévérité de la maladie coronarienne avec, pour près de 60% des cas, une athérosclérose qui touche 3 ou 4 artères coronaires.

Notons que dans notre étude, la majorité des patients présente un ou plusieurs facteurs de risque CV. Les plus représentés sont l'HTA, le tabagisme et la dyslipidémie. Pour cette dernière regroupant diverses anomalies quantitatives du profil lipidique, nous n'observons pas de différence significative dans les taux sanguins de triglycérides et d'HDL-C entre les différents sous-groupes de patients. Ceci montre que les troubles lipidiques sont communément retrouvés dans la population athéroscléreuse.

La présence d'un syndrome métabolique permet de distinguer, au sein des 2 groupes (M et C), 2 sous-groupes (M1 et C1, Smet+ / M2 et C2, Smet-). Les patients avec ou sans Smet représentent des effectifs similaires, ce qui permettra dans la suite de ce travail de comparer l'influence du Smet sur les profils d'expression des M1/M2.

Profil d'expression des macrophages M1/M2

Ce travail précise que les monocytes humains peuvent être différenciés en macrophages selon des phénotypes distincts avec des fonctions alternatives potentielles dans l'athérosclérose humaine, en lien avec notamment des expressions variables de médiateurs relatifs à l'inflammation, à la coagulation et au remodelage vasculaire.

Dans ce travail, nous confirmons que les macrophages M1 sont plutôt pro-inflammatoires avec l'expression de taux significativement plus élevés de TNF α et d'IL-1 β , cytokines pro-inflammatoires, alors que les macrophages M2 expriment significativement plus de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10.

Nous nous sommes intéressés à l'expression de divers médiateurs impliqués dans la physiopathologie de l'athérosclérose, au sein de ces 2 sous-populations macrophagiques :

- Acteurs de la coagulation :

Nous observons une expression plus importante du FT, principal initiateur de la coagulation, et du PAI-1, inhibiteur de la fibrinolyse, dans les macrophages M1 par rapport aux macrophages M2, ce qui peut suggérer une activité pro-coagulante et anti-fibrinolytique des M1. Il est clairement établi que le FT est fortement exprimé dans les plaques athéroscléreuses et que les monocytes/macrophages représentent une source principale de FT qui conduit à la formation de thrombus après la rupture de la plaque [57]. Il a été évoqué le rôle agoniste des cytokines de type Th1 sur l'expression du FT dans les monocytes [58]. Concernant le PAI-1, une étude de 2010 montre que l'expression génique du PAI-1 est significativement plus faible dans les M1 vs M2. Cette différence avec nos résultats peut s'expliquer par le fait que les auteurs ont analysé des macrophages extraits de tissu adipeux sous cutané abdominal de sujets obèses ou non, sans traitement et sans antécédent CV [59]. A l'inverse, une étude corrobore nos résultats et montre que la thrombospondine qui joue un rôle important dans l'activation M1 des macrophages associés aux tumeurs induit l'expression de PAI-1 par les monocytes/macrophages [60]. Le PAI-1, en favorisant la stabilité du thrombus, augmenterait le risque CV.

Parallèlement, nous observons que le TFPI, inhibiteur principal de la voie extrinsèque de la coagulation, est plus fortement exprimé dans les M2. Ainsi, le TFPI, présent dans la lésion athéroscléreuse, pourrait inhiber l'activité pro-coagulante du FT qui s'y trouve, permettant de réduire la thrombogénicité des plaques rompues [61]. Il a déjà été montré que l'IL-4 stimule la production par les monocytes humains du t-PA, impliqué dans l'activation de la fibrinolyse suggérant là aussi le rôle potentiel des macrophages M2 dans le contrôle des dépôts de fibrine au niveau des plaques d'athérosclérose [62].

- Acteurs de l'équilibre protéolytique :

Nous mettons en évidence des taux significativement plus élevés de MMP-9 et de son inhibiteur principal, TIMP-1 dans les macrophages M1 vs les M2 ainsi que des ratios MMP-9/TIMP-1, MMP-9/TFPI-2 et MMP-9/PAI-1 nettement supérieurs. Il a déjà été montré que les cytokines inflammatoires telles que TNF α et l'IL-1 β , inductrices du phénotype M1,

entraînent une augmentation de l'expression de MMP-9 dans les MDM [63]. Dans cette même étude, l'expression de TIMP-1 est induite uniquement avec le LPS et non avec les cytokines précédentes. Par ailleurs, l'IL-4, conduisant au phénotype M2, inhibe la biosynthèse des MMP et de TIMP-1 dans les macrophages alvéolaires humains [64]. A contrario, une étude plus récente a montré une sécrétion plus importante de MMP-9 dans les macrophages M2 mais notons que dans ce modèle de M2 induit par IL-4 [10ng/ml], il n'y a pas d'expression d'IL-10 et les auteurs observent une plus forte expression de MCP-1 (marqueur classiquement décrit des M1) dans les M2 [65].

Parallèlement au TIMP-1, le PAI-1 et le TFPI-2 jouent un rôle inhibiteur de la MMP-9. En effet le TFPI-2, présent dans la plaque d'athérosclérose, régule la dégradation de la MEC, en particulier du collagène, via son activité inhibitrice des gélatinases dont la MMP-9 et des protéases de la coagulation telles que la plasmine. Il semble donc avoir un effet stabilisant de la plaque en évitant une activation excessive de la MMP-9 dans les sites inflammatoires [66]. Ainsi les ratios de la MMP-9 rapportée à ses différents inhibiteurs sont un reflet plus fidèle que la MMP-9 seule de la stabilité de la plaque. De plus, la surexpression du TFPI-2 dans les M1 pourrait représenter un mécanisme de régulation négative, en réponse à la surexpression de métalloprotéases par ces macrophages, limitant ainsi la fragilisation de la plaque.

- Acteurs de l'équilibre pro-angiogénique :

Nous observons dans notre étude une expression significativement plus importante du VEGF dans les macrophages M2, ce qui est souvent montré dans des modèles de cancer mais pas encore, à notre connaissance, dans un modèle d'athérosclérose. Les macrophages associés aux tumeurs se caractérisent préférentiellement par un phénotype M2 avec une augmentation de l'expression de VEGF qui stimule l'angiogenèse et favorise la progression tumorale [67]. Cependant l'étude de Lolmede et coll. qui montrait déjà des divergences pour l'expression de MMP-9, met en évidence une expression de VEGF plus importante dans les M1 [65].

A l'inverse le TFPI-2, par inhibition de la plasmine, inhibe la migration cellulaire et l'angiogenèse et joue donc un rôle régulateur important dans ce processus d'angiogenèse [68]. L'expression du TFPI-2 principalement par les CMLV et les macrophages est significativement plus importante dans les lésions athéroscléreuses humaines par rapport aux artères normales [69]. Nous montrons que cette molécule anti-angiogénique est

significativement plus fortement exprimée dans les macrophages M1. Le ratio VEGF/TFPI-2, plus élevé dans les M2, traduit mieux la balance angiogénique.

Par ailleurs, rappelons qu'outre son activité pro-coagulante, le FT est un puissant inducteur des phénomènes de prolifération cellulaire et d'angiogenèse, très présents au sein des lésions athéroscléreuses. Ainsi, nous observons un ratio FT/TFPI-2 plus important dans les M2.

Le phénomène d'angiogenèse dans l'athérosclérose est maintenant bien établi. Cependant, cette néovascularisation semble avoir des effets contradictoires. En effet, le VEGF, induit notamment par l'hypoxie, permet le maintien de l'intégrité endothéliale et une meilleure oxygénation des tissus. Néanmoins, le VEGF est associé à la progression de la plaque d'athérosclérose : il augmente la perméabilité vasculaire et potentialise donc le recrutement, l'infiltration et l'accumulation des leucocytes inflammatoires dans la plaque [70]. Cette néovascularisation de l'intima et de la plaque est plus importante dans les plaques symptomatiques [71], les néovaisseaux formés sont souvent immatures, minces et plus facilement rompus expliquant les hémorragies intraplaques et contribuent donc à l'instabilité de la plaque [72].

Afin de comprendre ces différences d'expression observées au sein des 2 sous-types de macrophages et de savoir si ces profils d'expression sont spécifiques de ce contexte pathologique qu'est l'athérosclérose, nous avons étudié l'expression de ces mêmes médiateurs dans les macrophages M1 et M2, dérivés de monocytes sanguins issus de sujets sains.

Nous retrouvons les mêmes profils d'expression entre les MDM de patients athéroscléreux et les MDM de sujets sains, hormis certains médiateurs dont ceux de la voie du FT et de l'inflammation.

En effet, chez les sujets sains, l'expression basale de FT ne diffère pas entre les M1 et M2 et nous ne mettons en évidence une différence d'expression significative qu'après activation des macrophages (par le LPS pendant 1h30 à J8) alors que nous observons chez les patients athéroscléreux, une expression significativement plus importante, dans les macrophages M1, du FT à l'état basal (et après activation). Ceci suggère que les MDM de patients athéroscléreux seraient déjà dans un état activé via notamment les marqueurs inflammatoires circulants bien décrits dans cette population. Par ailleurs, nous n'observons pas de différence d'expression significative du TFPI entre les M1 et M2, chez les sujets sains.

De même, l'absence de différence d'expression significative de l'IL-10 entre les M1 et M2, chez les sujets sains, contrairement aux patients athéroscléreux peut faire évoquer un mécanisme anti-inflammatoire réparateur mis en place chez ces patients en réponse au microenvironnement différent.

Nous confirmons les résultats obtenus en ARN, par le dosage de certains médiateurs dans les surnageants de culture des M1 et M2. En effet, nous retrouvons une sécrétion plus importante dans les M1, de PAI-1 et de MMP-9, impliqués dans le remodelage extracellulaire et une sécrétion accrue de TFPI dans les M2.

La diversité fonctionnelle des macrophages dans l'athérosclérose attire actuellement une attention particulière. Quelques études en relation avec le phénotype des macrophages dans l'athérosclérose ont été publiées récemment.

Une étude de 2011 montre que les MDM de type 1 et 2, induits respectivement par le GM-CSF et le M-CSF, ont des profils transcriptionnels différents (analyse par microarrays puis validation par RT-PCR), avec l'identification de nouveaux gènes candidats dans l'athérosclérose et dont l'expression protéique a été confirmée en immunohistochimie dans les lésions athéroscléreuses humaines [73]. Parmi ces gènes différemment exprimés, les auteurs retrouvent principalement des gènes codant pour des molécules pro- ou anti-inflammatoires, dont la PPBP (pro-platelet basic protein, molécule chimioattractante pour les neutrophiles) plus fortement exprimée dans leurs macrophages M1 (« GM-MØ ») et la stabiline-1 (STAB1), impliquée notamment dans la clairance des cellules apoptotiques, retrouvée principalement dans leurs M2 (« G-MØ »). Aucune donnée sur l'expression des médiateurs de l'hémostase et de l'angiogenèse n'est mentionnée dans cette étude.

De la même manière, Waldo et coll. ont évalué le potentiel athérogène des 2 sous-populations M1 et M2 ; là encore, des monocytes humains circulants ont été différenciés en présence de GM-CSF et de M-CSF (différents des stimuli utilisés dans notre étude). Ils mettent en évidence des différences d'expression de molécules inflammatoires et impliquées dans l'homéostasie lipidique entre les 2 sous-populations de macrophages. La stabiline-1 est de nouveau retrouvée plus fortement exprimée dans les M-MØ (M2). De plus, parmi les nombreuses cibles testées par microarrays (plus de 500 gènes), ils trouvent une expression plus importante du FT dans les GM-MØ (M1) et du TFPI dans les M-MØ (M2) comme dans notre étude ; cependant, nous pouvons critiquer ce modèle puisqu'ils retrouvent une expression plus importante de l'IL-1 α , cytokine pro-inflammatoire, dans les M-MØ (M2) et une plus forte expression de l'IL-1RA (marqueur de caractérisation de la sous-population M2) dans les GM-MØ (M1). Notons que cette étude a porté sur les

monocytes de seulement 3 donneurs sains [74]. Notre étude présente l'avantage d'avoir été réalisée sur un plus grand nombre de sujets (n=45, 35 sujets athéroscléreux et 10 sujets sains), ce qui renforce nos résultats.

L'état d'activation et les fonctions des macrophages sont profondément influencés par la présence de cytokines dans l'espace environnant. Ainsi, les cytokines de type Th1 (IL-1 β) induisent un état d'activation dit «classique» ou M1 qui contribue au maintien d'un état inflammatoire et prothrombotique. En revanche, les cytokines Th2 (IL-4) induisent une activation «alternative» ou M2. La figure 38 résume les phénotypes des M1 et M2, étudiés dans la première partie de ce travail

L'intérêt suscité autour des macrophages alternatifs dans l'athérosclérose est grandissant. Ces macrophages sont présentés comme de nouvelles cibles thérapeutiques de part leurs propriétés anti-inflammatoires. Cette première partie du travail a permis de mieux comprendre leur rôle potentiel dans les plaques athéroscléreuses, en effet, nous montrons ici que les macrophages M2 promouvraient l'angiogenèse et réduiraient la thrombogénicité des plaques rompues. Il est maintenant établi que les sous-types de macrophages peuvent basculer d'un phénotype à l'autre en fonction des stimuli du microenvironnement [75]. Dans l'athérosclérose, cette balance M1/M2 semble cruciale dans le devenir de la plaque. Ce travail devra bien sûr être complété par l'étude des macrophages tissulaires isolés des plaques d'athérosclérose issues des patients inclus dans le protocole ayant bénéficié d'une endartériectomie carotidienne et pour lesquels nous avons conservé les pièces opératoires au laboratoire. La caractérisation de ces sous-populations M1 et M2 tissulaires, notamment leur potentiel thrombogène nous permettra de comparer les résultats obtenus *in vitro* sur les MDM et *in vivo* sur les macrophages tissulaires. L'étude *in vivo* permettra une extrapolation plus pertinente des résultats obtenus vis-à-vis du contexte pathologique étudié.

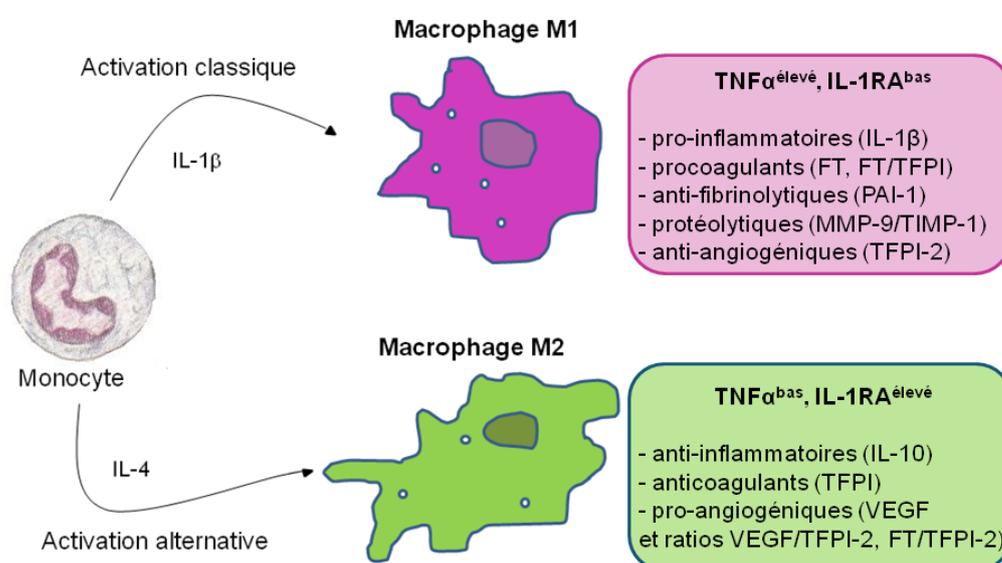


Figure 38 : Profils d'expression des M1/M2

Influence des principaux facteurs de risque CV

Il est aujourd'hui clairement établi, grâce à des études de cohortes, qu'il existe des facteurs de risque CV favorisant le risque de survenue d'événements cliniques d'origine athéroscléreuse. Ce risque est dépendant de la stabilité de la plaque athéroscléreuse, elle-même sous la dépendance de nombreux médiateurs sécrétés par les macrophages infiltrés dans les lésions athéroscléreuses. L'expression de quelques-uns de ces médiateurs vient d'être étudiée et discutée dans la première partie de ce travail.

Il nous a donc semblé intéressant d'analyser l'influence des principaux facteurs de risque CV des patients sur l'expression des médiateurs impliqués dans l'athérosclérose au sein des 2 phénotypes de macrophages, M1 et M2.

Facteurs de risque modifiables

Diabète

De nombreux travaux décrivent, chez les patients diabétiques, des plaques vulnérables, avec notamment un large infiltrat macrophagique expliquant une lumière vasculaire significativement réduite, ainsi que la présence importante de thrombi et de stigmates de rupture de plaque [76]. Peu de données existent sur l'impact du diabète sur le phénotype des macrophages.

Nous montrons, dans ce travail, que le diabète est significativement associé à des profils particuliers d'expression des macrophages M1/M2.

D'une part, nous observons que les MDM des sujets diabétiques présentent une expression altérée des marqueurs M2 (plus faible expression de l'IL-1RA) et donc que leurs monocytes ont une moindre capacité à se différencier vers un phénotype alternatif M2. De la même manière, l'équipe de G. Chinetti montre une expression altérée des marqueurs de caractérisation M2 dans les PBMC des sujets obèses mais aussi une capacité réduite des macrophages à se différencier vers un phénotype M2 sans toutefois observer de différence significative d'expression de ces marqueurs entre les sujets obèses normoglycémiques et les sujets obèses diabétiques [77]. Dans notre étude, le poids et l'IMC ne sont pas corrélés à l'expression des marqueurs de caractérisation M2 dans les macrophages alternatifs. Une autre étude sur un modèle murin de diabète (souris diabétique db/db) a montré une dérégulation du phénotype des monocytes/macrophages avec un défaut de transition du phénotype pro-inflammatoire vers un phénotype réparateur (M2) avec des expressions plus importantes de cytokines pro-inflammatoires et de métalloprotéases et une diminution d'expression des marqueurs M2 (MR), en accord avec nos résultats [78].

D'autre part, l'expression significativement plus faible du TFPI-2 (molécule anti-angiogénique) au sein de la sous-population M1 ainsi que le ratio VEGF/TFPI-2 plus important, suggèrent que les macrophages M1 des patients diabétiques potentialisent l'angiogénèse. Les plaques de patients diabétiques contiennent plus de microvaisseaux et de macrophages qui pourraient exacerber leur fragilité [79]. La proportion de macrophages M1/M2 dans les plaques de patients diabétiques serait un élément clé pour interpréter ces résultats, mais à ce jour elle n'est pas encore connue.

Par ailleurs, chez ces patients, les macrophages M1 ont des propriétés protéolytiques plus importantes (via le ratio MMP-9/TFPI-2).

Kai et coll. ont mis en évidence une augmentation des taux plasmatiques de MMP-9 chez des patients atteints de syndrome coronarien aigu par comparaison à des sujets présentant un angor stable, lesquels ont des taux comparables à ceux de volontaires sains. Les taux de MMP-9 pourraient donc constituer un marqueur d'instabilité de la plaque athéroscléreuse [80]. Plusieurs équipes montrent que le diabète est associé à une augmentation des taux circulants de MMP-9 [81, 82].

Afin de mieux comprendre l'impact du diabète sur ces profils d'expression, nous avons étudié les différents marqueurs biologiques de l'équilibre glycémique (glycémie à jeun, HbA1c et insulinémie).

Parmi ces marqueurs biologiques, seul le taux d'HbA1c, qui reflète l'équilibre du diabète à plus ou moins long terme, est corrélé avec l'activité protéolytique des M1. Ainsi, un diabète peu ou mal équilibré serait associé à la présence de macrophages M1 dont le phénotype est plus délétère. Il s'agit de la première description d'un lien entre la présence d'un diabète et un phénotype macrophagique protéolytique. Gostiljac et coll. montrent une corrélation positive entre l'HbA1c et les taux circulants de MMP-9 totale et active [82].

Dyslipidémie

Lorsque l'on distingue les patients athéroscléreux selon la dyslipidémie globale, regroupant diverses anomalies quantitatives du profil lipidique (hypoHDL, hyperLDL et /ou hyperTG), nous n'observons pas de lien entre ce facteur de risque et l'expression des divers médiateurs étudiés au sein des M1 et M2.

Cependant, nous mettons en évidence plusieurs liens entre l'altération de l'expression de certains médiateurs de l'athérosclérose et l'hypercholestérolémie de type LDL ou l'hypertriglycéridémie. En effet, l'hypercholestérolémie (hyper-LDL) est corrélée avec

un phénotype pro-inflammatoire et proangiogénique des macrophages M2. De la même manière, l'hypertriglycéridémie est corrélée avec l'expression du TFPI et du TIMP-1 dans les M1 et M2.

Concernant l'effet de la dyslipidémie, une étude a montré une augmentation de l'expression de gènes pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF α , ...) dans les MDM de patients avec des taux de HDL-cholestérol bas [83].

Une autre étude montre la régression des lésions d'athérosclérose après correction de la dyslipidémie dans un modèle murin, avec notamment une diminution de l'infiltrat macrophagique (CD68+) et du contenu en lipides ainsi qu'une augmentation du contenu en collagène. De plus, la correction de l'hyperlipémie entraîne au niveau des macrophages intra-plaques des modifications de leur phénotype à savoir une diminution de l'expression des gènes codant pour des molécules pro-inflammatoires et pro-thrombotiques. Les auteurs observent également un enrichissement en macrophages M2 dans les lésions en régression [84].

Récemment, a été décrit, un nouveau phénotype macrophagique, dénommé « Mox », en réponse aux constituants de la plaque notamment aux lipides oxydés, phénotype dont le profil d'expression est différent des M1 et M2 conventionnels, avec une moindre activité phagocytaire et chimiotactique [85]. Ainsi, les lipides oxydés accumulés au sein de la plaque affectent le phénotype et les fonctions des macrophages.

HTA et tabagisme

Nous n'avons pas retrouvé d'influence des autres facteurs de risque CV modifiables (tabagisme et HTA) sur l'expression des médiateurs étudiés. Notons cependant que les effectifs des groupes de patients présentant ou non ces facteurs de risque CV ne sont pas homogènes. En effet, dans notre cohorte, nombreux sont les patients hypertendus et tabagiques (respectivement, 77% et 74%), ce qui peut expliquer que nous ne retrouvons pas d'influence de ces 2 facteurs de risque sur la polarisation des macrophages. Ceci constitue donc une des limites de cette étude.

De nombreuses études épidémiologiques ont montré que le tabagisme est une cause importante de morbi-mortalité CV. Malgré les nombreux travaux décrivant les effets de la fumée de cigarette *in vivo* et *in vitro* sur cellules isolées, les mécanismes biologiques ne sont

pas complètement connus. La fumée de cigarette modifie le profil inflammatoire des monocytes humains [86]. Aucune étude n'a, à ce jour, évoqué l'effet du tabac sur le phénotype des macrophages dans l'athérosclérose malgré plusieurs données en pathologie pulmonaire. En effet dans ce contexte, le tabagisme altère la polarisation des macrophages alvéolaires en diminuant l'expression des gènes associés au phénotype M1 et en augmentant ceux associés au phénotype M2 [87].

Enfin l'impact de l'HTA a été étudié dans un modèle murin d'athérosclérose (ApoE^{-/-}) ; l'administration prolongée d'angiotensine II, molécule hypertensive, induit une vulnérabilité de la plaque (augmentation des macrophages et du contenu lipidique et diminution du collagène et des CMLV) et augmente l'expression dans la paroi vasculaire de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-6) et pour des chimiokines telles que MCP-1 [88, 89].

Syndrome métabolique

Le syndrome métabolique est défini comme étant la résultante d'un ensemble d'anomalies métaboliques et vasculaires telles que les dyslipidémies, le diabète, l'obésité viscérale et l'HTA, jouant un rôle important dans le développement et l'accélération des maladies CV. Nous observons, comme pour le diabète, des profils d'expression différents en présence d'un Smet. En effet, nous mettons en évidence une angiogenèse et une activité protéolytique plus marquées dans les M1 et une activité anti-inflammatoire plus faible dans les M2 des patients présentant un Smet. Nous observons également une altération de l'expression des marqueurs de caractérisation des M2 suggérant une capacité de différenciation vers un phénotype alternatif moindre. Ces résultats obtenus pour le Smet ne sont-ils pas juste le reflet de ce que l'on a déjà décrit avec le diabète ? Pour répondre à cette question, ce travail sera complété ultérieurement par une analyse statistique multivariée.

L'obésité se caractérise par un état inflammatoire chronique de bas niveau avec des taux circulants de médiateurs de l'inflammation. En effet le tissu adipeux est une source de nombreuses molécules contribuant à l'inflammation vasculaire. Nous montrons ici que le poids et le tour de taille des patients sont inversement corrélés à l'expression de cytokines anti-inflammatoires dans les M2 tandis que le poids, l'IMC ainsi que le taux circulant de leptine sont corrélés à l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans les M1. Le surpoids est donc associé à une modification du phénotype inflammatoire des macrophages.

Concernant les résultats que nous obtenons avec la leptine, ceux-ci sont cohérents avec ce qui est décrit dans la littérature. En effet, une étude montre que la leptine régule négativement les taux d'ARNm des récepteurs PPAR γ dans les MDM humains [90]. Ce récepteur PPAR γ , exprimé dans les macrophages des lésions athéroscléreuses humaines, exerce des fonctions anti-inflammatoires. En effet, dans les macrophages « classiques » M1, les agonistes synthétiques de PPAR γ , les glitazones, répriment la transcription des gènes inflammatoires (tels que MMP-9, IL-6, IL-1 α) en interférant négativement avec les voies de signalisation pro-inflammatoires [91]. De plus, les PPAR γ ont un rôle supplémentaire dans le contrôle de la réponse inflammatoire, de par leur capacité à promouvoir la différenciation des monocytes humains en macrophages M2 et donc à augmenter le pouvoir anti-inflammatoire de ces macrophages [46].

Même si nous ne l'avons pas étudié ici, l'exercice physique pourrait avoir un effet anti-inflammatoire en favorisant la polarisation M2 des monocytes-macrophages [92].

Facteurs de risque non modifiables

Concernant les facteurs de risque CV non modifiables, nous montrons que les macrophages M2 des femmes expriment significativement plus de cytokines anti-inflammatoires en comparaison aux M2 des sujets de sexe masculin. Chez la femme, ces macrophages M2 se révèlent alors plus efficaces dans la réponse anti-inflammatoire. Ceci est en accord avec le fait que les plaques carotidiennes, issues de patientes devant subir une endartériectomie carotidienne, ont un phénotype plus stable, moins inflammatoire par rapport à celles des patients de sexe masculin, indépendamment de la présentation clinique et des facteurs de risque CV [93].

De plus, l'âge est souvent associé à des modifications importantes du système CV dont la dysfonction endothéliale, avec une augmentation de la production des ROS et une augmentation de l'activité pro-coagulante. Dans notre étude, l'expression du TFPI dans les M1 est inversement corrélée à l'âge des patients. Ceci suggère une capacité pro-coagulante

augmentant avec l'âge, en accord avec le fait que l'âge prédispose au développement de thromboses.

Marqueurs de l'inflammation

L'athérosclérose est associée à une inflammation chronique intimale mais également périphérique avec des taux circulants plus élevés de protéines inflammatoires que chez des sujets sains. Ces biomarqueurs sont associés à une modification du profil d'expression des M1/M2. L'IL-6 semble être en lien avec une moindre expression de FT et de MMP-9 dans les M2. A contrario, le fibrinogène est corrélé à l'expression du VEGF dans les M2 et du TFPI dans les M1.

Sévérité de la maladie

Nous ne retrouvons pas de lien entre le phénotype des M1/M2 et la sévérité de la maladie athéroscléreuse, à savoir le nombre de vaisseaux sténosés pour le groupe « Mammaire » et le pourcentage de sténose dans le groupe « Carotide ». Par contre, il serait intéressant de connaître la proportion de macrophages M1 et M2 au sein des lésions et relier ce ratio M1/M2 à la sévérité et à la morphologie des lésions.

CHAPITRE VI : CONCLUSION & PERSPECTIVES

Ce travail a permis une caractérisation du niveau d'expression de différents médiateurs impliqués dans la physiopathologie de l'athérosclérose au sein des macrophages M1/M2.

Nous mettons en évidence ici que les macrophages dérivés des monocytes sanguins M1 et M2 expriment et sécrètent différemment ces médiateurs. Nous montrons que les macrophages pro-inflammatoires M1 sont procoagulants et antifibrinolytiques et exercent une activité protéolytique accrue. Les macrophages M2, quant à eux, sont plutôt anti-inflammatoires, réduisent la thrombogénicité des plaques via le TFPI, et promeuvent l'angiogenèse.

Ce travail a permis une meilleure vision des rôles potentiels respectifs des M1/M2 dans les plaques d'athérosclérose. Il devra être complété par une étude des macrophages isolés de plaques d'athérosclérose humaine.

Nous avons secondairement étudié l'impact du phénotype cardiométabolique des patients athéroscléreux sur ces sous-populations macrophagiques M1/M2.

En effet, nous montrons l'influence significative de certains facteurs de risque CV, dont principalement le diabète, le sexe et l'âge sur ces profils d'expression. Ainsi, les patients diabétiques présentent une activité pro-angiogénique macrophagique plus importante dans les M1 à l'origine d'une plus grande vulnérabilité des plaques chez ces patients. Nous observons également que certains biomarqueurs circulants de l'athérosclérose sont associés à une modification de ces profils d'expression.

L'ensemble de ces données contribuent à une meilleure compréhension des processus physiopathologiques complexes impliqués dans l'athérosclérose. Par ailleurs, comprendre la modulation des processus de différenciation des monocytes en macrophages par les facteurs de risque CV constitue un champ d'investigation original et prometteur dans l'espoir de développer des nouvelles stratégies thérapeutiques et préventives.

La suite de ce travail constituera à compléter cette étude par l'inclusion de nouveaux patients dans le protocole OPAL-2. Il est prévu que cette phase d'inclusion dure 3 ans ce qui devrait permettre d'inclure 100 patients bénéficiant d'une endartériectomie carotidienne et 100 patients bénéficiant d'un pontage aorto-coronaire. Ceci permettra d'obtenir des effectifs plus importants dans les différents groupes de patients et de poursuivre l'étude *in vitro* des macrophages issus des prélèvements sanguins de ces patients et notamment les extraits protéiques issus des cultures, non disponibles jusqu'ici.

De plus, nous compléterons le travail déjà réalisé *in vitro* en caractérisant les sous-populations de macrophages M1 et M2 isolées de différentes zones clés de la plaque (chape fibreuse, noyau lipidique, zone riche en néovaisseaux) à partir de ces pièces opératoires par microdissection laser (LMD 6000 Leica, en collaboration avec l'équipe Inserm UMR1011 du Pr Bart Staels, de l'Institut Pasteur de Lille). Cette technique consiste à isoler, sous contrôle microscopique, des cellules cibles, permettant ainsi une sélection des cellules à analyser. Elle permet, contrairement aux techniques globales qui sont réalisées sur un broyat tissulaire et donc sur divers extraits cellulaires, d'obtenir un matériel cellulaire très purifié pour les analyses moléculaires. L'étude de l'expression génique de ces médiateurs sera réalisée par RT-PCR sur les cellules isolées ou dans des broyats de plaques (technique maîtrisée au laboratoire).

Parallèlement, l'expression protéique de ces médiateurs pourra également être étudiée, selon les quantités de matériel récupéré, sur des coupes histologiques par immunomarquage. De l'histologie standard (Trichome de Masson, Oil Red O, Von Kausa) et des immunomarquages des macrophages (CD68), des sous-populations M1/M2 (TNF α /MR), des CMLV (α -actine) et des cellules endothéliales (CD31 et facteur Willebrand) seront réalisés et permettront d'apprécier l'architecture globale de la plaque et d'évaluer le rapport M1/M2 dans les plaques. Ceci nous permettra peut être de décrire, pour la première fois, que ce ratio M1/M2 dans la plaque est corrélé à la sévérité de la maladie athéroscléreuse, comme le montre une équipe japonaise dans le tissu adipeux épigastrique dans lequel le ratio M1/M2 est en lien avec la sévérité de la maladie coronarienne [94].

Ce projet nous permettra de comparer les résultats obtenus lors de ce travail de thèse dans les macrophages issus des prélèvements sanguins à ceux obtenus dans les macrophages de la plaque athéroscléreuse. La réalisation de l'ensemble de ce travail devrait nous permettre de mieux comprendre les processus physiopathologiques mis en jeu dans l'athérosclérose, l'impact des facteurs de risque CV sur ces processus et d'ouvrir de nouvelles pistes diagnostiques et thérapeutiques.

Par ailleurs, notre équipe travaille sur une pathologie qui présente des points communs avec l'athérosclérose : la sténose aortique (SA).

Il existe, dans cette pathologie, une dégénérescence des valves aortiques aboutissant à un rétrécissement aortique. Ce processus partage de fortes similitudes avec l'athérosclérose vasculaire. En effet, on y retrouve une infiltration de cellules inflammatoires, des dépôts lipidiques et une calcification, suggérant un lien entre athérosclérose et SA. Il est actuellement accepté que la SA est une pathologie « athérosclerotic-like ».

Comme d'autres équipes, nous avons observé la présence de macrophages dans les valves sténosées (par immunomarquage à l'aide d'un anticorps antiCD68), en particulier dans les zones calcifiées. L'inflammation est une des premières étapes de la maladie qui induit ce recrutement de macrophages dans la valve.

De plus, nous avons montré la présence de FT au sein des valves pathologiques, colocalisé avec les dépôts lipidiques et les calcifications. L'infiltration macrophagique des lésions valvulaires est en lien avec l'expression de FT [95]. Comme dans l'athérosclérose, les macrophages participeraient donc aux phénomènes inflammatoires et seraient impliqués dans la calcification via la thrombine. En effet, notre équipe a montré que l'expression de FT est corrélée à celle de la thrombine dans le tissu valvulaire. Cette dernière, dont l'action principale dans le processus de coagulation est de transformer le fibrinogène en fibrine, a également la capacité de cliver l'ostéopontine (OSP). Suite au clivage de l'OSP par la thrombine, un fragment N-terminal est libéré possédant des effets pro-inflammatoires et pro-calcifiants [96].

Le TFPI-2 joue également un rôle important dans le remodelage tissulaire, par la diminution de l'activation de nombreuses MMP comme on l'a déjà évoqué précédemment. Nous avons pu montrer que l'expression protéique du TFPI-2 est plus élevée dans les zones moins calcifiées de la valve et inversement corrélée au taux de calcification.

Comme nous avons pu le voir dans ce travail, les macrophages constituent une population hétérogène capable de s'adapter aux stimuli du microenvironnement. Alors que l'existence des 2 sous-types de macrophages M1 et M2 au sein des plaques athéroscléreuses est aujourd'hui bien établie, aucune étude n'a, à ce jour, montré le phénotype des macrophages infiltrés dans les lésions valvulaires. Ainsi, notre hypothèse est que, en miroir des lésions athéroscléreuses, il existe, au sein des lésions valvulaires

sténosées, différentes sous-populations de macrophages modulant le devenir de la lésion et dont le rôle dans l'expression de FT et la calcification reste à définir.

Pour mener à bien ce projet, une analyse histologique et immunohistologique des valves aortiques humaines sténosées (protocole ATHERAO) à l'aide d'anticorps spécifiques ciblant des marqueurs de caractérisation des M1/M2 (CD11c, marqueur des macrophages M1 et CD206, marqueur des M2) permettra de caractériser les macrophages infiltrés dans ces lésions et de localiser précisément ces phénotypes. Nous réaliserons, grâce à des colorations spécifiques (Von Kausa), des colocalisations avec les dépôts de calcium. L'isolement des macrophages d'intérêt directement à partir des valves, par microdissection laser, nous permettra de mesurer les marqueurs de calcification, de la voie du FT et du remodelage tissulaire (ARN et protéine) au sein de ces sous-populations.

La réalisation de ce travail devrait aider à une meilleure compréhension des effets des cellules inflammatoires, les macrophages, dans le développement des pathologies vasculaires et valvulaires chez l'homme, notamment sur les mécanismes cellulaires et moléculaires. De plus, ce travail devrait permettre d'identifier de nouveaux biomarqueurs de ces pathologies et ouvrir de nouvelles pistes diagnostiques et pronostiques ainsi que de nouvelles cibles thérapeutiques.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Institut de Veille Sanitaire (InVS). *Bulletin épidémiologique hebdomadaire (BEH)*. 2007.
- [2] Organisation mondiale de la santé (OMS). Les maladies non transmissibles, principales causes de décès dans le monde. Communiqué de presse du 27 avril 2011.
- [3] Organisation mondiale de la santé (OMS). Statistiques sanitaires mondiales, 2006.
- [4] European Heart Network (EHN). Health care costs of CVD in 2006. European Cardiovascular disease statistics, 2008.
- [5] Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP *et al.* Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1997; 100:2680-90.
- [6] Malek AM, Alper SL, Izumo S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *Jama* 1999; 282:2035-42.
- [7] Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M *et al.* Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49:2379-93.
- [8] Stevens A LJ. Histologie humaine. DeBoeck Université; 1997.
- [9] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-26.
- [10] Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE *et al.* A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995; 92:1355-74.
- [11] Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP *et al.* Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1262-75.
- [12] Naghavi M, Libby P, Falk E *et al.* From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation* 2003; 108:1664-72.
- [13] Stary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1177-8.
- [14] Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med* 1976; 295:369-77.
- [15] Steinberg D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat Med* 2002; 8:1211-7.
- [16] Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420:868-74.
- [17] Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 2001; 104:503-16.
- [18] Faxon DP, Fuster V, Libby P *et al.* Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group III: pathophysiology. *Circulation* 2004; 109:2617-25.
- [19] Mallat Z, Tedgui A. [Apoptosis and acute coronary syndromes]. *Med Sci (Paris)* 2004; 20:298-303.

- [20] Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK *et al.* Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1987; 316:1371-5.
- [21] Newby AC. Metalloproteinases and vulnerable atherosclerotic plaques. *Trends Cardiovasc Med* 2007; 17:253-8.
- [22] Hobeika MJ, Thompson RW, Muhs BE *et al.* Matrix metalloproteinases in peripheral vascular disease. *J Vasc Surg* 2007; 45:849-57.
- [23] Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006; 69:562-73.
- [24] Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP *et al.* Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med* 2003; 349:2316-25.
- [25] de Boer OJ, van der Wal AC, Teeling P, Becker AE. Leucocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization? *Cardiovasc Res* 1999; 41:443-9.
- [26] <http://www.brusselsheartcenter.be/fr/chirurgie-cardiaque/interventions/pontage-coronaire.html>, consulté en novembre 2011.
- [27] <http://www.chirurgie-vasculaire-caen.fr/les-interventions-1/endarterectomie-carotidienne>, consulté en novembre 2011.
- [28] Xu XH, Shah PK, Faure E *et al.* Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation* 2001; 104:3103-8.
- [29] Clinton SK, Underwood R, Hayes L *et al.* Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am J Pathol* 1992; 140:301-16.
- [30] Smith JD, Trogan E, Ginsberg M *et al.* Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:8264-8.
- [31] Ramos MA, Kuzuya M, Esaki T *et al.* Induction of macrophage VEGF in response to oxidized LDL and VEGF accumulation in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:1188-96.
- [32] Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:1015-22.
- [33] Meisel SR, Xu XP, Edgington TS *et al.* Differentiation of adherent human monocytes into macrophages markedly enhances tissue factor protein expression and procoagulant activity. *Atherosclerosis* 2002; 161:35-43.
- [34] Newby AC. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28:2108-14.
- [35] Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:23-35.
- [36] Mills CD, Kincaid K, Alt JM *et al.* M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 2000; 164:6166-73.

- [37] Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 2003; 73:209-12.
- [38] Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 1992; 176:287-92.
- [39] Mantovani A, Sica A, Sozzani S *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004; 25:677-86.
- [40] Gratchev A, Guillot P, Hakiy N *et al.* Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein beta1G-H3. *Scand J Immunol* 2001; 53:386-92.
- [41] Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C *et al.* Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res* 2001; 89:930-4.
- [42] Jiang X, Zeng HS, Guo Y *et al.* The expression of matrix metalloproteinases-9, transforming growth factor-beta1 and transforming growth factor-beta receptor I in human atherosclerotic plaque and their relationship with plaque stability. *Chin Med J (Engl)* 2004; 117:1825-9.
- [43] Gleissner CA, Shaked I, Little KM, Ley K. CXC chemokine ligand 4 induces a unique transcriptome in monocyte-derived macrophages. *J Immunol* 2010; 184:4810-8.
- [44] Porcheray F, Viaud S, Rimaniol AC *et al.* Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol* 2005; 142:481-9.
- [45] Khallou-Laschet J, Varthaman A, Fornasa G *et al.* Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PLoS One* 2010; 5:e8852.
- [46] Bouhrel MA, Derudas B, Rigamonti E *et al.* PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab* 2007; 6:137-43.
- [47] Moreno PR, Murcia AM, Palacios IF *et al.* Coronary composition and macrophage infiltration in atherectomy specimens from patients with diabetes mellitus. *Circulation* 2000; 102:2180-4.
- [48] Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res* 1999; 84:489-97.
- [49] Haffner SM, Lehto S, Ronnema T *et al.* Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998; 339:229-34.
- [50] Dale AC, Vatten LJ, Nilsen TI *et al.* Secular decline in mortality from coronary heart disease in adults with diabetes mellitus: cohort study. *Bmj* 2008; 337:a236.
- [51] InVS. Niveau tensionnel moyen et prévalence de l'hypertension artérielle chez les adultes de 18 à 74 ans. Bulletin épidémiologique hebdomadaire (BEH). 2008.
- [52] Zeiher AM, Schachinger V, Minners J. Long-term cigarette smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial vasodilator function. *Circulation* 1995; 92:1094-100.

- [53] Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 2006; 444:875-80.
- [54] Conroy RM, Pyorala K, Fitzgerald AP *et al.* Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J* 2003; 24:987-1003.
- [55] Boyum A. Separation of White Blood Cells. *Nature* 1964; 204:793-4.
- [56] Dupont A, Elkalioubie A, Juthier F *et al.* Frequency of abdominal aortic aneurysm in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Am J Cardiol* 2010; 105:1545-8.
- [57] Hatakeyama K, Asada Y, Marutsuka K *et al.* Localization and activity of tissue factor in human aortic atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 1997; 133:213-9.
- [58] Nguyen P, Cochery E, Guenounou M, Potron G. Cytokines et hémostasie. *Revue Française des Laboratoires* 2000; 2000:61-67.
- [59] Spencer M, Yao-Borengasser A, Unal R *et al.* Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 299:E1016-27.
- [60] Martin-Manso G, Galli S, Ridnour LA *et al.* Thrombospondin 1 promotes tumor macrophage recruitment and enhances tumor cell cytotoxicity of differentiated U937 cells. *Cancer Res* 2008; 68:7090-9.
- [61] Caplice NM, Mueske CS, Kleppe LS, Simari RD. Presence of tissue factor pathway inhibitor in human atherosclerotic plaques is associated with reduced tissue factor activity. *Circulation* 1998; 98:1051-7.
- [62] Hart PH, Burgess DR, Vitti GF, Hamilton JA. Interleukin-4 stimulates human monocytes to produce tissue-type plasminogen activator. *Blood* 1989; 74:1222-5.
- [63] Saren P, Welgus HG, Kovanen PT. TNF-alpha and IL-1beta selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. *J Immunol* 1996; 157:4159-65.
- [64] Lacraz S, Nicod L, Galve-de Rochemonteix B *et al.* Suppression of metalloproteinase biosynthesis in human alveolar macrophages by interleukin-4. *J Clin Invest* 1992; 90:382-8.
- [65] Lolmede K, Campana L, Vezzoli M *et al.* Inflammatory and alternatively activated human macrophages attract vessel-associated stem cells, relying on separate HMGB1- and MMP-9-dependent pathways. *J Leukoc Biol* 2009; 85:779-87.
- [66] Herman MP, Sukhova GK, Kisiel W *et al.* Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001; 107:1117-26.
- [67] Hasita H, Komohara Y, Okabe H *et al.* Significance of alternatively activated macrophages in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Sci* 2010; 101:1913-9.
- [68] Ivanciu L, Gerard RD, Tang H *et al.* Adenovirus-mediated expression of tissue factor pathway inhibitor-2 inhibits endothelial cell migration and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:310-6.
- [69] Crawley JT, Goulding DA, Ferreira V *et al.* Expression and localization of tissue factor pathway inhibitor-2 in normal and atherosclerotic human vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:218-24.

- [70] Moulton KS, Vakili K, Zurakowski D *et al.* Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:4736-41.
- [71] Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP *et al.* Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:2054-61.
- [72] Dunmore BJ, McCarthy MJ, Naylor AR, Brindle NP. Carotid plaque instability and ischemic symptoms are linked to immaturity of microvessels within plaques. *J Vasc Surg* 2007; 45:155-9.
- [73] Brocheriou I, Maouche S, Durand H *et al.* Antagonistic regulation of macrophage phenotype by M-CSF and GM-CSF: implication in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2011; 214:316-24.
- [74] Waldo SW, Li Y, Buono C *et al.* Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 2008; 172:1112-26.
- [75] Wolfs IM, Donners MM, de Winther MP. Differentiation factors and cytokines in the atherosclerotic plaque micro-environment as a trigger for macrophage polarisation. *Thromb Haemost* 2011; 106:763-71.
- [76] Hong YJ, Jeong MH, Choi YH *et al.* Plaque characteristics in culprit lesions and inflammatory status in diabetic acute coronary syndrome patients. *JACC Cardiovasc Imaging* 2009; 2:339-49.
- [77] Bories G, Caiazzo R, Derudas B *et al.* Impaired alternative macrophage differentiation of peripheral blood mononuclear cells from obese subjects. *Diab Vasc Dis Res* 2011.
- [78] Mirza R, Koh TJ. Dysregulation of monocyte/macrophage phenotype in wounds of diabetic mice. *Cytokine* 2011; 56:256-64.
- [79] Purushothaman KR, Meerarani P, Moreno PR. Inflammation and neovascularization in diabetic atherosclerosis. *Indian J Exp Biol* 2007; 45:93-102.
- [80] Kai H, Ikeda H, Yasukawa H *et al.* Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32:368-72.
- [81] Tayebjee MH, Lim HS, MacFadyen RJ, Lip GY. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 in type 2 diabetes: effect of 1 year's cardiovascular risk reduction therapy. *Diabetes Care* 2004; 27:2049-51.
- [82] Gostiljac D, Dordevic PB, Djuric D *et al.* The importance of defining serum MMP-9 concentration in diabetics as an early marker of the rupture of atheromatous plaque in acute coronary syndrome. *Acta Physiol Hung* 2011; 98:91-7.
- [83] Sarov-Blat L, Kiss RS, Haidar B *et al.* Predominance of a proinflammatory phenotype in monocyte-derived macrophages from subjects with low plasma HDL-cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:1115-22.
- [84] Feig JE, Parathath S, Rong JX *et al.* Reversal of hyperlipidemia with a genetic switch favorably affects the content and inflammatory state of macrophages in atherosclerotic plaques. *Circulation* 2011; 123:989-98.

- [85] Kadl A, Meher AK, Sharma PR *et al.* Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circ Res* 2010; 107:737-46.
- [86] van der Vaart H, Postma DS, Timens W, ten Hacken NH. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax* 2004; 59:713-21.
- [87] Shaykhiev R, Krause A, Salit J *et al.* Smoking-dependent reprogramming of alveolar macrophage polarization: implication for pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol* 2009; 183:2867-83.
- [88] Ni W, Kitamoto S, Ishibashi M *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 is an essential inflammatory mediator in angiotensin II-induced progression of established atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:534-9.
- [89] Mazzolai L, Duchosal MA, Korber M *et al.* Endogenous angiotensin II induces atherosclerotic plaque vulnerability and elicits a Th1 response in ApoE^{-/-} mice. *Hypertension* 2004; 44:277-82.
- [90] Cabrero A, Cubero M, Llaverias G *et al.* Leptin down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma) mRNA levels in primary human monocyte-derived macrophages. *Mol Cell Biochem* 2005; 275:173-9.
- [91] Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors: new targets for the pharmacological modulation of macrophage gene expression and function. *Curr Opin Lipidol* 2003; 14:459-68.
- [92] Yakeu G, Butcher L, Isa S *et al.* Low-intensity exercise enhances expression of markers of alternative activation in circulating leukocytes: roles of PPARgamma and Th2 cytokines. *Atherosclerosis* 2010; 212:668-73.
- [93] Hellings WE, Pasterkamp G, Verhoeven BA *et al.* Gender-associated differences in plaque phenotype of patients undergoing carotid endarterectomy. *J Vasc Surg* 2007; 45:289-96; discussion 296-7.
- [94] Hirata Y, Tabata M, Kurobe H *et al.* Coronary atherosclerosis is associated with macrophage polarization in epicardial adipose tissue. *J Am Coll Cardiol* 2011; 58:248-55.
- [95] Breyne J, Juthier F, Corseaux D *et al.* Atherosclerotic-like process in aortic stenosis: activation of the tissue factor-thrombin pathway and potential role through osteopontin alteration. *Atherosclerosis* 2010; 213:369-76.
- [96] Breyne J, Banfi C, Juthier F *et al.* Rétrécissement aortique valvulaire : quel rôle joue l'hémostase dans la maladie ? *Sang Thrombose Vaisseaux* 2011; 23:75-81.

INDEX FIGURES ET TABLEAUX

INDEX DES FIGURES

<i>Figure 1</i> : Causes principales de décès dans le monde en 2005, tous âges confondus	8
<i>Figure 2</i> : Répartition des coûts directs des maladies cardiovasculaires en France en 2006. 8	
<i>Figure 3</i> : L'athérosclérose, maladie des artères de gros et moyen calibre : schéma illustrant les différentes artères touchées.....	9
<i>Figure 4</i> : Localisation préférentielle des plaques d'athérosclérose au niveau de la paroi externe des bifurcations vasculaires en fonction des forces de cisaillement	10
<i>Figure 5</i> : Représentation schématique de la paroi artérielle saine.....	12
<i>Figure 6</i> : Comparaison de la structure d'une artère saine et d'une artère lésée par l'athérosclérose, illustrant le remaniement de la paroi artérielle.	13
<i>Figure 7</i> : Suite d'événements générant la strie lipidique.....	16
<i>Figure 8</i> : Chronologie de la formation des lésions athéroscléreuses	17
<i>Figure 9</i> : Evolution progressive de la plaque d'athérosclérose vers un phénotype « stable » ou « vulnérable ».....	20
<i>Figure 10</i> : Origine artérielle ou veineuse des greffons utilisés dans les pontages coronariens.	21
<i>Figure 11</i> : Technique d'endartériectomie	22
<i>Figure 12</i> : Schéma de maturation médullaire du monocyte	23
<i>Figure 13</i> : Système des phagocytes mononucléés.....	24
<i>Figure 14</i> : Répertoire membranaire et sécrétoire du macrophage dans l'athérosclérose.....	27
<i>Figure 15</i> : Diversité fonctionnelle et phénotypique des macrophages	28
<i>Figure 16</i> : Incidence de diverses manifestations cliniques de l'athérosclérose chez des patients diabétiques versus non diabétiques	32
<i>Figure 17</i> : Implication de l'obésité et du tabagisme dans le développement des maladies CV	34
<i>Figure 18</i> : Nature des prélèvements sanguins du protocole OPAL-2 et dosages biologiques réalisés.....	44
<i>Figure 19</i> : Nature des prélèvements opératoires et techniques prévues	45
<i>Figure 20</i> : Etape d'isolement des PBMC par centrifugation sur Ficoll.....	46
<i>Figure 21</i> : Conditions de culture et de différenciation des monocytes en macrophages	47
<i>Figure 22</i> : Schéma de plaque.....	48

<i>Figure 23</i> : Principe de la PCR quantitative par la méthode TaqMan®	49
<i>Figure 24</i> : Principe du dosage ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	52
<i>Figure 25</i> : Principe de la technologie Fluorokine®.....	52
<i>Figure 26</i> : Répartition de l'âge des patients lors de l'inclusion dans le protocole OPAL-2 ...	57
<i>Figure 27</i> : Répartition des sujets inclus dans le protocole OPAL-2 par type de chirurgie.....	58
<i>Figure 28</i> : Taux d'HbA1C selon la présence ou non d'un diabète	61
<i>Figure 29</i> : Marqueurs de l'équilibre glycémiqme selon les groupes de patients.....	61
<i>Figure 30</i> : Marqueurs lipidiques selon les groupes de patients.....	62
<i>Figure 31</i> : Marqueurs du syndrome métabolique selon les groupes de patients.....	62
<i>Figure 32</i> : Ratio de l'expression des marqueurs M1 et M2 dans les cultures de macrophages dérivés des monocytes différenciés par différentes concentrations d'IL-1 β	63
<i>Figure 33</i> : Photos prises au microscope à contraste de phase des MDM après incubation de 7j dans du milieu additionné d'IL-1 β ou d'IL-4.....	64
<i>Figure 34</i> : Expression relative à J8 des marqueurs M1 et M2 par les MDM différenciés par l'IL-1 β ou l'IL-4.....	64
<i>Figure 35</i> : Production et libération du PAI-1, MMP-9 et TFPI dans les surnageants de culture des macrophages différenciés à partir des monocytes sanguins	68
<i>Figure 36</i> : Corrélation entre le ratio MMP-9/TFPI-2 dans les macrophages M1 et l'hémoglobine glyquée.....	70
<i>Figure 37</i> : Corrélation entre l'âge des patients et l'expression du TFPI dans les M1	73
<i>Figure 38</i> : Profils d'expression des M1/M2	82

INDEX DES TABLEAUX

<i>Tableau 1</i> : Nomenclature et description des lésions d'athérosclérose aux différents stades évolutifs selon la classification de l' <i>American Heart Association</i>	14
<i>Tableau 2</i> : liste des amorces et sondes TaqMan® utilisées	50
<i>Tableau 3</i> : Répartition des patients selon les données coronarographiques.....	59
<i>Tableau 4</i> : Fréquence des principaux facteurs de risque CV chez les 35 patients inclus dans le protocole OPAL-2	60
<i>Tableau 5</i> : Expression relative de différents médiateurs de l'athérosclérose dans les macrophages M1 et M2, induits <i>in vitro</i> , à partir des monocytes sanguins de patients athéroscléreux.....	65
<i>Tableau 6</i> : Comparaison de l'expression relative de différents médiateurs de l'athérosclérose dans les macrophages M1 vs M2, induits <i>in vitro</i> , à partir de monocytes sanguins issus de sujets sains	67
<i>Tableau 7</i> : Association entre le diabète et l'expression relative de certains médiateurs de l'athérosclérose dans les 2 sous-populations macrophagiques M1 et M2.....	69
<i>Tableau 8</i> : Corrélation entre l'expression des médiateurs de l'athérosclérose et les marqueurs biologiques de l'équilibre lipidique	71
<i>Tableau 9</i> : Association entre le syndrome métabolique et l'expression relative de certains médiateurs de l'athérosclérose dans les 2 sous-populations macrophagiques M1 et M2	71
<i>Tableau 10</i> : Corrélation entre les différents paramètres cliniques de l'obésité.....	72
<i>Tableau 11</i> : Corrélation entre l'expression des médiateurs de l'athérosclérose et les marqueurs biologiques de l'inflammation.....	74

ANNEXES

Annexe 1 :

Cahier anonymisé de recueil des données clinico-biologiques du protocole OPAL-2



OPAL2

« Effet du syndrome métabolique sur l'expression du facteur tissulaire dans le macrophage et la cellule musculaire lisse de la plaque d'athérosclérose ».

CAHIER D'OBSERVATION

INITIALES PATIENT* :

 -

N° D'INCLUSION :

DATE D'INCLUSION :

* première lettre du nom (nom de jeune fille pour les femmes) et première du prénom

CONTACTS		
Christophe Zawadzki	tel : 44216	@ : christophe.zawadzki@chru-lille.fr
Joke Breyne	tel : 45623	@ : joke.breyne@gmail.com
Brigitte Jude	tel : 44891	@ : brigitte.jude@chru-lille.fr
Delphine Corseaux	tel : 45623	@ : dcorseaux@gmail.com
Annabelle Dupont	tel : 45623	@ : annabelle.dupont-2@univ-lille2.fr
Stéphan Haulon	tel : 32315	@ : stephan.haulon@chru-lille.fr
André Vincentelli	tel : 31642	@ : andre.vincentelli@chru-lille.fr
Richard Azzouli	tel : 31313	@ : richard.azzouli@chru-lille.fr
Carlo Banti	tel : 31647	@ : carlo.banti@chru-lille.fr
Francis Jutier	tel : 31647	@ : jutier@hotmail.com

Investigateur principal:
Pr B. Jude
Pôle d'Hématologie-Transfusion
Centre de Biologie-Pathologie
Tel: 03 20 44 59 38

Promoteur de l'étude:
CHRU de Lille
Délégation à la Recherche
Administration Générale
Tel: 03 20 44 56 34

Initiales patient : - PROTOCOLE OPAL2 N° d'inclusion :

IDENTIFICATION

Nom :

Prénom :

Nom d'épouse :

Date de Naissance :

Sexe : Masculin Féminin

N° d'inclusion :

Date d'inclusion :

Nature du geste opératoire :

Endartérectomie carotidienne

Pontage aorto-coronaire

Nom du chirurgien/médecin ayant inclus le patient :

Date prévue de l'opération :

GROUPES :

La nature du geste opératoire (endartérectomie carotidienne ou pontage aorto-coronaire) et la présence ou non d'un syndrome métabolique conditionne l'inclusion dans un des 4 groupes suivants :

GRUPE DU PATIENT:

- GROUPE C1 (endartérectomie carotidienne et présence d'un syndrome métabolique)
- GROUPE C2 (endartérectomie carotidienne et absence de syndrome métabolique)
- GROUPE M1 (pontage aorto-coronaire et présence d'un syndrome métabolique)
- GROUPE M2 (pontage aorto-coronaire et absence de syndrome métabolique)

Les principaux critères cliniques définissent le syndrome métabolique selon le NCEP-ATP III

¹(National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Program III, JAMA 2001;285(19):2486-97) sont:

- g. Tour de taille >102, cm (H)/>88, cm (F)
- g. Glycémie à jeun ≥1.1 g/l ou diabète traité
- g. Triglycérides ≥1.5 g/l
- g. HDL-cholestérol <0.4 g/l (H)/<0.5 g/l (F) ou dyslipidémie traitée
- g. Pression artérielle ≥130/85 mmHg, ou patient traité

Si au moins 3 des 5 facteurs sont présents, le patient présente un syndrome métabolique et doit être inclus dans les groupes C1 ou M1. S'il présente moins de 3 facteurs, le patient doit être inclus dans les groupes C2 ou M2 (absence de syndrome métabolique).

CRITERES D'INCLUSION

- Patient nécessitant une ~~endartérectomie~~ carotidienne ou un pontage ~~gortp~~-coronaire Oui Non
- Patient > 18 ans Oui Non
- Objectifs et contraintes de l'étude ~~expliqués~~ au patient Oui Non
- Ayant signé le formulaire de consentement éclairé Oui Non

ATTENTION, SI UNE SEULE CASE « NON » EST COCHÉE, NE PAS DEBUTER L'ETUDE

CRITERES DE NON INCLUSION

- Refus de signer le consentement éclairé de participation Oui Non
- Impossibilité de recevoir une information éclairée (défaut intellectuel du patient) Oui Non
- Patient sous mesure de protection de la Justice..... Oui Non
- Patient participant déjà à une recherche biomédicale Oui Non

ATTENTION, SI UNE SEULE CASE « OUI » EST COCHÉE, NE PAS DEBUTER L'ETUDE

FACTEURS DE RISQUE CARDIO-VA SCULAIRES

Hérédité (1^{er} degré) Oui Non Inconnue

Diabète Oui Non

Si oui : Type 1 Type 2
 < 5 ans > 5 ans

Traitement: Aucun Régime Sulfamide Biguanide Insuline ~~Glitazone~~
 Autre hypoglycémiant :

Si oui, complications du diabète : Œil Rein Neuropathies

Hypertension artérielle (Traitée ou TA>130/85) Oui Non

Consommation de tabac Actif → Nombre de paquets/année
 Arrêt depuis plus d'un an
 Jamais

Obésité Poids kg
 Taille cm
 Tour de taille cm

Hyperlipémie

Hypercholestérolémie (traitée ou cholestérol > 2 g/l) Oui Non

HDL-cholestérol <0.4 g/l (H)/<0.5 g/l (F) Oui Non

~~Hypertriglycérdémie~~ (traitée ou TG > 1.5 g/l) Oui Non

→ Traitement de l'hyperlipémie : Aucun
 Régime
 Statine
 ~~Fibrate~~
 Ezetimibe
 Autre :
 Depuis quand ?

Carotide controlatérale

- Déjà opérée Oui Non
- Pourcentage de sténose (classif. ECST): %
- Caractéristiques : Hémorragies intra-plaque
 Ulcération
 Calcification
 Thrombus

Explorations cérébrales réalisées

- Scanner Oui Non
 - IRM Oui Non
 - Lésions cérébrales mise en évidence :
 - Infarctus Oui Non
- Si oui, nombre :

Chaque infarctus est à détailler :

	Localisation	Localisation : Antérieure (1) Postérieure (2) Totale (3)	Attribuable à la lésion carotidienne ?	Remarques (commentaire libre)
Infarctus 1	<input type="checkbox"/> Droite <input type="checkbox"/> Gauche	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
Infarctus 2	<input type="checkbox"/> Droite <input type="checkbox"/> Gauche	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
Infarctus 3	<input type="checkbox"/> Droite <input type="checkbox"/> Gauche	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
Infarctus 4	<input type="checkbox"/> Droite <input type="checkbox"/> Gauche	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	

2) Bilan cardiaque:

- Antécédents coronarien Oui Non
 - Antécédents d'infarctus du myocarde Oui Non
 - Antécédents de pontage Oui Non
 - Antécédents d'angioplastie Oui Non
 - Arythmie Oui Non
 - Echo cardiaque < 1an Oui Non
- Si oui, fraction d'éjection ventriculaire gauche: %

3) Bilan membres inférieures :

- Artériopathie des membres inférieurs Oui Non
 - Claudication Oui Non
- Si oui, périmètre de marche >100m <100m
- Douleurs de décubitus Oui Non
 - Troubles trophiques Oui Non
 - Echodoppler Oui Non
- Si oui, localisation de la sténose : iliaque
 fémorale
 poplitée
 jambière

DONNEES CLINIQUES « PONTAGE AORTO-CORONAIRE »
 (pages 9 à 14 à ne remplir que pour les patients des groupes M1 et M2)

1) **Bilan cardiaque :**

Antécédents d'infarctus du myocarde

Oui Non

Mois et Année du dernier :

Territoire de l'infarctus : Antérieur Inférieur Latéral

Défini par : Onde Q à l'ECG Echographie Scintigraphie IRM

Revascularisation : Oui Non

Angioplastie : Oui Non

→ Mois et Année:

Pontage aorto-coronaire Oui Non

→ Mois et Année :

Commentaires éventuels :

Indication du pontage :

- **Pontage programmé :** Oui Non

- Ischémie silencieuse Oui Non
- Antécédent d'infarctus du myocarde Oui Non
- Angor stable Oui Non
- Angor instable Oui Non

- Pontage en urgence :

Oui Non

Infarctus du myocarde < 1 mois

Oui Non

Valeur maximale de la Troponine :

ng/ml

Type :

Normes :

Dérivés nitrés IV :

Oui Non

Dose : mg/h

Modification ECG

Oui Non

ST : mm

Territoire :

Ballon contropulsion intra-aortique :

Oui Non

Fraction d'éjection ventriculaire gauche :

%

Angiographie Echographie IRM Scintigraphie

Coronarographie

Nombre de vaisseaux sténosés : 1 2 3 TC Gauche

Vaisseaux sténosés : IVA Cx Ddx TC Gauche

Collatéralité : Oui Non

Evaluation viabilité myocardique avant pontage : Oui Non

Si oui, recherche faite par : Echographie dobutamine Scintigraphie IRM

Indication chirurgicale :

Pontage seul : Oui Non

Pontage et valvulopathie : Oui Non

Si oui, préciser :

1- Atteinte Valvulaire RAo IAo RM IM

2- Indication initiale = Pontage, découverte valvulopathie durant bilan pré-op
 Valvulopathie, découverte lésions coronaires durant bilan pré-op

CEC Oui Non

Vaisseaux Pontés IVA greffon artériel (M-R) greffon veineux

Cx/Mg greffon artériel (M-R) greffon veineux

Dte greffon artériel (M-R-G) greffon veineux

(M = mammaire interne ; R = radiale ; G = gastro-épigastrique)

Geste Valvulaire Mitral Remplacement Plastie
 Aortique Remplacement
 Autre :

Fraction d'éjection : % Angiographie Echographie

Evènements post-opératoires (≤ 10 jours après l'intervention) :

Infarctus du myocarde

• Troponine

Date :

Valeurs : ng/ml

Type :

Norme :

• Onde Q

Date :

Topographie :

Bas-débit :

Inotropes :
Durée :

Reprise :

Date :

Commentaires éventuels :

Décès (*)

Date :

(*) : EVENEMENT INDESIRABLE GRAVE A DECLARER

Commentaires éventuels :

Initiales patient : -

N° d'inclusion :

2) **Bilan neurologique :**

Mise en évidence d'une sténose carotidienne

Oui Non

localisée à

Droite Gauche

Pourcentage de sténose (classif. ECST) : %

Caractéristiques : Hémorragies intra-plaque

Ulcération

Calcification

Thrombus

Symptomatologie ischémique cérébrale

Oui Non

Si oui

Date (j/mm/aa)	AIT ou AVC	Nature des troubles (1)	Localisation des troubles :
<input type="text"/>	<input type="checkbox"/> AIT <input type="checkbox"/> AVC		<input type="checkbox"/> Droite <input type="checkbox"/> Gauche
<input type="text"/>	<input type="checkbox"/> AIT <input type="checkbox"/> AVC		<input type="checkbox"/> Droite <input type="checkbox"/> Gauche
<input type="text"/>	<input type="checkbox"/> AIT <input type="checkbox"/> AVC		<input type="checkbox"/> Droite <input type="checkbox"/> Gauche
<input type="text"/>	<input type="checkbox"/> AIT <input type="checkbox"/> AVC		<input type="checkbox"/> Droite <input type="checkbox"/> Gauche

(1) Choisir une ou plusieurs propositions :

- A : Cécité monoculaire
- B : Hémiparésie ou Hémiplégie
- C : Troubles sensitifs hémicorporels
- D : Troubles du langage
- E : Hémianopsie latérale homonyme

Mise en évidence d'une sténose carotidienne controlatérale :

Oui Non

Si oui, pourcentage de sténose (classif. ECST) : %

Initiales patient : -

N° d'inclusion :

3) **Bilan membres inférieurs :**

• Artériopathie des membres inférieurs

Oui Non

• Claudication

Oui Non

→ Si oui, périmètre de marche

>100m <100m

• Douleurs de décubitus

Oui Non

• Troubles trophiques

Oui Non

• Echodoppler

Oui Non

→ Si oui, localisation de la sténose :

iliaque

fémorale

poplitée

jambière

PRELEVEMENT S SANGUINS

Date :

Bilan sanguin (LE JOUR DU BLOC, AVANT ANESTHESIE)

- 1 tube EDTA (5 ml)
- 2 tubes secs (5 ml)
- 2 tubes citratés (5 ml)
- 5 tubes héparinés (5 ml)

Tous les tubes prélevés sont à mettre dans le sachet étiqueté « protocole OPAL2, amener immédiatement en hémostase » qu'il faut replacer dans un second sachet de transport TAL, avant de l'envoyer au CBP via le TAL

Hémostase

- 2 tubes citratés (5 ml) Fibrinogène, leptine, adiponectine
- 1 tube EDTA (5 ml) NFS, hémoglobine glyquée
- 4 tubes héparinés (5 ml) Culture macrophages
- 1 tube sec (5 ml) CRP, IL6

Biochimie

- 1 tube hépariné (5 ml) Glycémie, créatinine
- 1 tube sec (5 ml) Cholestérol, triglycérides, LDL, HDL

RESULTATS SANGUINS

Date :

Hémogramme réalisé non réalisé

- Hémoglobine , g/100 ml
- Hématocrite %
- Leucocytes /mm³
- Plaquettes /mm³

Bilan inflammatoire réalisé non réalisé

- fibrinogène g/l
- CRP , mg/l
- IL6 , pg/ml

Biochimie réalisé non réalisé

- Cholestérol , g/l
- LDL , g/l
- HDL , g/l
- Triglycérides , g/l
- Créatinine mg/l
- Glycémie , g/l
- Hb glyquée , %

Initiales patient : - PROTOCOLE OPAL2 N° d'inclusion :

PRELEVEMENT S OPERATOIRES Date :

Nature du prélèvement opératoire :

- Endartériectomie carotidienne :
Appeler le 45623 ou 06 61 89 48 85 **quelques minutes avant que l'échantillon soit prélevé.**

Mettre la pièce d'endartériectomie entière dans le pot ECBU étiqueté
« endartériectomie carotidienne » **sans aucun liquide.**

- Artère mammaire :
Mettre les 2 moitiés morphologiquement identiques dans 2 pots ECBU:
 pot « mammaire A » : 1^{ère} moitié **avec sérum physiologique**
 pot « mammaire B » : 2^{nde} moitié **avec fixateur RNAlater®**
Appeler le 45623 ou 06 61 89 48 85 dès que l'échantillon est prélevé.

CONTACTS		
Christophe Zawadzki	tel : 44216	✉ : christophe.zawadzki@chru-lille.fr
Joke Breyne	tel : 45623	✉ : joke.breyne@gmail.com
Brigitte Jude	tel : 44891	✉ : brigitte.jude@chru-lille.fr
Delphine CORSEAUX	tel : 45623	✉ : dcorseaux@gmail.com
Annabelle Dupont	tel : 45623	✉ : annabelle.dupont-2@univ-lille2.fr
Stéphan HAULON	tel : 32315	✉ : stephan.haulon@chru-lille.fr
André Vincentelli	tel : 31642	✉ : andre.vincentelli@chru-lille.fr
Richard AZZAOU	tel : 31313	✉ : richard.azzaoui@chru-lille.fr
Carlo Banti	tel : 31647	✉ : carlo.banti@chru-lille.fr
Francis Juthier	tel : 31647	✉ : juthier@hotmail.com

Initiales patient : - PROTOCOLE OPAL2 N° d'inclusion :

CLOTURE DEFINITIVE DU DO SSIER

Date :

Dossier vérifié : OUI NON

Par :

Signature :

Nom de l'investigateur :

Signature :

ETUDE « OPAL-2 »

NOTIFICATION DES EVENEMENTS INDESIRABLES

Identification du patient :

Initiales : N° de sujet : Sexe : M F Age : ans Centre de Lille Groupe : M1 M2 C1 C2

Description de l'événement indésirable	Date de début de l'événement	Intensité	Ecluse un Evénement Indésirable Grave (EIG) ?	Evolution (cochez une seule réponse)	Des mesures ont-elles été prises ?	Relation causale	Fin de l'événement
.....	<input type="checkbox"/> Légère <input type="checkbox"/> Modérée <input type="checkbox"/> Sévère	<input type="checkbox"/> OUI* <input type="checkbox"/> NON	<input type="checkbox"/> Inconnue <input type="checkbox"/> Guérison sans séquelles <input type="checkbox"/> Décès <input type="checkbox"/> Séquelles <input type="checkbox"/> En cours	<input type="checkbox"/> OUI** <input type="checkbox"/> NON	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> douteux <input type="checkbox"/> Non

Commentaires (traitement(s) incluant(s), mesures prises, conséquences vis à vis de l'étude, prise en charge, ...) :



Description de l'événement indésirable	Date de début de l'événement	Intensité	Ecluse un Evénement Indésirable Grave (EIG) ?	Evolution (cochez une seule réponse)	Des mesures ont-elles été prises ?	Relation causale	Fin de l'événement
.....	<input type="checkbox"/> Légère <input type="checkbox"/> Modérée <input type="checkbox"/> Sévère	<input type="checkbox"/> OUI* <input type="checkbox"/> NON	<input type="checkbox"/> Inconnue <input type="checkbox"/> Guérison sans séquelles <input type="checkbox"/> Décès <input type="checkbox"/> Séquelles <input type="checkbox"/> En cours	<input type="checkbox"/> OUI** <input type="checkbox"/> NON	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> douteux <input type="checkbox"/> Non

Commentaires (traitement(s) incluant(s), mesures prises, conséquences vis à vis de l'étude, prise en charge, ...) :

Nom de l'investigateur : _____ Date de ce rapport : Signature : _____

*SI OUI : EVENEMENT INDESIRABLE GRAVE (décès, menace du pronostic vital, hospitalisation ou prolongation d'hospitalisation, incapacité permanente ou sévère, grossesse, anomalie congénitale).
 COMPLÉTER LE FORMULAIRE EIG ET LE FAIRE DÉSORMAIS POSSIBLE AU N° INDICÉ
 **IMPORTANT : L'EVÉNEMENT INDESIRABLE A ENGAGÉ PLUS RÉSULTAT DU TRAITEMENT, LE R AJOUTER DANS LES COMMENTAIRES

ETUDE « OPAL-2 »

NOTIFICATION DES EVENEMENTS INDESIRABLES

Identification du patient :

Initiales : N° de sujet : Sexe : M F Age : ans Centre de Lille Groupe : M1 M2 C1 C2

Description de l'événement indésirable	Date de début de l'événement	Intensité	Ecluse un Evénement Indésirable Grave (EIG) ?	Evolution (cochez une seule réponse)	Des mesures ont-elles été prises ?	Relation causale	Fin de l'événement
.....	<input type="checkbox"/> Légère <input type="checkbox"/> Modérée <input type="checkbox"/> Sévère	<input type="checkbox"/> OUI* <input type="checkbox"/> NON	<input type="checkbox"/> Inconnue <input type="checkbox"/> Guérison sans séquelles <input type="checkbox"/> Décès <input type="checkbox"/> Séquelles <input type="checkbox"/> En cours	<input type="checkbox"/> OUI** <input type="checkbox"/> NON	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> douteux <input type="checkbox"/> Non

Commentaires (traitement(s) incluant(s), mesures prises, conséquences vis à vis de l'étude, prise en charge, ...) :

Description de l'événement indésirable	Date de début de l'événement	Intensité	Ecluse un Evénement Indésirable Grave (EIG) ?	Evolution (cochez une seule réponse)	Des mesures ont-elles été prises ?	Relation causale	Fin de l'événement
.....	<input type="checkbox"/> Légère <input type="checkbox"/> Modérée <input type="checkbox"/> Sévère	<input type="checkbox"/> OUI* <input type="checkbox"/> NON	<input type="checkbox"/> Inconnue <input type="checkbox"/> Guérison sans séquelles <input type="checkbox"/> Décès <input type="checkbox"/> Séquelles <input type="checkbox"/> En cours	<input type="checkbox"/> OUI** <input type="checkbox"/> NON	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> douteux <input type="checkbox"/> Non

Commentaires (traitement(s) incluant(s), mesures prises, conséquences vis à vis de l'étude, prise en charge, ...) :

Nom de l'investigateur : _____ Date de ce rapport : Signature : _____

*SI OUI : EVENEMENT INDESIRABLE GRAVE (décès, menace du pronostic vital, hospitalisation ou prolongation d'hospitalisation, incapacité permanente ou sévère, grossesse, anomalie congénitale).
 COMPLÉTER LE FORMULAIRE EIG ET LE FAIRE DÉSORMAIS POSSIBLE AU N° INDICÉ
 **IMPORTANT : L'EVÉNEMENT INDESIRABLE A ENGAGÉ PLUS RÉSULTAT DU TRAITEMENT, LE R AJOUTER DANS LES COMMENTAIRES

ETUDE « OPAL-2 »

NOTIFICATION DES EVENEMENTS INDESIRABLES

Identification du patient :

Initiales : ... N° de sujet : ... Sexe : M F Age : ... ans Centre de Lille Groupe : M1 M2 C1 C2

Description de l'événement indésirable	Date de début de l'événement	Intensité	Est-ce un Evénement Indésirable Grave (EIG) ?	Evolution (cochez une seule réponse)	Des analyses ont-elles été prises ?	Relation causale	Fin de l'événement
.....	<input type="checkbox"/> Légère <input type="checkbox"/> Modérée <input type="checkbox"/> Sévère	<input type="checkbox"/> OUI* <input type="checkbox"/> NON	<input type="checkbox"/> Inconnue <input type="checkbox"/> Guérison sans séquelles <input type="checkbox"/> Décès <input type="checkbox"/> Séquelles <input type="checkbox"/> En cours	<input type="checkbox"/> OUI** <input type="checkbox"/> NON	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> douteux <input type="checkbox"/> Non

Commentaires (traitement(s) instauré(s), mesures prises, conséquences vis à vis de l'étude, prise en charge, ...):

Description de l'événement indésirable	Date de début de l'événement	Intensité	Est-ce un Evénement Indésirable Grave (EIG) ?	Evolution (cochez une seule réponse)	Des analyses ont-elles été prises ?	Relation causale	Fin de l'événement
.....	<input type="checkbox"/> Légère <input type="checkbox"/> Modérée <input type="checkbox"/> Sévère	<input type="checkbox"/> OUI* <input type="checkbox"/> NON	<input type="checkbox"/> Inconnue <input type="checkbox"/> Guérison sans séquelles <input type="checkbox"/> Décès <input type="checkbox"/> Séquelles <input type="checkbox"/> En cours	<input type="checkbox"/> OUI** <input type="checkbox"/> NON	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> douteux <input type="checkbox"/> Non

Commentaires (traitement(s) instauré(s), mesures prises, conséquences vis à vis de l'étude, prise en charge, ...):

Nom de l'investigateur : Date de ce rapport : Signature :

* SI OUI : EVENEMENT INDESIRABLE GRAVE (Décès, menace du pronostic vital, hospitalisation ou prolongation d'hospitalisation, incapacité permanente ou sévère, grossesse, anomalie congénitale);
 COMPLÉTER LE FORMULAIRE EIG ET LE FAXER DES QUE POSSIBLE AU N° INDIQUÉ

** IMPORTANT / SI L'EVENEMENT INDESIRABLE A NECESSITE LA PRISE D'UN TRAITEMENT, LE RAJOUTER DANS LES COMMENTAIRES

FORMULAIRE DE NOTIFICATION D'UN
 EVENEMENT INDESIRABLE GRAVE

A faxer à la.FRC au 03 20 44 57 11

Déclaration initiale <input type="checkbox"/>	Suivi d'événement <input type="checkbox"/>					
(Ne remplissez ou modifiez que les cases 1, 7, 8, 9, 10, 11)						
1- Identification du patient :						
Nom : (..) (..) Prénom : (..)	Numéro de patient : (.....) Centre de Lille					
Date de naissance (ou âge) :	Sexe : <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F					
Groupe : <input type="checkbox"/> C1 <input type="checkbox"/> C2 <input type="checkbox"/> M1 <input type="checkbox"/> M2						
2- Description de l'événement indésirable :						
.....						
.....						
.....						
Début de l'événement JJ MM AA ..	Durée si inférieure à 24 h h mn					
Fin de l'événement :						
3- Antécédents pertinents :						
4- Critère de gravité :						
<input type="checkbox"/> Décès	<input type="checkbox"/> Hospitalisation ou prolongation d'hospitalisation					
<input type="checkbox"/> Mise en jeu du pronostic vital	<input type="checkbox"/> Anomalie congénitale					
<input type="checkbox"/> Invalidité ou incapacité	<input type="checkbox"/> Evénement considéré comme grave par l'investigateur					
5- Acte pratiqué au cours de l'étude :						
Acte pratiqué	Date					
.....					
6- Traitement(s) concomitants(s) à l'exception de ceux utilisés pour traiter l'EIG :						
Nom commercial ou DCI	Voie	Posologie	Date de début	En cours	Date de fin	Indication
				<input type="checkbox"/>		
				<input type="checkbox"/>		
				<input type="checkbox"/>		

* SI OUI : EVENEMENT INDESIRABLE GRAVE (Décès, menace du pronostic vital, hospitalisation ou prolongation d'hospitalisation, incapacité permanente ou sévère, grossesse, anomalie congénitale); COMPLÉTER LE FORMULAIRE EIG ET LE FAXER DES QUE POSSIBLE AU N° INDIQUÉ

** IMPORTANT / SI L'EVENEMENT INDESIRABLE A NECESSITE LA PRISE D'UN TRAITEMENT, LE RAJOUTER DANS LES COMMENTAIRES

1'- Identification du patient : Nom : Prénom : Numéro de patient :	
Nature de l'événement :	
7- Mesures prises <ul style="list-style-type: none"> • Concernant la prise en charge étudiée (cochez une seule réponse) <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Pas de changement <input type="checkbox"/> Interruption momentanée date : <input type="checkbox"/> Arrêt en raison de l'événement <input type="checkbox"/> Arrêt pour une autre raison que l'événement <input type="checkbox"/> Levée d'insu - Résultat : <input type="checkbox"/> Autre (précisez) • Concernant l'événement indésirable grave : Traitement correcteur ? <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non si oui, le(s)quel(s) : • Examens complémentaires : <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Si oui, préciser la nature et le résultat : 	8- Relation causale Cet événement peut-il être raisonnablement associé au(x) acte(s) pratiqué(s) ou au protocole de l'étude : <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Douteux <input type="checkbox"/> Non Si Non, sélectionnez une autre explication <input type="checkbox"/> Maladie traitée <input type="checkbox"/> Maladie associée <input type="checkbox"/> Traitement(s) concomitant(s) – Précisez le(s)quel(s) <input type="checkbox"/> Autre cause connue ou suspectée
9- Intensité (cochez une seule réponse) <input type="checkbox"/> Légère <input type="checkbox"/> Modérée <input type="checkbox"/> Sévère	10- Evolution (cochez une seule réponse) A la date du : <input type="checkbox"/> Inconnue <input type="checkbox"/> Guérison sans séquelle <input type="checkbox"/> Décès <input type="checkbox"/> Séquelles <input type="checkbox"/> En cours
11- Commentaires :	

Nom de l'investigateur : _____ Date de ce rapport :

Signature :

* SI OUI : EVENEMENT INDESIRABLE GRAVE (Décès, menace du pronostic vital, hospitalisation ou prolongation d'hospitalisation, incapacité permanente ou sévère, grossesse, anomalie congénitale): COMPLETER LE FORMULAIRE ET ET LE FAXER DES QUE POSSIBLE AU N° INDIQUE
 ** (IMPORTANT) SI L'EVENEMENT INDESIRABLE A NECESSITE LA PRISE D'UN TRAITEMENT, LE RAJOUTER DANS LES COMMENTAIRES



Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 – 59006 LILLE Cedex
Tél. 03.20.96.40.40 – Fax 03.20.95.90.09

DECISION D'AUTORISATION DE SOUTENANCE

Le Doyen de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Vu le Décret n° 88.996 du 19 Octobre 1988 modifié relatif aux études spécialisées du troisième cycle de Pharmacie

Vu le Décret n° 90810 du 10 Septembre 1990 fixant la réglementation du D.E.S. de Biologie Médicale

Vu la décision du Président de l'Université en date du 17 décembre 1999 relative aux délégations de signature :

DECIDE

Article 1er : **Madame LAVISSE-ROMA Charlotte**

Est autorisé(e) à soutenir son mémoire en vue de l'obtention du D.E.S. de BIOLOGIE MEDICALE sur le sujet suivant :

PROFIL D'EXPRESSION DES MACROPHAGES M1/M2 DANS L'ATHEROSCLEROSE HUMAINE ET MODULATION PAR LES FACTEURS DE RISQUE CARDIOVASCULAIRE

Article 2 : Ce mémoire peut tenir lieu de thèse en vue de l'obtention du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie.

Article 3 : La soutenance aura lieu le
Mercredi 6 juin 2012 à 18 h 00 – Amphithéâtre Marie Curie

Article 4 : Le jury est composé ainsi qu'il suit :

Président :

Monsieur le Professeur DUTHILLEUL, Faculté de Pharmacie de Lille

Membres :

Madame le Professeur B. JUDE, Faculté de Médecine de Lille

Madame le Professeur A. MUHR-TAILLEUX, Faculté de Pharmacie de Lille

Madame le Docteur A. DUPONT, Faculté de Médecine de Lille

Lille, le 23 avril 2012

Le Doyen

L. DUBREUIL



Université de Lille 2
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE
MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)
Année Universitaire 2011/2012

Nom : ROMA, née LAVISSE

Prénom : Charlotte

Titre du mémoire/thèse :

PROFIL D'EXPRESSION DES MACROPHAGES M1 ET M2 DANS L'ATHEROSCLEROSE HUMAINE ET MODULATION PAR LES FACTEURS DE RISQUE CARDIOVASCULAIRE

Mots-clés : athérosclérose, macrophages M1/M2, facteurs de risque cardiovasculaire, diabète, hémostase, facteur tissulaire, angiogénèse, protéolyse

Résumé :

Introduction : L'athérosclérose se caractérise par une inflammation chronique de l'intima des artères où s'infiltrent notamment les macrophages. Deux sous-types de macrophages coexistent dans la plaque athéroscléreuse humaine, les M1 et les M2. Les macrophages sont capables d'exprimer et de libérer divers médiateurs tels que des cytokines pro- et anti-inflammatoires, du Facteur Tissulaire (FT), initiateur principal de la coagulation et ses inhibiteurs physiologiques, les Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI et TFPI-2), des acteurs pro-angiogéniques (VEGF, Vascular Endothelium Growth Factor) et des métalloprotéases (MMP) impliquées dans la vulnérabilité de la plaque. **Objectifs :** Les buts de ce travail étaient de comparer le niveau d'expression et/ou de sécrétion de ces médiateurs entre les macrophages M1 et M2 issus de monocytes circulants de patients athéroscléreux, puis d'évaluer l'impact des principaux facteurs de risque cardiovasculaire sur ces profils d'expression. **Matériel et méthodes :** Des macrophages dérivés des monocytes circulants (MDM) de 35 patients athéroscléreux ont été mis en culture pendant 7 jours en présence d'IL-1 β (10ng/mL) ou d'IL-4 (10ng/mL) pour induire, respectivement, les phénotypes M1 et M2. L'expression des médiateurs de l'athérosclérose a été évaluée par RT-PCR quantitative. La sécrétion de certains médiateurs a été appréciée par dosage ELISA dans les surnageants de culture des MDM. **Résultats :** Nous confirmons les propriétés pro-inflammatoires des M1 (expression accrue du TNF α et d'IL-1 β , $p < 0,0001$ pour les 2) et les capacités anti-inflammatoires des M2 (expression accrue de l'IL-10, $p < 0,0001$). Nous observons que les M1 sont anti-fibrinolytiques (expression significativement plus élevée du PAI-1, inhibiteur de la fibrinolyse, dans les M1 vs M2, $p < 0,0001$) et expriment davantage de FT ($p = 0,04$) et de MMP-9 ($p < 0,0001$). Les M2, quant à eux, expriment significativement plus de VEGF ($p = 0,0001$) et de TFPI ($p = 0,0025$), modulant ainsi l'instabilité et la thrombogénicité des plaques. De plus, nous montrons que les patients diabétiques présentent, dans les M1, une activité pro-angiogénique et protéolytique plus importante, pouvant expliquer une fragilité accrue des plaques observée chez ces patients. L'expression du TFPI dans les M1 est inversement corrélée à l'âge des patients ($p = 0,045$, $r = -0,345$), en accord avec le fait que l'âge prédispose aux thromboses. Enfin, l'expression de l'IL-10 dans les macrophages M2 diffère selon le sexe des patients. **Conclusion :** Ce travail montre que les 2 sous-populations M1 et M2 peuvent moduler différemment les processus physiopathologiques impliqués dans l'athérosclérose et que le diabète, la dyslipidémie, l'obésité, le sexe et l'âge ont une influence significative sur les profils d'expression des M1 et M2.

Membres du jury :

Président :

Monsieur le Professeur Patrick DUTHILLEUL

Assesseurs :

Madame le Professeur Brigitte JUDE

Madame le Professeur Anne TAILLEUX

Directeur de thèse :

Madame le Docteur Annabelle DUPONT