



HAL
open science

Evaluation de radiotraceurs spécifiques de la plaque d'athérome vulnérable et de l'angiogenèse myocardique

Julien Dimastromatteo

► **To cite this version:**

Julien Dimastromatteo. Evaluation de radiotraceurs spécifiques de la plaque d'athérome vulnérable et de l'angiogenèse myocardique. Ingénierie biomédicale. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2010. Français. NNT: . tel-00487779

HAL Id: tel-00487779

<https://theses.hal.science/tel-00487779>

Submitted on 31 May 2010

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

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

UNIVERSITE DE GRENOBLE

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE GRENOBLE

Ecole Doctorale : Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement

Discipline : Biotechnologie, Instrumentation, Signal et Imagerie pour la Médecine,
la Biologie et l'Environnement

Présentée et soutenue publiquement par

JULIEN DIMASTROMATTEO

le 4 mars 2010

Evaluation de radiotraceurs spécifiques de la plaque d'athérome
vulnérable et de l'angiogenèse myocardique

Directeur de thèse : Pr. Daniel FAGRET

Composition du jury :

Mr le Professeur Philippe Franken : Rapporteur

Mr le Docteur Didier Le Bars : Rapporteur

Mr le Professeur Pascal Dumy : Examineur

Mr le Professeur Daniel Fagret : Examineur

Mr le Docteur Jean-Claude Madelmont : Examineur

Mr le Docteur Roberto Pasqualini : Examineur

Mr le Docteur Laurent Riou : Examineur

Mr le Professeur Gerald Vanzetto : Président

Abbréviations	6
Introduction générale.....	7
Revue Bibliographique.....	8
1 Introduction	8
2 Biologie du développement de la plaque d'athérome	9
2.1 L'athérosclérose	9
2.2 Rappel sur la structure artérielle.....	10
2.2.1 L'intima.....	10
2.2.2 La média.....	10
2.2.3 L'adventice.....	11
2.3 Lipoprotéines et athérosclérose.....	11
2.3.1 Rôle des lipoprotéines	11
2.4 La dysfonction endothéliale	16
2.5 Initiation de la formation de la plaque d'athérome	17
2.5.1 Pénétration des LDLs dans la paroi vasculaire	17
2.5.2 Oxydation des LDLs	18
2.5.3 Recrutement des cellules inflammatoires circulantes	19
2.5.3.1 « Rolling ».....	19
2.5.3.2 Activation et adhésion ferme.....	20
2.5.3.2.1 MCP-1	21
2.5.3.2.2 Interleukine -8 (Il-8) et Gro- α	21
2.5.3.2.3 Fractalkine.....	22
2.5.3.2.4 VCAM-1 et ICAM-1 dans l'adhésion ferme.....	22
2.5.3.3 La transmigration	24
2.5.3.3.1 PECAM-1	25
2.5.3.3.2 CD99	25
2.5.3.3.3 VE-cadhérine.....	26
2.5.3.3.4 Les « Junctional Adhesion Molecules » (JAM).....	26
2.5.4 Formation des cellules spumeuses	27
2.5.4.1 Différenciation des monocytes.....	28
2.5.4.2 Prolifération des macrophages	28
2.5.4.3 Vers un phénotype « spumeux »	29
2.6 Progression.....	31
2.6.1 Migration des CMLs vers l'intima.....	31
2.6.2 Rôle des lymphocytes T	32
2.6.2.1 Présentation des antigènes.....	32
2.6.2.2 Réponse des LT helper 1 (Th1).....	33
2.6.2.3 Réponse des LT helper 2 (Th2).....	33
2.6.3 La plaque d'athérome vulnérable.....	34
2.6.3.1 Facteurs de déstabilisations de la plaque vulnérable.....	35
2.6.3.1.1 La mort cellulaire	35
2.6.3.1.2 Les métalloprotéases (MMPs).....	36
2.6.3.1.3 La néoangiogenèse	38
2.6.3.1.4 Le facteur tissulaire	39
2.7 La thrombose.....	42
2.8 Classification des plaques d'athérome	43
2.9 Résumé.....	45
2.10 Conclusions	45
3 Imagerie de la plaque d'athérome vulnérable	47

3.1	Techniques d'imagerie invasive.....	48
3.1.1	Angiographie.....	48
3.1.2	Angioscopie.....	48
3.1.3	Echographie.....	49
3.1.3.1	Echographie endovasculaire (IVUS).....	49
3.1.3.2	Elastographie endovasculaire.....	50
3.1.3.3	Echocardiographie de contraste.....	51
3.1.4	OCT : Optical Coherence Tomography.....	52
3.1.5	La thermographie.....	53
3.1.6	L'imagerie de Résonance Magnétique intravasculaire (IRMiv).....	54
3.1.7	Les sondes fluorescentes activables (NIRF).....	55
3.1.8	Les sondes en médecine nucléaire.....	56
3.1.9	Les méthodes spectroscopiques.....	57
3.1.9.1	La spectroscopie proche infrarouge (NIR).....	57
3.1.9.2	La spectroscopie de Raman.....	57
3.1.10	Conclusion.....	58
3.2	Techniques d'imagerie non invasive.....	58
3.2.1	Tomodensitométrie aux rayons X (TDRX).....	58
3.2.2	Imagerie par Résonance Magnétique (IRM).....	60
3.2.3	Médecine nucléaire.....	64
3.2.3.1	Imagerie des Lipoprotéines de faible densité (LDLs).....	64
3.2.3.2	Imagerie de l'inflammation.....	66
3.2.3.2.1	MCP-1 :Monocyte Chemoattractant Protein-1.....	66
3.2.3.2.2	Le [¹⁸ F]-FDG.....	66
3.2.3.2.3	[¹⁸ F]-choline.....	68
3.2.3.2.4	Imagerie cellulaire des monocytes/macrophages.....	68
3.2.3.2.5	Imagerie de VCAM-1.....	69
3.2.3.2.6	Imagerie des metalloprotéinases (MMPs).....	69
3.2.3.3	Imagerie de l'apoptose.....	71
3.2.3.3.1	Annexine A5.....	71
3.2.3.4	Autres cibles moléculaires pour l'imagerie de la plaque vulnérable.....	72
3.2.3.4.1	Les récepteurs de l'endothéline.....	72
3.2.3.4.2	Angiogenèse.....	72
3.2.3.4.3	Oligonucleotides anti-sens.....	73
3.2.3.5	Conclusion.....	74
3.2.4	Conclusion.....	75
3.3	Conclusion.....	75
4	Conclusion générale.....	77
Partie expérimentale.....		79
5	Introduction.....	79
6	Traceurs utilisés.....	80
6.1	B2702p et dérivés.....	80
6.2	VP, VP mismatch et VINP-28.....	81
7	Radiochimie.....	82
7.1	Radiomarquage des traceurs technétiés.....	82
7.1.1	B2702p et dérivés.....	82
7.1.2	VP et VP mismatch.....	83
7.1.3	VINP-28.....	83
7.2	Marquage à la fluorescéine.....	83
7.3	Coefficient de partage.....	83

7.4	Stabilité in vivo des traceurs	83
7.5	Fixation aux protéines plasmatiques par électrophorèse.....	84
8	Polarisation de fluorescence.....	84
9	Protocole expérimental de l'évaluation des radiotraceurs.....	85
9.1	Induction de la lésion athérosclérotique par ligature de la carotide gauche.....	85
9.2	Imagerie in vivo	86
9.2.1	Imagerie planaire.....	86
9.2.2	Imagerie tomographique	86
10	Analyses postmortem	86
10.1	Dosages plasmatiques	86
10.2	Biodistribution par prélèvements d'organes	87
10.3	Immunohistochimie.....	88
10.3.1	Immunomarquage de VCAM-1, des macrophages et des néovaisseaux	88
10.3.2	Immunomarquage des CMLs.....	89
10.4	Analyse des images et quantifications	89
10.5	Analyses statistiques	90
11	Résultats	90
11.1	Radiochimie	90
11.2	Polarisation de fluorescence.....	91
11.3	Validation du modèle expérimental	92
11.3.1	Dosages plasmatiques	92
11.3.2	Immunohistochimie.....	92
11.4	Traceurs potentiels de VCAM-1	94
11.4.1	Biodistributions	94
11.4.2	Imagerie planaire.....	97
11.4.3	Imagerie tomographique	100
12	Discussion	101
12.1	Traceurs spécifiques de VCAM-1.....	101
12.1.1	Choix de la cible : VCAM-1	101
12.1.2	Validation du modèle expérimental	101
12.1.3	Choix et évaluation des traceurs spécifiques de VCAM-1	103
12.1.3.1	Choix des traceurs spécifiques de VCAM-1	103
12.1.3.2	Evaluation des traceurs spécifiques de VCAM-1	104
12.2	Comparaison du ^{99m} Tc-B2702p1 avec la littérature.....	107
13	Conclusion.....	108
	Revue bibliographique	110
1	Introduction	110
2	Infarctus du myocarde et angiogenèse myocardique	111
2.1	Généralités.....	111
2.2	Réponse inflammatoire	114
2.2.1	Initiation de la réponse inflammatoire post infarctus.....	114
2.2.1.1	Les TLR.....	114
2.2.1.2	Le complément.....	115
2.2.1.3	Les ROS	115
2.2.2	Les cytokines pro-inflammatoires.....	116
2.2.2.1	Le TNF α	116
2.2.2.2	L'Il-1 β	116
2.2.2.3	L'Il-6	117
2.2.3	Implications cellulaires dans la réponse inflammatoire post infarctus	117
2.2.3.1	Les plaquettes.....	117

2.2.3.2	Les neutrophiles	117
2.2.3.3	Les monocytes.....	118
2.2.3.4	Les mastocytes	119
2.2.3.5	Les fibroblastes	119
2.2.3.6	Les cellules vasculaires	120
2.2.3.7	Induction de l'angiogenèse.....	121
2.2.3.7.1	Induction de l'angiogenèse myocardique par l'hypoxie	121
2.2.3.7.2	Rôle de la matrice extracellulaire dans l'angiogenèse myocardique ...	122
2.2.4	Résolution de la réponse inflammatoire.....	123
2.2.5	Conclusion.....	124
3	Modulation de l'angiogenèse myocardique	124
3.1	Fonction cardiaque	125
3.2	Thérapie utilisant des protéines recombinantes	125
3.2.1	Etudes expérimentales.....	125
3.2.2	Etudes cliniques.....	126
3.3	Thérapie génique.....	127
3.3.1	Etudes expérimentales.....	127
3.3.2	Etudes cliniques.....	128
3.4	Thérapie cellulaire.....	129
3.4.1	Etudes expérimentales.....	129
3.4.2	Essais cliniques	130
3.5	Conclusions	130
4	Imagerie de l'angiogenèse.....	131
4.1	Imagerie moléculaire des marqueurs de l'angiogenèse.....	131
4.1.1	Imagerie de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$	131
4.1.2	Imagerie du VEGF	133
4.1.3	Imagerie des métalloprotéases	134
4.1.4	Conclusion.....	135
4.2	Imagerie des conséquences physiologiques de l'angiogenèse	136
4.2.1	Imagerie de perfusion.....	136
4.2.1.1	Imagerie scintigraphique	136
4.2.1.2	Imagerie par résonance magnétique (IRM).....	136
4.2.1.3	Echocardiographie de contraste	137
4.2.2	Imagerie de l'hypoxie.....	137
5	Conclusion.....	138
	Travail expérimental	139
6	Introduction	139
7	Matériel & Méthodes	140
7.1	Synthèse des traceurs	140
7.2	Radiomarquage des traceurs.....	140
7.3	Protocole expérimental.....	141
7.3.1	Induction de l'angiogenèse myocardique chez le rat	141
7.4	Imagerie moléculaire de l'angiogenèse myocardique.....	142
7.4.1	Biodistribution et imagerie ex vivo	142
7.4.2	Imagerie SPECT in vivo	143
7.5	Analyses postmortem	143
7.5.1	Immunohistochimie.....	143
7.5.2	Histologie	144
7.5.3	Biodistribution.....	144
7.5.4	Autoradiographie et coloration de la zone infarctie	144

7.6	Analyse des images et quantification	144
7.6.1	Images autoradiographiques ex vivo (Groupe 1)	144
7.6.2	Images Tomographiques in vivo (Groupe 2)	145
7.7	Analyse statistique.....	145
8	Résultats	145
8.1	Immunohistochimie du CD31, KiM2R et $\alpha v\beta 3$	145
8.2	Biodistributions du ^{99m}Tc -RAFT-RGD et du ^{99m}Tc -RAFT-RAD.....	146
8.3	Imagerie moléculaire de l'angiogenèse myocardique avec le ^{99m}Tc -RAFT-RGD ..	148
8.3.1	Imagerie autoradiographique ex vivo (Groupe 1).....	148
8.3.2	Imagerie moléculaire tomographique double isotope in vivo (Groupe 2)	150
9	Discussion	153
9.1	Validation du modèle expérimental	154
9.2	Choix du traceur de l'angiogenèse	154
9.3	Biodistribution.....	155
9.4	Imagerie moléculaire ex vivo	155
9.5	Imagerie moléculaire tomographique in vivo	156
9.6	Limitation de l'étude	157
9.6.1	Etude de la spécificité de fixation	157
10	Conclusion.....	157
	Références bibliographiques	158

Abbréviations

ACAT : Acétyl CoA Transférase

CD : Cell Differentiation

CE : Cellule Endothéliale

CL : Cholestérol Libre

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CML : Cellule Musculaire Lisse

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

EC : Ester de Cholestérol

FDG : Fluoro-Deoxy-Glucose

FGF : Fibroblast Growth Factor

FT : Facteur Tissulaire

G/M-CSF : Granulocyte/Macrophage-Colony
Stimulating Factor

HDL : High Density Lipoprotein

HIF : Hypoxia-Inducible Factor

ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule -1

IDL : Intermediar Density Lipoprotein

IFN : Interféron

Il : Interleukine

IRM(iv) : Imagerie par Résonance Magnétique
(intravasculaire)

IVUS : IntraVascular UltraSound

JAM : Junctional Adhesion Molecule

LCAT : Lécithine Clolestérol AcylTransférase

LDL : Low Lensity Lipoprotein

LDL-R : Low Lensity Lipoprotein Receptor

LFA-1 : Lymphocyte fonction-associated antigen -1

LPL : Liprotéine Lipase

LT/LB : Lymphocyte T/B

MCP-1 : Monocyte Chemattractant Protein -1

MEC : Matrice ExtraCellulaire

MMP : Matrix Metalloproteinase

NIR(F) : Near Infra Red (Fluorescence)

NO : Monoxyde d'azote

OCT : Optical Coherence Tomography

PECAM-1 : Platelet Endothelial Cell Adhesion

Molécule -1

PL : Phospholipide

ROS/RNS : Reactive Oxygen/Nitrogen Species

SR-B1 : Scavenger Receptor -B1

TDRX : TomoDensitométrie à Rayons X

TG : Triglycéride

TGF : Transforming Growth Factor

TIMP : Inhibiteur des MMPs

TLR : Toll Like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

VCAM-1 : Vacsular Cell Adhesion Molecule -1

VE-Cadhérine : Vascular Endothelial- Cadhérine

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VLA-4 : Very Late Antigen -4

VLDL : Very Low Lensity Lipoprotein

Introduction générale

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause mondiale de mortalité dont un tiers est imputable à la maladie coronaire. Ces victimes inaugurent leur maladie subitement par une crise cardiaque faisant suite à la rupture d'une plaque d'athérome vulnérable. L'enjeu clinique repose donc sur la prévention de ces accidents coronaires dans une population à risques cardiovasculaires. Or, à l'heure actuelle, il n'existe aucune technique d'imagerie qui permet la détection des plaques d'athérome vulnérable. La médecine nucléaire de par sa grande sensibilité peut apporter des solutions. **La première partie de cette thèse porte sur l'évaluation de nouveaux radiotraceurs potentiels spécifiques de la plaque d'athérome vulnérable.** Suite à l'infarctus du myocarde causé par l'ischémie des tissus situés en aval du thrombus, le pronostic vital du patient est alors engagé. Deux patients sur 3 meurent avant d'arriver à l'hôpital. Les patients qui en réchappent évoluent vers une insuffisance cardiaque pour mourir dans les 6 à 8 ans qui suivent l'accident coronaire. Cependant, des études expérimentales ont montré un effet bénéfique des traitements proangiogéniques sur la longévité post infarctus des animaux traités alors que les études cliniques correspondantes ont abouti à des résultats contradictoires. Ces résultats pourraient provenir de l'inefficacité des traitements proangiogéniques administrés. Or, à l'heure actuelle, il n'existe aucun moyen de contrôler in vivo l'efficacité de ces traitements proangiogéniques. **La deuxième partie de cette thèse porte sur la validation du radiotracer ^{99m}Tc -RAFT-RGD dans la détection de l'angiogenèse myocardique.**

Evaluation de nouveaux radiotraceurs pour la détection de la plaque d'athérome vulnérable

Revue Bibliographique

1 Introduction

Les maladies cardiovasculaires tuent chaque année 19 millions de personnes, soit 29% des décès dans le monde. Elles représentent la première cause mondiale de mortalité (WHO 2007). La majorité de ces décès sont causés par la maladie coronaire et le plus souvent ceci est dû à la rupture de plaque d'athérome à risques, peu sténosantes, appelées plaques d'athérome vulnérables. La rupture de ces plaques d'athérome vulnérables provoque la formation d'un thrombus qui obstrue potentiellement la lumière du vaisseau, entraînant l'ischémie myocardique et l'infarctus du myocarde.

La méthode de référence employée actuellement pour le diagnostic de la maladie coronaire, est la coronarographie. Cette méthode invasive permet d'observer la lumière du vaisseau grâce à l'injection d'un produit de contraste. Le diagnostic de la maladie coronaire est actuellement affirmé lorsque la présence d'une plaque d'athérome entraîne un rétrécissement de la lumière du vaisseau supérieur ou égal à 50%. Or, 1/3 seulement des accidents coronaires sont causés par des sténoses supérieures à 50%, tandis que les 2/3 des accidents restants sont causés par la rupture d'une plaque d'athérome responsable d'une sténose inférieure à 50% (Fuster 1999). Ces plaques d'athérome sont le plus souvent invisibles à la coronarographie. La coronarographie est donc inadaptée pour l'identification des plaques d'athérome vulnérables.

En effet, les plaques d'athérome vulnérables se développent de manière excentrique. Elles sont caractérisées par une fine capsule fibreuse enveloppant un large corps lipidique et nécrotique ainsi que par un phénomène inflammatoire intense. Le processus inflammatoire qui mène au développement de la plaque athérosclérotique vulnérable est ainsi caractérisé par un fort recrutement monocytaire et lymphocytaire dans la paroi artérielle. Il n'existe, à l'heure actuelle, aucune technique d'imagerie capable de détecter ces plaques d'athérome vulnérables de manière non invasive et applicable en routine clinique. De nombreuses modalités d'imagerie, invasives ou non, sont actuellement à l'étude pour le diagnostic de la plaque vulnérable. Parmi elles, la médecine nucléaire, grâce à sa grande sensibilité et aux informations d'ordre moléculaire et fonctionnel qu'elle apporte, peut amener des solutions. Le

but de ce travail est d'évaluer de nouveaux radiotraceurs potentiels de la plaque vulnérable. Pour cela, une cible moléculaire, marqueur de la plaque vulnérable, a été choisie : la molécule d'adhésion Vascular Cell Molecule Adhesion -1 (VCAM-1). Les ligands évalués sont des motifs peptidiques dérivés du B2702, molécule du CMH I connu pour se lier à VCAM-1, ainsi que des séquences oligopeptidiques obtenues par phage display in vitro et in vivo ayant montrés une forte affinité pour VCAM-1.

2 Biologie du développement de la plaque d'athérome

2.1 L'athérosclérose

L'athérosclérose est une pathologie inflammatoire chronique des artères de moyen et gros calibre (Ross 1999) qui se développe au niveau de sites privilégiés de l'arbre vasculaire et conduit à la formation de plaques d'athérome. La formation des plaques d'athérome débute dès les premières années de la vie durant lesquelles des monocytes/macrophages s'accumulent dans l'espace sous-endothélial. Les macrophages infiltrés accumulent le cholestérol oxydé de manière dérégulée et deviennent spumeux. C'est la formation de stries lipidiques. Ces stries peuvent évoluer vers une plaque fibreuse. Elle possède alors un corps lipidique et nécrotique recouvert d'une capsule fibreuse. Initialement, la plaque d'athérome se développe de manière excentrique (Glagov 1987). La plaque peut alors progresser vers un phénotype « stable », très fibreux, et qui réduit la lumière vasculaire ou vers un phénotype « instable » ou « vulnérable » avec un large corps lipidique recouvert d'une fine capsule fibreuse et caractérisée par une inflammation exacerbée. La plaque vulnérable peut se rompre subitement et former un thrombus qui va obstruer la lumière du vaisseau.

Les facteurs de risques prédisposant chaque individu au développement de lésions athérosclérotiques ont été déterminés à partir d'études épidémiologiques menées sur des populations dont les caractéristiques sont connues. Ces études permettent de corréler les survenues d'accidents cardiovasculaires à certaines habitudes ou caractéristiques de cette population. L'hypercholestérolémie, le diabète, l'obésité, le tabagisme et l'hypertension artérielle sont ainsi les principaux facteurs de risques identifiés à partir de ces différentes études épidémiologiques.

2.2 Rappel sur la structure artérielle

La paroi artérielle est constituée de 3 couches ou tuniques concentriques séparées par des lames élastiques (Figure 1).

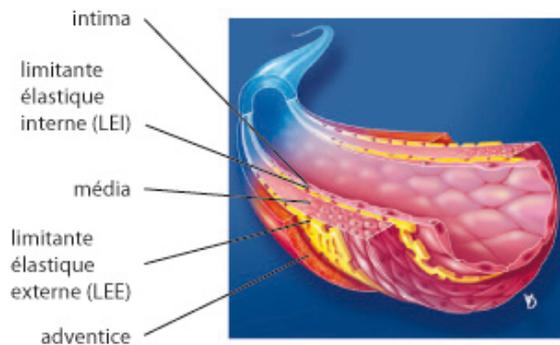


Figure 1

Structure d'une artère (www.illustration-medicale.fr).

2.2.1 L'intima

L'intima est une couche très fine constituée de l'endothélium, formé par une juxtaposition ordonnée de cellules endothéliales en contact direct avec le sang, et d'une couche sous-endothéliale qui correspond à un tissu conjonctif lâche. L'endothélium possède des propriétés métaboliques avec la synthèse de molécules vasoactives comme le NO, l'endothéline, l'Endothelium Dependant Relaxing Factor (EDRF) et la conversion de l'angiotensine. Il possède aussi des propriétés anti-thrombotiques avec la synthèse de prostaglandine I₂, d'antithrombine III et de l'activateur tissulaire du plasminogène. C'est dans l'espace sub-endothélial que débute la formation de la plaque d'athérome.

2.2.2 La média

La média est la tunique la plus épaisse de la paroi artérielle. Elle est séparée de l'intima par la limite élastique interne. Elle est principalement constituée de cellules musculaires lisses (CMLs) qui ont un rôle primordial sur la motricité du vaisseau. Les CMLs sont empilées de façon concentrique en couches appelées unités lamellaires. Le nombre de ces couches varie suivant le type d'artère : d'une couche, pour les artérioles, à plusieurs couches, pour les artères de calibre supérieur. Une lame d'élastine, la limite élastique externe, sépare la média de l'adventice. Cette limite n'est toutefois rencontrée que dans les vaisseaux de fort calibre.

2.2.3 L'adventice

L'adventice est la tunique externe de la paroi vasculaire. Elle est constituée d'un tissu conjonctif peu organisé, riche en collagène et en fibres élastiques, et contenant des fibroblastes et des adipocytes. Elle est irriguée par des vasa vasorum qui ont un rôle nourricier pour l'adventice elle-même ainsi que pour la partie externe de la media.

2.3 *Lipoprotéines et athérosclérose*

L'hyperlipidémie est un facteur de risque majeur pour le développement athérosclérotique. De grandes quantités de cholestérol sont transportées par des lipoprotéines de faible densité (LDLs) et de très faible densité (VLDLs) vers les tissus et contribuent ainsi au développement de l'athérosclérose (Maxfield 2005). L'augmentation de la perméabilité endothéliale aux sites athérogènes (cf. chapitre 2.5 ci-dessous) favorise le dépôt des lipoprotéines dans la paroi artérielle (Orr 2007) alors que le remodelage matriciel s'opérant au sein de la plaque en favorise la rétention (Maxfield 2005).

2.3.1 Rôle des lipoprotéines

Les cellules maintiennent le bon fonctionnement de leur membrane en réponse à différents changements dans leur environnement. Chez l'homme, le facteur le plus important influençant la composition de la membrane en lipides est la prise alimentaire de cholestérol et de graisse. Ceux-ci sont délivrés aux cellules de l'organisme via les lipoprotéines (Goldstein 2001). Le taux de cholestérol plasmatique est un facteur important dans le développement de l'athérosclérose. En effet, l'hypercholestérolémie est un facteur de risque responsable à lui seul de la formation de plaques d'athérome (Glass 2001).

Les lipoprotéines se distinguent entre elles par leur différence de densité. On identifie les chylomicrons, les VLDLs, les IDLs, les LDLs et les lipoprotéines de haute densité (HDLs). La composition lipidique et peptidique de ces particules est variable. Les protéines qui composent les lipoprotéines sont appelées apolipoprotéines ou apo (Tableau 1).

Lipoprotéines	Densité (g/ml)	Taille (nm)	Proportion EC/TG	Apo
Chylomicron	0,93	75 – 1200	1/19	B48, E, C
VLDL	0,93-1,006	30 - 80	1/3,3	B100, E, C
IDL	1,006-1,019	27 – 35	1/3,5	B100, E
LDL	1,019-1,063	18 – 27	1/0,23	B100
HDL	1,063-1,210	7 - 12	1/0,205	AI, AII, C

Tableau 1

Caractéristiques physicochimiques des lipoprotéines plasmatiques humaines (Lagrost 2003). EC : ester de cholestérol, TG : triglycéride.

Le coeur lipidique hydrophobe des lipoprotéines, constitué d'esters de cholestérol et de triglycérides, est recouvert d'une enveloppe amphiphile dont les constituants principaux sont les phospholipides, le cholestérol non-estérifié et les apolipoprotéines. Ces dernières confèrent à chaque lipoprotéine ses propriétés fonctionnelles et son devenir métabolique.

Les chylomicrons, ou particules post prandiales, sont synthétisées par les cellules intestinales pendant la période d'absorption active des lipides à partir de la lumière intestinale. Ils sont déversés dans les canaux lymphatiques d'où ils gagnent la circulation générale. L'hydrolyse des triglycérides (TG) qu'ils contiennent est réalisée pendant leur séjour plasmatique par la lipoprotéine lipase (LPL) présente à la surface de l'endothélium vasculaire. La majorité des acides gras libérés sont captés par les muscles et le tissu adipeux. Les résidus de chylomicrons (remnants) sont captés par le foie par l'intermédiaire des récepteurs de l'Apo E (Figure 2A).

Les VLDLs sont synthétisées par le foie. Elles possèdent à leur surface les Apo E et B100. Dans le sang, les VLDLs subissent l'attaque de la LPL, qui libère les acides gras des TG et les transforme en IDL ; Celles-ci ont deux voies possibles : la première est de se lier aux cellules hépatiques via leurs récepteurs à l'apo E et la seconde est de se transformer en LDL avec perte de l'apo E mais conservation de l'apo B100.

Chez l'homme, la majorité du cholestérol plasmatique est transporté par les LDLs. Toutes les cellules de l'organisme sont capables de capter les LDLs mais la majorité est captée par les cellules hépatiques (Figure 2A, D). Par ailleurs, l'augmentation des LDLs plasmatiques a été corrélée à l'augmentation du risque cardiovasculaire (Dawber 1957). Trois sous-classes de LDLs ont été mises en évidence. Ces particules diffèrent elles aussi par leur taille et par leur densité. La présence prépondérante de la plus petite et la plus dense de ces particules multiplierait par 3 le risque d'infarctus du myocarde indépendant du taux de LDL total (Austin 1988).

Les LDLs sont captées par les cellules via les récepteurs au LDL (LDL-R) qui reconnaissent le domaine extracellulaire de l'apo B100 (Figure 2D). La régulation de la teneur en LDL plasmatique passe essentiellement par la captation hépatique comme le démontre l'augmentation massive des LDLs dans le plasma des patients ayant une forme hétéro- ou homozygote de dyslipidémie familiale avec pour conséquence une diminution des LDL-R hépatiques.

Le catabolisme des LDLs par les hépatocytes débute par une internalisation induite par la liaison de l'apo B100 aux récepteurs des LDLs. Dans un premier temps, un réseau de complexes protéiques impliquant notamment la clathrine se fixe sur la face interne de la membrane. Après polymérisation et invagination de la membrane, la vésicule se détache en hydrolysant du GTP et migre vers l'intérieur de la cellule. Ensuite, les clathrines se dissocient de la paroi de la vésicule qui devient une vésicule lisse. Cet endosome fusionne avec un lysosome et les LDLs sont dégradées en acides aminés, en triglycérides, et en cholestérol (Figure 2C).

Les récepteurs aux LDLs sont soumis à un rétrocontrôle en fonction de la teneur en cholestérol intracellulaire (Briant 2003). Ainsi, lorsque la concentration en cholestérol intracellulaire est faible, le complexe « sterol regulatory element binding protein (SREBP) / SREBP cleavage-activating protein (SCAP), initialement retenu sur la membrane du réticulum endoplasmique (RE) sort du RE. SREBP subit alors deux clivages protéolytiques réalisés par Site-1 protease (S1P) et Site-2 Protease (S2P). Le domaine cytosolique de SREBP est ensuite transloqué dans le noyau afin d'activer la transcription de gènes codant entre autres pour le récepteur aux LDLs et pour l'HMG-CoA reductase qui intervient dans la biosynthèse du cholestérol (Brown 1999). A contrario, lorsque la concentration de cholestérol intracellulaire est élevée, le complexe SREBP/SCAP est retenu sur la membrane du RE, ne permettant pas la transcription de ces mêmes gènes.

L'acyl CoA cholestérol acyl transférase (ACAT) joue aussi un rôle important dans la régulation de la concentration en cholestérol intracellulaire en l'estérifiant (Tabas 2002). Les esters de cholestérol obtenus sont stockés sous forme de gouttelettes cytoplasmiques, cibles des hydrolases. Le cholestérol ainsi relâché peut être utilisé par la membrane plasmique ou pour la synthèse d'hormones stéroïdiennes chez les cellules concernées.

Enfin, un troisième système de régulation du cholestérol est fourni par des mécanismes d'efflux réalisés par les HDLs. Les HDLs sont des lipoprotéines ayant en charge le retour du surplus du cholestérol cellulaire vers le foie pour transformation en sels biliaires et en bile puis élimination par la voie intestinale. Le passage des molécules de cholestérol peut se faire

de manière passive et non-spécifique par diffusion à travers la membrane plasmique mais également, et largement, sous la dépendance de protéines spécifiques (Hayden 2000). En effet, la protéine codée par le gène ABCA1 intervient dans l'extraction du cholestérol des tissus périphériques par les HDLs. Le cholestérol diffuserait au niveau de microstructures (cavéoles) et cette diffusion serait aussi facilitée par le récepteur scavenger B1 (SR-B1) (Ji 1997) (Figure 2B).

La compréhension des mécanismes de régulation du métabolisme du cholestérol a permis le développement de modèles expérimentaux murins d'athérosclérose impliquant une hypercholestérolémie induite par la mutation des gènes codant pour l'apo E ou pour le récepteur au LDL. Ceci a permis de déterminer de nombreux mécanismes biologiques participant au développement de la plaque d'athérome.

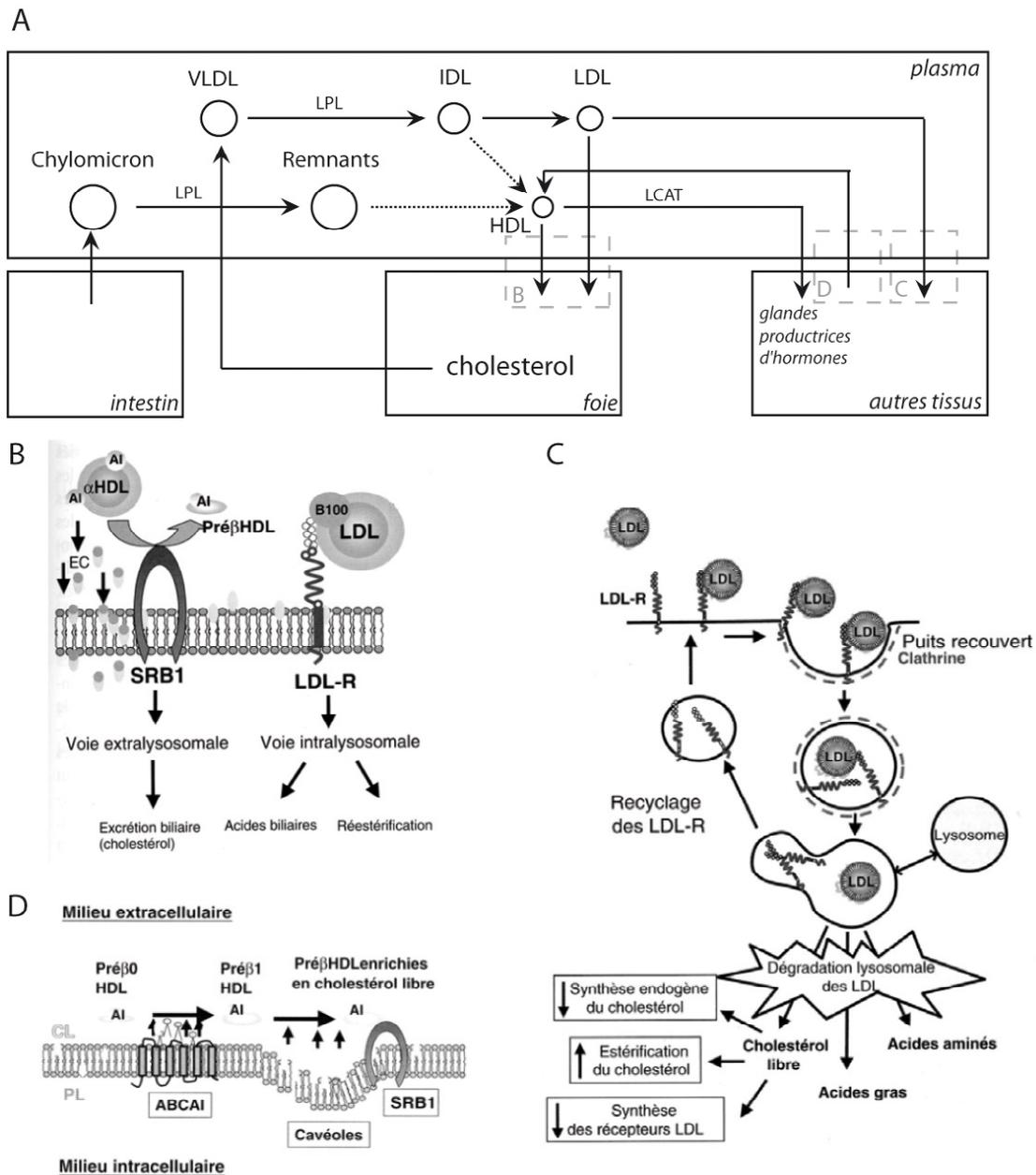


Figure 2

(A) Transport du cholestérol. (B) Métabolisme hépatique du cholestérol. Les HDLs sont prises en charge par SRB1, ce qui permet au foie la captation d'ester de cholestérol (EC) et son élimination extralysosomale sous forme d'excrétion biliaire. Les LDLs sont prises en charge par les LDL-R. Le mécanisme est décrit en (C). Cette voie lysosomale hépatique abouti à une réestérification du cholestérol ou à son élimination sous forme d'acides biliaires. (C) Captation et dégradation des LDLs. Les LDLs plasmatiques se lient au LDL-R. Ce complexe est endocyté à l'aide de molécule de clathrine. Les endosomes ainsi formés fusionnent avec des lysosomes. Les LDL-R sont recyclés et les LDLs dégradées. Le cholestérol ainsi libéré engendre une diminution de la synthèse endogène de cholestérol, augmente son estérification et sa mise en réserve et diminue la synthèse de LDL-R. (D) Mécanisme de l'efflux du cholestérol cellulaire. Le transporteur ABCA1 facilite la translocation du cholestérol des pools intracellulaires vers la membrane plasmique. Il permet également le transfert de phospholipides (PL) vers les particules pré β HDL primitives, les rendant ainsi compétentes pour acquérir du cholestérol non-estérifié. L'efflux de cholestérol se fait par diffusion au niveau de microdomaines membranaires spécialisés : les cavéoles. Le récepteur SRB1 intervient également à ce niveau en facilitant l'interaction de la particule pré β HDL avec la membrane plasmique. CL: cholestérol libre ; LPL : lipoprotéine lipase ; LCAT : Lecithine cholestérol acyltransferase ; ABC-1: ATP binding cassette -1 ; SRB-1 : Scavenger Receptor, class B1 (D'après Lagrost 2003).

2.4 La dysfonction endothéliale

Les plaques d'athérome se développent principalement au niveau des bifurcations artérielles, sur la paroi externe du point de branchement et sur la paroi interne des courbures artérielles prononcées. Ces sites sont associés à des perturbations du flux sanguin (Malek 1999, Figure 3).

En conditions physiologiques, les CE expriment différents mécanotransducteurs qui permettent la mise en place d'une réponse adaptée aux variations du flux sanguin. Parmi ceux-ci, les intégrines, « Vascular Endothelial-Cadherin (VE-Cadherin) », les récepteurs à tyrosine kinase, le glycocalyx apical, les protéines G hétérodimériques, la molécule d'adhésion « Platelet/Endothelial Cell-Adhesion Molecule -1 (PECAM-1) » mais aussi les canaux potassiques mécanosensibles. Ces mécanotransducteurs utilisent la voie de signalisation des « Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) » ou la voie « phosphoinositide-3 kinase (PI3K)-Akt » pour *in fine* phosphoryler les facteurs de transcription pro inflammatoires tels que « Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) » et « Activator Protein-1 (AP-1) ». Ces facteurs de transcription se lient au niveau des promoteurs des gènes sensibles aux forces de cisaillement induisant ou supprimant leur expression et modulant ainsi la fonction cellulaire (Chatzizisis 2007). Normalement, le relâchement musculaire est effectué par un relargage de facteurs vasoactifs tels que l'oxyde nitrique (NO) ou bien encore la prostaglandine (PG) I₂. Par contre, aux différents sites de l'arbre artériel où se développent les plaques d'athérome, les forces de cisaillement exercées par le flux sanguin sur l'endothélium sont diminuées. Les CE ne sont plus capables de maintenir un phénotype normal. En revanche, elles développent un phénotype pro-inflammatoire et ne permettent plus le relâchement des cellules musculaires lisses en réponse à une augmentation du flux sanguin. Ainsi, au niveau des zones de faibles forces de cisaillement se produit une augmentation du taux de renouvellement (turn-over), ainsi que une prolifération et l'entrée en apoptose des CE (Caplan 1973). L'altération de l'alignement des CE normalement réalisé dans le sens du flux en condition laminaire résulterait d'une modification du signal perçu par le cytosquelette. Aussi, une augmentation de la perméabilité jonctionnelle et une augmentation du stress oxydatif sont observées. Enfin, une amplification de l'expression des cytokines telles que « Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) » et des molécules d'adhésion tels que « Intercellular Cell Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) » et « Vascular Cell Adhesion Molecule-

1 (VCAM-1) » qui prédisposent au recrutement des monocytes et lymphocytes circulants et ainsi au développement de la plaques d'athérome a lieu (Iiyama 1999).

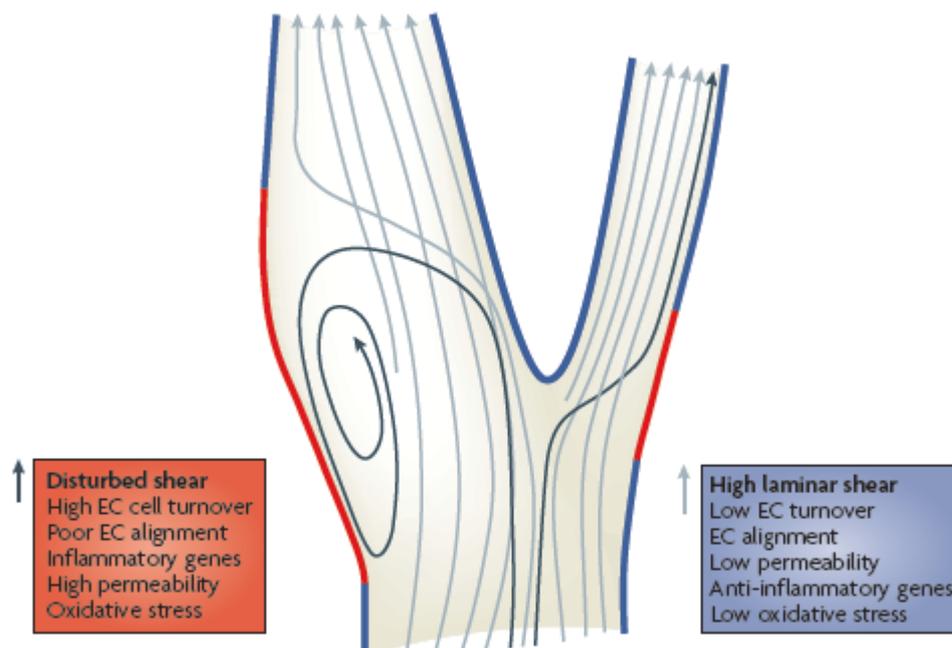


Figure 3

Bifurcation vasculaire avec perturbation du flux sanguin sur la paroi extérieure au point de branchement. En rouge, site de développement des lésions athérosclérotiques (Hahn 2009).

2.5 Initiation de la formation de la plaque d'athérome

2.5.1 Pénétration des LDLs dans la paroi vasculaire

Parallèlement aux transferts de cholestérol s'effectuant entre les LDLs et les cellules endothéliales, des vésicules de LDL se retrouvent intactes dans l'espace intimal de la paroi. Ce phénomène marque le début de la formation des stries lipidiques qui caractérisent la première étape de la formation de la plaque d'athérome (Figure 6). Le passage des LDLs dans la paroi artérielle répond à deux facteurs déterminants qui sont la concentration en LDL plasmatique et la perméabilité de la paroi artérielle (Nielsen 1996). La perméabilité de la surface luminale de la paroi artérielle a été mesurée in vivo en mesurant l'accumulation de radioactivité dans la paroi artérielle après injection de LDLs radiomarquées (Stender 1988). Ainsi, la pénétration de LDL dans la paroi artérielle saine varie d'un facteur 10 entre un individu ayant une cholestérolémie élevée et un individu normocholestérolémique. Une perméabilité plus élevée caractérisée par une accumulation de LDLs radiomarquées a aussi

été observée chez l'animal au niveau de sites aortiques prédisposés au développement de lésions athérosclérotiques (Schwenke 1989). Différents mécanismes ont été proposés. Le transfert des LDLs dans la paroi artérielle s'effectuerait par le transport vésiculaire à travers les cellules endothéliales (transcytose) (Vasile 1983), ou bien en passant par des pores se situant dans et/ou entre les cellules endothéliales (Weinbaum 1985).

2.5.2 Oxydation des LDLs

Comme décrit ci-dessus, les LDLs circulent dans le plasma et traversent pour partie l'espace subendothélial pour se retrouver dans l'intima après exclusion de la circulation générale. Il semblerait que l'oxydation des LDLs ne s'effectue pas ou très peu dans la circulation compte-tenu de la forte concentration en antioxydants plasmatiques (Frei 1988) ainsi que de la faible concentration de LDLs oxydées retrouvée dans le plasma de patients victimes d'atteintes coronaires (Stocker 2000). En conditions physiologiques, l'endothélium régule le transfert des lipides dans la paroi afin que les types cellulaires les plus éloignés puissent avoir accès aux lipides circulants. Il a été montré que le temps de rétention des molécules de LDL dans l'intima par les interactions avec la matrice extracellulaire contribue fortement à oxyder les LDLs (Borén 2000). La composition de la matrice extracellulaire (MEC) d'une artère normale est différente de celle d'une artère pathologique. La MEC de la plaque d'athérome ayant une affinité supérieure pour les LDLs, le temps de rétention des LDLs dans la paroi artérielle pathologique est augmenté et favorise ainsi leur oxydation.

Les lipides et l'apo B100 sont modifiés par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou de l'azote (RNS) au cours de l'oxydation des LDLs. Plusieurs enzymes participent à la production de ROS comme par exemple la NADP(H) oxydase et la xanthine oxydase (Godbole 2009) qui génèrent toutes deux la formation de l'anion superoxyde radicalaire ($O_2^{\cdot-}$). A ce stade précoce du développement de la plaque d'athérome, ces enzymes sont présentes dans les CEs et les CMLs aux sites de dysfonction endothéliale. La myelopéroxydase a aussi été observée au sein de lésions athérosclérotiques humaines. Cette enzyme est synthétisée par les phagocytes (Heinecke 1999). Elle modifierait les LDLs par l'intermédiaire d'espèces réactives provenant d'acides aminés (Podrez 2000). Les lipoxygénases jouent un rôle important dans l'oxydation des LDLs. Leur présence a aussi été mise en évidence chez l'homme et chez le lapin (Ylä-Herttualla 1990). Ainsi, en inhibant la 15-lipoxygénase (15-LO) chez des lapins nourris avec un régime riche en graisse et en cholestérol, la formation de lésions athérosclérotiques a diminué (Sendobry 1997).

2.5.3 Recrutement des cellules inflammatoires circulantes

Au même titre que les forces de cisaillement, la forme oxydée des LDLs et des cytokines telles que le Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), l'IL-1 sont aussi des facteurs d'activation des cellules endothéliales. Les cascades de signalisation déclenchées par ces cytokines mènent à l'activation du facteur de transcription NF κ B. L'activation du facteur de transcription NF κ B mène à l'activation de multiples gènes pro-immunogènes intervenant dans le recrutement des cellules inflammatoires circulantes (Collins 2001). Les molécules d'adhésion, telles que les « P-, E-selectin », « intracellular » et « vascular cell adhesion molecule -1 » (ICAM-1 et VCAM-1), et les cytokines telles que « monocyte chemoattractant protein -1 » (MCP-1) et l'interleukine-8 (IL-8), dont l'expression est régulée par NF κ B, jouent un rôle important dans le recrutement des leucocytes circulants dans la paroi artérielle. Après activation de l'endothélium par les forces de cisaillement, les cytokines et les LDLs oxydées (LDLox), la migration des leucocytes dans la paroi artérielle s'opère en plusieurs étapes (Figure 4) :

- (1) le « rolling », une succession d'interactions transitoires et permettent le ralentissement des monocytes sur l'endothélium dépendant des sélectines,
- (2) la phase d'activation des monocytes en rolling sur l'endothélium afin de les arrêter s'effectue par la liaison de cytokines comme MCP-1, IL-8 et fractalkine, à leur récepteur membranaire situé sur les monocytes.
- (3) l'arrêt des monocytes par adhésion ferme au niveau du site inflammatoire qui fait intervenir les intégrines comme Very Late Antigen-4 (VLA4 ou $\alpha_4\beta_1$) et (LFA-1) qui se lient respectivement à VCAM-1 et ICAM-1,
- (4) la transmigration des monocytes à travers l'endothélium.

2.5.3.1 « Rolling »

Les P- et E-selectin sont des molécules de la famille des molécules d'adhésion cellulaire qui jouent un rôle important dans la phase de « rolling » du recrutement monocyttaire par l'endothélium. Elles possèdent un domaine transmembranaire composé d'une seule chaîne glycoprotéique et d'une courte portion extracellulaire (Johnston 1989). Les sélectines se lient essentiellement aux molécules glycosylées, sialylées et fucosylées du glycocalyx.

La P-selectin est exprimée par les plaquettes mais aussi par les cellules endothéliales. Le LDLox induit son expression par l'intermédiaire des récepteurs LOX-1 situés sur des CEs en culture (Gebuhrer 1995, Chen 2001). Différentes cytokines telles que le TNF- α et l'IL-1 α induisent aussi son expression au même titre que celle de l'E-selectin (Stocker 2000). In vivo, la P-selectin a été détectée sur l'endothélium activé de lésions athérosclérotiques mais pas sur

l'endothélium normal (Johnson-Tidey 1994). Chez le lapin, l'expression de P-selectin est apparue après une semaine de régime riche en cholestérol et une infiltration intimale de macrophages a été observée après 2 semaines de régime (Sakai 1997). De plus, Ramos et al. ont montré qu'en bloquant P-selectin et son récepteur PSGL-1 dans un modèle expérimental de carotide isolée chez la souris Apo E^{-/-}, le recrutement leucocytaire était significativement diminué (Ramos 1999). Récemment, dans un modèle de remodelage vasculaire induit chez des souris double KO Apo E^{-/-} et Selp^{-/-} (gène codant pour la P-selectin), Manka et al. ont observé une diminution de la taille des lésions et de l'infiltration intimale des macrophages (Manka 2004).

Contrairement à la P-selectin, la E-selectin est uniquement exprimée par les cellules endothéliales activées. La présence de E-selectin a été détectée au niveau des CEs de lésions athérosclérotiques humaines ainsi qu'en surface de plaques humaines fibreuses et riches en lipides (Davies 1993). Chez les souris, le génotypage Sele^{-/-} (le gène Sele codant pour la E-selectin) a mené à une diminution de la taille des lésions d'autant plus marquée que la cholestérolémie est élevée comme observé chez la souris double mutante Selp^{-/-} et Apo E^{-/-} (Collins 2000). Cependant, l'effet le plus important a été obtenu chez des souris déficientes en E- et P-selectin avec une diminution de 80 % de la taille des lésions observées à un stade précoce du développement (Dong 1998). Ces résultats démontrent que l'expression de P- et E-selectin est un phénomène important aux stades précoces de la formation de la lésion athérosclérotique.

2.5.3.2 Activation et adhésion ferme

La deuxième phase de la migration des monocytes dans la paroi artérielle concerne l'activation des monocytes via les cytokines. Les principales cytokines impliquées dans ce processus sont MCP-1, Il-8, Gro- α et la fractalkine. Ces molécules peuvent être sécrétées par différents types cellulaires notamment par les monocytes déjà infiltrés, les cellules musculaires lisses, les microorganismes mais surtout par l'endothélium lui-même. En se fixant à leur récepteur situé sur la membrane des monocytes, les cytokines engendrent un changement conformationnel des intégrines. Ces molécules membranaires impliquées dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice augmentent ainsi leur avidité pour les molécules d'adhésion situées sur l'endothélium (Hynes 1992). Ce phénomène passe par une voie de signalisation inverse à celle activée par la fixation du ligand sur son récepteur (voie « outside-in »), c'est une voie « inside-out » (Ginsberg 1992).

2.5.3.2.1 MCP-1

MCP-1 est produite par les CE, les macrophages et les cellules musculaires lisses. La présence de MCP-1 a été observée dans des lésions athérosclérotiques humaines et animales (Terkeltaub 1998). Son récepteur CCR2 est exprimé par les monocytes circulants. L'expression de MCP-1 est augmentée en condition d'hypercholestérolémie (Han 1998) et celle de CCR2 est corrélée avec le taux de LDL plasmatique et inversement proportionnel à la concentration plasmatique de HDL (Han 2000). L'augmentation de l'expression de CCR2 amplifie la réponse chimiotactique de MCP-1 et augmenterait ainsi le recrutement des monocytes dans la lésion athérosclérotique. Contre toute attente et contrairement aux LDLs natives, les LDLox diminueraient l'expression de CCR2. En effet, une culture de monocytes incubés avec des LDLox présente une diminution du taux de CCR2 via une régulation passant par les PPAR- γ (Han 2000). Cette inhibition de l'expression de CCR2 empêcherait une transmigration inverse retenant ainsi les monocytes dans l'espace sous-endothélial. Des approches génétiques, utilisant des souris KO CCR2^{-/-} et MCP1^{-/-}, ont permis de mettre en évidence l'importance de ces deux molécules dans la formation des lésions athérosclérotiques. A la suite du croisement de chacune de ces souches avec une souche hypercholestérolémique Apo E^{-/-}, Boring et al. ont observé une réduction de la taille des lésions ainsi qu'une diminution des macrophages infiltrés dans la plaque (Boring 1998). Ces approches génétiques montrent clairement l'implication de MCP-1 et de son récepteur CCR2 dans le processus athérogénique.

2.5.3.2.2 Interleukine -8 (Il-8) et Gro- α

L'Il-8 et Gro- α sont deux cytokines de la famille des chemokines à domaine C-X-C. Elles partagent toutes les deux un récepteur commun couplé à la protéine G, le CXCR2 qui est exprimé par les monocytes et les macrophages (Boisvert 1998). L'expression de CXCR2 est proathérogénique comme le démontre la diminution des lésions athérosclérotiques dans un modèle murin ainsi que son implication dans la rétention des macrophages au sein de la plaque (Boisvert 2006). La surexpression de CXCR2 en surface de monocytes humains est induite par les LDLox via les récepteurs scavenger et la voie de p38 MAP kinase (Lei 2002). L'Il-8 est principalement exprimée par les macrophages et les cellules spumeuses mais aussi par les CE où son expression est induite par les forces de cisaillement et les LDLox (Yang 2005). Le couple Il-8/CXCR2 semble donc jouer un rôle important dans le recrutement monocyttaire dans la paroi artérielle.

La Gro- α est aussi exprimée par les CEs suite à l'induction occasionnée par les forces de cisaillement, par les LDLox et par le TNF- α . Gro- α reste liée aux protéoglycanes héparane sulfate sur la membrane plasmique et contribue de ce fait à l'adhésion des monocytes en condition de flux laminaire (Weber 1999). Huo et al. ont confirmé la participation de Gro- α à l'adhésion ferme dans une étude menée *ex vivo* sur des carotides de souris Apo E^{-/-}. En effet, en bloquant les voies de signalisation activées par les liaisons Gro- α /CXCR2 et MCP-1/CCR2, les auteurs ont observé une diminution de la fixation des monocytes sur l'endothélium en bloquant la voie de Gro- α et aucune diminution de cette fixation en bloquant la voie de MCP-1 (Huo 2001).

2.5.3.2.3 *Fractalkine*

La fractalkine est une molécule de la famille des chemokines à domaine CX3C. Elle possède non seulement un rôle chemoattractant mais aussi de molécule d'adhésion dont l'expression sur les CEs est induite par différents facteurs pro-inflammatoires tels que le TNF- α , IFN- γ et Il-1 (Bazan 1997). La fractalkine présente une forme membranaire et une forme soluble. Son récepteur CXCR1 est exprimé par les monocytes. Des études épidémiologiques ont montré que les individus ayant des variations génétiques du récepteur CX3CR1 de la fractalkine sur les acides aminés 249 et 280 présentaient un risque moindre de développer la maladie coronaire (McDermott 2001 et 2003). Ces études démontrent le rôle important du couple fractalkine/CX3CR1 dans le développement de la lésion athérosclérotique. De plus, Greaves et al. ont observé par immunohistochimie la présence de fractalkine dans des lésions athérosclérotiques humaines dans les régions contenant également des macrophages (Greaves 2001). Cependant, les éléments les plus convaincants dans la compréhension du rôle de la fractalkine dans l'athérosclérose proviennent de l'approche génétique. En effet, les souris double mutantes CX3CR1^{-/-} et Apo E^{-/-} présentent une réduction significative des lésions athérosclérotiques par rapport aux souris simple mutantes Apo E^{-/-} (Combadière 2003). Récemment, une étude a montré que la fractalkine soluble induisait l'expression de ICAM-1 sur l'endothélium vasculaire par sa liaison à CX3CR1 via la voie de signalisation Jak stat5 sur un modèle expérimental de cœur isolé murin (Yang 2007).

2.5.3.2.4 *VCAM-1 et ICAM-1 dans l'adhésion ferme*

VCAM-1 et ICAM-1 sont deux molécules d'adhésion appartenant à la famille des immunoglobulines (Ig) qui jouent un rôle important dans la phase d'adhésion ferme du recrutement leucocytaire dans la paroi artérielle. Ce sont des protéines transmembranaires se

caractérisant, respectivement, par une partie extracellulaire avec 6 ou 7 domaines Ig selon l'épissage et 5 domaines semblables aux Ig. Leur poids moléculaire est de 110 kDa pour VCAM-1 et de 55 kDa pour ICAM-1. Il existe 3 formes d'ICAM (-1, -2 et -3) se différenciant par le nombre de motifs Ig extracellulaires, la forme majoritairement observée étant ICAM-1. Leurs récepteurs appartiennent à la famille des intégrines, des hétérodimères formés de 2 sous-unités, α et β . VCAM-1 se lie à « Very Late Antigen -4 » (VLA-4 ou $\alpha 4\beta 1$) et ICAM-1 et -2 se lient à « Lymphocyte Fonction-associated Antigen-1 » (LFA-1 ou $\alpha L\beta 2$) nommées ainsi pour leur expression tardive par rapport à l'activation de l'endothélium (Elices 1990, Springer 1990).

L'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion est un phénomène important dans le développement de l'athérosclérose. L'accumulation de cholestérol dans la paroi intimale aortique induisant l'expression de VCAM-1 par les cellules endothéliales en est la preuve (Cybulsky 1991). Différentes études menées *in vitro* sur des cellules endothéliales humaines (HUVECs) ont montré une surexpression de VCAM-1, ICAM-1 en présence de différentes cytokines telles que le Il-1, TNF α , ou encore de lipopolysaccharides (LPS) (Carlos 1994).

La présence de VCAM-1 a été observée *in vitro* sur les cellules endothéliales des lésions athérosclérotiques précoces. Son expression intimale a aussi été observée plus tardivement par les macrophages et les cellules musculaires lisses chez le lapin hypercholestérolémique. La présence de VCAM-1 est confinée au site de développement de la plaque tandis que ICAM-1 a été observée en bordure de plaque sur l'endothélium sain (Iiyama 1999). Afin d'évaluer les fonctions de VCAM-1, une souche de souris mutante dépourvue de 4 des 6 domaines extracellulaires VCAM^{D4D/D4D} a été mise au point, la souche VCAM^{-/-} n'étant pas viable. Cette souche a été croisée avec des souris dépourvues du récepteur LDL (LDLR^{-/-}), donnant alors une souche hypercholestérolémique possédant une version tronquée de VCAM-1. La taille des lésions précoces observées chez ces souris double mutante VCAM^{D4D/D4D} et LDLR^{-/-} est significativement réduite alors que la même expérience menée chez des souris ICAM^{-/-} et LDLR^{-/-} n'a pas montré un tel résultat. Ces résultats suggèrent que VCAM-1 joue un rôle essentiel dans l'initiation du développement de la plaque d'athérome contrairement à ICAM-1 (Cybulsky 2001). L'adhésion ferme des monocytes sur l'endothélium via la liaison VLA-4/VCAM-1 prépare la CE endothéliale à la transmigration du monocyte. En effet, Barreiro et al. ont montré que VCAM-1 était connecté à l'actine du cytosquelette en interagissant directement avec l'erzine, la radixine et la méosine, influençant ainsi la morphogénèse (Barreiro 2002).

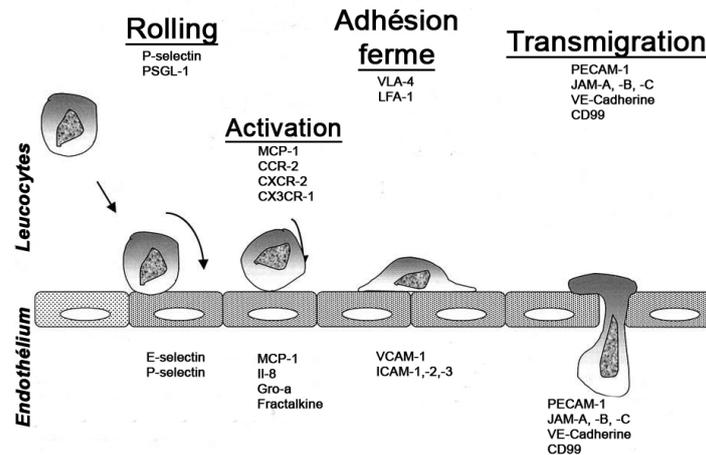


Figure 4

Représentation schématique des interactions entre les leucocytes et les CEs durant l'initiation de la formation de la plaque d'athérome et du rôle des différentes molécules d'adhésion dans ce processus.

2.5.3.3 La transmigration

La présence de leucocytes dans la partie intimale de la paroi artérielle indique la transmigration de ces cellules. Ce phénomène intervient à la suite de l'immobilisation des cellules inflammatoires par adhésion ferme sur l'endothélium. Les monocytes passent entre les CEs par diapédèse, processus par lequel la cellule se déplace grâce à la formation de pseudopodes. Ce phénomène nécessite un désassemblage du cytosquelette du côté luminal de l'endothélium et un réassemblage du côté basal.

La transmigration nécessite une augmentation transitoire de calcium intracellulaire chez les CEs adjacentes à la transmigration (Su 2000). Cette augmentation de calcium intracellulaire active la « myosin light chain kinase (MLCK) » qui va agir sur le repliement de la myosine de type II et engendrer la rétraction de la CE, facilitant ainsi le passage des leucocytes (Hixenbaugh 1997). Ce mécanisme est confirmé par des études menées in vitro. Ces études montrent que la transmigration monocyttaire est inhibée en présence d'un inhibiteur de la MLCK, ceci s'accompagnant de changements au niveau de l'actine du cytosquelette (Saito 1998). En plus des interactions hétérophiles décrites précédemment, c'est-à-dire intervenant entre deux molécules différentes, la transmigration fait également intervenir des interactions homophiles (Figure 5). Une molécule située sur les leucocytes interagit alors avec son homologue situé sur les CEs. Six molécules concentrées sur les faces latérales des CEs sont impliquées dans le processus de transmigration (Figure 4). PECAM-1, CD99, VE-cadhérine

et JAM A, B et C. PECAM-1 et les JAM sont de la famille des immunoglobulines, VE-cadhérine de la famille des cadhérines et CD99 est une molécule unique.

2.5.3.3.1 PECAM-1

PECAM-1 (CD31) est une molécule de 130 kDa qui possède 6 domaines extracellulaires de type Ig. Elle est fortement exprimée de manière diffuse sur les bords des CEs et en plus faible quantité sur les leucocytes (Newman 1990). Les interactions homophiles entre les domaines Ig 1 et 2 de PECAM-1 leucocytaire et les mêmes domaines de PECAM-1 endothéliale sont requises pour la diapédèse. En effet, des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que la compétition entre les monocytes exprimant PECAM-1 et un anticorps dirigé contre les domaines spécifiques d'interaction de PECAM-1 bloquait la diapédèse (Liao 1995, Bogen 1994). Des études cliniques (LOCATE et REGRESS) ont suggéré un lien entre le polymorphisme génétique de PECAM-1 et la progression de l'athérosclérose chez des patients coronariens (Elrayess 2003). PECAM-1 est aussi une molécule mécanosensible. Elle fait partie d'un complexe formé en réponse aux forces de cisaillement en association avec la VE-cadhérine (Tzima 2005). L'importance du rôle de PECAM-1 dans l'athérosclérose a été mise en évidence par l'approche génétique. Une étude récente a montré que des souris PECAM^{-/-} Apo E^{-/-} présentaient une taille de lésion athérosclérotique aortique diminuée et avait une réduction significative de l'activité du facteur de transcription NFκB résultant en une diminution de l'expression de VCAM-1 au niveau des CEs. Par conséquent, PECAM-1 endothélial contribuerait à la formation des lésions athérosclérotiques dans les régions où le flux sanguin est perturbé, en régulant les gènes médiés par NFκB (Harry 2008).

2.5.3.3.2 CD99

CD99 est une molécule de 32 kDa qui est fortement exprimée par les leucocytes et qui est concentrée en bordure des CEs (Schenkel 2002). Comme avec PECAM-1, CD99 leucocytaire se lie à CD99 endothéliale par interaction homophile. Le blocage de CD99 avec des anticorps dirigés contre les domaines d'interaction spécifiques entraîne le blocage de la diapédèse. Cependant, CD99 contrôle une étape différente de PECAM-1 car en bloquant les deux molécules, les effets s'additionnent et abolissent complètement la diapédèse (Schenkel 2002). La diapédèse est donc contrôlée par au moins deux interactions homophiles distinctes. Récemment, van Wanrooij et al. ont inoculé un vaccin contre CD99 à des souris LDLR^{-/-}. Ils ont observé une diminution significative des lésions athérosclérotiques aortiques et carotidiennes par rapport au groupe de souris n'ayant pas été vacciné (van Wanrooij 2008).

2.5.3.3.3 *VE-cadhérine*

Contrairement à PECAM-1 et à CD99, la présence de VE-cadhérine a été observée uniquement au niveau des jonctions entre CE. La VE-cadhérine est associée au filament d'actine du cytosquelette par des caténines (Navarro 1995). Récemment, Foteinos et al. ont observé que le développement des plaques chez la souris Apo E^{-/-} était strictement corrélé à la présence de fissures endothéliales et à l'expression des VE-cadhérines (Foteinos 2008). De plus, des études *in vitro* ont montré une disparition transitoire de VE-cadherine de la membrane pendant la diapédèse (Allport 2000). Ces données montrent l'importance de la VE-cadhérine dans le maintien de l'intégrité endothéliale et dans le développement de la plaque d'athérome.

2.5.3.3.4 *Les « Junctional Adhesion Molecules » (JAM)*

Différentes études montrent que les molécules d'adhésion jonctionnelles (JAM) régulent le recrutement des leucocytes dans la paroi artérielle et participent ainsi au développement de l'athérosclérose.

JAM-A est exprimée par les leucocytes, les plaquettes, les CE et les cellules épithéliales (Imhof 2004). Son rôle dans la transmigration leucocytaire pourrait passer par sa liaison hétérophile à LFA-1, récepteur de ICAM-1, avec son domaine membranaire proximal qui n'est pas impliqué dans la liaison homophile JAM-JAM (Ostermann 2002). La présence de JAM-A a été détectée chez des souris Apo E^{-/-} athérosclérotiques et dans les lésions athérosclérotiques humaines (Babinska 2007). Une étude menée *ex vivo* sur des carotides perfusées de souris Apo E^{-/-} a montré l'implication de JAM-A dans le recrutement des monocytes et des lymphocytes T dans la paroi artérielle (Ostermann 2005). De plus, les animaux déficients en JAM-A présentent une réduction significative de la formation des lésions néointimales dans un modèle expérimental de blessure carotidienne avec une diminution du nombre de macrophages néointimaux (Zernecke 2006).

JAM B est présente sur les CE et se lie de manière homophile à JAM B mais aussi de manière hétérophile à JAM C et à VLA-4 qui sont exprimés sur les monocytes et les lymphocytes. De plus, la liaison avec VLA-4 ne serait efficace que seulement si JAM B est déjà engagé avec JAM C (Cunningham 2002).

JAM C jouerait un rôle important dans le recrutement lymphocytaire. En effet, Johnson-Leger et al. ont montré que le JAM C soluble ou un anticorps dirigé contre JAM C bloque la migration de polynucléaires à travers une monocouche de CE humaines. Etant donné que JAM C est aussi exprimée par les populations de LB, de LT et par les monocytes, des

interactions homophiles entre JAM C leucocytaires et JAM C endothéliales pourraient être impliquées dans ce processus, de la même manière que PECAM-1 et CD99 (Johnson-Leger 2002). Cependant, Santoso et al. ont montré que JAM C se liait aussi au récepteur Mac-1, ce qui suggère aussi un mode de liaison hétérophile comme décrit pour JAM A (Santoso 2002).

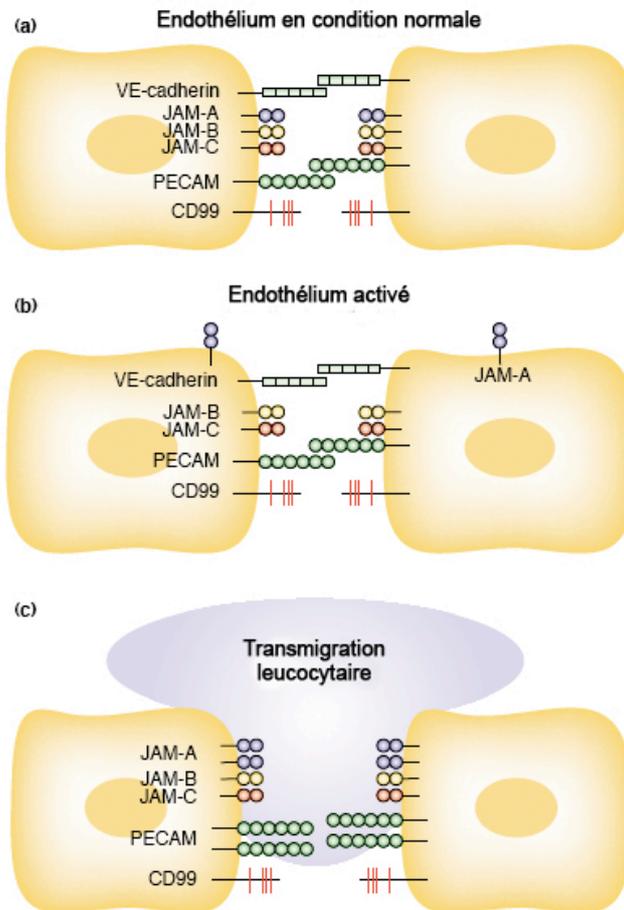


Figure 5

Molécules d'adhésion impliquées dans la transmigration leucocytaire. (a) En condition normale, la perméabilité de l'endothélium est assurée par des interactions homophiles entre les molécules d'adhésion telles que la VE-cadherin, les JAM A, B et C, PECAM et CD99, des cellules voisines. (b) En condition inflammatoire, ces molécules d'adhésion se réarrangent. Sous l'effet d'une combinaison de cytokines inflammatoires comme $TNF-\alpha$ et $IFN-\gamma$, les JAM-A sont redistribuées sur la partie apicale de la CE. (c) Lors de la migration trans-endothéliale des leucocytes, l'expression de la VE-cadherin diminue alors que celle de JAM-A et de PECAM est augmentée (d'après Muller 2003).

2.5.4 Formation des cellules spumeuses

Après transmigration dans la paroi artérielle comme décrit ci-dessus, les monocytes se différencient en macrophages. Le rôle des macrophages est de phagocyter les molécules de LDL et les débris cellulaires présents dans l'intima.

2.5.4.1 Différenciation des monocytes

« Macrophage Colony-Stimulated Factor » (M-CSF) est le principal régulateur de la différenciation des monocytes en macrophages *in vitro* et sa présence a été détectée dans les lésions athérosclérotiques (Rosenfeld 1992). L'importance de M-CSF dans le développement de la plaque d'athérome a été démontrée chez des souris transgéniques ostéoporétiques $op^{-/-}$ dépourvues de M-CSF (Qiao 1997). Ces études ont montré que les souris double transgéniques $op^{-/-}$; Apo E $^{-/-}$ ne présentaient aucune lésion athérosclérotique aortique par rapport au groupe $op^{+/+}$; Apo E $^{-/-}$.

Les monocytes qui pénètrent dans la paroi intimale peuvent également se différencier en cellules dendritiques (Banchereau 1998). Différents marqueurs tels que le système tubulovésiculaire et les granules Birbeck ont prouvé la présence de cellules dendritiques dans la paroi intimale (Bobryshev 2005). La différenciation des monocytes en macrophages ou en cellules dendritiques est dépendante des cytokines environnantes (Randolph 1998). Parallèlement, Nickel et al. ont montré que la différenciation et la maturation des cellules dendritiques étaient induites par la fixation du LDLox aux récepteurs scavenger (Nickel 2009). Au même titre que les macrophages, les cellules dendritiques semble jouer un rôle central comme cellules présentatrices d'antigène dans l'initiation du développement de la plaque d'athérome.

2.5.4.2 Prolifération des macrophages

Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulated Factor (GM-CSF) est l'élément régulateur important dans la prolifération des macrophages dans la paroi artérielle. *In vitro*, différentes molécules comme les glucocorticoïdes, l'urée ou bien encore les LDLox ont montré leur influence sur la prolifération des macrophages via la production de GM-CSF. Les LDLox étant présentes en grande quantité dans la paroi intimale au site de développement de la lésion athérosclérotique, leur influence sur la prolifération des macrophages est donc prépondérante. Les LDLox sont connues pour induire différents messagers intracellulaires. Notamment, l'inositol-3-phosphate (IP3) qui induit une élévation de la teneur en calcium intracellulaire par relargage du réticulum endoplasmique et ainsi l'activation de la protéine kinase C (PKC) (Matsumura 1997). La lysophosphatidylcholine (lyso-PC), un composant des LDLox, activerait aussi la PKC via la fixation du LDLox au récepteur scavenger (Sakai 1996). A son tour, la PKC induit l'expression de GM-CSF, lequel active de manière autocrine la prolifération cellulaire via les voies PI3K dépendante et indépendante (Biwa 2000). Une étude menée par Sakai et al. montre qu'en présence de LDLox, les macrophages provenant de souris

double mutantes pour les récepteurs « Scavenger » de types A1 et A2 (SR-A1 et 2) n'incorporent que 30% de la thymidine normalement incorporée par les macrophages de la culture contrôle. Cette étude indique que les LDLox augmentent la prolifération des macrophages via les SR-A1 et SR-A2 (Sakai 1996). D'autres récepteurs ont également été impliqués tels que le CD36 (Endemann 1993), SR-B1 (Acton 1994) et LOX-1 (Sawamura 1997).

2.5.4.3 Vers un phénotype « spumeux »

Les macrophages et les CMLs ingèrent une grande quantité de LDL sous-endothélial. Le récepteur cellulaire des LDLs (LDL-R) dont le ligand est l'apo B pour les LDLs est alors soumis à une régulation négative. La synthèse des récepteurs cesse et la captation ainsi que l'internalisation des LDLs diminuent lorsque la concentration en cholestérol intracellulaire atteint un certain seuil (Brown 1986). Cette régulation métabolique maintient un taux intracellulaire d'esters de cholestérol très inférieur à celui contenu dans les cellules spumeuses. Cette voie de captation des LDLs ne peut donc pas expliquer la transformation des macrophages ou des CMLs en cellules spumeuses. Par contre, le changement conformationnel de l'apo B engendré par l'oxydation des LDLs engendre une captation par des récepteurs différents. En effet, il a été montré que l'accumulation de LDLox serait effectuée via les récepteurs scavengers SR-A et CD36 (Yamada 1998). La contribution relative des récepteurs scavengers a été déterminée chez des souris transgéniques déficientes en Apo E, SR-A et CD36. Les résultats ont indiqué une diminution de l'athérosclérose et de l'accumulation lipidique chez ces animaux (Kunjathoor 2002). Ces résultats suggèrent que la captation des LDLox par SR-A et CD36 constitue les principales voies de formation des cellules spumeuses. Cependant, Moore et al. ont montré que la déficience en CD36 d'une souche de souris hypercholestérolémique ne ralentissait pas la progression des lésions athérosclérotiques (Moore 2005). Par conséquent, la captation des LDLox se ferait également par l'intermédiaire d'autres récepteurs. Récemment, le récepteur scavenger de la classe E, LOX-1 (ou SR-E), a montré son importance dans l'accumulation lipidique cellulaire. En effet, des études ont montré que la quantité de LDLox intracellulaire était réduite en bloquant LOX-1 avec un anticorps (Chen 2002) ainsi qu'en utilisant des oligonucléotides réprimant le gène codant LOX-1 chez les macrophages (Smirnova 2004).

En plus des récepteurs scavengers, une autre classe de récepteurs exprimée par des macrophages et appartenant à la famille des Toll-like récepteurs (TLR) jouerait un rôle dans l'initiation de l'athérosclérose et dans la formation des cellules spumeuses (Pasterkamp 2004).

En effet, des études ont montré qu'en activant les TLR de type 3 et 4, le récepteur nucléaire « Liver X Receptor » (LXR) était inhibé (Castrillo 2003). Ces résultats complètent ceux obtenus dans des études réalisées chez des souris apo E^{-/-} et LDLR^{-/-} ayant subi une transplantation de moëlle osseuse dépourvue du récepteur LXR. Les lésions athérosclérotiques de ces animaux ont augmenté (Tangirala 2002). Par ailleurs, ce récepteur nucléaire permet de réguler l'efflux cellulaire de cholestérol comme l'indique la diminution de 50% de la taille des plaques athérosclérotiques ainsi que l'augmentation de l'expression des gènes codant pour ABCA1 et ABCG1 chez des souris Apo E^{-/-} et LDLR^{-/-} observée par Joseph et al. après stimulation par des agonistes du LXR (Joseph 2002). Comme décrit ci-dessus (cf. chapitre 2.3.1), ABCA1 et ABCG1 sont des protéines permettant le transfert du surplus de cholestérol intracellulaire vers l'extérieur de la cellule alors pris en charge par les HDL. Par conséquent, en inhibant l'efflux de cholestérol de la cellule, les TLR participeraient à la transformation des macrophages mais aussi des CMLs en cellules spumeuses. Celles-ci entrent alors en apoptose et participent ainsi à la formation du corps lipidique caractéristique de la plaque d'athérome.

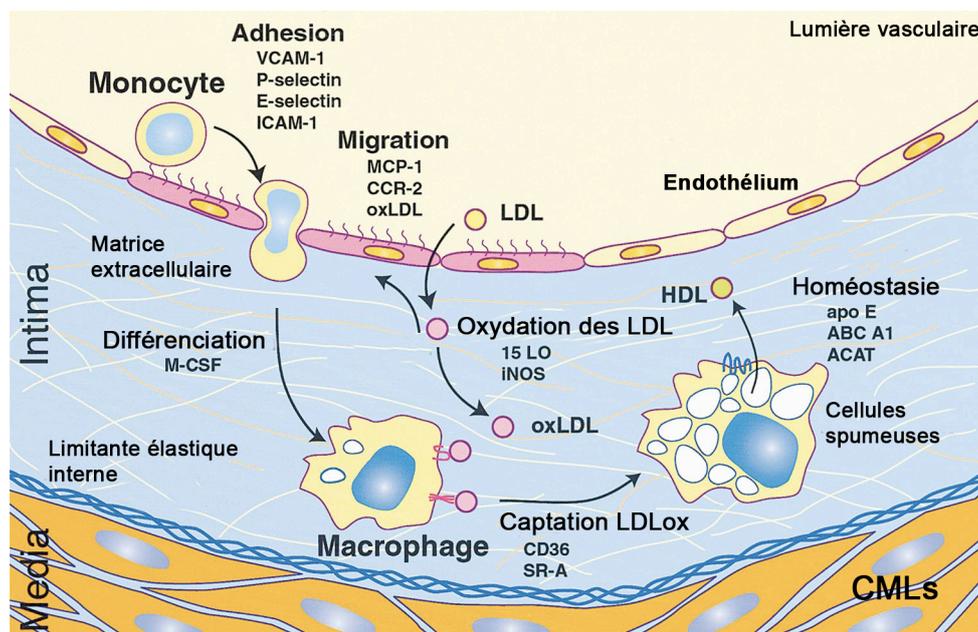


Figure 6

Initiation de la formation des plaques d'athérome. Les LDLox induisent le recrutement de monocytes aux sites de dysfonction endothéliale et leur transformation en cellules spumeuses dans l'intima (D'après Glass 2001).

2.6 Progression

La transition entre les stries lipidiques caractérisées par l'accumulation de LDLox et de cellules spumeuses dans la paroi artérielle et les lésions athérosclérotiques plus complexes caractérisées par un corps lipidique et une capsule fibreuse est notamment induite par la migration des CMLs de la média vers l'intima en passant au travers de la limitante élastique interne (LEI). Les CMLs intimaux prolifèrent et captent également les molécules de LDL modifiées, les conduisant à un phénotype spumeux. Les CMLs synthétisent également des protéines de la matrice extracellulaire, contribuant ainsi à la formation de la capsule fibreuse typique de la lésion athérosclérotique (Ross 1999, Glass 2001). Ce stade du développement de la lésion est influencé par les interactions entre les monocytes/macrophages et les lymphocytes T qui résultent en un large panel de réponses cellulaires et humorales. Les cellules T sont activées par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) et expriment en réponse des cytokines de types Th1 et Th2 (Hansson 1997).

2.6.1 Migration des CMLs vers l'intima

L'accumulation intimale des CMLs nécessite plusieurs étapes. Une dédifférenciation, une migration suivie d'une prolifération sont ainsi nécessaires (O'Brien 1993). Toutes ces étapes sont dépendantes de l'environnement en cytokines. La dédifférenciation correspond au retour à un phénotype fœtal des CMLs et serait engendrée par le TGF β sécrété par les macrophages présents dans l'intima (Grainger 1998). La migration des CMLs dépend de la répartition et de l'expression des intégrines ainsi que de la disposition du micro-environnement matriciel avoisinant (Dufourcq 1998). Cette migration fait aussi intervenir la synthèse par les CMLs de métalloprotéinases (MMP) dont le rôle est de digérer la matrice extracellulaire (Mason 1999). En dégradant la limitante élastique interne, les MMPs facilitent également le passage des CMLs vers l'intima. Dans l'intima, les CMLs prolifèrent sous l'influence de différentes cytokines telles que MCP-1, Il-1, TNF- α et « Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) » sécrétées par les principales cellules en présence. Les CMLs matures synthétisent également des molécules de la matrice extracellulaire, ce qui contribue à la formation de la chape fibreuse caractéristique de la plaque d'athérome. Contrairement aux CMLs qui synthétisent des fibres de collagène de type I et III dans les artères saines, les CMLs présentes dans les lésions athérosclérotiques produisent essentiellement des fibres de collagène de type I et de la fibronectine (Ross 1999). Cette composition particulière de la matrice extracellulaire en condition pathologique influence la rétention des lipoprotéines (O'Brien 1998) et l'index de prolifération cellulaire (Bond 2004, Roy 2002). Les CMLs sont aussi capables d'ingérer les

molécules de LDL oxydées. Elles peuvent donc évoluer vers un phénotype spumeux et in fine entrer en apoptose. Les résidus cellulaires et lipidiques contribuent alors à la formation du corps lipidique et nécrotique de la lésion athérosclérotique.

2.6.2 Rôle des lymphocytes T

Différentes études ont contribué à démontrer le rôle des lymphocytes T (LT) dans le développement des lésions athérosclérotiques. En effet, en croisant des souris Apo E^{-/-} avec une souche déficiente en RAG-1 donc dépourvue de lymphocytes T et B, la formation des lésions athérosclérotiques a été diminuée de 42 % sous régime standard (Dansky 1997). De plus, le transfert de LT CD4⁺ provenant de souris Apo E^{-/-} chez des souris Apo E^{-/-}/scid/scid déficiente en LT, permet le développement des lésions athérosclérotiques à un niveau similaire à celui du groupe contrôle immunocompétent (Weber 2008). Ces résultats mettent en évidence le rôle pro-athérogénique des LT.

La caractérisation du type de LT helper s'effectue par l'intermédiaire des cytokines sécrétées par les LT. Deux types de Th prédominent dans les lésions athérosclérotiques : les Th1 qui sont responsables de la médiation cellulaire et qui secrètent l'interféron- γ (IFN- γ) et l'Il-2, et les Th2 qui secrètent l'Il-4, Il-5, Il-10, Il-13 et qui sont associés aux anticorps produit par les LB (Tedgui 2006). Les cellules Th1 sont généralement perçues comme exerçant des effets pro-inflammatoires qui s'ils ne sont pas contrôlés conduisent à des dommages cellulaires, alors que les cellules Th2 arborent de puissantes fonctions anti-inflammatoires leur conférant une capacité de régulation des réponses cellulaires Th1 (Abbas 1996) (Figure 7).

2.6.2.1 Présentation des antigènes

Le transfert de LTs sensibilisés avec du LDLox et de ce fait immunocompétents, chez les souris Apo E^{-/-}/scid/scid se montre plus efficace pour le développement des lésions athérosclérotiques que le transfert de LT non spécifique. Ce résultat suggère que la présentation d'antigène joue un rôle important dans le développement de la lésion athérosclérotique (Zhou 2006). Parmi les cellules présentatrices d'antigène (CPA) présentes au sein de la plaque se trouvent les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques. Après avoir phagocyté des molécules immunogènes telles que les LDLox, les CPA présentent à leur surface un résidu de cette molécule associé à une protéine du complexe majeur d'histocompatibilité. Les LTs reconnaissant ce complexe grâce à leur TCR sont alors activés.

2.6.2.2 Réponse des LT helper 1 (Th1)

La majorité des LTs présents dans la plaque possède un profil de type Th1 produisant de l'IFN- γ (Tedgui 2006). L'activation des LTh1 requiert l'Il-12 et l'activation du TCR par la présentation d'antigènes. L'Il-12 est sécrétée par les macrophages et les cellules dendritiques et active les facteurs de transcription STAT4 et T-box chez les LT. Cette activation mène à la surexpression de l'IFN- γ et à l'inhibition de l'expression de l'Il-4 et -5 des LT. Les effets de l'IFN- γ sont multiples. Contre toute attente, l'IFN- γ diminue l'expression des récepteurs scavengers des macrophages, ce qui aurait un rôle anti-inflammatoire. Cependant, l'IFN- γ inhibe aussi la prolifération des CMLs ainsi que la synthèse de collagène alors qu'il augmente la synthèse des métalloprotéases, contribuant ainsi à l'amincissement de la capsule fibreuse. La déficience en IFN- γ chez la souris réduit le développement de la lésion et augmente sa teneur en collagène (Gupta 1997, Whitman 2000). Par ailleurs, des interactions avec les macrophages sont nécessaires pour activer les LTs. Les interactions entre CD40 exprimé par les macrophages et son ligand CD40L exprimé par les LT (CD 154) influent sur le développement des LTh1 en renforçant des signaux de costimulation. Le CD40L se fixe sur son récepteur CD40 exprimé par les LTs activés et engendre leur prolifération. Ainsi l'inhibition de la voie passant par CD40 diminue le développement des lésions et induit la formation d'une plaque « stable ». Ces résultats montrent l'implication pro-athérogénique de la réponse Th1.

2.6.2.3 Réponse des LT helper 2 (Th2)

L'activation des LTh2 passe par l'Il-4. Cette cytokine amplifie sa propre production ainsi que celle de l'Il-5 et, au contraire, inhibe la synthèse de l'IFN- γ via STAT6 et le facteur de transcription Gata3. Par conséquent, la réponse Th2 possède un effet antagoniste à la réponse Th1, c'est-à-dire un effet athéroprotecteur. Cependant, le rôle de la réponse Th2 dans le développement de la plaque d'athérome est controversé et dépendrait du stade d'avancement de la plaque ainsi que du modèle expérimental utilisé. En effet, dans un modèle de souris hypercholestérolémique, la réponse Th2 semble protéger le réseau artériel de la formation de stries lipidiques (Huber 2001) alors que dans un modèle murin LDLR^{-/-}, la déficience en Il-4 n'aurait aucun effet sur les lésions athérosclérotiques (King 2007).

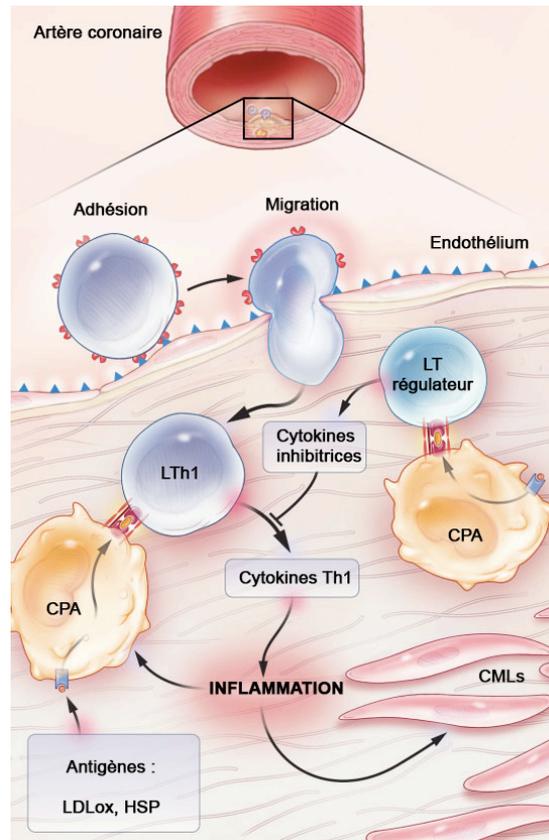


Figure 7

Effets des LT activés sur l'inflammation de la plaque d'athérome. La présentation d'un antigène tel que le LDLox par les macrophages ou les cellules dendritiques (CPA) déclenche l'activation des LTs. La plupart des LTs activés produisent des cytokines de type Th1 (ex : IFN- γ) qui activent les macrophages et les CMLs, contribuant ainsi à l'inflammation. Les LT régulateurs modulent ce processus en sécrétant des cytokines inhibitrices telles que l'IL-4 et l'IL-10 (D'après Hansson 2005).

2.6.3 La plaque d'athérome vulnérable

Comme décrit précédemment, les macrophages et les CMLs devenus spumeux entrent en apoptose (cf. chapitre 2.5.4.3). Ces corps apoptotiques chargés de lipides sont les principaux composants du corps lipidique de la lésion. Les CMLs présentes dans l'intima (cf. chapitre 2.6.1) synthétisent des fibres de collagène qui recouvrent le corps lipidique. L'inflammation caractérisée par la présence de lymphocytes et de monocytes/macrophages influe sur le phénotype de la plaque d'athérome via les différentes cytokines sécrétées. Ainsi, les cytokines anti-inflammatoires (cf. chapitre 2.6.2.2) orientent la plaque vers un phénotype stable en renforçant la chape fibreuse alors que les cytokines pro-inflammatoires (cf. chapitre 2.6.2.3) favorisent la destruction de la capsule fibreuse et la croissance du corps lipidique et orientent ainsi la plaque d'athérome vers un phénotype vulnérable. Sous l'effet de la croissance du corps lipidique et nécrotique et de la fragilisation de la capsule fibreuse, la plaque vulnérable

peut se rompre. Les éléments prothrombotiques comme le facteur tissulaire contenu dans la plaque entrent alors en contact avec les éléments prothrombotiques circulant et forment un thrombus pouvant obstruer complètement la lumière artérielle (Figure 8).

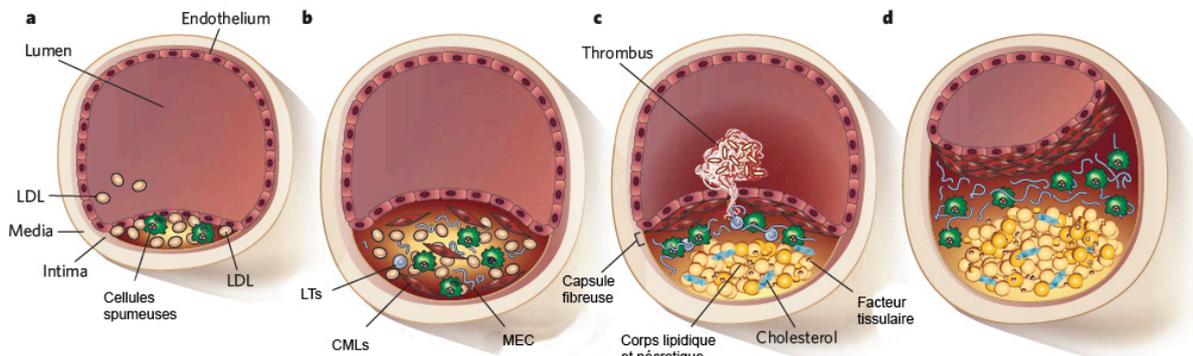


Figure 8

Initiation et progression de la plaque d'athérome. (a) Les LDLs pénètrent dans l'espace sous-endothélial et subissent une oxydation. Les LDLox s'agrègent dans l'intima où elles sont phagocytées par les monocytes/macrophages. L'ingestion dérégulée des LDLox par les macrophages mène à la formation de cellules spumeuses. L'accumulation des cellules spumeuses dans l'espace sous-endothélial est à l'origine des stries lipidiques observées chez les enfants et les adolescents. (b) Les cellules musculaires lisses (CMLs) qui ont migrées de la média vers l'intima participent à la sécrétion de matrice extracellulaire (MEC). En plus des monocytes, des lymphocytes T sont recrutés dans la lésion et participent à la réponse inflammatoire chronique. A ce stade, un remodelage compensatoire se met en place afin que la lumière du vaisseau ne soit pas réduite. (c) Les cellules spumeuses entrent en apoptose et relarguent ainsi des débris cellulaires et des cristaux de cholestérol. De plus, les CMLs forment la capsule fibreuse sous-endothéliale. Ce processus contribue à la formation du corps nécrotique et lipidique de la plaque. Cette plaque non obstructive peut se rompre et exposer les éléments prothrombotiques comme le facteur tissulaire, aux éléments prothrombotiques circulants. Un thrombus se forme et selon sa taille, il peut oblitérer complètement le vaisseau. (d) Si la plaque ne se rompt pas et continue de croître alors la lésion empiètera sur la lumière vasculaire jusqu'à sténoser l'artère (D'après Rader 2008).

2.6.3.1 Facteurs de déstabilisations de la plaque vulnérable

2.6.3.1.1 La mort cellulaire

Le corps nécrotique et lipidique de la lésion représente une accumulation des résidus cellulaires provenant des diverses cellules spumeuses entrées en nécrose, en apoptose et en autophagie (Martinet 2009). C'est une zone non vascularisée, dépourvue de cellules et de support collagénique. Il joue un rôle majeur dans l'induction de la rupture de la plaque en fonction de l'évolution de sa taille mais aussi de la rétention en son sein de facteurs prothrombotiques tels que le facteur tissulaire. En condition normale, la mort cellulaire par apoptose contribue à la régulation de l'épaisseur de la paroi artérielle en réponse au flux

sanguin (Fisher 2000) et les phagocytes nettoient les résidus apoptotiques présents. L'apoptose est alors quasi indétectable en condition normale. Dans l'athérogenèse, on remarque une faible quantité d'apoptose dans les stries lipidiques alors qu'une forte densité de corps apoptotiques (40%) a été observée dans les lésions avancées (Han 1995). Cette accumulation de corps apoptotiques dans la lésion athérosclérotique proviendrait soit d'une augmentation des corps apoptotiques surpassant la capacité des phagocytes, soit d'un dysfonctionnement de la phagocytose. Dans ce deuxième cas, les corps apoptotiques se nécrosent et deviennent alors pro-inflammatoires (Thorpe 2009). La mort cellulaire est principalement induite par les LDLox ingérées par les cellules spumeuses. En effet, l'oxystérol, un produit d'oxydation des LDLs, a été décrit comme étant le principal composant induisant l'apoptose cellulaire (Rusinol 2000). La voie de transduction du signal apoptotique qu'emprunte l'oxystérol passe par l'activation de la caspase-8 via le récepteur de mort cellulaire *fas* (Li 1998). Ces résultats ont été confirmés par Sata et al. qui ont bloqué l'apoptose avec un anticorps anti-*fas* (Sata 1998). D'autres phénomènes comme les forces de cisaillement induisent l'apoptose au même titre que des molécules vaso-actives ou pro-inflammatoires. Ainsi, l'angiotensine et les ROS favorisent l'apoptose des cellules musculaires lisses ; le TGF β , le TNF α et FasL favorisent l'apoptose des cellules endothéliales ; enfin, le TNF α et l'IFN- γ induisent l'apoptose chez les macrophages (Littlewood 2003). Par conséquent, la fragilisation de la chape fibromusculaire provoquée par l'entrée en apoptose des CMLs associée à l'augmentation de la taille du corps lipidique et nécrotique fragilise la plaque (Mallat 2000, Clarke 2008). L'apoptose est donc un critère important de vulnérabilité de la plaque.

2.6.3.1.2 Les métalloprotéases (MMPs)

La destruction de la matrice extracellulaire est un phénomène important dans la rupture de plaque vulnérable. Une perte de collagène a été observée au niveau des épaulements de la plaque de façon colocalisée avec des cellules spumeuses macrophagiques (Hansson 2005). Les plaques avancées montrent un large corps lipidique et nécrotique dans lequel les macrophages sont présents et la matrice extracellulaire est fortement dégradée. Cette dégradation est réalisée par des protéases comme les sérine protéases, les cathepsines et surtout les métalloprotéinases (MMPs), toutes trois sécrétées par les macrophages (Dollery 2006). Les MMPs sont une famille de 24 protéines qui partagent un mécanisme catalytique à base de Zn²⁺. Elles sont produites sous forme de proenzymes et sont activées par une cascade protéolytique médiée le plus souvent par d'autres MMPs (Nagase 2006). Leur inactivation

s'effectue par des inhibiteurs tissulaires endogènes de MMPs (TIMPs). Les MMPs sont capables de dégrader toutes sortes de protéines composant la matrice extracellulaire. Les MMP-1, MMP-8, MMP-13 et MMP-14 sont des collagénases et les MMP-2,-3 et -9 sont des gélatinases.

Les agonistes tels que le LPS bactérien, Il-1beta, et le TNF-alpha agissent par liaison à des récepteurs comme les intégrines en stimulant la phospholipase A2 (PLA2) et la cyclo-oxygénase (COX-1) en augmentant ainsi la production de prostaglandine E2 (PGE2), laquelle agit par un mode autocrine sur les récepteurs prostanoides endothéliaux (EP4-R) afin d'élever la concentration intracellulaire d'AMPc et ainsi de PKA. La voie passant par le facteur de transcription pro-inflammatoire NFkB est aussi empruntée. Une autre voie par laquelle les MMPs seraient activées mettrait en jeu la liaison entre la P-sélectine et son récepteur PSGL (Newby 2008). D'autres types cellulaires comme les CE et les CMLs expriment un certain nombre de MMPs (Figure 9).

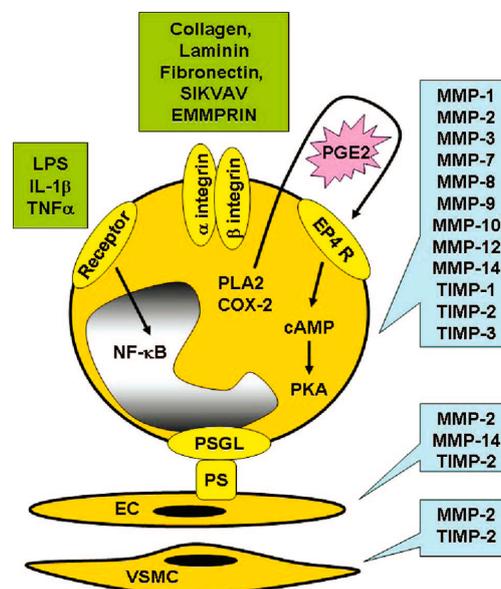


Figure 9

Régulation des MMPs et des TIMPs chez les monocytes/macrophages (Newby 2008).

Les MMP-2, -9 et -11 sont exprimées de manière constitutive en faible concentration par les macrophages et leur activation ne dépend pas de stimuli pro inflammatoires. A contrario, les MMP 1, -3 et -8 sont surexprimées en présence de LDLox via l'activation du facteur nucléaire kB (NFkB).

Les collagénases, MMP-1, -8, -13 et 14, joueraient un rôle particulièrement important dans la déstabilisation de la plaque. En effet, ce sont les seules MMPs capables de dégrader les fibres de collagènes (type I et III) présentes dans les plaques fibreuses (Katsuda 1992). Récemment, Cheng et al. ont démontré que l'angiotensine II, protagoniste de l'hypertension artérielle, augmenterait la déstabilisation des plaques vulnérables chez les souris en diminuant sa teneur en collagène par les MMP-8 et -13 (Cheng 2009).

2.6.3.1.3 La néoangiogenèse

L'angiogenèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux pré-existant en réponse à un besoin tissulaire. Les microvaisseaux sont présents dans les artères normales au niveau de l'adventice, où ils sont appelés « vasa-vasorum » ainsi que dans les lésions athérosclérotiques au cours de leur croissance. Leur rôle est d'apporter les nutriments nécessaires au bon fonctionnement de la paroi artérielle. Ils prennent naissance au niveau des principaux troncs de l'arbre artériel. La majorité des microvaisseaux présents dans la plaque d'athérome provient de l'adventice et s'étendent jusqu'à la média (Sluimer 2009). La présence de macrophages, de LTs et d'hématies a été observée à proximité de ces néovaisseaux (Jeziorska 1999). Plusieurs hypothèses ont été émises, associant la présence de microvaisseaux à la rupture des plaques vulnérables. Il a été montré que la densité capillaire était significativement augmentée dans les plaques rompues par rapport aux plaques non rompues (Virmani 2006). De plus, la densité capillaire est aussi augmentée dans les plaques présentant une inflammation, une hémorragie et une fine capsule fibreuse (Moreno 2004). D'autres études ont montré que les molécules d'adhésion comme E-Selectin, ICAM-1 et VCAM-1 étaient exprimées en plus grande quantité par les néovaisseaux par rapport aux artères principales (O'Brien 1996, Boyle 2000), ce qui engendre une augmentation du recrutement de cellules inflammatoires au sein de la plaque. Une autre hypothèse consisterait en une déstabilisation mécanique de la plaque par les néovaisseaux en augmentant la dégradation de la matrice extracellulaire et en diminuant ainsi la cohésion tissulaire. Des études ont montré que les sites préférentiels de rupture correspondaient aux endroits qui subissaient les contraintes imposées par les forces de cisaillement et présentaient aussi une prédominance en macrophages et en microvaisseaux (Jeziorska 1999, Yilmaz 2007).

Les mécanismes moléculaires qui régulent l'angiogenèse sont maintenant bien connus. Ils impliquent les voies de signalisation induites par le manque d'oxygène (hypoxie), l'inflammation et les ROS via le facteur de transcription HIF α . Ces voies favorisent d'une part l'expression de facteurs proangiogéniques tels que VEGF, PlGF et FGF dans les

différents types cellulaires de la plaque d'athérome (Couffinhal 1997, Ignatescu 1999) et d'autre part ont un rôle dans l'apoptose des macrophages, le métabolisme lipidique, la réponse immunitaire et la production de MMP-2 (Figure 10) (Sluimer 2009).

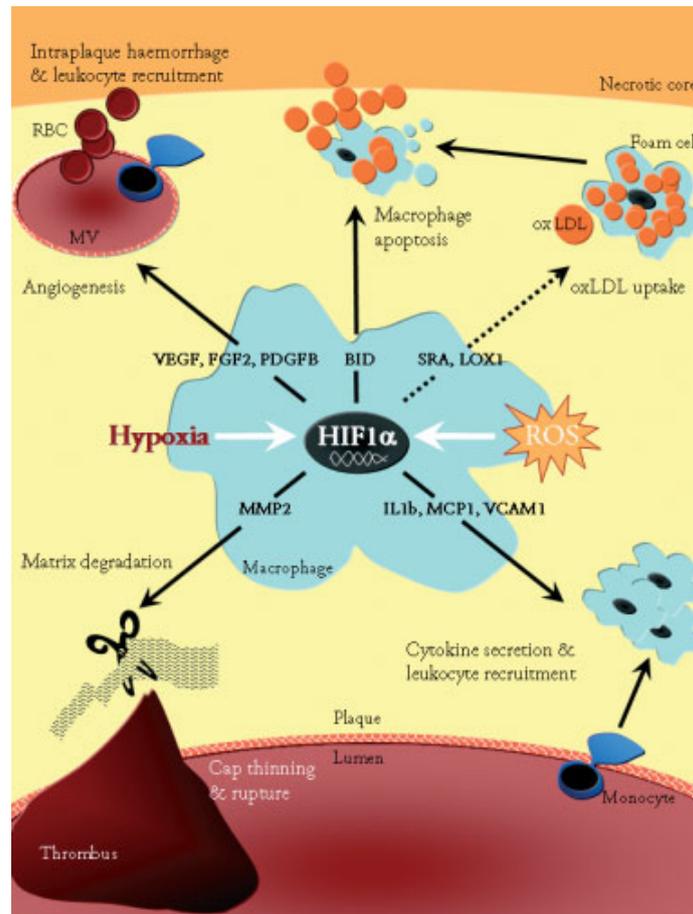


Figure 10

Effets de l'hypoxie et de HIF dans l'athérosclérose (Sluimer 2009).

Cependant, même si l'hypoxie est le principal facteur déclenchant de l'angiogenèse via HIF, il existe aussi une autre voie indépendante de HIF qui est impliquée dans la formation de nouveaux vaisseaux. En effet, l'inflammation peut aussi réguler l'angiogenèse indépendamment de HIF. Différentes études ont montré que l'Il-6, Il-1 β et le TNF α augmentaient l'expression de VEGF via les voies ERK-MAPK, JAK-STAT3 et NF κ B (North 2005, Frantz 2005).

2.6.3.1.4 Le facteur tissulaire

Le facteur tissulaire est depuis longtemps connu comme un facteur clé de la cascade de coagulation.

Le facteur tissulaire, appelé aussi thromboplastine, est une protéine de 47 KDa exprimée à la fois par des cellules vasculaires et non vasculaires. Dans la paroi artérielle, le FT est exprimé de manière constitutive par les cellules sous endothéliales comme les cellules musculaires lisses et permet ainsi une rapide initiation de la coagulation lorsqu'un vaisseau est endommagé (Wilcox 1989). Les cellules endothéliales et les monocytes, quant à eux, n'expriment pas le FT en condition physiologique. De cette façon, il n'y pas de contact entre le FT cellulaire et la circulation sanguine. Par contre, son expression peut être induite par ces cellules en réponse à différents stimuli. Le FT semble aussi être impliqué dans la progression de l'athérosclérose. En effet, il permet de réguler la migration et la prolifération des CMLs vasculaires (Cirillo 2004). Ce processus est très important puisqu'il intervient dans le remodelage de la paroi vasculaire suite à une blessure. De plus, le FT serait aussi impliqué dans la néovascularisation de la plaque et ainsi dans sa déstabilisation (Hansson 2005). Par conséquent, le facteur tissulaire n'intervient pas seulement au stade post rupture dans la formation du thrombus mais participe également à la progression de la plaque vers un phénotype vulnérable.

La cascade de coagulation est enclenchée dès lors que le FT entre en contact avec le facteur VII circulant. Il en résulte la formation d'un complexe FT-FVIIa. Ce complexe active le facteur IX. FT-FVIIa, tout comme le facteur IXa, engendre l'activation du facteur X. En complexe avec le facteur Va et du Calcium, le FXa catalyse la conversion prothrombine en thrombine ce qui mène à la formation de fibrine, à l'activation des plaquettes et au final à la formation du thrombus (Figure 11).

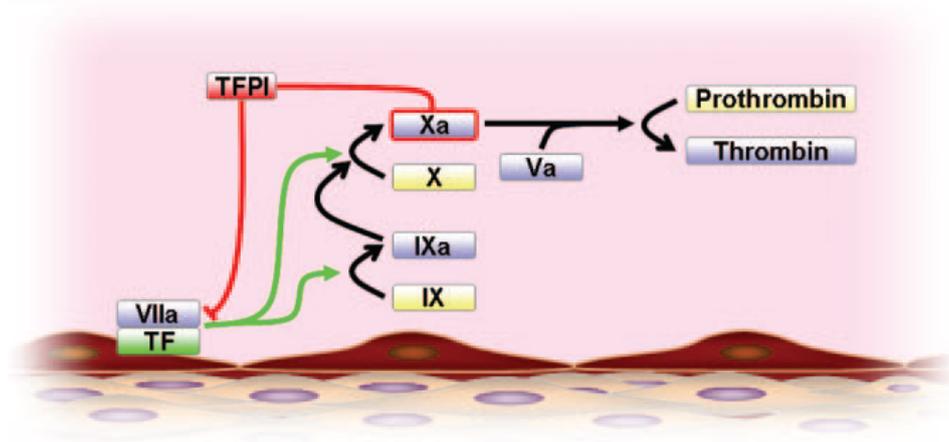


Figure 11

Le facteur tissulaire, initiateur clé de la cascade de coagulation (Steffel 2006)

L'expression du FT par les cellules endothéliales est induite par des cytokines comme le TNF-alpha (Steffel 2005), l'Il-1bêta (Napoleone 1997) ou bien encore CD40-L (Bavendiek 2002), par d'autres molécules telles que la sérotonine ou l'histamine ainsi que par des médiateurs comme la thrombine, le VEGF ou les LDLox (Camera 1999, Eto 2002, Drake 1991). Des études ont montré que la quantité induite de protéine FT chez les cellules vasculaires n'était pas forcément corrélée à son activité (Camera 1999, Steffel 2005). Il existe deux explications à cela. La première repose sur la sécrétion concomitante d'un inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (FTPI). La deuxième explication met en avant la distribution du FT dans différents compartiments tissulaires. En effet, le FT biologiquement actif se situe à la surface des cellules alors qu'il existe aussi un pool intracellulaire de FT relargué seulement lorsque la cellule est endommagée (Camera 1999, Schechter 1997). D'ailleurs, le FT a été observé sous trois formes différentes : activé en surface, inactivé en surface et intracellulaire (Schechter 1997, Penn 1999) (Figure 12).

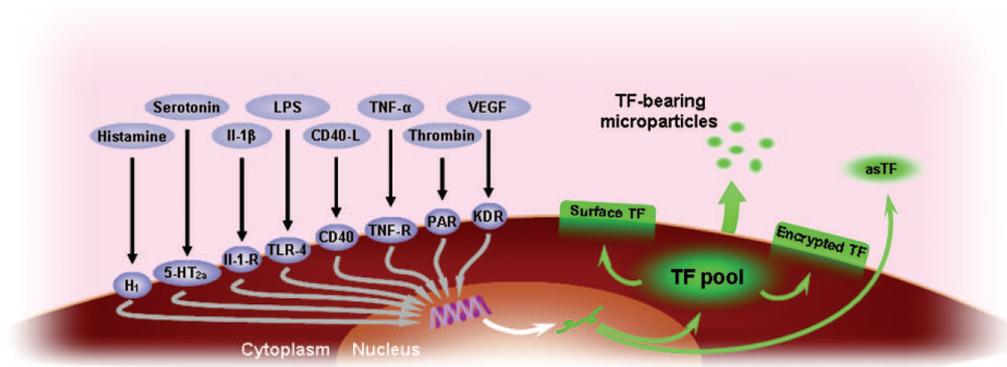


Figure 12

Induction de l'expression du facteur tissulaire et protéine active (Steffel 2006).

Un faible taux de FT a été retrouvé au niveau de la média d'artères saines (Wilcox 1989). De la même manière, une faible quantité basale de FT a été observée dans des cellules musculaires lisses en culture (Steffel 2005, Schechter 1997). L'induction d'une surexpression de FT a été obtenue par les mêmes molécules que celles décrites ci-dessus pour les cellules endothéliales. En revanche, la réponse à une stimulation des cellules musculaires lisses semble être globalement moins importante par rapport aux cellules endothéliales et aux monocytes.

Au même titre que les cellules endothéliales, les monocytes n'expriment que faiblement le FT en conditions physiologiques. Cependant son expression peut être induite par des stimuli inflammatoires tels que la protéine C réactive (Cermak 1993) ou CD40-L (Mach 1997).

L'angiotensine II et la forme oxydée des LDLs induisent aussi son expression (He 2005, Wada 1994). Des études ont montré que les cytokines sécrétées par les LTh1 ainsi que le contact cellule-cellule avec les LTh1 induisaient l'expression de FT chez les monocytes/macrophages (Del Prete 1995). Il a aussi été observé que la transformation des macrophages en cellules spumeuses résultait en l'augmentation de l'expression du FT (Meisel 2002). Par contre, les cytokines sécrétées par les LTh2 inhiberaient cette surexpression (Del Prete 1995). Lors de l'athérogenèse, on observe une surexpression de FT au niveau monocyttaire à un stade précoce (Wilcox 1989). Cette surexpression s'étend aux macrophages, aux cellules spumeuses et aux CML à un stade tardif (Thiruvikraman 1996). La présence de FT a été observée au sein du corps nécrotique de la plaque, essentiellement associé à des microparticules dérivées de la mort de cellules spumeuses, de macrophages ou de lymphocytes (Mallat 2000).

2.7 La thrombose

Comme décrit précédemment (cf. chapitre 2.6.3), la thrombose se produit lorsque les molécules prothrombotiques contenues dans le corps nécrotique et lipidique comme le facteur tissulaire (cf. chapitre 2.6.3.1.4) entrent en contact avec les molécules prothrombotiques circulantes suite à la rupture d'une plaque vulnérable (Hamm 2001). La rupture est une complication des plaques ayant un corps lipidique occupant plus de 40% du volume total et une fine capsule fibreuse riche en macrophage et pauvre en CML. Elle peut être le résultat d'un déséquilibre entre les contraintes physiques circonférentielles et la solidité intrinsèque de la chape. Dans ce cas, la rupture se situe au niveau des épaules de la plaque vulnérable. Mais elle peut être aussi le résultat d'un processus enzymatique protéolytique provenant des macrophages ou des mastocytes présents dans la plaque (Fuster 2005). La rupture n'est pas la seule voie conduisant à la thrombose. L'érosion superficielle d'une plaque fibreuse est aussi un facteur prédisposant à la thrombose et cette érosion ne serait pas liée à l'infiltration des cellules de l'inflammation (Davies 1992). Les manifestations cliniques de la maladie coronaire sont essentiellement dues à la formation d'un thrombus qui va obstruer la lumière du vaisseau (Hamm 2001, Figure 13). Le thrombus se développe suite à la dénudation de l'endothélium (érosion partielle, 35%), ou lorsque la plaque s'est rompue (rupture profonde, 60%) (Virmani 2006).

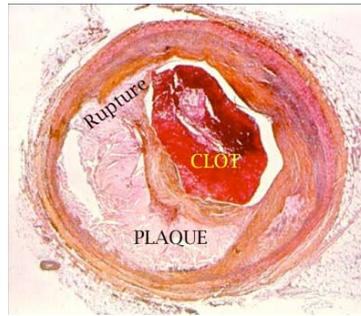


Figure 13

Rupture d'une plaque d'athérome occasionnant la formation d'un thrombus (clot) qui obstrue la lumière vasculaire (D'après Glass 2001).

2.8 Classification des plaques d'athérome

Selon la classification de l'« American Heart Association » les plaques d'athérome peuvent présenter huit phases successives d'évolution, identifiées d'un point de vue histopathologique par huit types de plaque (Stary 2000). L'évolution des plaques d'athérome est présentée sur la Figure 14. Quelques macrophages spumeux présents de manière isolée dans la paroi de l'artère caractérisent la lésion de type I. Lorsque ces macrophages spumeux s'accumulent de manière plus intense, il se forme des stries lipidiques qui caractérisent la lésion de type II. On dénote aussi la présence de CMLs spumeuses. Les lésions catégorisées en type III présentent, elles, des pools extracellulaires isolés de lipides. Ces 3 types de lésions sont associés à des lésions précoces. Cependant, le type III est associé à un stade pré-athéromateux. Aucun de ces types lésionnels précoces n'est associé à des manifestations cliniques et la régression vers un phénotype normal est possible.

La lésion de type IV est la première des lésions avancées, on parle alors de stade athéromateux. Cette lésion est caractérisée par la formation d'un corps lipidique résultant d'une accumulation de lipides extracellulaires recouvert par des cellules spumeuses. Ce type de lésion peut passer directement à une lésion de type VI avec la formation d'un thrombus. A l'origine non symptomatique, ces lésions deviennent alors symptomatiques.

Les lésions de type V ou fibroathéromateuse sont caractérisées par une chape fibromusculaire remplaçant les tissus meurtris par l'accumulation de lipide et de cristaux de cholestérol. On observe la présence de fibres de collagène et de CML organisées de manière différente à leur alignement habituel dans la média.

Les lésions de type VI sont des lésions de type IV ou V dont la rupture en surface a engendré une hémorragie ou la formation d'un thrombus. De ce fait, les plaques de type VI sont

appelées des lésions complexes. La superposition d'évènements hémorragiques observé en anatomopathologie montre que la formation successive de thrombi en surface d'une même lésion de type VI mène rapidement à l'occlusion de la lumière du vaisseau. De plus, la fibrose des lésions de types VI mène à un phénotype de lésion de type V dont le volume entraîne une diminution de la lumière vasculaire.

La lésion de type VII possède les mêmes caractéristiques que le type V avec en plus la présence de calcification alors que la lésion de type VIII se caractérise par la forte présence de CML et de fibre de collagène et par un faible voire inexistant corps lipidique. Ces deux types de plaques sont plus ou moins sténosantes en fonction du calibre des artères où elles se développent. Elles sont aussi le résultat d'une régression ou d'un changement en lipide des lésions de type IV-VI.

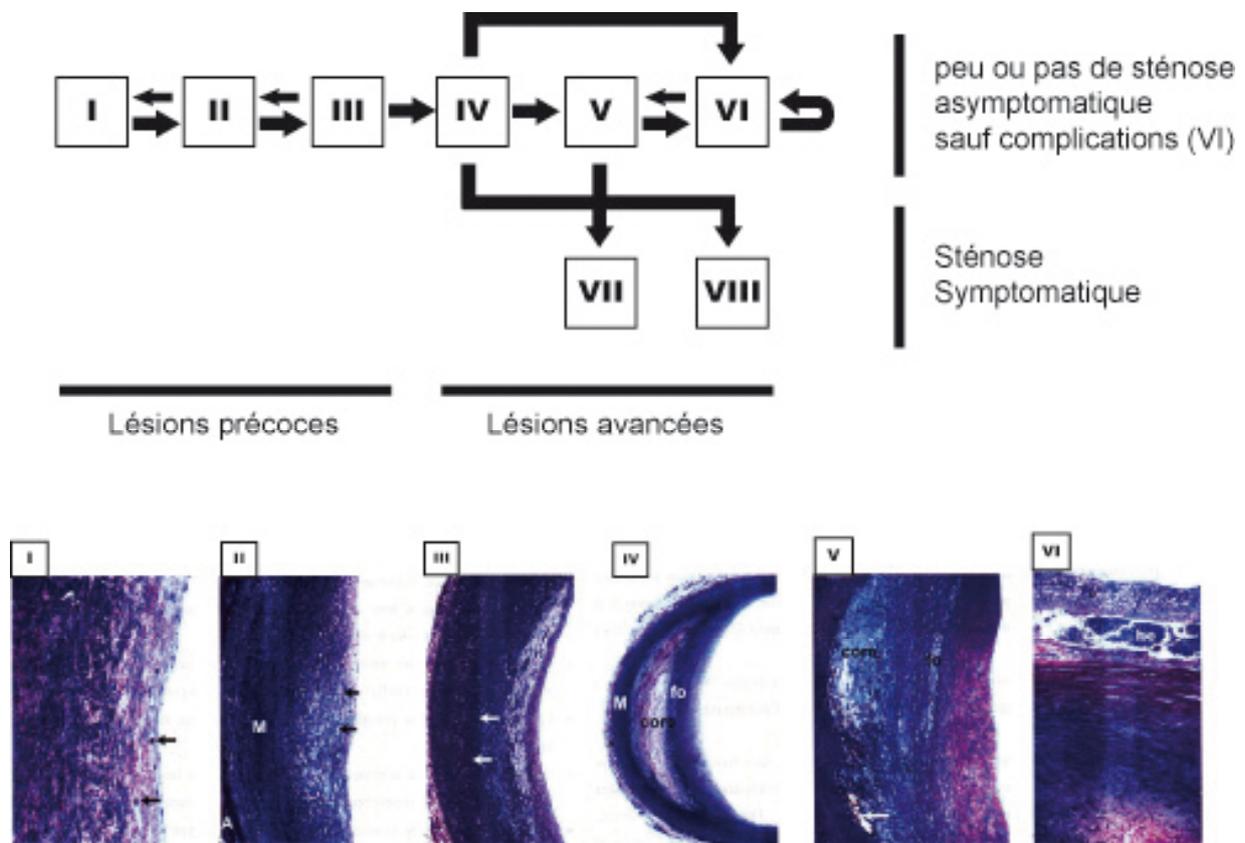


Figure 14

Evolution de la plaque d'athérome (D'après Stary 2000). Type I : présence de macrophages non chargés en gouttelettes lipidiques (flèche noire). Type II : présence de macrophages chargés en gouttelettes lipidiques (flèches noires), M (média), A (adventice). Type III : gouttelettes lipidiques extracellulaires (flèches blanches). Type IV : la fusion de gouttelettes lipidiques extracellulaires abouties à la formation d'un large corps (core) lipidique. La région recouvrant le corps lipidique est pauvre en collagène mais contient beaucoup de cellules spongieuses (fo). Type V : La plaque lipidique est étendue et contient des cristaux de cholestérol (flèche blanche), elle est recouverte d'une capsule fibreuse contenant les cellules spongieuses (fo). Type VI : plaque complexe avec

la présence d'un thrombus récent (tr) incluant une zone hémorragique (he). Type VII : équivalent du type V avec présence de calcification. Type VIII : plaque très fibreuse avec un faible corps lipidique.

2.9 Résumé

Les plaques d'athérome vulnérable débutent leur développement sur des sites privilégiés de l'arbre artériel. Ces endroits sont les lieux de perturbation du flux sanguin occasionnant de ce fait une diminution de la perméabilité endothéliale. Les molécules de LDL en excès pénètrent dans l'espace sous-endothélial où leur oxydation s'opère. Les CE sont alors activées et recrutent les cellules inflammatoires circulantes qui une fois dans l'espace sous-endothélial, se différencient en macrophages. Ces phagocytes ont pour fonction de nettoyer cette espace sous-endothélial des LDLox résidants. Cependant, les macrophages sont rapidement dépassés et accumulent de ce fait beaucoup de cholestérol. Elles deviennent alors des cellules spumeuses puis entrent en apoptose. La progression de la plaque fait intervenir les CMLs et les LTs. Les CMLs migrent de la média vers l'intima. Elles synthétisent et sécrètent des fibres de collagène, principale composant de la chape fibreuse. Elles sont de la même manière que les macrophages capables d'ingérer les LDLox. Parallèlement, les LTs infiltrés, activés par les CPA, augmentent le caractère inflammatoire de la lésion en sécrétant majoritairement des cytokines pro-inflammatoires. La réaction inflammatoire caractéristique de la plaque d'athérome vulnérable est responsable de la formation d'un cœur lipidique et nécrotique recouvert d'une capsule fibreuse. L'épaisseur de la capsule fibreuse, si elle devient insuffisante, peut conférer à la plaque un caractère vulnérable. La rupture d'une plaque d'athérome vulnérable entraîne la formation immédiate d'un thrombus comme conséquence du contact entre le sang et les éléments pro-thrombotiques du cœur lipidique et nécrotique. C'est la formation de ce thrombus qui est responsable de l'ischémie myocardique et des symptômes cliniques de l'événement coronaire (Hansson 2005).

2.10 Conclusions

Les plaques d'athérome vulnérables sont des plaques d'athérome qui sont susceptibles d'engendrer des complications. Le terme « vulnérable » dénote le fait qu'un évènement puisse survenir dans le futur (Naghavi 2003). Cependant, le terme de plaque « à haut risque » a également été utilisé. Les plaques vulnérables qualifient des lésions athérosclérotiques pouvant se rompre à tout moment et occasionner des conséquences cliniques importantes. Différents critères permettent de caractériser une plaque vulnérable :

- une intense inflammation (infiltration monocytaire et lymphocytaire)

- une fine capsule fibreuse (<65µm)
- un large corps lipidique et nécrotique (>40% du volume total de la plaque)

Les plaques vulnérables sont relativement peu calcifiées, peu ou pas sténosantes et présentent les caractéristiques des lésions de type IV décrites précédemment (Stary 2000). Cependant, il existe différentes sortes de plaques vulnérables dont la prévalence est inconnue (Figure 15).

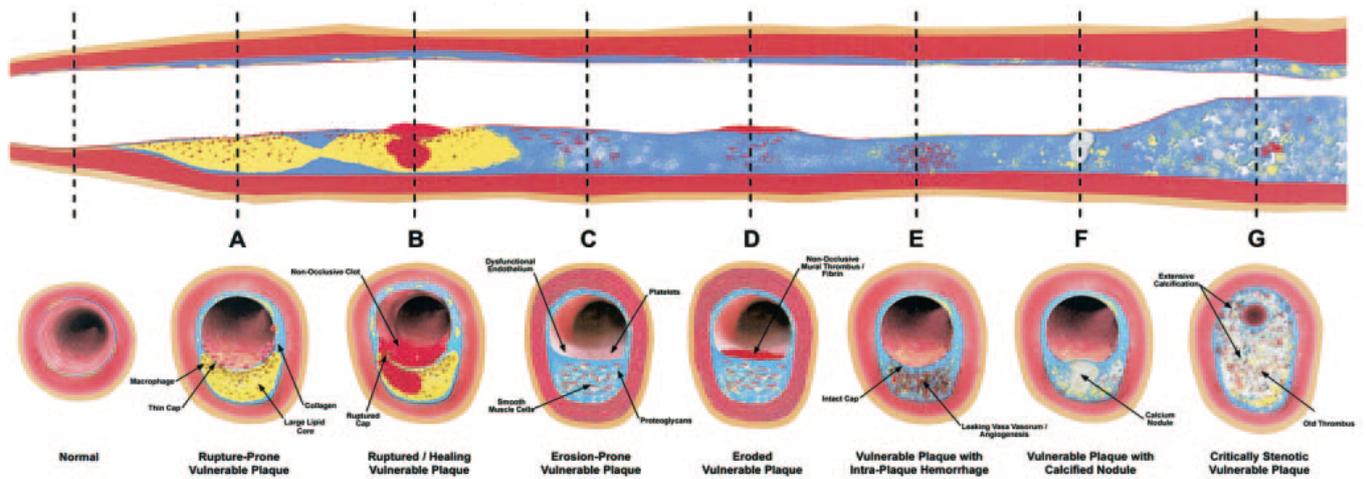


Figure 15

Les différents types de plaque vulnérable à l'origine d'événements coronariens aigus (Naghavi 2003).

Son développement excentrique, n'oblitérant que très peu la lumière du vaisseau, rend la plaque vulnérable difficilement détectable en coronarographie, qui reste cependant la technique de référence actuellement utilisée en routine clinique.

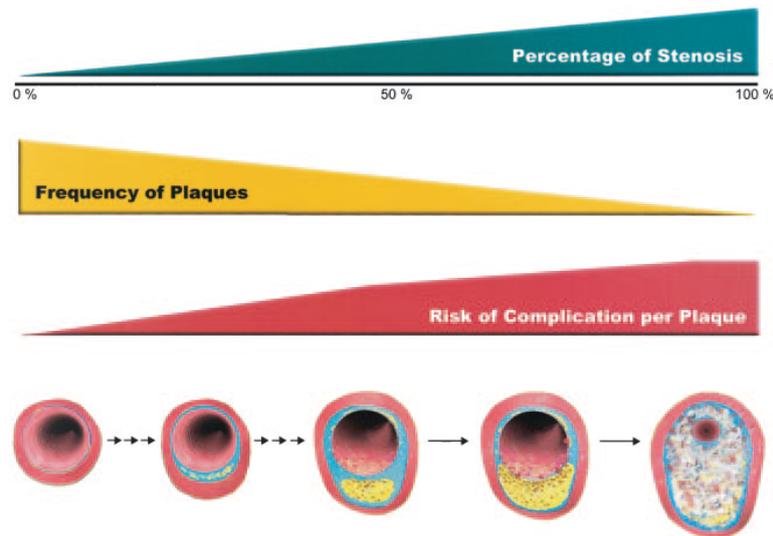


Figure 16

Corrélation entre le risque de complication des plaques, le pourcentage de sténose et leur fréquence (Naghavi 2003).

Comme le montre la Figure 16, bien que le risque absolu de complication des plaques sévèrement sténosantes soit plus grand que le risque absolu des plaques peu sténosantes, les plaques peu sténosantes sont plus nombreuses que les plaques sévèrement sténosantes (Naghavi 2003). Par conséquent, la probabilité qu'un événement coronaire aigu survienne à cause de la rupture d'une plaque vulnérable peu sténosante est plus importante que celle causée par une plaque sévèrement sténosante. La détection de ces plaques vulnérables avant que l'accident vasculaire ne survienne présente donc un intérêt clinique majeur.

3 Imagerie de la plaque d'athérome vulnérable

Différentes techniques d'exploration de la plaque d'athérome sont utilisées en clinique ou sont en cours de développement. Certaines de ces techniques sont invasives : elles nécessitent un cathétérisme afin d'atteindre les zones à explorer ; d'autres techniques sont non invasives : elles ne nécessitent aucune intrusion dans l'organisme si ce n'est celle d'un agent de contraste dont l'innocuité aura été préalablement démontrée.

3.1 Techniques d'imagerie invasive

3.1.1 Angiographie

L'angiographie est une technique dédiée à l'étude des vaisseaux sanguins. C'est la méthode de référence utilisée actuellement dans le diagnostic de la maladie coronaire. Son principe repose sur l'injection d'un produit de contraste lors d'une imagerie aux rayons X. Un cathéter est introduit dans l'arbre vasculaire puis guidé jusqu'aux artères d'intérêt. Le produit de contraste est alors injecté à l'aide d'une pompe et des clichés radiographiques sont pris (Figure 17).



Figure 17

Exemple d'image obtenue en angiographie (www.scielo.br)

Cette technique permet d'obtenir des informations sur la lumière vasculaire. Elle ne renseigne en aucun cas sur la composition de la plaque et les changements qui s'opèrent à l'intérieur de la paroi vasculaire. Or, malgré le risque de complications élevé des lésions sténosantes, leur fréquence reste faible comparée à celle des lésions peu ou pas sténosantes (Naghavi 2003). De plus, la plupart des accidents coronaires sont causés par la rupture de plaques d'athérome pas ou peu sténosantes (Glagov 1987) (chapitre 2.9).

Même si la technique a évolué avec le développement de l'angiographie rotationnelle qui permet d'observer la lumière du vaisseau en 3D et ainsi d'obtenir des informations plus précise qu'en 2D (Maddux 2004), elle ne permet pas de caractériser la composition biologique des plaques d'athérome.

3.1.2 Angioscopie

L'angioscopie est une technique d'imagerie qui permet d'observer directement la paroi du vaisseau. Son principe repose sur la transmission par fibre optique de la lumière émise dans le spectre du visible. Les images obtenues sont colorées et permettent de discriminer une plaque

fibreuse (blanche) d'une lésion athérosclérotique contenant une plaque lipidique importante (jaune) et la présence d'un thrombus (rouge) (Figure 18).

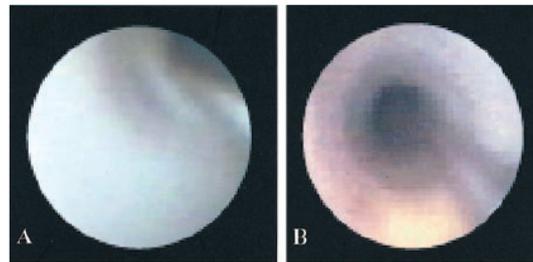


Figure 18

Exemple d'images obtenues par angioscopie (MacNeill 2003).

A : plaque fibreuse blanche ; B : plaque lipidique jaune.

Ueda et al. ont établi une corrélation entre l'intensité de la coloration jaune des plaques d'athérome et la susceptibilité de cette plaque à se rompre et à former un thrombus. Cette étude a porté sur une cohorte de 843 patients hospitalisés afin de diagnostiquer la maladie coronaire (Ueda 2004). Cependant, cette technique nécessite des conditions d'utilisation particulières et notamment un environnement artériel dépourvu de sang. Pour cela, le flux sanguin est bloqué par un ballonnet qui constitue une source potentielle de complications dont la principale est l'occlusion aigüe de l'artère cible. Une alternative consiste en l'injection d'un bolus de sérum physiologique qui permet d'obtenir une fenêtre de visibilité dans l'artère. Une autre limitation importante inhérente à l'angioscopie est la subjectivité de l'interprétation des couleurs. Celle-ci a incité le développement de méthodes d'analyse automatisées des images angioscopiques. Actuellement, l'angioscopie permet de visualiser et de classer les plaques en fonction de leur couleur. Elle ne donne cependant pas accès à d'autres critères importants de vulnérabilité d'une plaque tels que l'épaisseur de la capsule fibreuse ou la taille du cœur lipidique (Yamamoto 2009).

3.1.3 Echographie

3.1.3.1 Echographie endovasculaire (IVUS)

L'IVUS (Intravascular Ultrasound) est une technique d'examen vasculaire qui nécessite la cathétérisation d'une sonde à ultrasons miniaturisée. Le principe repose sur le comportement d'un tissu biologique face à une onde acoustique. Le milieu biologique oppose une résistance au mouvement imposé par l'onde acoustique qui le traverse. Il est donc caractérisé par

l'impédance acoustique. Ces informations d'impédance sont recueillies puis transformées en niveaux de gris afin de générer une image. Les ultrasons utilisés sont de fréquence généralement comprise entre 20 et 50 MHz. A 30 MHz, la longueur d'onde est de 50 μm et donne une résolution axiale d'environ 150 μm (De Franco 2001, Nissen 2001). L'échographie endovasculaire permet d'obtenir des informations sur l'épaisseur et la densité acoustique de la paroi vasculaire. Elle permet de distinguer une artère saine d'une artère athérosclérotique. En effet, les différents tissus composant la plaque apparaissent avec des intensités différentes. Les lipides sont ainsi hypo échogènes tandis que les calcifications et les fibres sont hyperéchogènes (Figure 19).

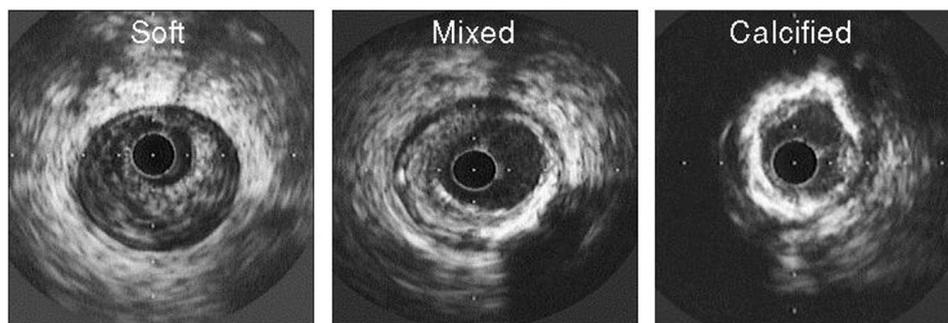


Figure 19

Morphologie de la plaque d'athérome vulnérable en échographie endovasculaire. Tissu mou (à gauche), tissu fibreux faiblement calcifié (au centre) et tissu fortement calcifié (à droite) (Nissen 2001).

Cependant, en raison de sa résolution insuffisante (150-300 μm), il reste difficile de déterminer l'épaisseur de la capsule fibreuse avec cette technique, un paramètre dont l'importance dans la détermination de la vulnérabilité de la plaque d'athérome est reconnue (cf. chapitre 2.9) (DeMaria 2006).

3.1.3.2 Elastographie endovasculaire

Différentes approches ont été mises au point dans le but de différencier la plaque d'athérome stable de la plaque d'athérome vulnérable. L'élastographie permet notamment d'apprécier la déformation des tissus en différents points de la plaque d'athérome en fonction du cycle cardiaque à partir d'informations obtenues par l'IVUS (Shaar 2006). Deux images IVUS sont utilisées, l'une à haute pression (systole) et l'autre à faible pression (diastole). Le décalage obtenu entre les deux images transformé en signal radiofréquence et codé en niveau de couleur permet d'obtenir une cartographie de l'élasticité des différentes zones de la plaque en fonction de sa composition (Figure 20).

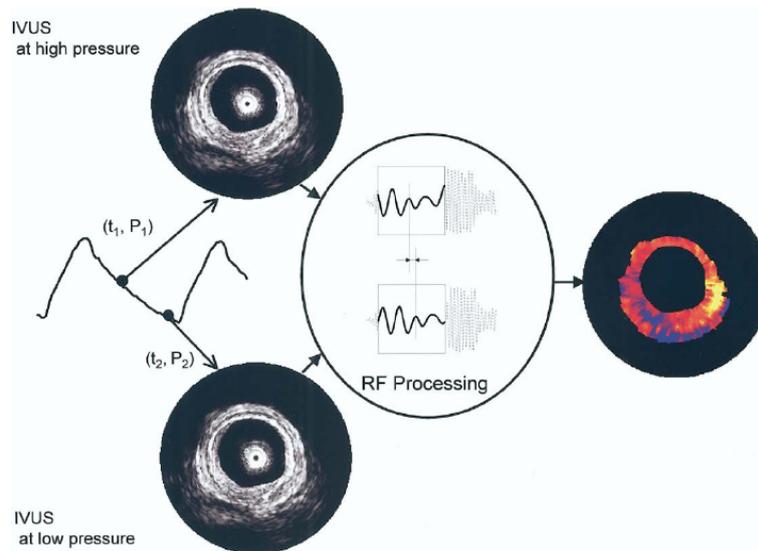


Figure 20

Principe de mesure de l'élastographie intravasculaire (Shaar 2006)

Ainsi, l'élastogramme obtenu permet d'observer la présence d'une région excentrée avec des valeurs de déformation très forte au niveau des « épaules » de cette même région.

Cette technique a aussi pu être appliquée de manière non-invasive. Kanai et al. ont utilisé l'échographie transcutanée afin de mettre en évidence la présence et la composition de plaques d'athérome au niveau de l'artère carotide chez deux sujets sains (Kanai 2003). Récemment, cette méthode a été employée pour évaluer l'élasticité d'artères carotides humaines chez le sujet diabétique (Okimoto 2008). Cependant, l'évaluation coronaire non-invasive est probablement impossible compte tenu de la profondeur des artères d'intérêts.

3.1.3.3 Echocardiographie de contraste

Le développement d'agents de contraste ciblés confère à l'IVUS les possibilités d'une modalité d'imagerie fonctionnelle. En effet, des vésicules lipidiques emplies de gaz inerte tels que le per- ou décafluorobutane ont été recouvertes par des anticorps dirigés contre des marqueurs de la plaque d'athérome vulnérable afin de créer des agents de reconnaissance spécifiques.

Villanueva et al. ont utilisé du perfluorobutane encapsulé avec un anticorps anti- ICAM-1 sur des cultures de cellules endothéliales in vitro (Villanueva 1998). Une multiplication du signal par un facteur d'environ 40 a été observée entre des cellules endothéliales activées avec IL-1 β et la culture de cellules non activées. En 2004, Hamilton et al. ont réalisé l'imagerie IVUS in vivo de VCAM-1, ICAM-1, la fibrine ainsi que du facteur tissulaire, marqueurs de la

plaque vulnérable exprimés en surface des cellules endothéliales chez le porc Yucatan, après injection d'immunoliposomes échogènes spécifiques (Hamilton 2004). Dernièrement, Kaufmann et al. ont démontré la faisabilité de l'imagerie échographique non invasive de l'expression de VCAM-1 sur l'aorte de souris Apo E^{-/-} hypercholestérolémiques et contrôles nourries avec un régime standard ou enrichi en cholestérol, après injection de microbulles lipidiques criblées d'anticorps anti-VCAM-1 (Kaufmann 2007) (Figure 21). Cependant, l'utilisation clinique de cette technique n'est pas envisagée à l'heure actuelle.

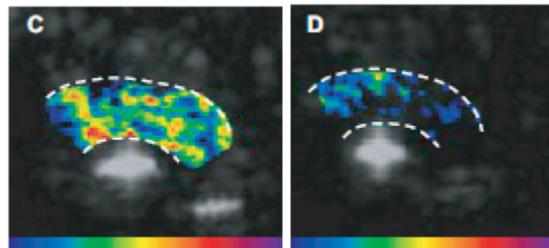


Figure 21

Exemple d'images obtenues en échographie après injection de microbulles couplées avec des anticorps anti-VCAM-1 (à gauche) et de microbulles non spécifiques (à droite) (Kaufmann 2007).

3.1.4 OCT : Optical Coherence Tomography

L'OCT est une technique d'imagerie optique intravasculaire dont le principe repose sur la mesure de la réverbération des ondes infrarouges par les tissus environnants (Stamper 2006). Cette technique possède une résolution pouvant aller jusqu'à 10 μm . Plusieurs études ont montré que l'OCT permettait de mettre en évidence les structures composant la plaque d'athérome in vitro (Brezinski 1996) (Figure 22). D'autres études menées chez l'animal ont permis d'observer in vivo la structure d'aortes de lapins normaux (Fujimoto 1999) ainsi que celles d'artères coronaires chez le porc (Tearney 2000). La faisabilité de la technique a aussi été démontrée chez l'homme (Jang 2001). La grande résolution de cette technique permet d'apprécier l'épaisseur de la capsule fibreuse ainsi que la teneur en macrophages grâce à la méthode validée par Tearney et al. (Tearney 2003) et ainsi de classer les plaques selon des critères reconnus de vulnérabilité (MacNeill 2004).

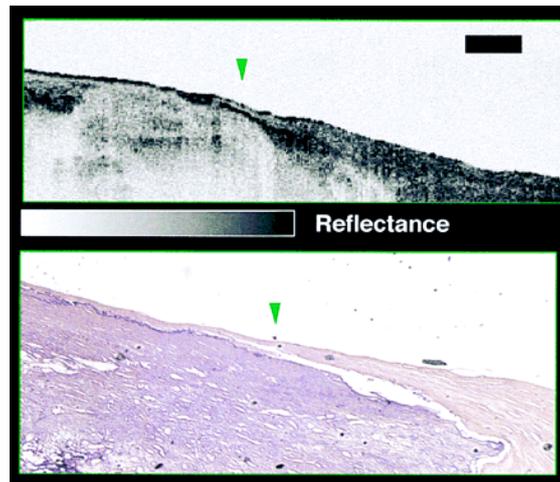


Figure 22

Exemple d'image OCT (en haut) en comparaison avec une coupe histologique. La flèche verte indique la couche intimale de la plaque d'athérome à son point le plus mince.

Cependant, l'OCT est confrontée à deux limitations majeures qui sont l'atténuation du signal occasionnée par le flux sanguin et la faible pénétration des ondes infrarouge dans le tissu. L'atténuation du signal causé par le sang a été solutionnée grâce à l'injection IV d'une solution saline (Fujimoto 1999) mais cela ne peut être utilisé qu'à des sites distincts. La pénétration des ondes dans la paroi artérielle est de 2 à 3 mm, ce qui ne permet pas d'imager les artères présentant une plaque d'athérome à large corps lipidique et nécrotique. Des paramètres comme la taille du corps lipidique et le remodelage de la paroi artérielle ne peuvent donc pas être déterminées. Par contre, la teneur en macrophage intraplaque est une indication biologique que l'OCT peut fournir et qui est nécessaire à l'identification des plaques d'athérome vulnérables (Raffel 2008).

3.1.5 La thermographie

La thermographie est une technique basée sur la mesure de la température à la surface de la paroi artérielle. Le principe fait appel à la différence de température existante entre la surface de la plaque d'athérome vulnérable et la paroi saine. En effet, l'inflammation est reconnue comme étant la principale caractéristique de la plaque vulnérable. Cette inflammation augmentant la production de chaleur, l'élévation de température dans la plaque d'athérome vulnérable serait le reflet de l'intensité du processus inflammatoire local (Lerakis 2008).

Des études *ex vivo* ont été réalisées sur des échantillons de carotide humaine présentant une hétérogénéité thermique et notamment, une élévation de la température au niveau du site d'infiltration des macrophages (Casscells 1996). Grâce au développement d'une sonde

thermique, Stefanadis et al. ont pu observer une différence de température entre la lésion athérosclérotique et la paroi de l'artère saine. De plus, la température des plaques dans une population de patients récemment victimes d'un infarctus du myocarde est supérieure à celle observée chez des patients présentant un angor stable (Stefanadis 1999). Cependant, une étude portant sur une cohorte de 18 patients atteints d'angor à l'effort a montré que l'hétérogénéité thermique était sous estimée dans les plaques d'athérome et que cette sous estimation serait due au « cooling effect » c'est-à-dire à une dissipation de la chaleur par le flux sanguin (Stefanadis 2003). Malgré cette limitation, le remodelage artériel positif et la rupture de plaque ont tous deux été corrélés avec des variations locales de température chez des patients atteints d'un syndrome coronarien aigu (Toutouzas 2007). La thermographie intravasculaire a aussi été utilisée comme outil pour évaluer les effets d'un traitement aux statines sur les plaques athérosclérotiques. Il a été observé une diminution de l'hétérogénéité thermique des plaques d'athérome chez les patients traités avec des statines comparé aux patients non traités (Toutouzas 2006). La thermographie peut être une technique intéressante si couplée avec une sonde IVUS pour obtenir des informations anatomiques.

3.1.6 L'imagerie de Résonance Magnétique intravasculaire (IRMiv)

L'IRM intravasculaire est une modalité d'imagerie dont le principe est basé sur le comportement des protons soumis à des impulsions électromagnétiques radiofréquences (RF) dans un champ magnétique. En effet, soumis à un champ magnétique intense, les spins s'orientent dans l'axe du champ. L'impulsion RF apporte de l'énergie au système de spins qui s'écartent de leur axe d'aimantation : c'est la phase d'excitation. Lorsque l'émission de radiofréquence est interrompue, le système restitue l'énergie absorbée pour retourner à l'état d'équilibre : c'est la phase de relaxation. Elle se décompose en 2 phénomènes obéissant à des mécanismes différents : la relaxation longitudinale, qui correspond à la repousse de la composante longitudinale (T1), et la relaxation transversale, qui correspond à la chute de l'aimantation transversale (T2). Ces 2 temps de relaxation caractéristiques des atomes d'hydrogène et de leur environnement et ainsi des tissus étudiés sont mis en évidence grâce à des séquences IRM particulières.

L'approche intravasculaire de l'IRM consiste à combiner une sonde réceptrice avec une IRM classique externe de 0,5 Tesla. Grâce à cette technique, Correia et al. ont pu démontrer que les résultats obtenus ex vivo en IRM intravasculaire (IRMiv) étaient bien corrélés avec l'histologie de coupes d'aorte thoracique humaine isolées. La capsule fibreuse a été reconnue par l'IRMiv sur 20 des 24 plaques identifiées en histologie, et le corps nécrotique sur 23 des

24 plaques (Correia 1997). Une autre étude a pu mettre en évidence une différence de signal entre la capsule fibreuse, les lipides et le calcium de manière *ex vivo* sur des plaques carotidiennes humaines (Rogers 2000). Cependant, l'utilisation des sondes IRM intravasculaires est limitée par la taille du cathéter et par la durée des acquisitions. Récemment, Larose et al. ont validé *ex vivo* et *in vivo* l'utilisation d'une sonde miniaturisée pour la caractérisation de lésions athérosclérotiques dans les artères aorto-iliaques humaines (Larose 2005). En 2008, la même équipe a démontré qu'en utilisant un produit de contraste comme le Gadolinium-DTPA avec cette sonde, le signal provenant des tissus fibreux était amélioré (Larose 2008). Parallèlement, une approche alternative intéressante a été développée. Il s'agissait d'incorporer l'aimant, habituellement situé à l'extérieur de la sonde, à l'intérieur de la sonde, ce qui permet ainsi de réduire l'encombrement lié au dispositif d'aimantation (Blank 2005). Cependant, le diamètre de cette nouvelle sonde étant de 1,73 mm limite sa capacité d'exploration des vaisseaux autres que ceux de gros calibres. Ce système a permis une caractérisation tissulaire en fournissant une cartographie colorée des différents composants de la plaque. Ainsi les auteurs ont pu discerner une plaque stable d'une plaque vulnérable *ex vivo* sur des échantillons d'artères coronaires isolées de cœur humain (Schneiderman 2005). Cette sonde représente une avancée sur le plan technologique. Cependant, elle doit encore être miniaturisée afin d'aller plus loin dans l'exploration et la caractérisation du réseau artériel.

3.1.7 Les sondes fluorescentes activables (NIRF)

Cette technique repose sur l'injection d'un ligand fluorescent spécifique d'une cible d'intérêt de la plaque d'athérome. Les sondes activables sont également appelées sondes intelligentes : elles ne sont détectables qu'en présence de leur cible, provoquant ainsi une amplification ou une modification du spectre d'émission du fluorochrome. La fluorescence de la sonde étant dépendante de sa liaison avec son ligand, le rapport signal sur bruit est très élevé. La détection peut être réalisée de manière non invasive chez les petits animaux de laboratoire. Cependant, la fluorescence émise dans le domaine du proche infrarouge ne pouvant traverser qu'une faible épaisseur de tissu, l'utilisation de sondes intravasculaires sera nécessaire pour la caractérisation des plaques d'athérome chez l'homme. L'information apportée par cette technique d'imagerie est d'ordre métabolique. Ainsi, Chen et al. ont utilisé une sonde fluorescente activable afin d'observer l'activité protéasique de la cathepsine B (Chen 2002). Récemment, la détection de la fluorescence émise dans le proche infrarouge par la dégradation par la cathepsine b de la cystéine injectée a été évaluée *in vivo* chez le lapin

hypercholestérolémique. Les résultats ont indiqué un rapport signal sur bruit 5,6 fois supérieur dans le groupe ayant reçu l'agent cystéinique par rapport au groupe contrôle n'ayant reçu qu'une solution saline (Jaffer 2008).

3.1.8 Les sondes en médecine nucléaire

L'imagerie en médecine nucléaire est généralement réalisée de manière non invasive. Cependant, une approche intravasculaire est en développement afin de pallier à certaines limitations inhérentes à la détection externe de la radioactivité ainsi qu'au comportement biologique du traceur. Tandis que les techniques de détection externes privilégient le rayonnement gamma, les techniques intravasculaires détectent préférentiellement les émissions β . En effet, les rayons gamma ont un pouvoir pénétrant très élevé. Le parcours du positron (β^+) est en revanche de quelques millimètres et diminue ainsi la probabilité que des rayonnements β^+ parasites provenant d'autres organes n'atteignent le détecteur. Le radioisotope de prédilection pour cette utilisation est le fluor 18. Le parcours des β^+ est de l'ordre du millimètre. La sonde radiosensible placée à proximité de l'isotope peut alors détecter les émissions β^+ . De plus, le [^{18}F]-FDG, un analogue du glucose, est déjà utilisé en imagerie TEP non invasive. Ce radiotraceur s'accumule aux sites de métabolisme élevé tels que les plaques d'athérome vulnérables. En effet, des études expérimentales menées ex vivo sur des aortes lésées chez le lapin nourri avec un régime enrichi en cholestérol montrent une captation en [^{18}F]-FDG au niveau des lésions 4,8 fois plus élevée par rapport à l'artère normale (Lederman 2001). Janecek et al. ont testé une sonde sensible aux émissions β^+ et aux électrons de conversion en provenance de différents isotopes. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le ^{204}Tl , un émetteur Bêta pur (Janecek 2004). Ces premiers résultats associés à la mise au point d'une sonde radiosensible de 1 mm de diamètre suggèrent la faisabilité de la détection intravasculaire du [^{18}F]-FDG pour des vaisseaux d'un diamètre supérieur au millimètre (Mukai 2004). Récemment, afin d'évaluer in vivo la plaque vulnérable, Hosokawa et al. ont introduit une sonde radiosensible d'un millimètre de diamètre dans l'artère fémorale et dans une artère coronaire sur un modèle canin après avoir préalablement placé des sources ponctuelles d'activité décroissantes de [^{18}F]-FDG autour de ces artères. Les sources de plus forte activité ont pu être détectées (Hosokawa 2006, Shikhaliev 2006, Strauss 2006).

3.1.9 Les méthodes spectroscopiques

Les méthodes de spectroscopie sont basées sur le principe d'absorption des radiations par les molécules étudiées. Cette absorption induit différentes transitions selon la longueur d'onde utilisée.

3.1.9.1 La spectroscopie proche infrarouge (NIR)

Dans le cas de la spectroscopie infrarouge, les molécules absorbent des radiations émises dans le proche infrarouge (longueur d'onde : 800-2500 nm). Ces absorptions sont recueillies puis quantifiées. La fréquence d'oscillation dépend de la masse atomique et de la force des liaisons mises en jeu, cette fréquence fournit des informations précises sur l'identité de la molécule. Cette technique a été utilisée chez l'homme pour le diagnostic des plaques d'athérome vulnérables post mortem (Moreno 2002). Un algorithme a été mis au point avec 50% de la gamme d'échantillons en guise de référence et des prédictions ont été réalisées sur la moitié des échantillons restants. Les résultats ont montré une sensibilité et une spécificité de 90% et 93% pour le corps lipidique, 77% et 93% pour la fine capsule fibreuse, et 84% et 89% pour la présence de cellules inflammatoires, respectivement. Parallèlement, Moreno et al. ont testé la spectroscopie NIR in vivo chez des lapins hypercholestérolémiques ou normaux, pour identifier les plaques riches en lipide à travers le sang. Des plages lipidiques d'environ 0,75 mm² ont pu être mis en évidence avec une sensibilité de 78% et une spécificité de 75% (Moreno 2002).

3.1.9.2 La spectroscopie de Raman

La spectroscopie Raman consiste à éclairer la matière de façon à faire vibrer les liaisons moléculaires qui la compose. Ces vibrations se matérialisent par une émission photonique secondaire dont le décalage en longueur d'onde par rapport à l'onde excitatrice représente une signature caractéristique de chaque liaison. Les spectres ainsi obtenus sont finalement l'image propre de la (ou les) molécule(s) présente(s) dans le champ lumineux.

Cette technique a permis la quantification en temps réel de la teneur en cholestérol et en tissu calcifié d'artères coronaires humaines ex vivo (van de Poll 2003). Récemment, Rocha et al. ont identifié différents types de plaques carotidiennes provenant de cadavres humains en se basant sur les différents pics Raman obtenus pour chaque tissu les composant (Rocha 2007). Cependant, la technique présente un faible rapport signal sur bruit en raison de la faible quantité d'émission secondaire par rapport à l'émission primaire. Ce rapport est encore

minoré par la faible pénétration tissulaire du rayonnement (~0.3 mm) due en partie à la présence du sang in vivo (Moreno 2002).

3.1.10 Conclusion

Techniques	Résolution	Pénétration	Capsule fibreuse	Plaque lipidique	Inflammation	Calcium	Thrombus
Angioscopie		-	+	+	-	-	+
IVUS	150 µm	+	+	+	+	+	-
OCT	10 µm	-	+	-	+	-	-
Thermographie	500 µm	-	-	-	+	-	-
IRM intravasculaire	160 µm	+	+	+	-	+	-
Sondes							
-fluorescence		-	-	-	+	-	-
-médecine nucléaire	quelques mm	+	-	-	+	-	-
Spectroscopie			-	+	+	+	-

Tableau 2

Tableau récapitulatif des différentes techniques invasives d'imagerie de la plaque d'athérome et de leurs caractéristiques respectives. NB : Les sondes utilisées en médecine nucléaire n'ont été utilisées qu'avec le [¹⁸F]-FDG.

De nombreuses modalités d'imagerie intravasculaire de la plaque d'athérome vulnérable sont actuellement en cours de développement (Tableau 2). La technique d'imagerie idéale serait une combinaison de différentes modalités (IVUS, OCT, IRM) permettant d'obtenir les informations moléculaires et morphologiques nécessaire à la caractérisation complète de la plaque d'athérome et la détermination de sa vulnérabilité. D'autres part, une technique invasive ne pourra en aucun cas être utilisée en routine clinique sur une large population d'individus (40 à 50 millions de personnes pour les Etats-Unis par exemple) (SHAPE). L'exploration d'une telle population sera par contre envisageable avec une modalité d'imagerie non-invasive.

3.2 Techniques d'imagerie non invasive

3.2.1 Tomodensitométrie aux rayons X (TDRX)

La tomodensitométrie est une technique d'imagerie non invasive utilisant les rayons X. Le tissu est bombardé de photons X et des capteurs situés autour du tissu récupèrent les photons l'ayant traversé. Les rayons X traversent un organisme et laissent une partie de leur énergie dans le tissu. L'énergie des photons recueillie par le détecteur est alors atténuée par rapport à l'énergie des photons émis. Cette atténuation dépend de la densité du tissu traversé.

L'atténuation est par conséquent caractéristique du tissu traversé. Ainsi, les images obtenues associent différents niveaux de gris aux différents coefficients d'atténuation.

L' Electron Beam Computed Tomography (EBCT), le scanner le plus utilisé, possède deux détecteurs stationnaires.

Ces dernières années, la TDRX a beaucoup évolué d'un point de vue technologique avec, principalement, une augmentation du nombre de détecteurs et une acquisition effectuée de manière spiralee. Cela a donné naissance à une génération de « Multi Detector Computed Tomography » (MDCT) dont le principal avantage repose sur une diminution du temps d'acquisition et ainsi une baisse de la dosimétrie pour le patient.

La MDCT possède une grande sensibilité pour la détection des calcifications dans la plaque d'athérome (Achenbach 2004) mais une sensibilité plus faible pour les lésions non calcifiées (Leber 2004). Sur l'aorte abdominale athérosclérotique de lapins, Viles-Gonzalez et al. ont démontré qu'il était difficile de discerner une plaque fibreuse d'une plaque riche en lipide même avec un coefficient d'atténuation différent (respectivement, 116 ± 27 vs. 51 ± 25 unités Hounsfield, $P < 0.01$) avec un MDCT (Viles-Gonzalez 2004). Cependant, une étude clinique a aussi montré que les patients ayant eu un événement coronarien aigu présentaient des plaques d'une densité inférieure à celles des patients atteints d'angor stable (25 ± 15 vs. 71 ± 16 unités Hounsfield, respectivement) (Inoue 2004). Par ailleurs, le MDCT permet d'identifier et de quantifier les calcifications des artères coronaires et ainsi d'obtenir un score calcique. Cependant, la relation existante éventuellement entre le degré de calcification d'une plaque et sa vulnérabilité est sujette à controverse.

Récemment, Hyafil et al. ont également démontré la faisabilité de détecter les macrophages présents dans les plaques athérosclérotiques aortiques chez le lapin avec agent de contraste nanoparticulaire, le N1177 (Hyafil 2007). Deux heures après l'injection du N1177 ou de l'agent de contraste conventionnel, un signal 40% plus élevé a été observé avec le N1177 par rapport à l'agent de contraste conventionnel (Figure 23) au niveau des plaques présentes sur l'aorte. De plus, les régions athérosclérotiques ayant capté le N1177 correspondent à des zones d'accumulation de macrophages comme indiqués par l'immunohistochimie. Dernièrement, Hyafil et al. ont également comparé la captation du N1177 à celle du [^{18}F]-FDG dans les plaques d'athérome aortiques chez le lapin (Hyafil 2009). Les auteurs ont montré une corrélation positive entre la captation de N1177 et l'activité métabolique reflétée par la captation du [^{18}F]-FDG au sein des lésions athérosclérotiques.

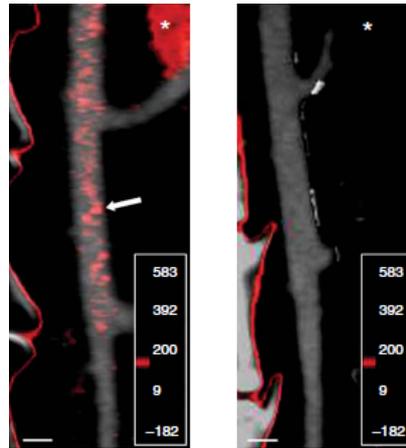


Figure 23

Images d'aorte athérosclérotique de lapin obtenu en CT deux heures après injection de N1177 (à gauche) ou de l'agent de contraste conventionnel (à droite) (Hyafil 2007).

Par conséquent, le N1177 offre la possibilité expérimentale de détecter les macrophages présents dans les lésions athérosclérotiques aortiques. Aucune évaluation clinique de cette méthodologie n'est disponible à l'heure actuelle.

3.2.2 Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)

Comme décrit dans le chapitre 3.1.6, les temps de relaxation T1 et T2 caractérisant chacun le retour à l'état d'équilibre des protons suite à une excitation sont caractéristiques des atomes d'hydrogène dans un environnement particulier. Ces temps de relaxation associés à la densité de proton apportent des informations sur les différents composants contenus de la plaque d'athérome vulnérable. Notamment, Toussaint et al. ont démontré qu'il était possible de discriminer ex vivo le corps lipidique de la fibrose contenus dans des plaques d'athérome carotidienne et coronarienne humaines en mode T2, alors que des calcifications présentes sur des échantillons de coronaires humaines ont été observées en mode T1 (Toussaint 1995). Parallèlement, en utilisant un aimant de 1,5 Tesla sur des échantillons d'artères humaines, Martin et al. ont discerné ex vivo la média de l'adventice en utilisant des séquences pondérées en T2 (Martin 1995). Ces différentes séquences ont été majoritairement utilisées en imagerie IRM in vivo de la plaque carotidienne humaine. Ces études ont montré que les corps lipidiques et nécrotiques et les hémorragies intra plaques pouvaient être détectés avec une sensibilité de 85% et une spécificité de 92% (Yuan 2001). De plus, Cai et al. ont démontré qu'il était possible de classifier les lésions athérosclérotiques carotidiennes humaines selon les critères établis par l'American Heart Association (AHA) et notamment les plaques de type IV ou de type V avec une sensibilité et une spécificité de 84% et 90%, respectivement (Cai

2002). Parallèlement, d'autres auteurs ont étudié la possibilité de quantifier les images obtenues en utilisant différentes séquences. Clarke et al. ont classifié les zones correspondantes aux différents composants de la plaque carotidienne humaine obtenues après endartérectomie, puis les ont comparés avec les coupes histologiques correspondantes. Sur la base de cette classification, une sensibilité et une spécificité de 83,9% et 75% ont été respectivement obtenues (Clarke 2003). La quantification du corps lipidique et nécrotique ainsi que du tissu fibreux contenu dans des plaques d'athérome a pu être réalisée in vivo chez 31 patients candidats à une endartérectomie carotidienne. Les images de résonance magnétique ont été comparées aux coupes histologiques correspondantes. Les zones d'intérêt ont été dessinées sur les images IRM et histologiques. Les quantifications ont été exprimées en % de la surface totale de la plaque. Ainsi, les auteurs ont démontré que les mesures IRM étaient similaires à celles effectuées en histologie (23,7 vs. 20,3 %, $p < 0,01$, respectivement pour le corps lipidique et nécrotique) (Saam 2005). L'IRM non invasive in vivo d'artères coronaires humaines a été réalisée en utilisant des séquences d'acquisition particulières. Les auteurs se sont affranchis des artéfacts émanant du sang et du mouvement cardiaque et pulmonaire en utilisant une séquence « Black Blood » ainsi qu'en synchronisant l'acquisition avec l'électrocardiogramme (ECG) et les mouvements respiratoires. Ainsi, une différence significative a été mise en évidence entre l'épaisseur de la paroi artérielle saine et celle de la paroi coronaire sténosée à plus de 40% ($0,75 \pm 0,17$ vs. $4,38 \pm 0,71$ mm, $p < 0,0001$, respectivement) (Fayad 2000). La faisabilité de l'IRM pour l'imagerie des plaques d'athérome coronaire n'a cependant pas été confirmée.

L'IRM peut également être utilisée pour l'imagerie expérimentale et non-invasive de cibles moléculaires. Tout d'abord, l'utilisation du gadolinium comme agent de contraste a permis d'améliorer la détection de plaque d'athérome (Yuan 2002). Un agent de contraste dérivé du Gadolinium, le Gadofluorine, a montré ex vivo une bonne captation permettant une amplification du signal IRM au niveau de l'aorte de lapins WHHL hypercholestérolémiques (Barkhausen 2003). Afin d'imager les différents composants de la plaque d'athérome vulnérable, les agents de contraste doivent porter différentes molécules de type anticorps ou peptides leur permettant de se fixer spécifiquement sur les régions ciblées, ou posséder un magnétisme particulier et être directement reconnus par les cellules. Les nanoparticules d'oxyde de fer (USPIOs) en sont un exemple. En effet, les USPIOs injectés par voie intraveineuse sont phagocytés par les macrophages présents au sein de la plaque (Litovsky 2003, Ruehm 2001). L'imagerie in vivo des plaques carotidiennes humaines a été réalisée avec ces nanoparticules. Sur les images de résonance magnétique obtenues, les USPIOs ont

été observées dans 75 % des plaques vulnérables et seulement dans 7% des plaques stables (Kooi 2003). Récemment, la captation aortique des USPIOs injectées chez des souris Apo E^{-/-} traitées avec de l'angiotensine II et dans un groupe non traité a été étudiée in vivo (Morris 2008). L'administration d'angiotensine II a pour effet d'augmenter la quantité de macrophages présents dans les plaques d'athérome. La captation des USPIOs est significativement plus élevée dans le groupe traité que dans le groupe non traité (36±7 vs. 19±4% de perte du signal IRM, respectivement) (Figure 24).

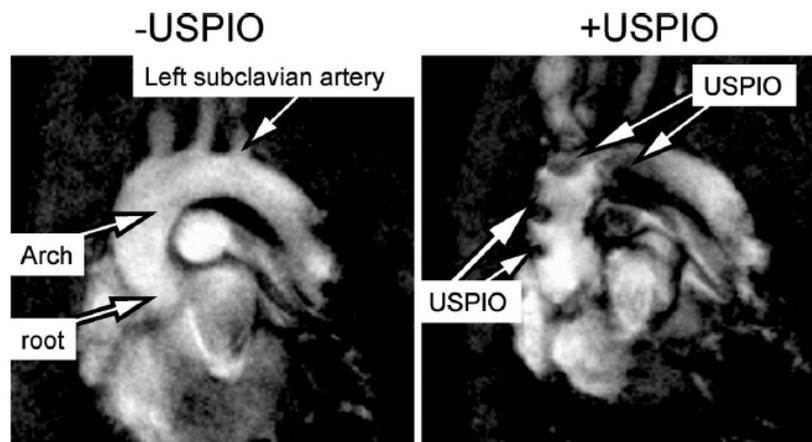


Figure 24

Exemple d'image obtenue en IRM de la crosse aortique de souris Apo E^{-/-} avant injection des USPIOs (à gauche) et après injection des USPIOs (à droite) (Morris 2008).

Amirbekian et al. ont utilisé des immunomicelles destinées à cibler les récepteurs scavenger des macrophages chez des souris Apo E^{-/-} (Amirbekian 2007). Après avoir démontré que les immunomicelles étaient colocalisés avec les macrophages dans les lésions athérosclérotiques, les investigateurs ont montré une multiplication par 2 de l'intensité du signal émis par les lésions athérosclérotiques par rapport au signal émis par les immunomicelles non spécifiques. L'année suivante, Lancelot et al. ont injecté un inhibiteur des métalloprotéases couplé à du Gadolinium (P947) dans un modèle expérimental de souris Apo E^{-/-} (Lancelot 2008). Les résultats de cette étude ont montré que P947 permettait de visualiser in vivo les lésions athérosclérotiques aortiques. Parallèlement, les études ex vivo menées sur des échantillons de plaques humaines ont montré une captation différentielle du P947 en fonction de la quantité de MMPs présentes dans la plaque. Des agents de contrastes multimodalités sont actuellement développés. Ainsi, Nahrendorf et al. ont synthétisé une nanoparticule sur laquelle ont été greffés des groupements chimiques permettant sa détection par différentes modalités d'imagerie telles que la TEP, l'optique, le CT et l'IRM (Nahrendorf 2008). Les résultats ont montré que ces nanoparticules étaient principalement captées par les macrophages (73.9%)

présents au niveau des plaques d'athérome aortiques chez la souris Apo E^{-/-}. L'imagerie IRM in vivo a permis de détecter la présence de cet agent multimodalité au niveau du sinus aortique chez la souris Apo E^{-/-} (Figure 25).

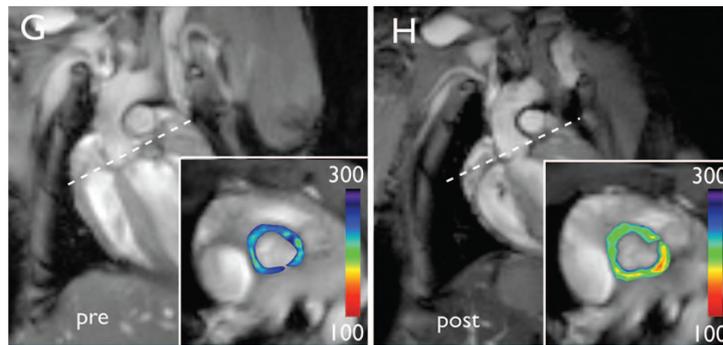


Figure 25

Image de résonance magnétique du sinus aortique de souris Apo E^{-/-} obtenue avant injection de l'agent multimodalité (à gauche) et après injection (à droite).

Dernièrement, Lipinski et al. ont montré que l'utilisation d'une nanoparticule (NP) lipidique ciblant les récepteurs scavenger CD36 couplé au Gadolinium (anti-CD36 NP) a permis de caractériser des plaques athérosclérotiques aortiques humaines et aussi d'améliorer le contraste dans le myocarde en augmentant le rapport signal sur bruit de 52,2 % alors que les NPs contrôles n'augmentent ce rapport que de 18,7% (Lipinski 2009).

D'autres composants caractérisant la plaque d'athérome vulnérable ont été évalués. Notamment, la néoangiogenèse, caractérisée par la présence de l'intégrine $\alpha\beta_3$, a été observée sur des plaques d'athérome aortiques développées par des lapins New Zealand nourris avec un régime enrichi en cholestérol en utilisant des nanoparticules ciblées contre $\alpha\beta_3$ (Winter 2003). Cet agent de contraste a permis une amplification du signal IRM au niveau des aortes des animaux hypercholestérolémiques par rapport aux animaux contrôles. Récemment, Calcagno et al. ont entrepris de détecter les néovaisseaux des lésions athérosclérotiques chez le lapin à l'aide de la technique du « black blood » en IRM associé au [¹⁸F]-FDG. Les résultats ont montré une faible corrélation entre la captation en [¹⁸F]-FDG et la densité de néovaisseaux (R=0,52) et une meilleure corrélation entre le signal IRM et la densité de néovaisseaux (R=0,71). Cependant, cette étude requiert un nombre d'animaux plus élevé pour tirer des conclusions sur ces différentes corrélations. Toutes ces études expérimentales montrent le fort potentiel de l'IRM pour la détection des plaques d'athérome aortiques. Le potentiel de la technique pour la détection des plaques d'athérome vulnérables coronaires n'est en revanche pas encore démontré.

3.2.3 Médecine nucléaire

Les modalités d'imagerie non invasives, CT et IRM, décrites précédemment présentent toutes deux une grande résolution spatiale (< mm) mais une faible sensibilité (< μM). La médecine nucléaire est une technique d'imagerie simple, utilisable de manière non invasive en routine clinique et très sensible (10^{-12}M). Elle consiste en l'injection d'une molécule radiomarquée spécifique d'une cible ou d'un processus biologique. Le patient est ensuite placé sous une gamma-caméra, afin de réaliser une acquisition scintigraphique en modalité SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) ou TEP (Tomographie par Emission de Positons) de la répartition du traceur dans l'organisme.

Les radiotraceurs potentiels pour l'imagerie de la plaque d'athérome vulnérable sont des composés ciblant des molécules clés, des marqueurs ou des processus impliqués dans l'athérogenèse. Certains agents sont radiomarqués avec des émetteurs de photons gamma ou des émetteurs de positons. La détection non invasive de ces radiotraceurs s'effectue alors, respectivement par SPECT ou TEP.

3.2.3.1 Imagerie des Lipoprotéines de faible densité (LDLs)

Plusieurs études ont montré que les isoformes natives et oxydées des LDLs (LDLs et LDLox) jouent un rôle important dans la genèse de l'athérosclérose instable (Ross 1999). Différentes stratégies ont été utilisées afin d'imager l'accumulation des LDLs dans les lésions athérosclérotiques. Le radiomarquage direct des lipoprotéines a été réalisé avec ^{125}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{123}I et ^{111}In (Lees 1983, Lees 1985, Vallabhajosula 1988, Lees 1988, Rosen 1990, Hay 1991, Virgolini 1991, Pirich 1995). Dans une étude clinique, Lees et al. ont observé une accumulation du $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -LDL dans les artères carotides, iliaques et fémorales chez 4 des 17 patients présentant de l'athérosclérose (Lees 1988). Cependant, la faible cinétique d'accumulation du traceur et la forte activité circulante perturbent les images in vivo. Les LDLox sont fortement impliquées dans le processus qui mène à la formation des plaques vulnérables. Des auteurs ont oxydé des LDLs natives in vitro avec du cuivre et du peroxyde d'hydrogène avant de le radiomarquer au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Iuliano 1996). Le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -LDLox a montré une meilleure accumulation tissulaire ainsi qu'une cinétique plus favorable que les LDLs natives. Ainsi, chez 7 patients, le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -LDLox a permis d'imager des plaques carotidiennes avec un rapport d'activité entre la cible et le bruit de fond d'environ 1,5. Une stratégie alternative permettant d'imager l'accumulation des LDLox dans les lésions athérosclérotiques a été employée par Tsimikas et al. Les auteurs ont montré que des anticorps anti-oxydation

radiomarqués tels que l'anticorps monoclonal murin (MAB)MDA-2 qui reconnaît les épitopes lysine-malondialdéhyde (MDA), injecté par voie intraveineuse, possède une forte prédilection à se fixer au niveau des lésions athérosclérotiques plutôt que sur des artères saines (Tsimikas 1999). La captation aortique du ^{125}I -MDA2 est amplifiée pour les lésions riches en lipides chez les souris LDLR $^{-/-}$ et diminuée chez les animaux suivant un régime antioxydant (Torzewski 2004). Le MDA-2 radiomarqué au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a permis de réaliser l'imagerie non invasive des plaques d'athérome chez 4 lapins WHHL sur un total de 7 animaux étudiés (Tsimikas 2000). Cependant, la lente cinétique sanguine du MDA radiomarqué requiert une période assez longue entre l'injection de la molécule et l'acquisition des images, ainsi que l'injection de MDA-LDL afin de diminuer l'activité circulante.

La méthode de « phage display » a aussi été utilisée afin d'identifier des anticorps monoclonaux humain dirigés contre des épitopes d'oxydation des LDLox. Différentes séquences ont été décrites parmi lesquelles IK17 qui se lie aux MDA-LDLs, aux LDLox intactes mais pas aux LDLs natives. Le radiotracer ^{125}I -IK17 injecté par voie IV chez la souris hypercholestérolémique LDLR $^{-/-}$ montre une captation spécifique au niveau des lésions athérosclérotiques aortiques (Shaw 2001, Tsimikas 2002). Cependant, la faisabilité de l'imagerie in vivo non invasive des lésions athérosclérotiques n'a pas été démontrée.

« Lectin-like oxLDL receptor-1 » (LOX-1) est un récepteur membranaire scavenger exprimé par les cellules endothéliales, les monocytes/macrophages, les cellules musculaires lisses et les plaquettes qui possèdent une forte affinité pour les LDLox (Dunn 2008). Récemment, Ishino et al. ont utilisé un anticorps anti-LOX-1 radiomarqué au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ dans un modèle expérimental d'athérosclérose (Ishino 2008). Les auteurs ont montré que malgré la corrélation faible entre l'activité en traceur et les récepteurs LOX-1 des macrophages en autoradiographie et en immunohistochimie, le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -anti-LOX-1 permettait de visualiser les lésions athérosclérotiques aortiques des lapins WHHLMI 24 heures après injection avec un rapport d'activité de 10 entre la captation de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -anti-LOX-1 dans la lésion et la captation dans la zone saine des aortes des lapins contrôles et de 2 avec la captation de l'anticorps contrôle radiomarqué au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ dans les lésions athérosclérotiques. Cependant, au même titre que les autres anticorps radiomarqués testés jusqu'à maintenant, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -anti-LOX-1 présente une forte activité sanguine qui ne favorise pas le ratio signal sur sang, important en imagerie nucléaire.

3.2.3.2 Imagerie de l'inflammation

3.2.3.2.1 MCP-1 : *Monocyte Chemoattractant Protein-1*

Les monocytes circulants sont attirés au niveau du site de développement des plaques d'athérosclérose par MCP-1, une chemokine qui est produite par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les macrophages au cours de la formation de la plaque d'athérome. MCP-1 se lie au récepteur CCR-2 de la membrane plasmique des monocytes/macrophages (Kinlay 2001). MCP-1 radiomarqué à l'iode 125 a été évalué pour l'imagerie moléculaire de la plaque après injection chez le lapin hypercholestérolémique ayant subi une déendothélialisation des artères iliaques. Une clairance sanguine rapide a été observée avec une demi-vie de l'ordre de 10 minutes. Bien que l'imagerie in vivo n'ait pas été convaincante à cause du marquage à l'iode 125, les autoradiogrammes ont montré une accumulation de ^{125}I -MCP-1 dans la paroi artérielle endommagée. Cette accumulation a été corrélée avec le nombre de macrophages infiltrés (Ohtsuki 2001). MCP-1 a été récemment radiomarqué au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ et injecté à des lapins chez qui une lésion athérosclérotique a été induite par blessure de l'aorte abdominale (Hartung 2007). Les images ex vivo ont indiqué que la captation de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MCP-1 dans les lésions athérosclérotiques était 4 fois supérieure à celle observée chez les animaux contrôle. Une bonne corrélation entre $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MCP-1 et la densité de macrophages a été aussi observée, et la fixation du traceur a été détectée dans les lésions athérosclérotiques en imagerie moléculaire non invasive in vivo. Par conséquent $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MCP-1 est un agent prometteur pour l'imagerie moléculaire des plaques d'athérome vulnérables.

3.2.3.2.2 Le [^{18}F]-FDG

Le FDG est un analogue du glucose marqué au Fluor 18. Il est utilisé en oncologie de manière routinière dans les services de médecine nucléaire. En effet, les cellules tumorales, ayant un métabolisme exacerbé, accumulent le [^{18}F]-FDG en proportion de leur métabolisme glucidique.

En 2002, Rudd et Al. ont montré qu'il était possible d'imager les plaques carotidiennes en utilisant le [^{18}F]-FDG à condition qu'elles soient symptomatiques. Les analyses immunohistochimiques ont montré la présence de macrophages en plus grande quantité dans les plaques carotidiennes symptomatiques par rapport aux plaques asymptomatiques (Rudd 2002). Une corrélation entre la présence de macrophages et la captation de [^{18}F]-FDG a été démontrée dans un premier temps dans un modèle expérimental d'athérosclérose chez le lapin WHHL (Ogawa 2004), puis chez l'homme dans les lésions carotidiennes (Tawakol 2006).

D'autres études ont permis de suivre les effets de traitements anti-inflammatoires sur la progression de la plaque d'athérome (Tahara 2006, Ogawa 2006). Ces travaux sont en accord avec l'utilisation du [^{18}F]-FDG comme marqueur de plaque d'athérome. Pourtant, Laurberg et al. sont allés à l'encontre de ces travaux en n'observant aucune accumulation de [^{18}F]-FDG dans les plaques aortiques que développent les souris Apo E^{-/-} (Rudd 2007). Cette étude a été lourdement controversée. Cette controverse met en avant des problèmes méthodologiques concernant le modèle expérimental utilisé mais aussi la résolution spatiale de la camera PET non adaptée à la taille de la lésion (Laurberg 2007). Rudd et al. ont démontré la reproductibilité de la méthode consistant à imager les plaques carotidiennes à l'aide du [^{18}F]-FDG. Les variabilités interscans, interobservateurs, intraobservateurs sont très faibles. Ces résultats rendent possibles des études longitudinales multicentriques (Rudd 2007). Dix-neuf patients ont subi chacun deux examens scintigraphiques au [^{18}F]-FDG à 2 semaines d'intervalle. L'étude a montré une bonne répétabilité à court terme du signal [^{18}F]-FDG avec des coefficients de corrélation intraclass supérieurs à 0,8 avec une captation en [^{18}F]-FDG supérieure dans les carotides par rapport artères iliaques et fémorales (Rudd 2008). Récemment, Bural et al. ont étudié la captation du [^{18}F]-FDG sur une cohorte de 149 sujets âgés de 5 à 83 ans. Les auteurs ont montré qu'au moins un segment artériel des différents segments pris en compte dans l'étude présentait une captation de [^{18}F]-FDG et que le nombre de segments associés au [^{18}F]-FDG augmente avec l'âge du sujet (Bural 2008). Cependant, une limitation à l'imagerie de la plaque d'athérome coronaire avec le [^{18}F]-FDG reste la forte captation myocardique qui défavorise le rapport signal sur bruit de fond. Pourtant, une étude clinique rétrospective récente portant sur une cohorte de 32 patients a été réalisée afin d'évaluer les effets d'un régime riche en graisse sur la captation myocardique du [^{18}F]-FDG. Les auteurs ont montré qu'il était possible de détecter des plaques d'athérome coronaire après suppression du signal myocardique chez les patients ayant suivi un régime riche en cholestérol et faible en carbohydrate. Cependant, le caractère rétrospectif est une limitation importante à cette étude. En effet, les prises alimentaires n'ayant pas été contrôlées, les auteurs ne sont pas certains que les patients aient suivi correctement le régime. Des études complémentaires et contrôlées doivent être effectuées (Wykrzykowska 2009). Par ailleurs, l'aspect contraignant du régime à suivre par les patients rendra certainement l'examen au [^{18}F]-FDG difficile à appliquer en routine clinique.

3.2.3.2.3 [¹⁸F]-choline

La [¹⁸F]-choline a initialement été introduite comme traceur pour l'imagerie de cancers cérébraux et prostatiques (Schmid 2005). La choline entre dans les cellules par un mécanisme de transport spécifique. Elle est phosphorylée par la choline kinase, métabolisée en phosphatidylcholine et éventuellement incorporée dans la membrane plasmique. Une forte captation de choline a été observée dans des macrophages activés (Boggs 1995). Une corrélation a aussi été observée entre la captation de choline radiomarquée au fluor 18 et l'accumulation de macrophages dans un modèle expérimental de tissu mou infecté (Wyss 2004) mais aussi dans un modèle de blessures cérébrales induite par irradiation (Speath 2004). Matter et al. ont aussi travaillé sur le potentiel de [¹⁸F]-choline pour l'imagerie moléculaire de la plaque d'athérome. Ex vivo, la captation de [¹⁸F]-choline est bien corrélée aux zones d'accumulation lipidique et aux zones positives en macrophages par rapport à la captation de ¹⁴C-FDG obtenue chez la souris Apo E^{-/-} hypercholestérolémique. Cependant, l'imagerie TEP n'a pas pu mettre en évidence une captation de [¹⁸F]-choline au niveau des lésions athérosclérotiques in vivo (Matter 2006).

3.2.3.2.4 Imagerie cellulaire des monocytes/macrophages

Récemment, deux études se sont intéressées à l'imagerie cellulaire des monocytes/macrophages. Tout d'abord, Kircher et al. ont réalisé in vitro un marquage des monocytes à l'indium 111 à l'aide d'oxine avant d'injecter ces cellules radiomarquées à des souris contrôles ou déficientes en Apo E dans le but d'observer la pathogénèse de l'athérosclérose (Kircher 2008). Cinq jours après l'injection, l'imagerie non-invasive du recrutement des monocytes dans la plaque d'athérome a été réalisée et une zone de forte activité localisée dans l'aorte ascendante a pu être observée. Une bonne corrélation ($R^2=0,87$) entre le signal SPECT in vivo et la teneur de la plaque en monocyte a aussi été observée. L'inhibition du recrutement monocyttaire a pu être mis en évidence avec cette méthodologie. Des études cliniques utilisant l'oxine marquée à l'¹¹¹In sont en cours de réalisation. Une autre approche est basée sur le fait que les macrophages sont avides de structures supramoléculaires polysaccharidiques telles que les nanoparticules. Ces dernières ont été modifiées et marquées avec du ⁶⁴Cu afin d'être détectable en TEP, en résonance magnétique et en optique. Ce nouvel agent multimodalité a fourni des images moléculaires de lésions athérosclérotique aortiques 24 heures après son injection chez des souris Apo E^{-/-} (Nahrendorf 2008).

Récemment, une étude autoradiographique menée par Fujimura et al. chez des patients candidats à une endartérectomie carotidienne a démontré la faisabilité de réaliser l'imagerie

des récepteurs périphériques mitochondriaux du benzodiazépine (RPB), fortement exprimés par les macrophages activés, avec un ligand [³H]PK 11195 spécifique des RPBs (Fujimura 2008).

3.2.3.2.5 Imagerie de VCAM-1

Les cellules endothéliales expriment des molécules spécifiques dans des conditions pro-athérogène (Kinlay 2001). VCAM-1 joue un rôle important dans le recrutement des cellules inflammatoires circulantes telles que les monocytes et les lymphocytes dans le développement de la plaque d'athérome (Ley 2001). Aux stades avancés des lésions, VCAM-1 est exprimée aussi bien par les néovaisseaux que par les cellules musculaires lisses et les macrophages de la média (O'Brien 1996). Dernièrement, Nahrendorf et al. ont réalisé l'imagerie moléculaire de l'expression de VCAM-1 dans le sinus aortique de la souris ApoE^{-/-} âgée de 45 semaines et nourrie avec une régime riche en cholestérol (Nahrendorf 2009). Les auteurs ont comparé différentes séquences. Après modifications pour radiomarquage à l'indium 111, ces séquences ont été incubées avec des cellules endothéliales murines surexprimant VCAM-1, puis injectées in vivo. La forme tétramérique TLP a montré les meilleurs résultats de captation in vitro et ex vivo avec un fort signal émanant des autoradiographies aortiques. Ce traceur a ensuite été radiomarké au [¹⁸F]. Les études de biodistribution ont montré une augmentation de 312% de la captation du [¹⁸F]-4V dans le sinus aortique chez la souris ApoE^{-/-} par rapport au sinus aortique de souris contrôles. Ces résultats ont été confirmés en imagerie TEP/CT in vivo. La quantification des images TEP in vivo a montré une diminution significative du signal dans le groupe de souris qui a reçu un traitement aux statines par rapport au groupe non traité. Ces résultats montrent le potentiel du [¹⁸F]-4V dans l'imagerie moléculaire de l'expression de VCAM-1 dans la lésion athérosclérotique chez le petit animal.

3.2.3.2.6 Imagerie des metalloprotéinases (MMPs)

Les MMPs sont impliqués dans le remodelage tissulaire. Lors de l'athérogénèse, les MMPs sont sécrétées par différents types cellulaires (Galis 2004, Newby 2006). Les macrophages représentent la principale source de MMPs durant le développement de la plaque vulnérable. Les inhibiteurs de MMPs (MMPIs) sont des molécules qui se lient spécifiquement aux MMPs avec une très grande affinité. Plusieurs dérivés hydroxymates possédant des propriétés inhibitrices des MMPs à des concentrations de l'ordre du nanomolaire ont été synthétisés (HO-CGS 27023A 1a-1i) et radiomarkés à l'iode 123 (¹²³I-HO-CGS 27023A 1a-1i) afin d'évaluer leur potentiel dans l'imagerie moléculaire des plaques d'athérome vulnérables

(Kopka 2004). ^{123}I -HO-CGS 27023A a été injecté dans un modèle expérimental murin de remodelage vasculaire induit par ligature de la carotide gauche et caractérisé par une infiltration macrophagique et une surexpression des MMPs. L'accumulation in vivo de ^{123}I -HO-CGS 27023A dans la lésion athérosclérotique a été inhibée avec une préinjection de traceur non radiomarqué. La captation spécifique de ^{123}I -HO-CGS 27023A a pu être détectée en imagerie planaire non invasive (Schäfers 2004). CGS 27023 et ses dérivés hydroxymates ont récemment été radiomarqués au ^{18}F pour l'imagerie TEP (Breyholtz 2007, Wagner 2007). Les études préliminaires de biodistribution ont indiqué qu'il n'y avait aucune accumulation spécifique de ^{18}F -CGS 27023A 1f et ^{18}F -CGS 27023A 1e chez la souris contrôle. La préparation de dérivés non hydroxamate des MMPIs a également été décrite récemment (Breyholtz 2005). Récemment, Fujimoto et al. ont évalué un inhibiteur des MMPs (MPI) marqué au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MPI) chez des lapins dont l'aorte a été déendothélialisée avec un ballonnet et soumis à un régime hypercholestérolémiant ou non et à un traitement aux statines ou non (Fujimoto 2008). Les auteurs ont montré que la captation en $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MPI était corrélée à la présence des macrophages et des MMP-2 et -9 dans les plaques et ont réalisé l'imagerie in vivo des lésions athérosclérotiques aortiques 4 heures après injection. Comme le montrent les autoradiographies, les aortes de lapins soumises à un traitement aux statines ou à une interruption du régime hypercholestérolémiant présentent une captation en $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MPI inférieure à celle des lapins ayant eu un régime ininterrompu. Dernièrement, Oshima et al. ont utilisé le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MPI dans un modèle d'athérosclérose spontanée chez les souris Apo E^{-/-} et LDLR^{-/-} nourries ou pas avec un régime hypercholestérolémiant (Oshima 2009). Les auteurs ont réalisé l'imagerie moléculaire in vivo des lésions athérosclérotiques avec un signal meilleur chez le groupe Apo E^{-/-} avec régime hypercholestérolémiant. Haider et al. ont également coinjecté le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MPI avec ^{111}In -AnnexinV, traceur de l'apoptose, dans un modèle de lapin déendothélialisé (Haider 2009). Les auteurs ont observé les plus importantes captations en $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MPI et ^{111}In -AnnexinV dans les lésions athérosclérotiques du groupe de lapin nourris avec un régime hypercholestérolémiant. Les aortes des lapins hypercholestérolémiques ont pu être visualisées in vivo avec certitude par rapport aux autres groupes d'animaux.

3.2.3.3 Imagerie de l'apoptose

3.2.3.3.1 Annexine A5

Kolodgie et al. a été le premier à démontrer la faisabilité de l'imagerie non invasive du phénomène apoptotique avec ^{99m}Tc -Annexine A5 dans un modèle expérimental de lésion athérosclérotique induite par déendothélialisation de l'aorte infradiaphragmatique chez le lapin nourri avec un régime riche en cholestérol (Kolodgie 2003). La rapide clairance sanguine du traceur a permis de réaliser l'imagerie planaire in vivo 2 heures après l'injection. Une corrélation positive a été observée entre la captation du ^{99m}Tc -Annexine A5 et la présence de macrophages ou d'apoptose mais pas avec les cellules musculaires lisses. La faisabilité de l'imagerie planaire in vivo de l'apoptose avec le ^{99m}Tc -annexine A5 a été confirmée chez le lapin hypercholestérolémique (Ishino 2007). Johnson et al. ont obtenu des images SPECT in vivo de la captation d' ^{99m}Tc -Annexine A5 au niveau d'artères coronaires lésées de porc nourris avec un régime enrichi en cholestérol. Treize artères lésées sur 22 ont montré une captation focale de radiotracer en même temps que ces mêmes artères présentaient un index apoptotique significativement plus élevé que les 9 artères restantes (Johnson 2005). Récemment, le développement des équipements d'imagerie dédiés au petit animal a permis de réaliser des images tomographiques de lésions athérosclérotiques aortiques dans un modèle expérimental murin de développement de plaque d'athérome (Isobe 2006). Plusieurs études expérimentales ont indiqué que ^{99m}Tc -Annexine A5 permettait d'observer des variations du phénomène apoptotique présent dans des lésions athérosclérotiques. Hartung et al. ont montré que la modification du régime alimentaire et un traitement aux statines diminuaient la captation de ^{99m}Tc -Annexine A5 en imagerie ex vivo dans un modèle expérimental d'athérosclérose induite par déendothélialisation de l'aorte abdominale chez le lapin (Hartung 2005). L'effet de l'inhibition spécifique de caspases sur l'apoptose contrôlé avec ^{99m}Tc -Annexine A5 in vivo par imagerie SPECT a aussi été étudié dans un modèle expérimental similaire (Sarai 2007). ^{99m}Tc -Annexine et [^{18}F]-FDG ont récemment été comparés dans une étude autoradiographique pour la détection de l'athérosclérose aortique chez la souris Apo E^{-/-} nourrie avec un régime riche en cholestérol. Bien que la captation absolue du [^{18}F]-FDG dans les lésions athérosclérotique soit 5 à 6 fois supérieure, le rapport d'activité entre les lésions au stade précoce et les lésions avancées est significativement plus élevé avec ^{99m}Tc -Annexine A5 par rapport au [^{18}F]-FDG. ^{99m}Tc -Annexine A5 semble avoir un meilleur potentiel que le [^{18}F]-FDG comme indicateur du stade tardif de la plaque vulnérable plutôt que du stade précoce du développement des lésions (Zhao 2007). De plus, Zhao et al.

ont montré que la captation de ^{99m}Tc -annexine A5 et de $[^{18}\text{F}]$ -FDG par les lésions athérosclérotiques dépendait non seulement de la sévérité de la plaque mais aussi du taux de cholestérol plasmatique (Zhao 2008). Des études cliniques de phase I ont montré que la biodistribution et la dosimétrie de ^{99m}Tc -Annexine A5 étaient adaptées à l'imagerie de l'apoptose d'aortes abdominales et thoraciques humaines (Kemerink 2003). Dans une étude clinique pilote, Kietselaer et al. ont évalué la captation de ^{99m}Tc -Annexine A5 au niveau des carotides humaines. Les résultats ont montré que la captation du traceur est visible chez des patients ayant eu un accident vasculaire cérébral récent et que l'accumulation de ^{99m}Tc -Annexine A5 corrélait avec les particularités histopathologiques des plaques vulnérables présentes sur les échantillons d'artères carotidiennes prélevés (Kietselaer 2004).

Même si ^{99m}Tc -Annexine est le radiotraceur le plus largement étudié dans l'imagerie de l'apoptose, d'autres traceurs peptidiques et non peptidiques ont été décrits (Elmaleh 1998, Bauer 2005, Aloya 2006, Faust 2007, Luo 2008). Des études complémentaires doivent être réalisées afin d'éclaircir leur comportement biologique.

3.2.3.4 Autres cibles moléculaires pour l'imagerie de la plaque vulnérable

3.2.3.4.1 Les récepteurs de l'endothéline

L'implication de l'endothéline dans la pathogénèse de l'athérosclérose a orienté les études vers le développement de dérivés de l'endothéline comme agents potentiels dans l'imagerie de la plaque d'athérome grâce à sa fixation aux récepteurs de l'endothéline (Dinkelborg 1998, Tepe 2001). Cependant, une étude menée chez le lapin a démontré que le comportement biologique des traceurs spécifiques des récepteurs à l'endothéline ne permettait pas l'imagerie des plaques d'athérome (Meding 2002).

3.2.3.4.2 Angiogenèse

L'angiogenèse a récemment été reconnue comme un critère majeur de vulnérabilité dans le développement de la plaque (Moreno 2004). Une étude autoradiographique menée chez un modèle expérimental murin de lésion athérosclérotique induite par la ligature de la carotide gauche a montré que le traceur ^{111}In -RP748 spécifique de l'intégrine $\alpha v \beta 3$ se localisait préférentiellement au niveau de la lésion athérosclérotique (Sadeghi 2004).

L'extra domaine B (ED-B) est inséré sur la fibronectine pendant l'angiogenèse. Matter et al. ont utilisé un anticorps humain L19 dirigé contre ED-B afin de réaliser l'imagerie autoradiographique de la néoangiogenèse dans des plaques aortiques de souris

hypercholestérolémiques (Matter 2004). Une autre équipe a comparé le comportement de ^{125}I -L19 avec celui de ^{125}I -G11, un anticorps radiomarqué dirigé contre le domaine C de la tenascine-C surexprimée dans les plaques athérosclérotique et absentes des tissus normaux (von Lukowicz 2007). Les deux agents ont montré un potentiel certain pour l'imagerie de la plaque à temps long. Cependant, aucune étude d'imagerie *in vivo* n'est encore disponible.

3.2.3.4.3 *Oligonucleotides anti-sens*

Finalement, de récentes études ont suggéré que différentes voies de signalisation ainsi que différents facteurs de transcription sont activés à des stades précoces de l'athérogenèse, incluant des proto-oncogènes comme c-fos et c-myc (Thurberg 1998, De Nigris 2001). L'activation des proto-oncogènes au cours du développement de l'athérosclérose résulte en une augmentation de la quantité d'ARNm qui pourrait devenir une cible potentielle pour l'imagerie en utilisant des oligonucléotides anti-sens (ONAS). Des ONAS radiomarqués au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ et dirigés contre le proto-oncogène c-myc ont été injectés chez le lapin New Zealand nourri avec un régime enrichi en cholestérol. L'accumulation du radiotracer dans la paroi vasculaire a été corrélée avec les zones de développement athérosclérotique et a pu être détectée *in vivo* en imagerie planaire (Qin 2005).

3.2.3.5 Conclusion

Biologie	Cible/ Molécule	Traceurs	Modèle animal/humain	Imagerie in vivo	Notes
Phagocytose des LDLs Formation des cellules spumeuses	LDL	¹²⁵ I-LDL	Carotides humaines	+	Forte activité circulante
		^{99m} Tc-LDL	Carotides humaines	+	
	LDLox	^{99m} Tc-LDLox	Carotides humaines	+	Procédé de fabrication difficile (honéreux)
	LDLox	^{99m} Tc-MDA-2	Aorte lapin	+	Forte activité circulante
	LDLox	¹²⁵ I-IK17	Aorte souris LDLR-/-	-	
	LOX-1	^{99m} Tc-anti-LOX-1	Aorte lapin	+	Forte activité circulante
Activation des monocytes	CCR2	¹²⁵ I-MCP1	Aorte lapin	-	
		^{99m} Tc-MCP1	Aorte lapin	++	
Métabolisme macrophages	GLUT	¹⁸ F]-FDG	Carotides humaines	++	
			Coronaires humaines	+	Régime contraignant
	Membrane	¹⁸ F]-choline	Aorte souris ApoE-/-	-	
Adhésion des monocytes	VCAM-1	¹¹¹ In-TLP	Aorte souris ApoE-/-	-	Etude ex vivo
		¹⁸ F]-4V	Aorte souris ApoE-/-	++	
Inhibition des MMPs	MMPs	¹²³ I-HOCS 27023A	Carotides souris ApoE-/-	+	
		^{99m} Tc-MPI	Aorte lapin	+	
			Aorte souris	+	
Apoptose	PS	^{99m} Tc-Annexine A5	Aorte lapin	+	
			Carotides humaines	+	Lésions tardives

Tableau 3

Tableau récapitulatif des différents traceurs développés pour la détection des plaques d'athérome vulnérable.

Ces dernières années, différentes cibles moléculaires caractéristiques de la plaque d'athérome vulnérable ont été évaluées en imagerie nucléaire (Tableau 3). Les traceurs de l'inflammation semblent être particulièrement prometteurs. ^{99m}Tc-MCP-1 pour l'imagerie SPECT, le [¹⁸F]-4V et [¹⁸F]-FDG pour l'imagerie TEP ont tous trois montré un comportement expérimental intéressant dans l'imagerie de l'inflammation de la plaque d'athérome. Parmi tous les traceurs évalués expérimentalement, seuls le [¹⁸F]-FDG et le ^{99m}Tc-annexine A5 ont dépassé les études précliniques et ont permis de réaliser l'imagerie des plaques d'athérome carotidiennes. Cependant, ces traceurs n'ont pas permis de réaliser l'imagerie des lésions athérosclérotiques coronaires. La petite taille des plaques d'athérome, l'activité circulante de la fraction non liée des radiotraceurs et les mouvements du cœur sont encore des difficultés à surmonter afin de détecter les plaques d'athérome vulnérables coronaires.

3.2.4 Conclusion

Modalités	Résolution	Sensibilité	Capsule Fibreuse	Corps Lipidique	Inflammation	Calcium
CT	25-200 μ m	-	-	-	+	+
IRM	25-100 μ m	10 ⁻⁵ M	-	+	+	-
Médecine Nucléaire	0,5-1,5mm	10 ⁻¹² M	-	-	+	-

Tableau 4

Récapitulatif des différentes techniques d'imagerie non invasives et de leurs possibilités dans la détection des plaques d'athérome vulnérables.

Les différentes modalités d'imagerie non-invasives que sont le CT et l'IRM possèdent une grande résolution leur permettant de discriminer différentes structures de la plaque d'athérome (Tableau 4). Cependant, cela n'est pas suffisant pour déterminer la vulnérabilité d'une plaque d'athérome. L'inflammation est un critère important de vulnérabilité (cf. chapitre 2.10) qui nécessite une approche moléculaire des modalités d'imagerie. Les dernières avancées technologiques en matière de détecteurs et d'agents de contraste ciblés ont alors permis à ces techniques d'entrer dans le domaine de l'imagerie moléculaire, initialement réservé exclusivement à la médecine nucléaire, en utilisant des composés ciblant un marqueur de la plaque d'athérome. Néanmoins, la concentration in vivo de ces marqueurs spécifiques de la plaque vulnérable est difficilement quantifiable. Il est donc nécessaire d'utiliser une technique d'imagerie la plus sensible possible afin d'espérer détecter de faible concentration de molécules cibles. Or, des modalités d'imagerie décrites précédemment, la médecine nucléaire possède la plus grande sensibilité nécessaire à la détection des plaques vulnérables. Par conséquent, l'apport de la médecine nucléaire dans la détection des plaques d'athérome vulnérables coronaires est tout à fait justifié.

3.3 Conclusion

Différentes techniques d'imagerie invasives et non invasives sont en cours de développement pour la détection des plaques vulnérables. Elles présentent chacune, indépendamment des autres techniques, des atouts non négligeables. D'un point de vue général, les techniques d'imagerie invasive et non-invasive permettent d'obtenir des informations morphologiques et fonctionnelles sur les plaques d'athérome. L'OCT possède une résolution spatiale suffisante pour apprécier une fine capsule fibreuse (<65 μ m), critère morphologique de vulnérabilité et l'IVUS avec des microbulles ciblées ou bien encore la thermographie permettent d'obtenir des informations d'ordre moléculaire. En couplant deux modalités d'imagerie invasive,

l'évaluation des plaques d'athérome vulnérables pourrait être réalisée en utilisant des critères morphologiques et métaboliques ou fonctionnels. Cependant, d'après la stratégie de dépistage des individus à risque cardiovasculaire élevé proposée par la société savante SHAPE (Society for Heart Attack Prevention and Eradication), il est inenvisageable d'utiliser ces techniques invasives sur les millions de personnes jugées à risques à l'issue des évaluations telles le score de Framingham aux Etats-Unis ou le projet SCORE utilisé en Europe et qui portent tous deux sur l'hygiène de vie des individus. En effet, s'il est reconnu que ces scores permettent d'identifier efficacement les individus à très faible ou à très haut risque cardiovasculaire, il reste que la grande majorité de la population se situe à un niveau de risque intermédiaire, pour lequel la plus grande part des accidents cardiaques survient statistiquement. Or, le pouvoir prédictif des scores américains et européens est médiocre pour ce niveau de risque intermédiaire. Au niveau individuel, cette indétermination a pour conséquences de ne pas permettre l'identification et le traitement de personnes à haut risque, ou la prise en charge médicale d'individus dont le risque cardiovasculaire réel ne le justifie pas. La société américaine pour la prévention et l'éradication des accidents cardiaques, regroupant des scientifiques et cliniciens de renom, a récemment proposé une nouvelle stratégie de détermination du risque coronaire individuel qui utilise les outils médicaux disponibles en routine clinique à ce jour (Naghavi 2006). A l'échelle américaine, il s'agirait d'évaluer tous les hommes âgés de 45 à 75 ans et toutes les femmes de 55 à 75 ans, soit 50 millions d'individus. La classification des individus en populations à risque faible, modéré, modérément élevé, élevé, ou très élevé est envisagée sur la base de deux examens existants, l'évaluation du score calcique par tomographie assistée par ordinateur aux rayons X et la détermination échographique du rapport de l'épaisseur intima-media carotidien. En l'état, et sur un plan financier, cette nouvelle stratégie de détection permettrait d'ores et déjà une économie de l'ordre de 21,5 milliards US\$ sur le coût des maladies cardiovasculaires aux Etats-Unis.

Consciente des limitations de ces techniques, SHAPE insiste sur le développement de nouvelles méthodes d'imagerie moléculaire de la plaque d'athérome vulnérable et sur l'intégration future de ces outils diagnostiques à la stratégie de détermination du risque coronaire individuel, avec l'objectif d'améliorer la qualité de la prise en charge et du suivi médical des patients à risque. Le marché potentiel pour une méthode permettant la détection non invasive de la plaque d'athérome vulnérable représenterait alors 40 millions d'individus pour les Etats-Unis uniquement. Pour l'heure, différentes modalités d'imagerie non invasive proposent des solutions permettant la détection des plaques d'athérome vulnérables. Malgré tous les efforts mis en jeu, ces techniques ne possèdent pas la résolution spatiale nécessaire à

l'évaluation des plaques vulnérables sur critère morphologique uniquement. Par conséquent, les modalités d'imagerie moléculaire permettant de caractériser les plaques vulnérables sont en plein développement. Ainsi la médecine nucléaire, avec sa grande sensibilité, est une modalité d'imagerie tout a fait adaptée. La mise au point d'un radiotracer possédant un rapport optimal signal sur bruit in vivo constitue un enjeu majeur qui suscite de nombreuses études à l'heure actuelle.

4 Conclusion générale

L'athérosclérose est une pathologie inflammatoire de la paroi artérielle. L'hypercholestérolémie est le seul facteur de risque nécessaire à la formation des plaques d'athérome. Ainsi, la pénétration des LDLs dans l'espace sub-endothélial au niveau de sites privilégiés de l'arbre vasculaire que sont les bifurcations et les courbures prononcées, marque le point de départ de la formation des plaques d'athérome. La forte inflammation et les modifications structurelles de la paroi vasculaire mènent à la progression de la lésion athérosclérotique vers un phénotype vulnérable. La plaque d'athérome vulnérable est caractérisée par une fine capsule fibreuse (<65µm) recouvrant un large corps lipidique et nécrotique. La rupture de ces plaques vulnérables mène à la formation d'un thrombus qui est à l'origine de l'infarctus du myocarde. Son développement excentrique, n'obstruant pas la lumière du vaisseau, rend sa détection difficile en coronarographie, méthode de référence actuellement employée en clinique. La mise au point d'une technique d'imagerie permettant la détection des plaques d'athérome vulnérable utilisable en routine clinique est par conséquent nécessaire. Comme il a été décrit dans le chapitre précédent, plusieurs modalités d'imagerie, dont la médecine nucléaire, étudient des cibles, marqueurs de l'inflammation, de l'apoptose et d'autres phénomènes participant à la formation de la plaque d'athérome vulnérable. Cependant, aucune modalité d'imagerie n'est actuellement utilisée en routine clinique pour le diagnostic de la plaque d'athérome coronaire vulnérable.

Depuis maintenant dix ans, le laboratoire travaille sur la molécule d'adhésion VCAM-1 comme cible pertinente pour la détection non invasive de la plaque d'athérome vulnérable. Différents traceurs élaborés à partir de la séquence B2702, molécule du CMH I connu pour se lier à VCAM-1, ont été évalués dans un modèle d'athérosclérose spontanée chez le lapin WHHL hypercholestérolémique. Les autoradiographies d'aorte ont montré que la captation du traceur corrélait avec les zones d'accumulation lipidique. Les meilleurs rapports d'activité entre les lésions athérosclérotiques et l'aorte saine ont été obtenus avec le ¹²⁵I-B2702 et le ^{99m}Tc-B2702. Cependant, ces résultats n'ont pas pu être confirmés in vivo en imagerie planaire

à cause d'une activité circulante trop élevée (Broisat 2007). Par conséquent, une stratégie basée autour de la séquence B2702 et visant à obtenir un traceur avec de meilleures caractéristiques, a été mise en place. La présente étude a pour but d'évaluer de nouveaux radiotraceurs potentiels de la plaque vulnérable. Les ligands évalués sont des motifs peptidiques dérivés du B2702 ainsi que des séquences oligopeptidiques obtenues par phage display *in vitro* et *in vivo* ayant montrés une forte affinité pour VCAM-1.

Partie expérimentale

5 Introduction

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause mondiale de mortalité (OMS 2008). La majorité de ces décès est causée par la maladie coronaire le plus souvent due à la rupture de plaques d'athérome vulnérables. Elles sont caractérisées par une fine capsule fibreuse ($< 65 \mu\text{m}$) enveloppant un large corps lipidique et nécrotique ainsi que par un phénomène inflammatoire intense. Le processus inflammatoire qui mène au développement de la plaque athérosclérotique vulnérable est ainsi caractérisé par un fort recrutement monocytaire et lymphocytaire dans la paroi artérielle. Les connaissances sur la physiopathologie de l'athérosclérose ont beaucoup évolué ces dernières années. Des traitements efficaces existent. Cependant, à l'heure actuelle, aucune technique d'imagerie capable de détecter ces plaques d'athérome vulnérables de manière non invasive n'est applicable en routine clinique. La médecine nucléaire, grâce à sa grande sensibilité et aux informations d'ordre moléculaire qu'elle apporte, peut amener des solutions.

Différentes molécules d'adhésion sont impliquées dans les processus de « rolling » des leucocytes en surface de l'endothélium, dans l'adhésion de ces leucocytes et dans leur migration à travers l'endothélium. Les sélectines E et P sont impliquées dans le « rolling », la molécule d'adhésion des cellules vasculaires 1 (VCAM-1) et la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1) dans l'adhésion et la diapédèse (Chia 1998, Huo 2001). Des études fondamentales ont permis de mettre en évidence le rôle majeur de VCAM-1 lors de l'initiation et du développement des plaques d'athérome vulnérables. Ainsi, la présence de VCAM-1 tronquée chez des souris transgéniques hyperlipidémiques inhibe la formation de la plaque d'athérome (Ley 2001, Cybulsky 2001). VCAM-1 est une immunoglobuline de 110 kDa de la superfamille des immunoglobulines, exprimée en surface de l'endothélium vasculaire activé. Elle se lie au « Very Late Activation antigen-4 » (VLA-4) exprimé à la surface des leucocytes mononucléés (Osborn 1989). VCAM-1 n'est pas présente sur l'endothélium en condition normale. En revanche, VCAM-1 est exprimée au niveau de l'endothélium activé par des facteurs pro-inflammatoires ainsi qu'au niveau des sites de dysfonction endothéliale induite par des forces de cisaillement faibles et oscillantes (Cybulsky 1991; Malek 1999). De plus, VCAM-1 reste exprimée durant toute la phase inflammatoire, y compris aux stades tardifs de formation de la plaque d'athérome vulnérable, et cette

expression reste localisée au niveau des plaques (Iiyama 1999). L'inflammation est donc caractérisée par le recrutement de monocytes et lymphocytes T au sein des plaques d'athérome et VCAM-1 joue un rôle majeur dans ce phénomène. Cette infiltration leucocytaire fait partie des critères majeurs de définition de la plaque d'athérome vulnérable (Naghavi 2003). Par conséquent, la molécule d'adhésion VCAM-1 est une cible pertinente pour l'imagerie non invasive de la plaque d'athérome vulnérable.

B2702 est un résidu peptidique 74-85 de la molécule du CMH I (Ling 2000). Ling et al. ont montré que le motif dimérique B2702(R) (séquence : 84-75/75-84), formé par la répétition et l'inversion de B2702 (séquence : 75-84), est le meilleur inhibiteur de la liaison VCAM-1/VLA-4. Sur un modèle *in vivo* d'inflammation pulmonaire induite chez la souris par de l'ovalbumine, ce motif peptidique bloque le recrutement des leucocytes (Ling 2000). Les études précédemment réalisées au laboratoire ont porté sur l'évaluation de variante de B2702 radiomarké dans un modèle d'athérosclérose spontanée chez le lapin WHHL hypercholestérolémique. Les résultats ont montré que la variante de B2702 non répétée (B2702p) marqué au ^{99m}Tc a permis de réaliser l'imagerie autoradiographique des lésions athérosclérotiques aortiques chez le lapin hypercholestérolémique WHHL (Broisat 2007). Les résultats ont montrés une captation en ^{99m}Tc -B2702p dans les lésions athérosclérotiques des lapins WHHL 2 fois supérieure à celle obtenue dans les zones saines des lapins contrôles. Cependant, l'imagerie *in vivo* n'a pu être réalisée à cause d'une activité circulante trop élevée. Par conséquent, différentes séquences dérivées de B2702p ainsi que des radiotraceurs spécifiques de VCAM-1 provenant de la littérature ont été évalués dans un modèle expérimental d'athérosclérose. Les résultats obtenus avec ces traceurs sont comparés avec B2702p dans le même modèle.

6 Traceurs utilisés

6.1 B2702p et dérivés

Les différentes séquences de B2702p et de ses dérivés B2702p1-20 sont présentées dans le Tableau 5. Les séquences [HG] ajoutées à la séquence de B2702p et de ses dérivés permettent le radiomarquage au technétium 99m (^{99m}Tc) sur l'histidine (H) avec un système de ligand tridentate [$^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3$]⁺. Tous les dérivés ont un poids moléculaire de 1450 g.mol⁻¹ et ont été synthétisés par Eurogentec.

Dénominations	Séquences
B2702p	H ₂ N-HGR ENL RIA LRY- COOH
B2702p1	H ₂ N-HGR <u>A</u> NL RIL <u>A</u> RY- COOH
B2702p2	H ₂ N-HGR ENL <u>A</u> IL <u>A</u> RY- COOH
B2702p3	H ₂ N-HGR ENL RIL <u>A</u> RA- COOH
B2702p4	H ₂ N-HGR ENL RIL <u>A</u> A Y- COOH
B2702p5	H ₂ N-HGR ENL R <u>A</u> L <u>A</u> RY- COOH
B2702p6	H ₂ N-HGR EN <u>A</u> RIL <u>A</u> RY- COOH
B2702p7	H ₂ N-HG <u>A</u> ENL RIL <u>A</u> RY- COOH
B2702p8	H ₂ N-HGR ENL RIA <u>A</u> RY- COOH
B2702p9	H ₂ N-HGR E <u>A</u> L RIL <u>A</u> RY- COOH
B2702p10	H ₂ N-HGR ENL RIL <u>A</u> RY- COOH
B2702p11	H ₂ N-HG <u>A</u> ENL RIA LRY- COOH
B2702p12	H ₂ N-HGR <u>A</u> NL RIA LRY- COOH
B2702p13	H ₂ N-HGR E <u>A</u> L RIA LRY- COOH
B2702p14	H ₂ N-HGR EN <u>A</u> RIA LRY- COOH
B2702p15	H ₂ N-HGR ENL <u>A</u> IA LRY- COOH
B2702p16	H ₂ N-HGR ENL R <u>A</u> A LRY- COOH
B2702p17	H ₂ N-HGR ENL RIA L <u>A</u> Y- COOH
B2702p18	H ₂ N-HGR ENL RIA LR <u>A</u> - COOH
B2702p19	H ₂ N-HGR <u>A</u> NL RIL <u>A</u> RA- COOH
B2702p20	H ₂ N-HGR <u>A</u> NL RIL <u>A</u> A Y- COOH
B2702p1 mis.	H ₂ N- HGL RAY IRA RNL -COOH

Tableau 5

Détail des séquences de B2702p et de ses dérivés.

6.2 VP, VP mismatch et VINP-28

Les séquences de VP, VP mis. et VINP-28 sont présentées dans le Tableau 6. VP est une séquence peptidique de 9 acides aminés obtenue par la technique de phage display in vitro par Kelly et al. (Kelly 2005). VP mis. possède les mêmes acides aminés que VP mais agencés dans un ordre aléatoire. VINP-28 est une séquence peptidique de 7 acides aminés obtenue par la technique de phage display in vivo par Nahrendorf et al. (Nahrendorf 2006). La séquence [GGSK(H)GK] a été ajoutée à VP, VP mis. et VINP-28 afin de permettre leur radiomarquage

7.1.2 VP et VP mismatch

1850 MBq de solution contenant le précurseur sont ajoutés à 52 nmoles de peptides (100 µg) de VP et VP mis. puis incubés 30 minutes à 80°C. La pureté radiochimique est déterminée par chromatographie liquide haute performance avec une colonne RP-C4 (Licrosorb, 5 µm, 4,6 x 250 mm) et un gradient (A, H₂O / acide trifluoroacétique (TFA) (0,1 %); B, 90% [acétonitrile / TFA 0,1%], 10% [H₂O / TFA 0,1%]).

7.1.3 VINP-28

1100 MBq de solution contenant le précurseur sont ajoutés à 56 nmoles de peptides (100 µg) de VINP-28 puis incubés 30 minutes à 80°C. La pureté radiochimique est déterminée par chromatographie liquide haute performance avec une colonne RP-C4 (Licrosorb, 5 µm, 4,6 x 250 mm) et un gradient (A, H₂O / acide trifluoroacétique (TFA) (0,1 %); B, 90% [acétonitrile / TFA 0,1%], 10% [H₂O / TFA 0,1%]).

7.2 Marquage à la fluorescéine

La séquence B2702p1 a été marquée à la fluorescéine afin d'être utilisée in vitro en polarisation de fluorescence. Le chromophore est greffé sur le peptide via une fonction isothiocyanate (-N=C=S) qui donne une thiourée après réaction avec la fonction amine N-terminale (Fluo-NH-SO-NH-B2702p1). La réaction se fait dans le diméthylformamide (DMF) avec de la diisopropylethylamine pour amener le pH à 8.0.

7.3 Coefficient de partage

Le coefficient de partage est déterminé en ajoutant 185 à 370 kBq de la molécule radiomarquée d'intérêt à une solution biphasique (1 mL) d'un tampon phosphate pH 7,4 (solution aqueuse) et d'une solution d'octanol pH 7,4 (50/50). L'échantillon est vortexé 1 minute, centrifugé pendant 10 minutes, puis décanté. Un aliquot de 100 µl de chaque phase est recueillie et la radioactivité mesurée à l'activimètre.

7.4 Stabilité in vivo des traceurs

Trois heures après injection intraveineuse des radiotraceurs chez des souris Apo E ^{-/-}, des échantillons d'urine et de sang sont recueillis afin de déterminer la stabilité du radiotraceur in vivo. L'échantillon d'urine est directement analysé en chromatographie liquide haute performance en phase inverse (PI-CLHP). Le sang est d'abord centrifugé 15 minutes à 8000 g puis le plasma est filtré à travers une membrane 10 K omegaTM (Nanosep®, Pall life science,

New York, USA) avant analyse par PI-CLHP. Le solvant d'éluion de la CLHP est un gradient acétonitrile-TFA 0,1%(B)/H₂O-TFA 0,1%(A) (gradient : 0-5 mn : 5% B, 5-20mn : 5 à 80% B, 20-25 mn : 80% B).

7.5 Fixation aux protéines plasmatiques par électrophorèse

37 MBq de peptide radiomarqué sont ajoutés à 1 ml de sang humain total et incubés à 37 °C pendant 1 heure. 200 µl de sang sont ensuite prélevés et centrifugés à 2000 tr/min pendant 5 minutes. 40 µl de ce sérum, de la solution contenant du peptide radiomarqué seul et du sérum seul sont déposés sur un gel d'agarose, hydragel K20 (Sebia®). Les gels sont ensuite mis dans une cuve contenant du tampon Tris-Barbital à 270 V pendant 35 minutes. La répartition de la radioactivité le long du gel est mesurée à l'aide d'un appareil Berthold® et les différents pics de radioactivité sont associés au différents groupes de protéines du sérum colorées préalablement.

8 Polarisation de fluorescence

La polarisation de fluorescence a été utilisée afin de mesurer in vitro l'affinité existante entre B2702p1 et VCAM-1. Cette technique permet de déterminer le coefficient de dissociation (K_d) entre une molécule fluorescente et son ligand (Checovich 1995).

Principe - La polarisation de fluorescence est basée sur l'observation des mouvements moléculaires de molécules fluorescentes en solution (Kakehi 2001). Les molécules en solutions sont animées d'un mouvement de rotation. Dans le cas de petites molécules le mouvement est très rapide tandis que le mouvement est ralenti dans le cas de molécules de plus grosse taille. Lorsque les petites molécules marquées à l'aide d'un fluorochrome en solution sont excitées avec une lumière polarisée plane, la lumière émise en réponse est dépolarisée du fait du mouvement rapide de la molécule. Cependant, lorsque cette molécule fluorescente se lie à une autre molécule, le complexe possède alors une masse moléculaire plus grande et son mouvement est ralenti. Quand ce complexe est excité par une lumière polarisée, la lumière émise est moins dépolarisée. La différence entre ces deux états est dépendante du nombre de molécules liées.

Méthode – 100 µl d'une solution de B2702p1-fluo (10µM) dans un tampon HEPES/KCl (50mM) sont placés dans une cuve adaptée au polarimètre. Une solution de rh-VCAM-1 (6,757µM) ou de BSA (725 ou 1450µM) est ajoutée microlitre par microlitre dans la cuve. Trois minutes de brassage sont nécessaires avant chaque mesure afin d'obtenir une solution homogène. La cuve est placée dans le polarimètre (Perkin Elmer® LS50). La polarisation est

mesurée après chaque ajout comme la variation de l'anisotropie de la solution (A). Le coefficient de dissociation (Kd) est obtenu en ajustant la courbe $A=f([\text{rh-VCAM ou BSA}])$ avec l'équation $A=A_0+(A_{\text{max}}-A_0)*([\text{rh-VCAM ou BSA}]/Kd+[\text{rh-VCAM ou BSA}])$ avec A_0 l'anisotropie à $[\text{rh-VCAM}]_0$ et A_{max} l'anisotropie à $[\text{rh-VCAM}]_{\text{max}}$ (Sörme 2004) avec le logiciel SlideWrite Plus® 7.0 (Advanced Graphics Software, Inc.).

9 Protocole expérimental de l'évaluation des radiotraceurs

Le protocole expérimental permettant d'évaluer les radiotraceurs chez la souris Apo E^{-/-} dont la carotide gauche a été ligaturée est présenté sur la Figure 26. Les étapes réalisées avec les différents radiotraceurs sont détaillées dans le Tableau 7.

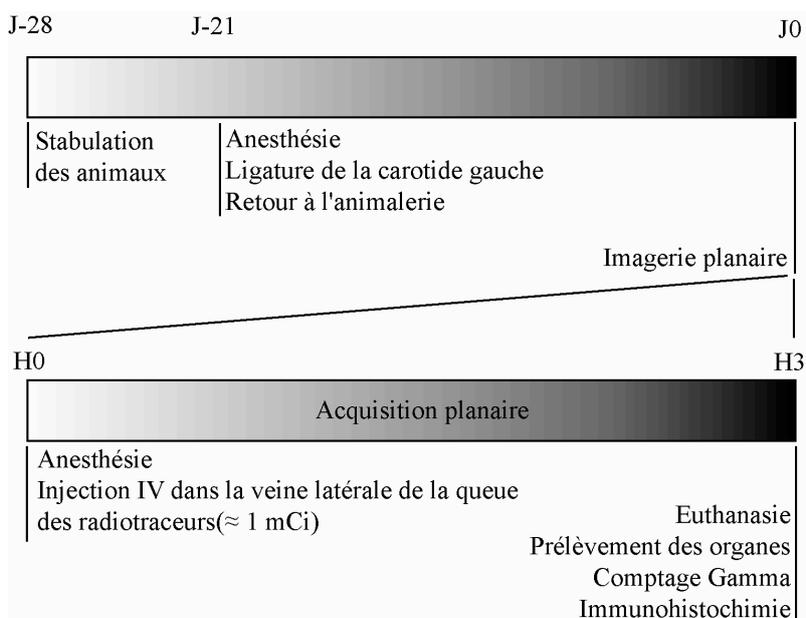


Figure 26

Protocole expérimental pour l'évaluation des radiotraceurs chez la souris Apo E^{-/-} dont la carotide gauche a été ligaturée afin d'induire le développement d'une lésion athérosclérotique localisée.

9.1 Induction de la lésion athérosclérotique par ligature de la carotide gauche

Après une semaine de stabulation, 125 souris hypercholestérolémiques Apo E^{-/-} (19,2±0,1g.) ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale d'un mélange de xylazine (1/3 ; 10 mg/kg) et de kétamine (2/3 ; 100 mg/kg). Après incision de la peau au niveau de la thyroïde, l'artère carotide gauche a été dégagée pour être ligaturée grâce à un fil de suture Sofsilk 5-0.

L'incision a ensuite été refermée et les animaux replacés à l'animalerie pendant 3 semaines. Les animaux dont la ligature n'a pas été serrée forment le groupe sham.

9.2 Imagerie in vivo

9.2.1 Imagerie planaire

Trois semaines après ligature de l'artère carotide gauche, les animaux sont anesthésiés comme décrit ci-dessus. Les radiotraceurs testés en imagerie planaire sont listés dans le tableau 7. Les radiotraceurs ont été injectés dans la veine latérale de la queue de l'animal. Une acquisition scintigraphique corps entier d'une durée de 3 heures est réalisée à l'aide d'une gamma-caméra dédiée au petit animal (Gamma-imagers, Biospace mesures, France) en collimation de type parallèle. L'animal est maintenu endormi avec une anesthésie gazeuse à l'isoflurane 1%. A la fin de l'acquisition, la souris est euthanasiée par injection IP d'une surdose de Sodium Pentobarbital.

9.2.2 Imagerie tomographique

$36,8 \pm 2,1$ MBq de $^{99m}\text{Tc-B2702p}$ et $36,3 \pm 2,5$ MBq de $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$ ont été injectés dans 4 et 6 souris Apo E^{-/-} supplémentaires, respectivement. Une acquisition tomographique haute résolution, centrée sur la zone de développement de la lésion athérosclérotique carotidienne, a été réalisée pendant 60 minutes à partir de 2h30 post injection avec la gamma camera dédiée au petit animal en utilisant une collimation de type pinhole. Les animaux ont été maintenus endormis par anesthésie au gaz isoflurane (1%). Les souris ont ensuite été euthanasiées par injection d'une surdose de Pentobarbital Sodique.

10 Analyses postmortem

10.1 Dosages plasmatiques

Après euthanasie, environ 500 µl de sang sont prélevés et centrifugés 2 minutes à 4000 RPM. Le plasma ainsi obtenu est congelé pour la détermination ultérieure des concentrations plasmatiques en triglycérides (TG) et en cholestérol total. Ces dosages reposent sur une méthode enzymatique d'hydrolyse du cholestérol par la cholestérol-estérase et l'hydrolyse des TG par une lipoprotéine lipase (automate Roche/Hitachi, CHU Grenoble).

10.2 Biodistribution par prélèvements d'organes

Les deux artères carotides ainsi que le cœur, l'aorte, le poumon, le foie, la rate, le rein, le sang, la thyroïde, la graisse, et le muscle squelettique sont délicatement prélevés, rapidement rincés et pesés. L'activité en radiotracteur dans chaque organe est mesurée grâce à un compteur gamma (Cobra II, Packard Instruments) en utilisant une fenêtre énergétique de 15-75 KeV pour l' ^{125}I et de 100-168 KeV pour le $^{99\text{m}}\text{Tc}$. La biodistribution des traceurs est exprimée en pourcentage de la dose injectée par gramme d'organe frais (%DI/g).

Nom	Effectif (n)	DI (MBq)	Biodistribution	Imagerie planaire	Imagerie SPECT
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702p	18	28,3±2,6	x	x	x
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702p1	11	35,5±1,3	x	x	x
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702p2	3	45,8±2,0	x	x	
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702p3	3	41,9±1,1	x	x	
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702p4	5	40,6±1,8	x	x	
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702p5					
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702p6	3	35,6±0,5	x	x	
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702p7	3	37,8±1,7	x	x	
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702p8	3	42,2±2,4	x	x	
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702p9	3	38,5±2,2	x	x	
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702p10	3	28,6±7,5	x	x	
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702p11	3	31,3±1,7	x		
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702p12	3	36,6±1,6	x		
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702p13	3	30,0±1,4	x		
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702p14	3	21,3±3,3	x		
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702p15	3	34,1±4,5	x		
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702p16	3	34,4±1,1	x		
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702p17	3	32,0±2,8	x		
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702p18	3	25,0±4,2	x	x	
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702p19	3	30,8±5,1	x	x	
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702p20	3	27,1±1,5	x	x	
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702p1 mis.	3	31,4±3,8	x	x	
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -VP	6	35,4±2,7	x	x	
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -VP mis.	3	39,1±1,6	x	x	
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -VINP28	5	34,5±3,7	x	x	

Tableau 7

Récapitulatif des différentes étapes réalisées avec les traceurs. DI : dose injectée.

10.3 Immunohistochimie

10.3.1 Immunomarquage de VCAM-1, des macrophages et des néovaisseaux

Lors de la biodistribution, les carotides prélevées sont rapidement rincées dans du sérum physiologique afin d'éliminer le sang résiduel puis placées dans des cassettes, elles-mêmes plongées dans un mélange fixatif d'alcool-formol-acide acétique (AFA). Les échantillons sont ensuite inclus en bloc de paraffine. Des coupes de 6 µm d'épaisseur sont réalisées avec un microtome.

Afin de réaliser l'immunohistochimie de VCAM-1 (sc-1504, SantaCruz Biotechnologies), des macrophages (Mac-2, #GL8942AP, Cedarlane labs) et des néovaisseaux (CD31, sc-1506, SantaCruz Biotechnologies) et du FT (sc-23596, SantaCruz Biotechnologies), les coupes sont dans un premier temps déparaffinées par 2 bains successifs de xylène (2x10 min.) puis dans un deuxième temps réhydratées par des bains successifs d'éthanol dont le pourcentage diminue progressivement (2x3min. à 100%, 2x1min. à 95% et 2x1 min. à 80%) pour finir par un bain d'H₂O distillée (1 min.). Ensuite, le blocage des peroxydases endogènes par un bain de H₂O/H₂O₂ 30% (90/10, vol/vol) est effectué. Les lames sont rincées dans un bain de H₂O distillée (1x5min.). Une étape de démasquage est ensuite nécessaire afin de rompre les liaisons formées lors de la fixation des tissus en paraffine et ainsi rendre accessible l'antigène cible. Les échantillons sont incubés dans une solution de démasquage (VectorLab[®]) puis chauffés aux micro-ondes pendant 15 minutes à 600W en prenant soin de faire le niveau régulièrement. Cette étape n'est pas nécessaire avec le protocole d'immunomarquage des macrophages. Un bain de 5 minutes est ensuite réalisé dans un tampon phosphate (PBS) afin d'éviter ultérieurement des variations de pH.

Afin de bloquer les sites de fixation non spécifiques, les tissus sont incubés 60 minutes dans une solution contenant de l'avidine (kit de blocage Avidin/Biotin VectorLab[®]) et du sérum provenant de la même origine que l'anticorps secondaire, lequel provient de l'âne pour les protocoles VCAM-1 et CD31, et du lapin pour le protocole Mac-2 (10%, vol/vol dans PBS-FSG 0,5%).

Les lames sont incubées pendant une nuit à 4°C avec une solution contenant l'anticorps primaire (anti-VCAM-1 [1µg/ml], anti-CD31 [0,07 µg/ml]), du sérum d'âne (10%) et du kit de blocage biotine. L'immunomarquage des macrophages est effectuée en utilisant une solution contenant l'anti-Mac-2, du sérum de lapin et du kit de blocage biotine. Les lames sont ensuite rincées dans du PBS-FSG 0,5% (3x4 min) sur agitateur avec un mouvement lent pour VCAM-1 et plus rapide pour les autres protocoles. Les échantillons sont ensuite incubés

pendant une heure à température ambiante avec de l'anticorps secondaire biotinylé (Donkey anti-goat [15µg/ml] ou Rabbit anti-rat []) et du sérum d'âne ou de lapin (10% dans du PBS-FSG 0,5%). Les lames sont ensuite rincées dans du PBS-FSG 0,5% (3x4 min). Trente minutes après sa préparation, le kit ABC d'amplification des sites de réaction avidin/biotin (Vector Lab[®]) est appliqué sur les tissus pendant 30 min. Les échantillons sont ensuite rincés dans du PBS. La solution DAB (Vector Lab[®]), substrat de la réaction colorée, est appliquée sur les tissus pendant 5 min. Une coloration brune apparaît. La réaction est arrêtée en plongeant les lames dans l'eau (2x5 min). La contre-coloration est effectuée dans un bain d'hématoxyline (2 min) suivi d'un rinçage à l'eau courante (4min). Enfin, les échantillons sont déshydratés par une succession de bains d'éthanol 100% (3x5 min) et de xylène (2x5 min) et les lames sont montées à l'aide d'un liquide de montage en phase organique.

10.3.2 Immunomarquage des CMLs

Le protocole permettant d'observer la présence des CMLs est différent des protocoles détaillés précédemment. On notera l'absence d'anticorps secondaire et le montage final en phase aqueuse. Afin de bloquer les sites de fixation non spécifiques, les tissus sont incubés 60 minutes à température ambiante dans une solution contenant de l'avidine (kit de blocage Avidin/Biotin VectorLab[®]) et du sérum provenant de la souris (10%, vol/vol dans PBS-FSG 0,5%). Les lames sont incubées avec une solution contenant l'anti-actine clone 1A4 (Sigma, 1/100 dans PBS/FSGO 0,5%) du sérum de souris (10%), du kit de blocage biotine, pendant une heure à température ambiante. Les lames sont ensuite rincées dans du PBS (5 min.) sur agitateur. Puis la solution de chromogène Permanent Red est appliquée sur les échantillons pendant 30 minutes. La solution est aspirée et les échantillons lavés pendant 5 minutes dans de l'eau distillée. On procède enfin à la contre-coloration dans un bain d'hématoxyline de 2 minutes. Les lames sont montées en phase aqueuse.

10.4 Analyse des images et quantifications

L'analyse et la quantification des images planaires s'effectuent avec le logiciel Gamma-Vision+ (Biospace Lab). Les images planaires utilisées pour la quantification correspondent à la dernière heure d'acquisition (2-3h). Deux régions d'intérêt (ROI) sont dessinées, l'une au niveau de la carotide gauche et l'autre au niveau de la carotide droite. L'activité en traceurs dans ces ROIs est mesurée et exprimée en cpm/mm²/DI.

L'analyse des images tomographiques est réalisée avec le logiciel AMIRA[®]. Des coupes transversales ciblées sur les carotides de l'animal sont extraites du volume reconstitué

(128x128, 3 itérations). La quantification des coupes transversales s'effectue avec le logiciel Gamma-Vision+ comme décrit précédemment.

10.5 Analyses statistiques

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les comparaisons entre deux groupes requièrent l'utilisation d'un test t de Student pour valeurs non appariées. Les comparaisons de paramètres au sein d'un même groupe sont effectuées avec un test t de Student pour valeurs appariées. Les tests sont réalisés avec le logiciel Systat version 10.2[©] (Systat Software Inc.). Les valeurs de $p < 0,05$ sont considérées comme statistiquement significatives.

11 Résultats

11.1 Radiochimie

Les données radiochimiques sont présentées dans le Tableau 8.

Peptides	PRC (%)	Stabilité urine (%)	Stabilité plasma (%)	Temps de rétention sur C18 (min)	Temps de rétention sur C4 (min)	Coefficient de partage (log P)	Fixation aux protéines plasmatiques (%)
B2702p	90	93	95	25	23	-1,5	70
B2702p1	95	94		26	21	-1,2	57 \pm 4
B2702p2	95	96			23	-1,3	60 \pm 6
B2702p3	97	83			23	-1,7	67 \pm 3
B2702p4	95	92			22	-1,1	61 \pm 2
B2702p5	50				6, 19, 23, 27		
B2702p6	93	95		24	21	-1,6	53 \pm 2
B2702p7	95	50			23	-1,8	57 \pm 3
B2702p8	80	84			21	-1,2	59 \pm 5
B2702p9	95	97			24	-1,0	71 \pm 3
B2702p10	95	99			21	-0,9	62 \pm 4
B2702p11	97	82	57	23			
B2702p12	88	80	62	20			
B2702p13	96	79	40	20			
B2702p14	96	76		20			
B2702p15	96	85		19			
B2702p16	91	70		22			
B2702p17	90	80	47	19			
B2702p18	88	81		23			
B2702p19	88	79			28		19
B2702p20	92	78			28		16
VP	90	80	85		20	-1,8	27 \pm 2
VP mis.	92	90	80		20	-1,5	15 \pm 5
VINP-28	94	70			22	-2,4	17 \pm 2
B2702p1 mis.	90	89					

Tableau 8

Données radiochimiques des différents traceurs utilisés.

La pureté radiochimique (PRC) après radiomarquage du Tc-B2702p, ses 20 dérivés, ainsi que $^{99m}\text{Tc-VP}$ et $^{99m}\text{Tc-VINP28}$ est supérieure à 80%. Le radiomarquage $^{99m}\text{Tc-B2702p5}$ n'a pas pu être réalisé. Une proportion supérieure à 90 % du radiotracer injecté a été retrouvée dans les urines 3 heures après injection du $^{99m}\text{Tc-B2702p}$, $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$, 2, 4, 6, 9 et 10. Les dérivés $^{99m}\text{Tc-B2702p3}$, 8, 11-20 présentent une stabilité urinaire située entre 75 et 85% alors que les peptides $^{99m}\text{Tc-B2702p7}$, $^{99m}\text{Tc-VP}$ et $^{99m}\text{Tc-VINP28}$ affichent une stabilité <70%. Respectivement, 80, 90 et 70% de $^{99m}\text{Tc-VP}$, $^{99m}\text{Tc-VP}$ mis. et VINP28 ont été retrouvés dans les urines 3 heures après leur injection. La faible activité de la plupart des échantillons plasmatiques ne permet pas d'analyser la stabilité des traceurs dans le plasma. Cependant, le $^{99m}\text{Tc-B2702p}$ possède une stabilité plasmatique supérieure à 95 % tandis que le $^{99m}\text{Tc-B2702p11-13}$ et -17 ont une stabilité plasmatique inférieure à 62%. La stabilité plasmatique de VP est de 80%. Le coefficient de partage montre que $^{99m}\text{Tc-B2702p}$ et $^{99m}\text{Tc-B2702p1-10}$ sont des molécules hydrophiles (Tableau 8).

11.2 Polarisation de fluorescence

Les résultats de polarisation de fluorescence sont présentés sur la Figure 27. Avec la méthode mathématique décrite dans le chapitre 8.2, un K_d de $15\mu\text{M}$ est obtenu. Cette valeur est 40 fois supérieure à celle obtenue avec la BSA ($15\mu\text{M}$ vs. $595\mu\text{M}$, respectivement).

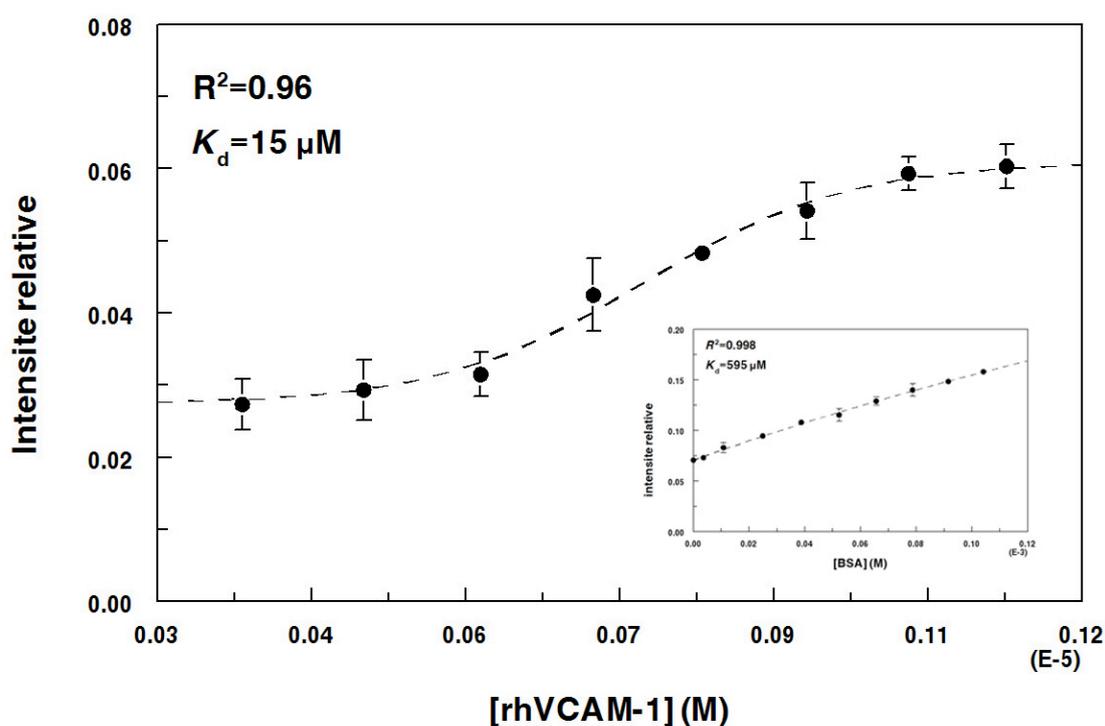


Figure 27

Affinité entre B2702p1 et VCAM-1 réalisée par polarisation de fluorescence.

11.3 Validation du modèle expérimental

11.3.1 Dosages plasmatiques

Les concentrations plasmatiques en triglycérides (TG) et en cholestérol total sont présentées dans le Tableau 9. La concentration plasmatique en cholestérol total est significativement plus élevée chez les souris Apo E^{-/-} par rapport aux souris C57Bl/6 (3,91±0,14 vs. 0,70±0,03 g/l, p<0,05, respectivement) tandis que les concentrations plasmatiques en TG sont identiques (0,65±0,04 vs. 0,64±0,24 g/l, p=NS, respectivement).

(g/l)	Triglycérides	Cholestérol total
Apo E ^{-/-}	0,65±0,04	3,91±0,14*
C57Bl/6	0,64±0,24	0,70±0,03

Tableau 9

Dosages plasmatiques des tryglycérides et du choléstérol total chez les souris Apo E^{-/-} et les C57Bl/6. *, p<0,05, Apo E^{-/-} vs. C57Bl/6.

11.3.2 Immunohistochimie

Les colorations trichrome HES et les immunomarquages de VCAM-1, des macrophages (Mac-2), des CMLs (α -actinine) et des néovaisseaux (CD31) des coupes d'artère carotide réalisées chez la souris Apo E^{-/-} sont présentées sur la Figure 28 et la Figure 29. Les informations histologiques obtenues par coloration trichrome des artères carotides droite (saine) et gauche (sham) montrent une paroi artérielle fine et régulière contenant des fibres élastiques tortueuses délimitant l'intima, la média et l'adventice. La coloration trichrome HES de la carotide gauche (ligaturée) montre un épaissement de la paroi artérielle et un remodelage vasculaire obstruant la lumière du vaisseau. La présence de VCAM-1 est observée dans la néointima au centre de l'artère et dans l'adventice en périphérie (flèches). L'expression de VCAM-1 est colocalisée avec celle de Mac-2 (macrophages) dans l'intima et dans l'adventice. La coloration rouge révélant l' α -actine (CMLs) se trouve essentiellement localisée dans la média de la carotide gauche. Les carotides droite et sham montrent un immunomarquage sur toute la paroi artérielle (Figure 28). Aucune coloration dans la carotide gauche n'a été observée avec l'immunomarquage de CD31 (Figure 29). La spécificité des immunomarquages a été vérifiée en omettant l'anticorps primaire. Aucune coloration n'est alors observée.

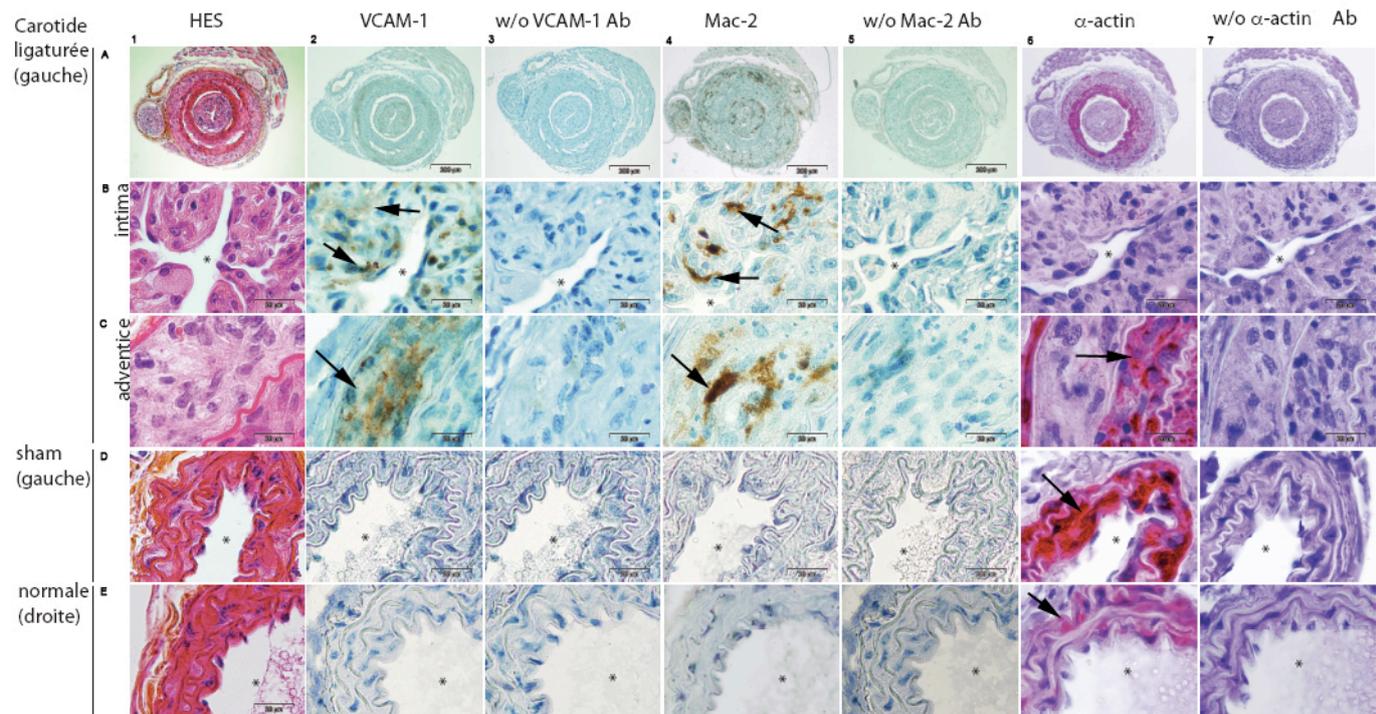


Figure 28

Immunohistochimie de VCAM-1, Mac-2 et α -actine. La ligne A montre des coupes adjacentes de l'artère carotide gauche ligaturée. Des grossissements de l'intima et de l'adventice de cette même artère sont présentés ligne B et C, respectivement. La paroi artérielle de la carotide gauche non ligaturée (sham) est représentée sur la ligne D. La dernière ligne montre la paroi artérielle droite (normale). La coloration histologique hématoxyline-éosine-safran (HES) est représentée dans la colonne 1. L'expression de VCAM-1 et de Mac-2 est observée dans l'intima (B;2 et B;4, respectivement) et dans l'adventice (C;2 et C;4, respectivement). L'immunomarquage de l' α -actine a été observée dans l'adventice (C;6) de la carotide ligaturée et dans la paroi artérielle de la carotide sham et normale (D;6 et E;6, respectivement). La spécificité de l'immunomarquage de VCAM-1, de Mac-2 et de l'alpha-actine a été montrée par l'absence de coloration des artères en absence d'anticorps primaire (colonnes 3, 5 et 7, respectivement). La lumière du vaisseau est indiquée par une astérisque (*).

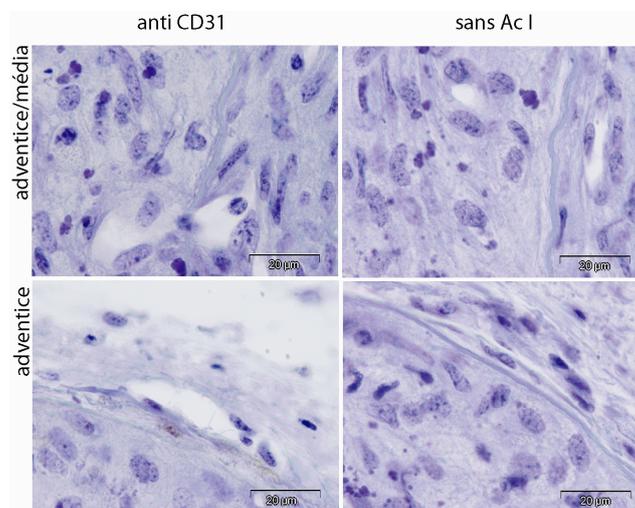


Figure 29

Immunomarquage de CD31 dans la carotide gauche ligaturée des souris Apo E^{-/-}. Aucune coloration n'a pu être mise en évidence dans l'adventice/média de la paroi artérielle.

11.4 Traceurs potentiels de VCAM-1

11.4.1 Biodistributions

Les biodistributions 3 heures après injection de B2702p, de ses dérivés B2702p1 à 20, de VP, VP mis. et VINP-28, sont présentées dans les Tableau 10 et Tableau 11. L'élimination des radiotraceurs s'effectue préférentiellement par voie rénale pour ^{99m}Tc -B2702p, ^{99m}Tc -B2702p1-4, 6, 8, 10-20, ^{99m}Tc -VP et ^{99m}Tc -VINP28. La voie hépatique et la voie rénale sont utilisées de manière équivalente pour ^{99m}Tc -B2702p7 et ^{99m}Tc -B2702p9. Une captation significativement supérieure dans la carotide gauche par rapport à la carotide droite est observée après injection des traceurs B2702p1 et B2702p18 ($1,28 \pm 0,43$ vs. $0,51 \pm 0,13$ %DI/g. et $1,96 \pm 0,18$ vs. $1,02 \pm 0,12$ % DI/g., $p < 0,05$, respectivement). L'activité dans la carotide gauche est significativement plus élevée chez les animaux ayant reçu une injection de B2702p par rapport au B2702p2-4, 6-10, 16, 17, 19 et 20. L'activité sanguine de B2702p est aussi significativement plus élevée que B2702p1-4, 6-10, 16, 17, 19, 20 et VP.

Organes	B2702p	B2702p sham	B2702p1	B2702p1 mismatch	B2702p2	B2702p3	B2702p4	B2702p6	B2702p7	B2702p8	B2702p9	B2702p10
Coeur	1.45±0.13	1.84±0.15	0.27±0.05	0.71±0.21	0.30±0.14	0.36±0.09	0.25±0.08	0.29±0.00	0.39±0.04	0.32±0.08	0.11±0.01	0.46±0.31
Aorte	2.65±0.35	3.03±0.32	0.51±0.11	1.67±0.69	0.94±0.59	0.73±0.20	0.62±0.26	0.58±0.03	0.67±0.07	0.68±0.14	0.26±0.02	0.27±0.02
Poumon	3.91±0.39	3.75±0.63	0.77±0.14	1.72±0.44	0.77±0.33	0.88±0.17	0.57±0.17	0.68±0.04	0.87±0.09	0.85±0.12	0.37±0.03	0.40±0.05
Foie	10.6±2.63	5.84±1.39	3.06±0.57	22.1±5.9	2.73±0.25	4.21±0.55	4.69±0.93	5.89±0.96	8.24±0.42	6.85±1.61	2.05±0.13	2.76±0.50
Rate	2.21±0.25	2.24±0.34	1.60±0.70	0.78±0.11	1.40±0.38	0.76±0.22	0.55±0.16	0.50±0.02	0.96±0.26	0.83±0.20	0.38±0.06	0.37±0.11
Rein	69.0±13.0	61.7±11.5	4.58±0.45	15.5±4.2	13.39±1.92	33.12±0.74	26.20±5.07	8.23±0.69	8.02±1.29	20.62±10.80	2.16±0.19	23.6±3.70
Graisse	1.03±0.21	0.95±0.03	0.16±0.03	0.50±0.18	0.28±0.20	0.31±0.08	0.23±0.07	0.17±0.02	0.19±0.03	0.19±0.05	0.12±0.01	0.13±0.01
Muscle	1.21±0.24	0.89±0.15	0.13±0.02	0.48±0.10	0.20±0.10	0.19±0.06	0.16±0.05	0.13±0.02	0.19±0.00	0.22±0.08	0.06±0.01	0.06±0.00
Sang	5.70±0.55	7.15±0.60	0.90±0.17†	2.40±0.79	0.87±0.30†	1.33±0.34†	0.90±0.36†	1.06±0.06†	1.29±0.14†	1.21±0.29†	0.37±0.03†	0.37±0.01†
Thyroïde	9.73±3.01	10.9±3.8	0.65±0.17	1.10±0.41	1.28±0.09	0.63±0.10	0.57±0.15	1.52±0.28	1.9±70.69	1.60±0.59	0.35±0.02	0.25±0.02
C. gauche	2.41±0.44	1.89±0.18	1.28±0.43*	1.21±0.59	0.48±0.18†	0.54±0.12†	0.68±0.41†	0.52±0.09†	0.36±0.20†	0.37±0.05†	0.14±0.03†	0.14±0.04†
C. droite	1.80±0.25	1.95±0.54	0.51±0.13†	1.17±0.59	0.31±0.11†	0.40±0.14†	0.22±0.12†	0.42±0.18†	0.44±0.24†	0.15±0.05†	0.11±0.03†	0.39±0.23†

Tableau 10

Biodistribution des radiotraceurs ^{99m}Tc-B2702p à ^{99m}Tc-B2702p10, 3 heures après injection chez la souris ApoE, exprimée en %DI/g. d'organe. *, p<0,05 vs. C.droite et †,p<0,05 vs.

Organes	B2702p11	B2702p12	B2702p13	B2702p14	B2702p15	B2702p16	B2702p17	B2702p18	B2702p19	B2702p20	VP	VP mis.	VINP28
Cœur	1.84±0.07	0.43±0.11	1.64±0.25	2.48±0.65	4.53±0.31	0.29±0.04	0.40±0.14	0.50±0.10	0.51±0.07	0.59±0.15	0.53±0.11	0.80±0.08	1.50±0.26
Aorte	2.65±0.08	2.83±0.94	2.29±0.29	3.24±0.56	5.16±0.14	0.56±0.08	0.59±0.18	2.52±0.35	0.93±0.30	1.41±0.40	1.09±0.49	1.93±0.28	4.24±0.83
Poumon	3.61±0.29	4.17±1.51	3.29±0.42	5.72±1.35	11.2±0.7	0.94±0.06	1.24±0.47	3.17±0.52	1.29±0.22	1.16±0.30	1.66±0.45	2.60±0.34	3.99±0.72
Foie	10.8±0.6	5.52±0.62	7.95±0.61	12.7±2.4	18.1±0.7	3.35±0.40	3.49±1.23	6.31±1.51	5.54±0.52	6.14±1.08	7.53±0.79	9.39±0.50	7.91±1.00
Rate	2.93±0.07	3.11±0.19	2.85±0.44	3.67±0.98	6.43±0.15	1.22±0.05	1.59±0.74	2.33±0.68	1.49±0.13	1.03±0.40	1.19±0.31	4.38±0.49	2.58±0.37
Rein	19.2±0.8	36.9±11.4	22.7±7.5	34.6±1.9	34.0±4.4	98.9±18.1	85.3±25.7	63.9±17.2	15.2±5.97	11.1±1.98	51.4±5.53	57.1±4.75	101±18.4
Graisse	1.52±0.32	0.80±0.09	0.77±0.26	0.80±0.06	1.60±0.71	0.37±0.14	0.26±0.09	1.22±0.45	0.19±0.04	0.23±0.07	0.44±0.07	0.59±0.11	1.02±0.23
Muscle	0.63±0.08	0.82±0.37	0.52±0.12	0.67±0.17	1.21±0.06	0.17±0.01	0.33±0.16	0.68±0.01	0.25±0.01	0.22±0.05	0.61±0.28	0.33±0.09	0.69±0.17
Sang	6.65±0.35	4.44±1.15	5.86±0.51	10.7±2.2	16.4±0.9	0.98±0.14†	1.33±0.44†	5.89±1.00	1.97±0.45†	2.18±0.60†	1.94±0.54†	3.15±0.39	4.82±0.89
Thyroïde	14.2±6.90	8.79±2.75	11.0±3.2	15.9±2.6	6.26±1.12	1.67±0.21	2.77±0.40	18.8±2.7	1.93±1.53	0.47±0.19	0.84±0.08	1.09±0.11	2.28±0.41
C. gauche	2.14±0.33	2.09±0.87	1.70±0.25	2.20±0.17	3.29±0.73	0.41±0.02†	0.39±0.12†	1.96±0.18*	0.68±0.12†	0.86±0.12†	1.31±0.27	1.39±0.41	4.79±1.29
C. droite	1.85±0.65	1.42±0.43	1.76±0.43	2.19±0.24	1.91±0.47	0.40±0.18†	0.23±0.08†	1.02±0.12†	1.07±0.46	1.19±0.76	1.11±0.33	1.13±0.04	3.93±1.03

Tableau 11

Biodistribution des radiotraceurs ^{99m}Tc-B2702p11 à ^{99m}Tc-B2702p20, ^{99m}Tc-VP, ^{99m}Tc- VP mis. et ^{99m}Tc-VINP28, 3 heures après injection chez la souris ApoE, exprimée en %DI/g. d'organe. *, p<0,05 vs. C.droite et †,p<0,05 vs. ^{99m}Tc-B2702p.

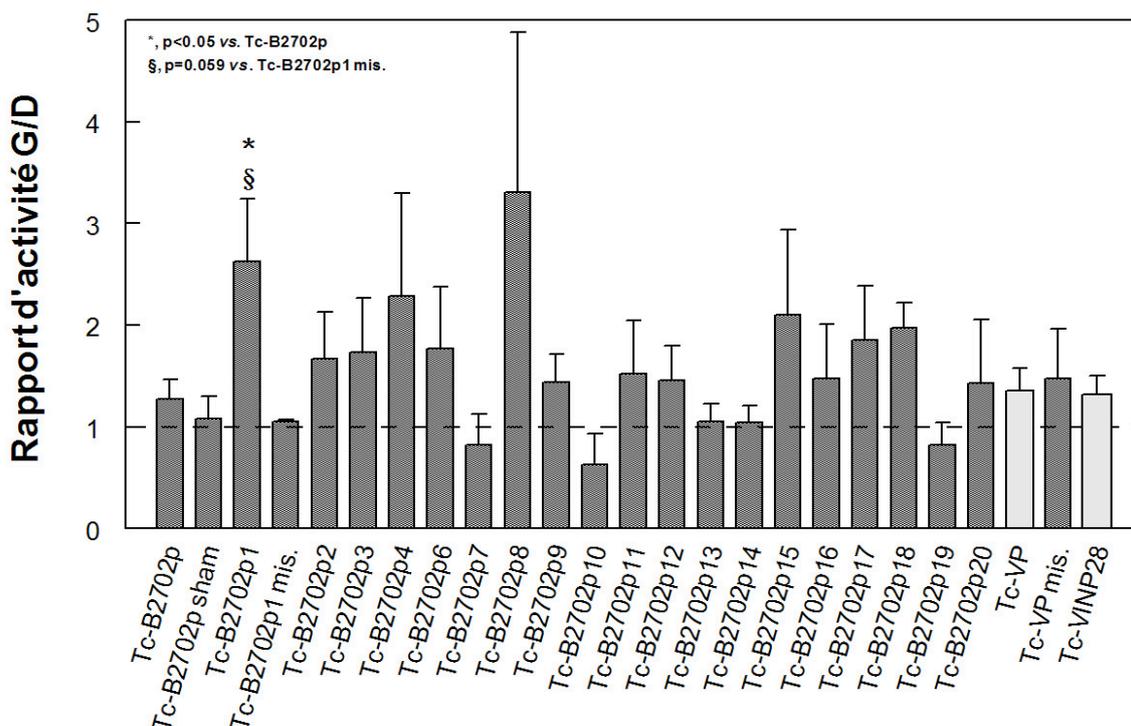


Figure 30

Rapport d'activité entre la carotide gauche et la carotide droite (G/D) obtenue par prélèvement des vaisseaux 3 heures après l'injection de $^{99m}\text{Tc-B2702p}$, $^{99m}\text{Tc-B2702p1-20}$, $^{99m}\text{Tc-VP}$, $^{99m}\text{Tc-VP mis.}$ et $^{99m}\text{Tc-VINP28}$.

La Figure 30 présente les rapports d'activité entre la carotide gauche et la carotide droite (G/D) obtenue par prélèvement des vaisseaux 3 heures après injection des radiotraceurs $^{99m}\text{Tc-B2702p}$, $^{99m}\text{Tc-B2702p1-20}$, $^{99m}\text{Tc-VP}$, $^{99m}\text{Tc-VP mis.}$ et $^{99m}\text{Tc-VINP28}$. Le rapport d'activité G/D du $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$ est 2 fois supérieur à celui de $^{99m}\text{Tc-B2702p}$ ($2,63 \pm 0,61$ vs. $1,27 \pm 0,20$, $p < 0,05$, respectivement) et 2,5 fois plus élevé que le rapport d'activité G/D du peptide contrôle $^{99m}\text{Tc-B2702p1 mismatch}$ ($2,63 \pm 0,61$ vs. $1,05 \pm 0,02$, $p = 0,059$, respectivement). Le rapport d'activité G/D obtenu après injection du $^{99m}\text{Tc-B2702p}$ chez les animaux ligaturés n'est pas différent par rapport au groupe d'animaux sham ($1,27 \pm 0,20$ vs. $1,08 \pm 0,22$, $p = \text{NS}$, respectivement). Les rapports d'activité G/D entre le $^{99m}\text{Tc-VP}$ et son contrôle $^{99m}\text{Tc-VP mis.}$ ne sont pas différents ($1,36 \pm 0,22$ vs. $1,48 \pm 0,48$, $p = \text{NS}$, respectivement).

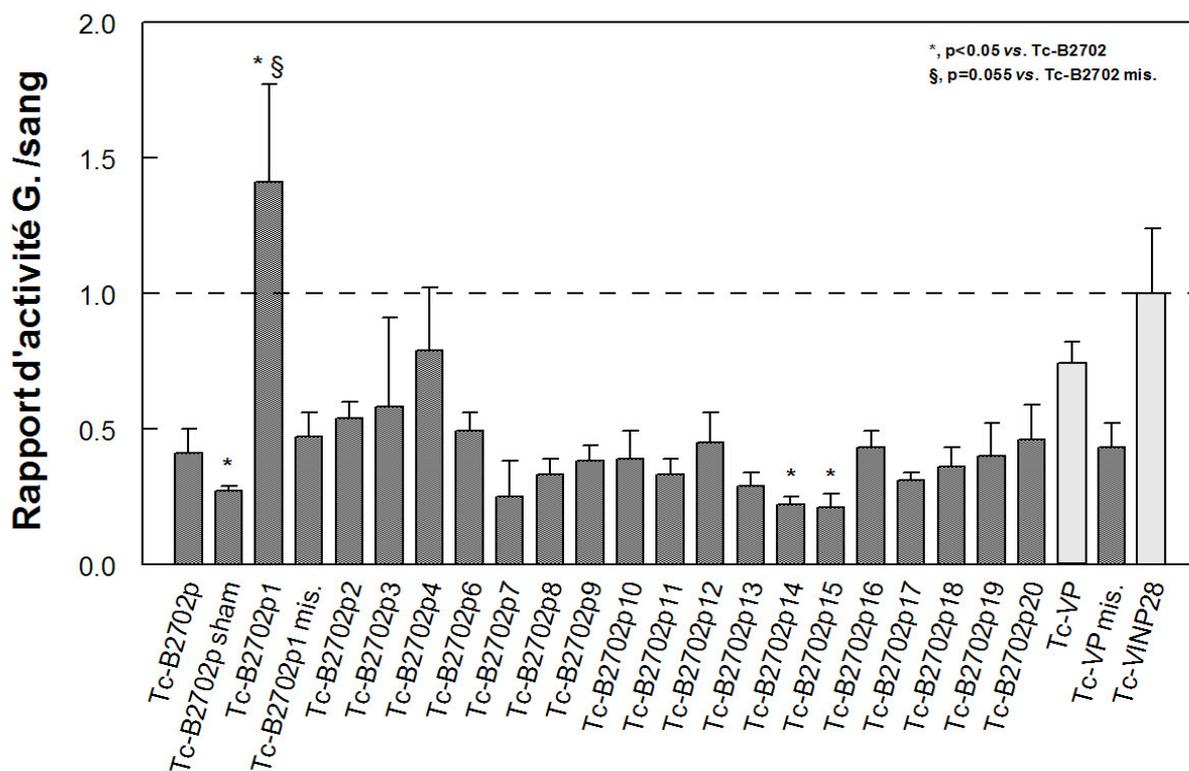


Figure 31

Rapports d'activité entre la carotide gauche et le sang (G/sang) obtenus par prélèvement d'organes 3 heures après l'injection de $^{99m}\text{Tc-B2702p}$, $^{99m}\text{Tc-B2702p1-20}$, $^{99m}\text{Tc-VP}$, $^{99m}\text{Tc-VP mis.}$ et $^{99m}\text{Tc-VINP28}$.

Les rapports d'activité entre la carotide gauche et le sang (G/sang) obtenus par prélèvement d'organes 3 heures après l'injection de $^{99m}\text{Tc-B2702p}$, $^{99m}\text{Tc-B2702p1-20}$, $^{99m}\text{Tc-VP}$, $^{99m}\text{Tc-VP mis.}$ et $^{99m}\text{Tc-VINP28}$ sont présentés sur la Figure 31. Les rapports d'activité G/sang de $^{99m}\text{Tc-B2702p14}$ et de $^{99m}\text{Tc-B2702p15}$ sont significativement inférieurs à $^{99m}\text{Tc-B2702p}$ ($0,22\pm 0,03$ et $0,21\pm 0,05$ vs. $0,41\pm 0,09$, $p<0,05$, respectivement). Une diminution significative du rapport d'activité G/sang obtenu après injection du $^{99m}\text{Tc-B2702p}$ entre le groupe d'animaux ligaturés et le groupe sham ($0,41\pm 0,09$ vs. $0,27\pm 0,02$, $p<0,05$, respectivement) a aussi été observée. De plus, le rapport d'activité G/sang du $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$ est 3,4 fois supérieur au $^{99m}\text{Tc-B2702p}$ ($1,41\pm 0,36$ vs. $0,41\pm 0,09$, $p<0,05$, respectivement) et 3 fois plus élevé que son peptide contrôle $^{99m}\text{Tc-B2702p1 mismatch}$ ($1,41\pm 0,36$ vs. $0,47\pm 0,09$, $p=0,055$, respectivement).

11.4.2 Imagerie planaire

Les images planaires représentatives des dérivés $^{99m}\text{Tc-B2702p}$ sont présentées sur la Figure 32.

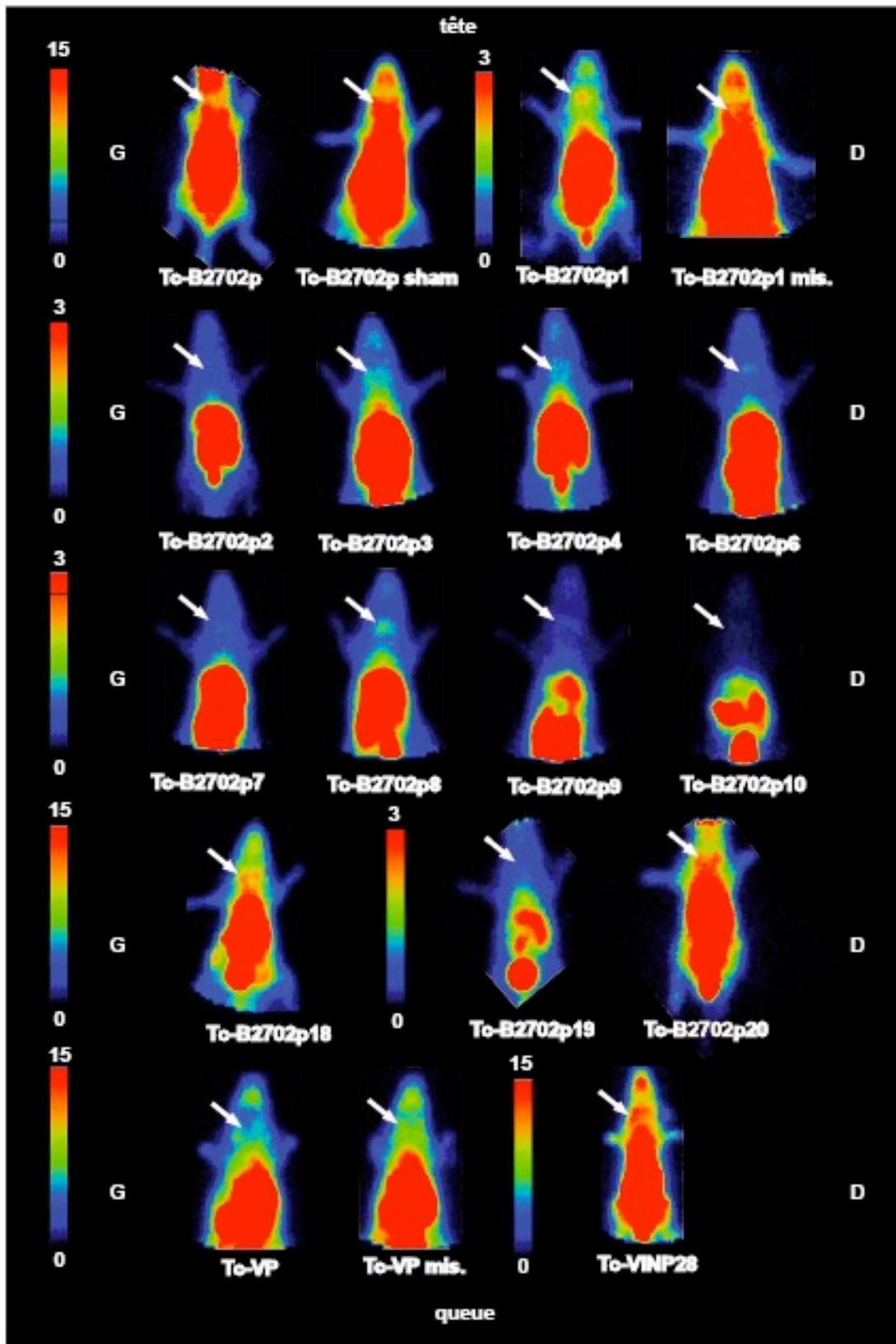


Figure 32

Images planaires représentatives du ^{99m}Tc -B2702p, de ces dérivées, du ^{99m}Tc -VP, ^{99m}Tc -VP mis. et du ^{99m}Tc -VINP-28. La flèche blanche indique la captation en radiotracteur sur la carotide gauche ligaturée. G :gauche, D :droite.

Les flèches blanches indiquent l'activité en traceur dans la carotide gauche ligaturée.

Les rapports d'activité G/D obtenus par quantification des images planaires après injection de $^{99m}\text{Tc-B2702p}$, $^{99m}\text{Tc-B2702p1-4}$, $^{99m}\text{Tc-B2702p6-10}$, $^{99m}\text{Tc-B2702p18-20}$, $^{99m}\text{Tc-B2702p1 mismatch}$, $^{99m}\text{Tc-VP}$, $^{99m}\text{Tc-VP mis.}$ et $^{99m}\text{Tc-VINP28}$ sont présentées sur la Figure 33.

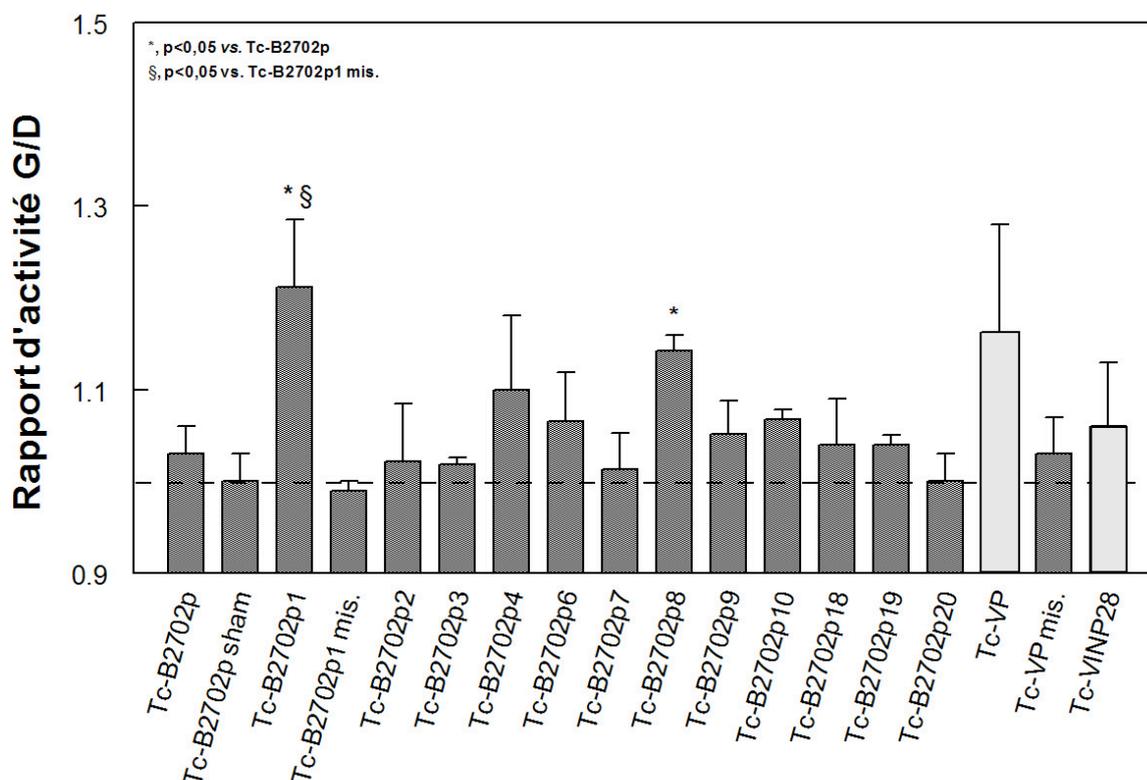


Figure 33

Rapports d'activité G/D obtenus par quantification des images planaires après injection de $^{99m}\text{Tc-B2702p}$, $^{99m}\text{Tc-B2702p1-4}$, $^{99m}\text{Tc-B2702p6-10}$, $^{99m}\text{Tc-B2702p18-20}$, $^{99m}\text{Tc-B2702p1 mismatch}$, $^{99m}\text{Tc-VP}$, $^{99m}\text{Tc-VP mis.}$ et $^{99m}\text{Tc-VINP28}$.

Aucune différence significative n'a été observée entre le groupe ligaturé et le groupe sham injecté avec $^{99m}\text{Tc-B2702p}$ ($1,03 \pm 0,03$ vs. $1,00 \pm 0,03$, $p = \text{NS}$, respectivement). Un rapport d'activité G/D significativement supérieur pour le $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$ par rapport au $^{99m}\text{Tc-B2702p}$ et $^{99m}\text{Tc-B2702p1 mismatch}$ ($1,21 \pm 0,07$ vs. $1,03 \pm 0,03$ et $0,99 \pm 0,01$, respectivement, $p < 0,05$) a été observé. Le rapport d'activité G/D obtenu avec le $^{99m}\text{Tc-B2702p8}$ est significativement plus élevé qu'avec le $^{99m}\text{Tc-B2702p}$ ($1,14 \pm 0,02$ vs. $1,03 \pm 0,03$, $p < 0,05$, respectivement). Enfin, les rapports d'activité G/D obtenus après injection de $^{99m}\text{Tc-VP}$ et $^{99m}\text{Tc-VINP28}$ ne sont pas significativement différents de celui obtenu avec le $^{99m}\text{Tc-B2702p}$ ($1,16 \pm 0,12$ et $1,06 \pm 0,07$ vs. $1,03 \pm 0,03$, $p = \text{NS}$, respectivement).

11.4.3 Imagerie tomographique

Des images scintigraphiques représentatives de coupes transversales de souris Apo E^{-/-} réalisées après l'injection de ^{99m}Tc-B2702p (A) et de ^{99m}Tc-B2702p1 (B) sont représentées sur la Figure 34. Les flèches blanches indiquent l'activité en ^{99m}Tc-B2702p et ^{99m}Tc-B2702p1 dans la carotide gauche portant la ligature. Les quantifications correspondantes des coupes transversales d'images SPECT obtenues après injection de ^{99m}Tc-B2702p (C) et de ^{99m}Tc-B2702p1 (D) sont présentées sur la figure 31. Chez tous les animaux ayant reçus du ^{99m}Tc-B2702p1, l'activité en radiotracer est plus élevée dans la carotide gauche par rapport à la carotide droite conduisant à des moyennes d'activités significativement différentes ($2,19 \pm 0,41$ vs. $1,39 \pm 0,28$ cpm/mm²/MBq, $p < 0,01$, respectivement). Il n'y a pas de différence significative des activités moyennes entre la carotide gauche et la carotide droite chez les animaux ayant reçus le ^{99m}Tc-B2702p ($5,35 \pm 1,58$ vs. $5,44 \pm 1,72$ cpm/mm²/MBq, $p = \text{NS}$, respectivement).

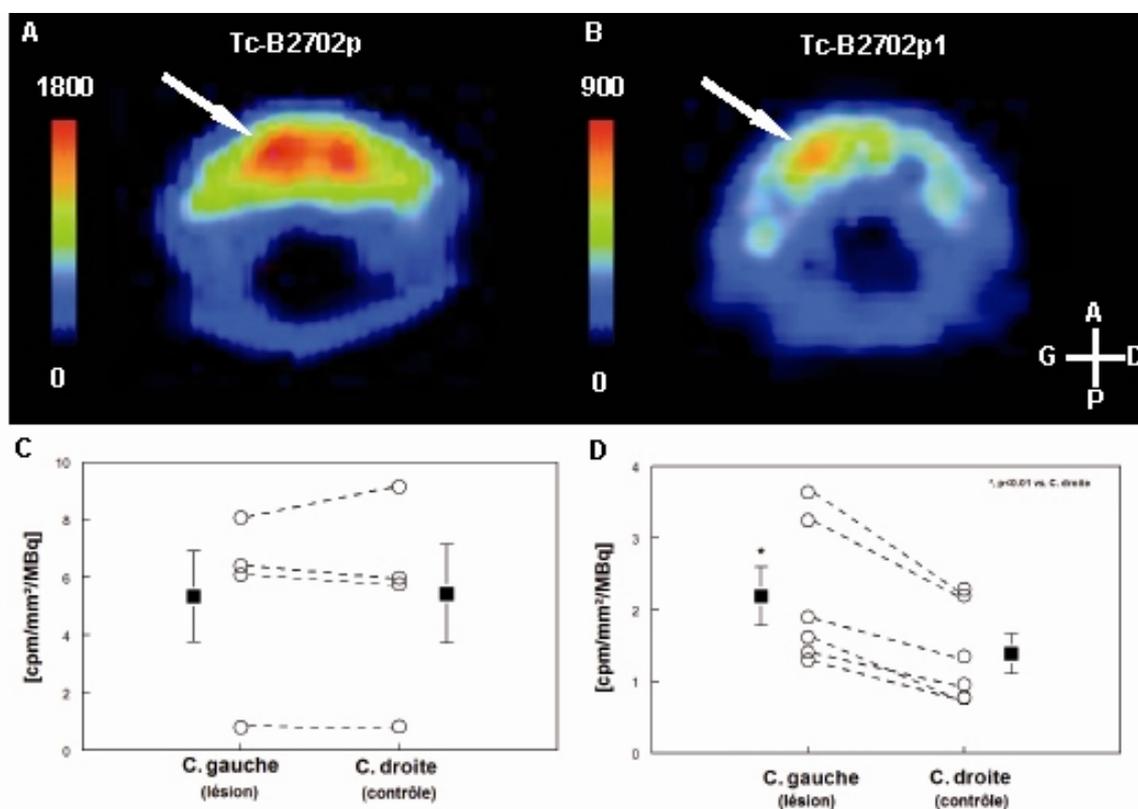


Figure 34

Les images représentatives de coupes transversales de souris Apo E^{-/-} obtenues par imagerie SPECT après injection de ^{99m}Tc-B2702p (A) et de ^{99m}Tc-B2702p1 (B). Les flèches blanches indiquent la captation du ^{99m}Tc-B2702p ou ^{99m}Tc-B2702p1 sur la carotide gauche. En dessous, les quantifications individuelles et moyennes des images SPECT du ^{99m}Tc-B2702p (C) et du ^{99m}Tc-B2702p1 (D). A : antérieur, P : postérieur, G : gauche, D : droite, *, $p < 0,01$ vs. C.droite.

12 Discussion

12.1 Traceurs spécifiques de VCAM-1

12.1.1 Choix de la cible : VCAM-1

L'athérocclérose est une pathologie inflammatoire chronique des vaisseaux de gros et moyen calibre (Ross 1999). Cette pathologie implique le recrutement de monocytes/macrophages et de lymphocytes au site de développement de la lésion. Pour cela l'expression de molécules d'adhésion par l'endothélium est nécessaire. Parmi ces molécules d'adhésion, VCAM-1 joue un rôle particulièrement important. VCAM-1 est une protéine de 110 kDa qui fait partie de la famille des immunoglobulines. Elle est exprimée par les cellules endothéliales activées et lie VLA-4, qui est exprimée constitutivement sur les lymphocytes et les monocytes (Osborn 1989). L'expression de VCAM-1 est restreinte au niveau des plaques, incluant les lésions précoces chez le lapin, la souris et l'homme (Iiyama 1999, O'Brien 1993, O'Brien 1996, Cybulsky 1991). De plus, VCAM-1 est surexprimée par les néovaisseaux de la plaque vulnérable (O'Brien 1996), ce qui est un point très important car l'on sait maintenant que la néoangiogenèse contribue grandement à la déstabilisation de la plaque (Moreno 2004). VCAM-1 est par conséquent une cible pertinente pour l'imagerie moléculaire non-invasive de la plaque d'athérome vulnérable.

12.1.2 Validation du modèle expérimental

Le modèle murin de ligature de l'artère carotide gauche utilisé dans cette étude a été développé par Kumar A. et Lindner V. (1997). Une prolifération importante des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales conduisant à une diminution du diamètre du vaisseau et à une augmentation des surfaces intimale et médiale ainsi qu'une infiltration de cellules inflammatoires ont été observées dans une zone située de 1 à 2 mm en amont de la ligature à partir de 2 semaines après l'intervention.

Ce modèle expérimental de ligature de la carotide gauche chez la souris Apo E^{-/-} nourrie avec un régime standard a été utilisé au laboratoire pour l'évaluation de différents traceurs potentiels spécifiques de la plaque d'athérome vulnérable. Les dosages plasmatiques confirment l'hypercholestérolémie des souris Apo E^{-/-}. En effet, le taux de cholestérol est multiplié par 6 par rapport au groupe contrôle. Cette hypercholestérolémie résulte d'une accumulation plasmatique des chylomicrons, des VLDLs, des IDLs et surtout des HDLs dont

le rôle principal est de ramener le cholestérol des tissus périphériques vers le foie pour y être éliminé. Cette hypercholestérolémie est suffisante pour obtenir un remodelage vasculaire et une expression de VCAM-1 3 semaines après la ligature. L'expression de VCAM-1 a été évaluée par immunohistochimie au niveau de la carotide gauche ligaturée, de la carotide gauche (sham) et au niveau de la carotide droite contrôle chez la souris Apo E^{-/-}. L'expression de VCAM-1 a été observée dans l'adventice et dans la néointima de la carotide gauche. Les macrophages ont également été observés dans ces mêmes zones. Les CMLs ont été observées dans la média de la paroi de la carotide gauche. Par conséquent, l'expression de VCAM-1 dans ce modèle expérimental semble provenir des macrophages. Les résultats d'immunomarquage des néovaisseaux (CD31) étant négatifs, la colocalisation de l'expression de VCAM-1 avec CD31 n'a pas pu être évaluée. Les résultats obtenus par O'Brien et al. montrant que VCAM-1 est aussi fortement exprimée par la néovasculature formée dans l'adventice de la paroi artérielle n'ont pu être reproduit (O'Brien 1996).

Ce modèle de ligature a été évalué chez la souris Apo E^{-/-} nourrie avec un régime enrichi en cholestérol (Ivan 2002, Lessner 2002). Entre 0 et 3 jours après la ligature, l'expression de VCAM-1 est confinée aux cellules endothéliales. A partir de 7 jours et jusqu'à 14 jours, VCAM-1 n'est plus exprimée par l'endothélium, mais par la media où elle est co-localisée avec les cellules musculaires lisses. Durant cette période, la surface de la lésion augmente de manière importante et conduit à une obstruction quasi-totale de la lumière du vaisseau, et les macrophages contenus dans la lésion ont entamé leur transition vers un phénotype de cellules spumeuses. Ce modèle de ligature a également été utilisé par Schäfer et al. afin d'évaluer un radiotraceur potentiel de la lésion athérosclérotique (Schäfer 2004). L'avantage principal du modèle est lié à la reproductibilité des lésions obtenues et au fait que la localisation de la plaque d'athérome est connue a priori. Par ailleurs, l'étude de Nakashima et al. (Nakashima 1998) indique que l'expression de VCAM-1 chez les souris Apo E^{-/-} n'ayant pas subi de ligature de la carotide gauche est limitée à la surface endothéliale du sinus aortique et à de petites zones d'embranchement, et qu'elle n'est pas maximale après 2 semaines de traitement par un régime enrichi en cholestérol. Ces résultats indiquent que l'expression de VCAM-1 devrait être nettement supérieure dans la lésion carotidienne que dans la vasculature voisine si les animaux sont utilisés 2 à 3 semaines après la ligature.

12.1.3 Choix et évaluation des traceurs spécifiques de VCAM-1

12.1.3.1 Choix des traceurs spécifiques de VCAM-1

B2702p est une séquence peptidique de 10 acides aminés qui provient d'une séquence à motif répété décrite par Ling et al. comme se liant spécifiquement à VCAM-1 et inhibant de ce fait l'infiltration leucocytaire in vivo dans un modèle d'inflammation des voies respiratoires murin au même titre que le fait le ligand naturel de VCAM-1 VLA-4 (Ling 2000). Lors d'études antérieures menées au laboratoire, plusieurs séquences modifiées de B2702p ont été radiomarquées et injectées dans un modèle expérimental de lésion athérosclérotique spontanée développée chez le lapin WHHL hypercholestérolémique (Broisat 2007). Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le ^{125}I -B2702p et le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702. Les études ex vivo ont montré des résultats encourageants avec un bon rapport d'activité entre la lésion et la paroi saine. Cependant, la forte activité sanguine de ^{125}I -B2702 et de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -B2702 n'a pas permis d'observer les lésions aortiques in vivo. La séquence B2702p a donc été déclinée en plusieurs dérivés afin d'améliorer le comportement biologique du traceur. De plus, un modèle expérimental de ligature de la carotide gauche réalisée chez la souris Apo E^{-/-} hypercholestérolémique plus adapté à l'évaluation d'un grand nombre de traceur a été utilisé. B2702p et ses dérivés ont été testée dans ce modèle expérimental.

Chaque acide aminé de la séquence décapeptidique B2702p a été substitué par une alanine pour donner les séquences B2702p11 à B2702p18. Les séquences B2702p1 à B2702p10 présentent les mêmes substitutions mais avec en plus une inversion entre l'alanine et la lysine (.....AL..↔.....LA.), située du côté C-terminal de la séquence. Les peptides B2702p19 et B2702p20 présentent chacun deux substitutions et l'inversion décrite précédemment. Les différentes séquences sont présentées dans le chapitre 6.1.

VP est une séquence tirée de la littérature (Kelly 2005). Elle a été découverte par une approche en phage display in vitro. Cette étude visait à obtenir des séquences spécifiques provoquant l'internalisation des phages après leur fixation à VCAM-1 exprimé par des CE en condition de flux. Les auteurs avaient pour objectif d'obtenir des séquences permettant de cibler des nanoparticules multimodalités. La séquence spécifique VHSPNKK qui possède une homologie avec la chaîne alpha de VLA-4, le ligand naturel de VCAM-1, se lie à VCAM-1 et inhibe les interactions leucocytes/endothélium de 68% comparé à une réduction de 52% obtenue avec un anticorps anti-VCAM-1. Les auteurs ont retenu cette séquence et ont ajouté les acides aminés GGSK(H)GK à l'extrémité C-terminale afin de réaliser un marquage

fluorescent. Ils ont alors observé un taux d'internalisation de la molécule fluorescente 12 fois supérieur à celui obtenu avec un anti-VCAM-1-fluorescent. Après injection de nanoparticules ciblant VCAM-1 grâce à cette séquence, Kelly et al. ont pu réaliser l'imagerie par résonance magnétique in vivo de l'expression aortique de VCAM-1 chez la souris Apo E^{-/-} avec un rapport aorte/muscle d'environ 3.

VINP-28 est également une séquence provenant de la littérature. Cette séquence a été découverte par une approche de phage display in vivo chez la souris Apo E^{-/-} visant à obtenir une séquence peptidique spécifique de VCAM-1 (Nahrendorf 2006). La séquence VHPKQHR ainsi obtenue présente aussi une homologie avec VLA-4 mais avec une affinité 20 fois supérieure à la séquence VHSPNKK précédemment décrite (Kelly 2005). Là encore, les auteurs ont développé cette séquence en l'intégrant dans un agent multivalent pouvant être utilisé en IRM et en imagerie optique. Ils ont réalisé l'imagerie in vivo du VINP-28 au niveau du sinus aortique chez la souris Apo E^{-/-} par résonance magnétique avec un rapport contraste sur bruit de fond d'environ 9.

Dernièrement, Nahrendorf et al. ont repris les 2 motifs des séquences précédemment décrites, connues pour se lier à VCAM1, sur lesquels a été greffée la séquence peptidique GGSYK afin de réaliser le radiomarquage à l'¹¹¹In (Nahrendorf 2009). Ces deux traceurs monomériques nommés MCP et MLP ont donné des résultats moins bons comparés au TLP qui est un traceur tétramérique obtenu à partir de la séquence MLP. En effet, ¹¹¹In-MCP, ¹¹¹In-MLP et ¹¹¹In-TLP ont été testés dans un modèle d'athérosclérose induit chez la souris Apo E^{-/-}. En autoradiographie, la captation lésionnelle de ¹¹¹In-TLP est 2,4 fois supérieure à celle de ¹¹¹In-MCP et 4,8 supérieure à la captation lésionnelle de ¹¹¹In-MLP. La séquence tétramérique TLP a ensuite été radiomarkée au [¹⁸F] et renommée [¹⁸F]-4V. Ce nouveau traceur a permis de détecter l'expression de VCAM-1 par imagerie TEP dans les lésions athérosclérotiques chez la souris Apo E^{-/-} âgée de 45 semaines et nourrie avec un régime riche en cholestérol.

12.1.3.2 Evaluation des traceurs spécifiques de VCAM-1

Les études de biodistributions menées chez la souris Apo E^{-/-} ont montré que le ^{99m}Tc-B2702p est éliminé principalement par les reins et à moindre échelle par la voie hépatique. La forte captation au niveau de l'artère controlatérale et l'activité sanguine importante ne permettent pas l'obtention d'un rapport signal sur bruit favorable à l'imagerie in vivo.

Les études de biodistributions ont montré que les dérivés $^{99m}\text{Tc-B2702p11-18}$, qui ne diffèrent du $^{99m}\text{Tc-B2702p}$ que d'un seul acide aminé, sont éliminés principalement par voie rénale. Parmi les dérivés B2702p11-18, seule la carotide gauche des animaux injectés avec le $^{99m}\text{Tc-B2702p18}$ présente une activité deux fois supérieure à la carotide droite contrôle. Cependant, l'activité sanguine ainsi que la captation lésionnelle du $^{99m}\text{Tc-B2702p18}$ étant similaires à celle du $^{99m}\text{Tc-B2702p}$, le rapport signal sur bruit ne s'en trouve pas amélioré. Les images planaires réalisées *in vivo* ne permettent pas de discerner la lésion du tissu sain avoisinant et confirment ainsi les résultats obtenus *ex vivo*.

Les dérivés $^{99m}\text{Tc-B2702p1-10}$ présentent eux aussi une élimination rénale expliquée par leur hydrophilie. Tous ces dérivés, hormis le $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$, présentent une captation carotidienne gauche 5 à 17 fois plus faible comparée à celle du $^{99m}\text{Tc-B2702p}$. Les dérivés $^{99m}\text{Tc-B2702p1-10}$ présentent aussi une captation au niveau de l'artère controlatérale 3,5 à 16 fois plus faible comparée à celle du $^{99m}\text{Tc-B2702p}$. Le $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$ est le seul de ces dérivés qui présente un rapport de fixation entre la carotide gauche et la carotide droite plus élevé que le $^{99m}\text{Tc-B2702p}$. De plus, les dérivés $^{99m}\text{Tc-B2702p1-10}$ présentent une activité sanguine plus faible que celle du $^{99m}\text{Tc-B2702p}$. Le $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$ possède de ce fait un rapport signal sur bruit favorable à l'imagerie *in vivo*. Le $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$ mismatch ne se fixant pas dans la lésion réalisée par la ligature suggère que la fixation du $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$ à VCAM-1 *in vivo* est spécifique. Ainsi, les caractéristiques du $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$ sont favorables à la détection *in vivo* de l'expression de VCAM-1 chez la souris Apo E^{-/-}. L'imagerie planaire permet de détecter la fixation du $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$ au niveau de la ligature. L'imagerie tomographique haute résolution du $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$ a été réalisée dans le but d'améliorer le contraste entre la carotide gauche et la carotide droite. Les résultats obtenus en imagerie planaire sont en accord avec les résultats obtenus en imagerie SPECT haute résolution. Le dérivé $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$ permet de détecter l'expression de VCAM-1 dans les lésions athérosclérotiques chez la souris Apo E^{-/-}.

Dans le but d'améliorer les caractéristiques du $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$, des substitutions correspondantes aux dérivés $^{99m}\text{Tc-B2702p3}$ et $^{99m}\text{Tc-B2702p4}$ ont été apportées à sa séquence, conduisant respectivement aux dérivés $^{99m}\text{Tc-B2702p19}$ et $^{99m}\text{Tc-B2702p20}$. En effet, les séquences $^{99m}\text{Tc-B2702p3}$ et $^{99m}\text{Tc-B2702p4}$ présentent toutes deux les meilleurs rapports signal sur bruit après la séquence $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$. Les caractéristiques individuelles conférées par ces modifications et celles du $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$, réunies en une seule séquence, pourraient avoir un effet synergique permettant d'obtenir un traceur avec des caractéristiques optimales. Les études de biodistributions ont montré une élimination rénale de ces deux

radiotraceurs s'expliquant par leur caractère hydrophile. Leur captation dans la lésion est plus faible que le ^{99m}Tc -B2702p1 et leur activité sanguine plus élevée. Par conséquent, le rapport entre la carotide gauche et l'activité sanguine n'est pas meilleur que celui de ^{99m}Tc -B2702p1. Ces résultats ont été confirmés en imagerie planaire.

Le B2702p1 radiomarqué au ^{99m}Tc est par conséquent le dérivé de B2702p testé qui possède les meilleures caractéristiques biologiques permettant l'imagerie in vivo de l'expression de VCAM-1 dans la lésion athérosclérotique.

Nous avons utilisé la séquence VP spécifique de VCAM-1 ainsi qu'une séquence possédant les mêmes acides aminés mais dans un ordre aléatoire en guise de peptide contrôle (VP mis.) que nous avons radiomarquées au ^{99m}Tc . Les études de biodistribution ont montré une élimination du radiotraceur à dominante rénale pouvant s'expliquer par son hydrophilie. Les rapports d'activité entre la carotide gauche et la carotide droite similaires entre le ^{99m}Tc -VP et son contrôle ne sont pas en faveur d'une fixation spécifique entre le traceur et sa cible contenue dans la lésion. Par conséquent, le ^{99m}Tc -VP n'a pas permis de mettre en évidence in vivo la présence de VCAM-1 au niveau de la lésion dans notre modèle expérimental murin.

Nous avons également utilisé la séquence VINP-28 à laquelle a été ajouté la même séquence d'acides aminés qu'à VP permettant le radiomarquage au ^{99m}Tc . Le ^{99m}Tc -VINP-28 a été injecté dans notre modèle expérimental murin de ligature carotidienne. Les études de biodistribution ont montré une élimination du radiotraceur à dominante rénale pouvant s'expliquer par sa composante hydrophile. Trois heures après injection, un rapport d'activité entre la carotide gauche et le sang, reflétant le rapport signal sur bruit, similaire, avoisinant 1, à celui obtenu avec le ^{99m}Tc -VP a été observé. Les images planaires réalisées in vivo confirment ce faible rapport qui permettrait de mettre en évidence l'expression de VCAM-1 au niveau de la lésion athérosclérotique.

Finalement, ces 2 séquences ne possèdent pas de meilleures caractéristiques que ^{99m}Tc -B2702p1. L'une des raisons possibles pour lesquelles ces deux séquences n'ont pas permis d'obtenir d'aussi bons résultats que dans la littérature porterait sur les modifications réalisées sur les séquences pour le radiomarquage. En effet, ces modifications peuvent changer l'encombrement stérique du radiotraceur ce qui influencerait la reconnaissance pour sa cible ainsi que son comportement biologique.

12.2 Comparaison du $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$ avec la littérature

Parmi tous les radiotraceurs testés, seul le dérivé $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$ s'est montré intéressant pour détecter *in vivo* et de manière non invasive les lésions athérosclérotiques grâce à l'imagerie nucléaire. D'autres radiotraceurs ciblant des marqueurs de la plaque vulnérable sont en cours de développement. Parmi eux, le $^{123}\text{I-HO-CGS 27023A}$ spécifique des métalloprotéases (MMPs), le $^{99m}\text{Tc-annexine A5}$ traceur de l'apoptose ainsi que le $^{99m}\text{Tc-MCP1}$ et la $[\text{}^{18}\text{F}]\text{-4V}$ traceurs de l'inflammation, sont 4 radiotraceurs prometteurs spécifiques de la plaque vulnérable (Schäfer 2004, Ohshima 2009, Isobe 2006, Nahrendorf 2009).

Schäfer et al. ont utilisé un inhibiteur des MMPs (MPI) radiomarqué à l'iode 123 (le $^{123}\text{I-HO-CGS 27023A}$) dans un modèle expérimental similaire à celui utilisé dans nos travaux (Schäfer 2004). Le rapport d'activité entre la lésion et le tissu normal obtenus à partir des images planaires est comparable à celui obtenu avec le $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$ puisqu'il est de 1,5 pour le $^{123}\text{I-HO-CGS 27023A}$ et de 1,3 pour le $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$.

D'autre part, Narula et al. ont réussi à détecter les lésions athérosclérotiques aortiques chez différents types de souris dont les Apo E^{-/-} après injection de $^{99m}\text{Tc-MPI}$ (Ohshima 2009). Les quantifications des images ne sont pas disponibles. Cependant, les études de biodistributions réalisées 3 heures après injection chez le souris Apo E^{-/-} montrent une captation maximale en $^{99m}\text{Tc-MPI}$ au niveau de la crosse aortique d'environ 1 %DI/g. La captation du $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$ dans la lésion est de environ 1,3 %DI/g. En revanche, la captation en radiotraceur est plus faible dans le tissu sain des animaux injectés avec le $^{99m}\text{Tc-MPI}$ comparé au $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$ (0,19±0,05 vs. 0,51±0,13 %DI/g., respectivement).

Isobe et al. ont évalué le $^{99m}\text{Tc-Annexine A5}$ dans un modèle de développement d'athérosclérose chez les souris Apo E^{-/-} et LDLR^{-/-} nourris ou non avec un régime riche en cholestérol (Isobe 2006). L'imagerie SPECT/CT a été réalisée 3h après l'injection et la biodistribution 4 heures post-injection. La captation du $^{99m}\text{Tc-Annexine A5}$ dans les lésions situées sur la crosse aortique du groupe Apo E^{-/-} nourri avec un régime standard obtenu après prélèvement d'organe est de 0,60±0,16 %DI/g. Dans notre cas la captation du $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$ est de 1,28±0,43 %DI/g. Cependant, comme avec le radiotraceur $^{99m}\text{Tc-MPI}$, la captation du $^{99m}\text{Tc-Annexine A5}$ est plus faible dans le tissu sain du groupe contrôle comparé à la captation du $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$ (0,15±0,05 vs. 0,51±0,13 %DI/g., respectivement). Ohtsuki et al. ont injecté le MCP-1 radiomarqué à l'iode 125 chez la souris Balb/c (Ohtsuki 2001). Les études de biodistribution réalisées 3 heures après injection indiquent une captation sanguine

3,2 fois plus élevée que celle obtenue avec le $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$. Les auteurs n'ont pas réalisé d'imagerie in vivo sur ce modèle murin.

Enfin, Nahrendorf et al. (2009) ont testé un traceur tétramérique, le $^{111}\text{In-4V}$, dans un modèle murin d'athérosclérose aortique. Les auteurs ont obtenu une captation lésionnelle 1h post injection de 0,35 %DI/g. Cette même séquence radiomarquée au fluor 18 (^{18}F)-4V) montre une captation lésionnelle de $5,9 \pm 1,5$ % DI/g. d'organe. Cependant, dans cette étude, les rapports d'activité entre la lésion et l'aorte saine ont été effectués entre les lésions athéroclérotiques développées par les souris Apo E-/- et l'aorte saine des animaux wildtype, ce qui n'est pas notre cas. Nous ne sommes donc pas en mesure de comparer nos rapports d'activité.

Par conséquent, la captation du $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$ dans la lésion athérosclérotique est meilleure que celle du $^{99m}\text{Tc-Annexine A5}$ et de l' $^{111}\text{In-4V}$. L'activité du $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$ dans le tissu sain est plus faible que celle de $^{99m}\text{Tc-Annexine A5}$ ou de $^{99m}\text{Tc-MPI}$ et son activité sanguine est aussi plus faible que celle de $^{125}\text{I-MCP1}$. $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$ possède donc des caractéristiques biologiques comparables par rapport à celles des autres radiotraceurs décrits dans la littérature.

13 Conclusion

Les études réalisées ont montré que $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$, se fixait au niveau des lésions athérosclérotiques exprimant VCAM-1 et induite par ligature de la carotide gauche chez la souris Apo E-/. Le $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$ a donc permis la détection non invasive in vivo de l'expression de VCAM-1 dans les lésions athérosclérotiques. Ces résultats encourageants justifient l'évaluation rapide de $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$ chez l'homme. Cette évaluation fait l'objet du projet PLAQIMAG financé par l'ANR. Considérant la disponibilité similaire et importante du matériel d'imagerie SPECT et PET au niveau mondial, l'un des objectifs techniques de ce projet est le radiomarquage de B2702p1 en utilisant un isotope compatible avec l'imagerie SPECT ($^{99m}\text{Tc-B2702p1}$) et PET (^{18}F)-B2702p1). L'avancée scientifique attendue est la visualisation de plaques d'athérome coronaires vulnérables chez l'homme. Le principal verrou technique à lever consistera à vérifier l'hypothèse selon laquelle $^{99m}\text{Tc-B2702p1}$ et ^{18}F -B2702p1 présentent une captation dans la plaque d'athérome ainsi qu'une cinétique sanguine compatibles avec l'imagerie in vivo des lésions athérosclérotiques vulnérables chez l'homme. De ce point de vue, les résultats obtenus expérimentalement sont extrêmement encourageants. La capacité du matériel de détection (γ -caméras) à réaliser l'imagerie de structures de petites

tailles et à proximité immédiate du sang telles que les plaques d'athérome constitue également un verrou technique. Dans cette optique, le marquage du traceur avec des isotopes permettant à la fois l'imagerie SPECT et l'imagerie PET augmentera significativement la probabilité de succès.

Evaluation du ^{99m}Tc -RAFT-RGD dans l'angiogenèse myocardique post-infarctus

Revue bibliographique

1 Introduction

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde (WHO 2007). Aux Etats-Unis, l'infarctus du myocarde est le principal responsable de cette mortalité avec 875 000 événements par an. Pour 22% des hommes et 46% des femmes, l'infarctus du myocarde mène à une insuffisance cardiaque dans les 6 ans, et 80% de ces sujets hommes ainsi que 90 % des sujets femmes mourront dans les 8 ans (Heart disease and stroke statistics – 2007 update).

L'infarctus du myocarde est caractérisé par une nécrose et une apoptose des myocytes qui mènent à la formation d'une cicatrice, à la dilatation du ventricule gauche et au remodelage de la paroi ventriculaire ce qui peut, à terme, évoluer vers une insuffisance cardiaque (Sutton 2000, Gheorghide 2006). Pendant la phase aigue de l'infarctus du myocarde, la reperfusion de la zone infarctée est responsable d'un phénomène inflammatoire intense (Frangogiannis 2002). L'angiogenèse, i.e. la formation de nouveaux vaisseaux à partir du réseau vasculaire préexistant (Tucker 2006), est stimulée par l'hypoxie des tissus et par le phénomène inflammatoire. L'angiogenèse permet ainsi l'approvisionnement des tissus en oxygène et en nutriments, devenus nécessaires pour répondre aux besoins créés par le fort métabolisme dans la zone sujette à l'inflammation et à la formation de la cicatrice (Frangogiannis 2002). L'amplitude de la réponse angiogénique pourrait avoir un impact favorable sur le pronostic vital du patient (Sinusas 2004).

Expérimentalement, différentes techniques comme l'injection de cellules souches, le transfert de gènes ou les traitements aux facteurs de croissance sont parvenues à induire l'angiogenèse, à augmenter la perfusion tissulaire et à améliorer la fonction cardiaque après reperfusion d'une zone ischémique (Kocher 2001, Hao 2007, Okazaki 2007, Chen 2007, Rafii 2003, Hughes 2004, Simons 2003, Freedman 2002). Des études cliniques préliminaires ont été réalisées et ont rapporté des résultats favorables en terme de capacité à résister à l'épreuve physique et en termes d'amélioration des paramètres fonctionnels recencés par des questionnaires du type SF-36. Bien que le phénomène placebo soit bien décrit dans différents

domaines médicaux, les investigateurs ont été surpris d'observer lors de ces études qu'un groupe de patient sans aucune alternative thérapeutique possible à leur problème d'occlusion coronaire pouvait augmenter leur résistance à l'effort physique de 45 à 60 secondes (Simons 2003). L'importance de l'effet placebo dans les études cliniques préliminaires ne permet donc pas de conclure sur un effet des traitements proangiogéniques. D'autres essais cliniques ont été menés de manière contrôlée et en double-aveugle. Cependant, ces études cliniques contrôlées ont généré des données controversées sur l'amélioration des paramètres fonctionnels cardiaques tels que l'épreuve d'effort et la perfusion myocardique. Même si l'efficacité des traitements pro-angiogéniques administrés lors de ces études a été démontrée expérimentalement, le transfert de ces traitements à la clinique n'a donc pas montré de résultats aussi favorables (Simons 2003, Yla-Herttuala 2007, Nordlie 2006). Les méthodes employées lors de ces essais cliniques évaluent les conséquences physiologiques de l'angiogénèse. Cependant, celles-ci peuvent être très localisées et par conséquent difficiles à détecter de manière non invasive avec les stratégies utilisées actuellement en clinique (Meoli 2004). Par conséquent, il existe un besoin pour un outil non-invasif qui permette de contrôler l'efficacité des traitements proangiogéniques en ciblant directement l'angiogénèse (Sinusas 2004). Parmi les techniques non-invasives, la médecine nucléaire, modalité d'imagerie moléculaire et fonctionnelle très sensible, peut apporter des solutions.

La présente étude a pour but d'évaluer un radiotracer spécifique de l'angiogénèse myocardique in vivo dans un modèle expérimental d'ischémie reperfusée chez le rat. La cible utilisée est l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ surexprimées par les cellules endothéliales durant la formation des nouveaux vaisseaux (Brooks 1994). Le ligand évalué est une molécule originale, un cyclodécapeptide radiomarqué au ^{99m}Tc sur une face et affichant 4 motifs RGD sur l'autre face. Le motif RGD est décrit pour lier spécifiquement $\alpha_v\beta_3$ (Ruoslahti 2003).

2 Infarctus du myocarde et angiogénèse myocardique

2.1 Généralités

L'infarctus du myocarde est la conséquence immédiate de l'occlusion d'une artère coronaire. Privé subitement d'oxygène, le tissu myocardique meurt et se nécrose.

En condition anaérobie, on observe une diminution jusqu'à épuisement de la production d'énergie dans les cellules cardiaques. En effet, l'ischémie qui caractérise l'infarctus du myocarde engendre une diminution de la pression partielle en oxygène (P_{O_2}) dans le sang et

prive ainsi les cellules cardiaques placées en aval de l'occlusion d'un substrat essentiel à la production d'énergie et donc à leur survie (Figure 35).

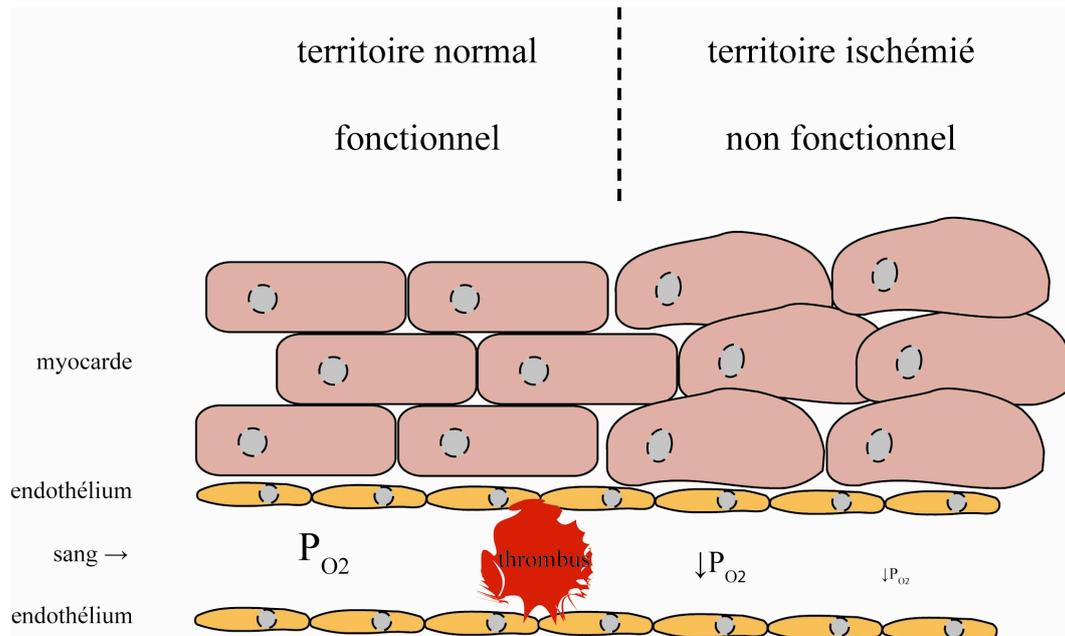


Figure 35

Schéma simplifié représentant l'évolution du myocarde passant d'un phénotype normal, fonctionnel, à un phénotype ischemique, non fonctionnel, après obstruction du vaisseau par un thrombus. Le myocarde va ensuite se nécroser. P_{O_2} : pression partielle en oxygène.

La diminution de la P_{O_2} entraîne une diminution de la phosphorylation oxydative qui a pour conséquence une forte baisse d'Adénosine Triphosphate (ATP). La glycolyse se retrouve alors source de synthèse d'ATP pour environ 80% de la synthèse totale. Au bout de quelques minutes, la glycolyse ralentit fortement, laissant place à une élévation de la concentration intracellulaire en lactate et à un pH très faible. Cette épuisement progressif de l'ATP ne permet plus le fonctionnement des pompes Na^+/K^+ ATPase, ce qui bouleverse l'homéostasie hydrique de la cellule. Les molécules d'eau pénètrent alors dans la cellule qui s'hypertrophie (Figure 36).

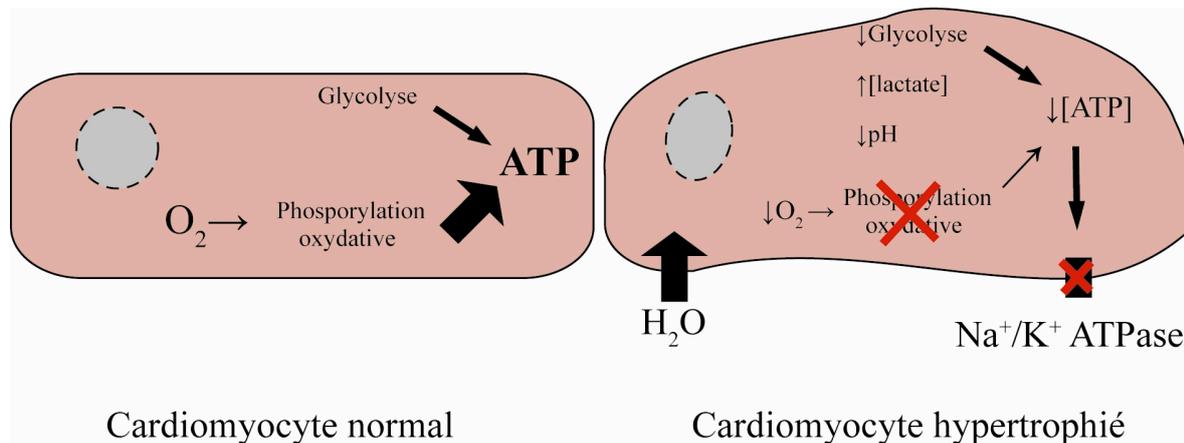


Figure 36

Schéma simplifié représentant le dysfonctionnement métabolique à l'origine de l'hypertrophie cellulaire. En condition aérobie (à gauche), l'ATP est principalement synthétisé grâce à la phosphorylation oxydative. Une grande quantité est générée par la glycolyse. En condition anaérobie (à droite), la phosphorylation oxydative ne permet plus la synthèse d'ATP. La glycolyse devient le fournisseur majoritaire d'ATP. Cependant, la glycolyse s'épuise. Le lactate augmente et le pH intracellulaire diminue. La concentration d'ATP diminue. La pompe Na⁺/K⁺ ATPase ne permet plus de maintenir un équilibre hydrique. L'eau entre en large excès dans la cellule qui s'hypertrophie. Celle-ci va ensuite se nécroser ou entrer en apoptose.

Chronologiquement, cette baisse du métabolisme aérobie débute 10 secondes après l'ischémie. La contractilité des cardiomyocytes qui l'accompagne diminue et disparaît au bout de 60 secondes. S'installent alors des modifications structurelles réversibles se traduisant par un gonflement des cellules et des mitochondries. Une diminution des réserves en glycogène a aussi été observée. A partir de 20 minutes des dégâts irréversibles comme la rupture du sarcolemme se mettent en place. La présence de mitochondries amorphes en faible densité a aussi été observée (Jennings 1990). Quarante minutes après l'ischémie, les cellules cardiaques se nécrosent ou entrent minoritairement en apoptose.

Une réponse inflammatoire apparaît alors. Cette réponse inflammatoire aboutira à la formation d'une cicatrice. Ainsi, une diminution de la contractilité ou de la force de contraction ventriculaire apparaît, entraînant une diminution de la fraction d'éjection et donc une diminution de la fonction cardiaque. Le myocarde s'hypertrophie afin de compenser le manque de contractilité, ce qui contribue à l'altération de sa compliance et diminue sa capacité de relaxation en diastole. Ces différents phénomènes sont susceptibles de mener à un état d'insuffisance cardiaque. Par conséquent une diminution de la taille de la cicatrice permettrait de conserver une meilleure fonction ventriculaire. L'angiogenèse participe à cet effet en augmentant la réponse inflammatoire et de fait, la réparation des tissus endommagés.

2.2 Réponse inflammatoire

Le processus de réparation comporte 3 phases distinctes : une phase inflammatoire, une phase proliférative et une phase de maturation (Frangogiannis 2006). La première phase dite inflammatoire correspond à l'activation de cascades de cytokines et de chémokines permettant un recrutement de leucocytes au niveau de la zone infarctée. Différentes études ont montré le rôle important des mastocytes comme étant à l'origine de la sécrétion des cytokines, des chemokines et des facteurs de croissance.

2.2.1 Initiation de la réponse inflammatoire post infarctus

Les cellules nécrotiques entraînent une réaction inflammatoire qui aboutira à la formation d'une cicatrice. Cette étape implique les mécanismes immunitaires innés. Les récepteurs situés en surface des membranes des cellules immunitaires reconnaissent des ligands endogènes relargués par les tissus endommagés et activent ainsi les voies inflammatoires. Des études ont montré que les récepteurs Toll-like (TLR), le complément et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ont un rôle important dans le déclenchement de la réponse inflammatoire post infarctus en activant le système NFκ-B (Frangogiannis 2008).

2.2.1.1 Les TLR

Différents ligands endogènes provenant de tissus endommagés sont capables d'activer les TLRs. Parmi ceux-ci on retrouve les protéines de chocs thermiques (HSP), le hyaluronane et les fragments de fibronectine (Beg 2002). Par conséquent, les altérations de la matrice extracellulaire dues à la destruction des tissus peuvent activer le système immunitaire inné via les TLRs (Frantz 2007). Actuellement, il existe 13 membres de la famille des TLRs. La liaison du ligand sur le TLR aboutit à l'activation du facteur de transcription NFκB via différentes molécules comme MyD88, IRAK1 et 4 et TRAF6 (Akira 2004). Récemment, il a été montré que les souris déficientes en TLR4 avaient une taille d'infarctus et une inflammation réduite et présentaient un remodelage favorable suite à l'infarctus du myocarde (Oyama 2004). Au contraire, les souris déficientes en TLR2 ont une taille de zone infarctée et une infiltration leucocytaire inflammatoire similaire au groupe contrôle, mais ont une fibrose diminuée de la zone saine ainsi qu'un remodelage ventriculaire réduit (Shishido 2003). Ces résultats montrent que les TLR4 ont un rôle important dans la réponse immunitaire innée post infarctus et que les TLR2 n'affectent que très peu cette réponse inflammatoire mais modulent plutôt le dépôt de collagène.

2.2.1.2 Le complément

Le système du complément est une composante importante de la réponse immunitaire innée. Différentes études ont démontré que l'ischémie myocardique active la cascade du complément (Rossen 1988). Hill et al. ont été les premiers à mettre en évidence le rôle des fragments produits par l'activité protéolytique de C3 sur le leucotactisme dans l'infarctus du myocarde chez le rat (Hill 1971). Par la suite, l'utilisation d'autres composants du complément comme le C1 et le C4 par les patients ayant subi un infarctus du myocarde aigu a suggéré qu'un relargage de constituants membranaires est capable d'activer aussi la cascade du complément (Pinckard 1975). De plus, les mRNA et les protéines de tous les composants du complément sont surexprimés dans l'infarctus du myocarde (Yasojima 1998). Le rôle du complément semble aussi être important dans le recrutement des neutrophiles et des monocytes dans le myocarde endommagé (Dreyer 1992). La contribution de l'activation du complément semble être particulièrement importante durant la première heure de reperfusion (Birdsall 1997). En effet, le composant C5a du complément est le principal chémoattractant des neutrophiles et agirait aussi sur les monocytes circulants.

2.2.1.3 Les ROS

En condition normale, le myocarde possède des systèmes de défense contre les attaques radicalaires. Ces systèmes de défense sont constitués par des enzymes (catalase, glutathion peroxydase et superoxyde dismutase (SOD)) ainsi que par des antioxydants intracellulaires. Cependant, ces systèmes de défense sont inopérants dans la zone infarctée, laissant place à la génération d'espèces radicalaires provenant de l'oxygène. Les ROS interagissent directement avec les lipides, les protéines et l'ADN, provoquant l'endommagement des cellules et leur mort. Des travaux menés chez le chien ont montré qu'une combinaison antioxydante de SOD et de catalase infusée 15 minutes avant la reperfusion réduit significativement la taille de l'infarctus (Jolly 1984). En revanche, aucun effet n'est observé lorsque l'infusion débute 40 minutes après la reperfusion, ce qui suggère que l'endommagement des tissus par les ROS est un événement précoce. Par ailleurs, des souris transgéniques surexprimant des SOD affichent une protection contre les blessures post-ischémiques (Wang 1998). De plus, les animaux surexprimant les SOD ont montré une réduction significative de la taille de l'infarct sur un modèle de cœur isolé et perfusé (Langerdorff) en présence d'une ligature de l'artère coronaire gauche (Chen 1998). Parallèlement, les ROS déclenchent les cascades de cytokines et de chemokines par l'intermédiaire de l'activation de NFkB (Griendling 2003). Par ailleurs, les

ROS influencent le recrutement leucocytaire par l'expression de P-selectine (Patel 1991) et de ICAM-1 (Sellak 1994).

2.2.2 Les cytokines pro-inflammatoires

L'induction et le relargage des cytokines pro-inflammatoires TNF α , Il-1 β et Il-6 ont été observées dans l'infarctus du myocarde dans différents modèles expérimentaux. L'activation du complément, la génération de ROS et l'activation de NF κ B stimule la synthèse des ARNm de ces cytokines à la fois chez les cellules résidentes mais aussi chez les cellules circulantes, résultant en leur surexpression dans la zone infarctée.

2.2.2.1 Le TNF α

Gordon et al. ont identifié les mastocytes comme principale source de TNF α dans le phénomène inflammatoire (Gordon 1990). Dans un modèle canin d'ischémie/reperfusion de l'artère coronaire circonflexe, Frangogiannis et al. ont montré un relargage d'histamine et de TNF α dans la lymphe de manière précoce suite à l'ischémie (Frangogiannis 1998). De plus, les études immunohistologiques ont aussi montré que la dégranulation des mastocytes résidents s'effectuait dans la zone ischémiée et non dans la zone saine du myocarde. Cette dégranulation s'effectue par les mastocytes et les macrophages dans les premières minutes qui suivent l'ischémie (Gilles 2003) ainsi que par les cardiomyocytes lorsque l'ischémie perdure (Dörge 2002). Les récepteurs au TNF α (TNFR1 et TNFR2) sont exprimés par la plupart des cellules cardiaques dont les cardiomyocytes (Kadokami 2000). Le TNF α et l'activation de ses récepteurs ont un rôle ambivalent dans l'infarctus du myocarde. En effet, une expression excessive de TNF α associée à l'activation des TNFR1 a tendance à augmenter la taille de l'infarctus alors qu'une faible expression de TNF α associée à l'activation des TNFR2 aurait un rôle protecteur (Schulz 2009).

2.2.2.2 L'Il-1 β

Il existe 3 formes d'Il-1 : l'Il-1 α , l'Il-1 β et l'Il-1Ra. Les deux premières isoformes sont agonistes alors que la l'Il-1Ra est un antagoniste spécifique. Les deux isoformes α et β sont capables d'induire l'expression d'autres cytokines, chemokines et facteurs de croissance et de molécules d'adhésion. Une surexpression des Il-1 a été observée dans différents modèles expérimentaux d'infarctus du myocarde (Herkowitz 1995). De plus, une augmentation significative de l'Il-1 β plasmatique a été observée chez des patients victimes d'un infarctus du

myocarde (Guillen 1995). L'activité de IL-1 β passe exclusivement via les récepteurs de types 1 (IL-1R1). L'IL-1 β stimule la synthèse des ARNm des MMPs chez des animaux contrôles, mais pas chez des animaux transgéniques dont les fibroblastes cardiaques sont dépourvus d'IL-1R1. Ces résultats suggèrent que les IL-1 sont essentielles à l'inflammation et à la fibrogenèse dans l'infarctus du myocarde et jouent un rôle important dans le remodelage post-infarctus (Bujak 2008).

2.2.2.3 L'IL-6

La synthèse d'IL-6 par les monocytes et les cardiomyocytes présents dans le myocarde ischémique est induite par des facteurs comme le TNF α . L'IL-6 est capable de moduler l'expression génique des cellules comme l'expression de la molécule d'adhésion ICAM-1 par les CEs permettant le recrutement leucocytaire dans le tissu endommagé (Frangogiannis 1998). D'autre part, des études menées chez la souris dépourvue d'IL-6 ont montré un retard significatif dans la cicatrisation de blessures cutanées (Gallucci 2000). Ces résultats suggèrent l'implication de l'IL-6 dans la réparation tissulaire.

2.2.3 Implications cellulaires dans la réponse inflammatoire post infarctus

L'activation de la réponse inflammatoire post infarctus est associée à l'induction de molécules d'adhésion et à une augmentation de la perméabilité vasculaire. On assiste alors à l'extravasation de cellules inflammatoires circulantes activées dans la zone infarctée (Figure 37).

2.2.3.1 Les plaquettes

Les plaquettes sont les premières cellules recrutées sur le site ischémique (Martin 2005). Leurs rôles sont multiples. Elles peuvent s'aggréger au niveau de la zone infarctée, contribuer à la formation d'une matrice extracellulaire de fibrine provisoire, relarguer des chemokines telles que RANTES et PF4 qui ont un rôle dans le recrutement des monocytes circulants, des cytokines (IL-1 β), et des facteurs de croissance comme le PDGF et TGF- β (von Hundelshausen 2007, Gawaz 2005).

2.2.3.2 Les neutrophiles

Les neutrophiles sont recrutés très tôt après l'infarctus du myocarde. Après une ischémie sans reperfusion, l'infiltration neutrophilaire apparaît lentement (12-24h) avec un pic entre 2 et 4

jours essentiellement dans la zone bordant l'ischémie. Quelques neutrophiles ont été aperçus au cœur de la zone ischémisée (Reimer 1989, Zhao 2000). L'infiltration des neutrophiles est plus rapide et plus intense après reperfusion suite à une occlusion réversible (Chatelain 1987). Leur transmigration nécessite des interactions avec les molécules d'adhésions exprimées par les CEs activées. Parmi elles, les P- et L- selectines ont un rôle important dans le rolling comme le démontrent des études expérimentales menées chez le félin. Une atténuation de l'accumulation des neutrophiles dans la zone ischémique et reperfusée du myocarde a ainsi été observée après administration d'anticorps dirigé contre les P- et L- sélectines (Ma 1993, Weyrich 1993). De plus, les souris déficientes en P-selectine présentent une taille d'infarctus réduite après 30 minutes d'occlusion et 2h de reperfusion coronaire alors qu'aucune différence n'est observée après 60 minutes d'occlusion (Palazzo 1998). Bien que les sélectines soient nécessaire dans le rolling, les neutrophiles nécessitent d'autres molécules d'adhésion, de type intégrines, pour effectuer l'adhésion ferme et la transmigration. L'adhésion ferme des neutrophiles nécessite la présence de la chaîne $\beta 2$ (CD18) des intégrines que possède LFA-1, Mac-1 ou p150. Par conséquent, les neutrophiles se lient aux CEs via ICAMs. Par ailleurs, LFA-1 semble nécessaire à l'adhésion ferme en se fixant sur ICAM-1 comme l'indiquent des études dans lesquelles la transmigration est bloquée par l'administration d'anticorps anti-LFA-1 (Furie 1991). Ding et al. ont aussi montré que l'extravasation des neutrophiles est considérablement diminuée chez des souris déficientes en LFA-1 (Ding 1999). De plus, des études ont montré que PECAM-1 est nécessaire à la transmigration des neutrophiles entre les cellules endothéliales (Gumina 1996). Par ailleurs, les cytokines pro-inflammatoires telles que TNF α , IL-1 et Il-6 stimulent l'expression d'ICAM-1 sur les cardiomyocytes, et permettent la fixation des neutrophiles activés (Entman 1990). Ce contact cellule-cellule provoque l'endommagement des cardiomyocytes par des enzymes protéolytiques et des molécules cytotoxiques relarguées par les neutrophiles adhérents (Entman 1992). Paradoxalement, les radicaux libres et les enzymes sécrétées par les neutrophiles contribuent aussi à nettoyer les résidus de cellules mortes et les débris matriciels dans la zone infarctée en association avec les macrophages, favorisant ainsi la réparation tissulaire.

2.2.3.3 Les monocytes

Les monocytes circulants migrent dans l'espace extravasculaire et se différencient en macrophages 2 à 3 jours après l'infarctus du myocarde (Gibson 2006). Différents médiateurs comme MCP-1, le complément, TGF- β , et les radicaux libres participent au recrutement

monocytaire dans le site inflammatoire. Ce recrutement est suivi d'une maturation et différenciation des monocytes en macrophages matures. Cette transformation implique des facteurs de croissance tels que GM-CSF et M-CSF dont l'expression a été observée dans les zones d'accumulation et de prolifération macrophagique dans un modèle canin d'infarctus du myocarde (Frangogiannis 2003).

Les macrophages activés ont plusieurs rôles. Ils sont responsables de la phagocytose des cellules mortes, des débris cellulaires et du nettoyage des neutrophiles et des cardiomyocytes apoptotiques. Ils sécrètent aussi des cytokines et des facteurs de croissance régulant les fibroblastes et l'angiogenèse, menant ainsi à la formation d'un tissu d'aspect granuleux fortement vascularisé. De plus, ils contribuent au remodelage matriciel en produisant des MMPs et leurs inhibiteurs.

2.2.3.4 Les mastocytes

Les mastocytes sont des cellules résidentes multifonctionnelles capables de sécréter une large gamme de médiateurs inflammatoires et pro-fibrotiques. Les mastocytes sont localisés à proximité des vaisseaux (Frangogiannis 1999). Comme mentionné précédemment, les mastocytes résidents dans le myocarde dégranulent rapidement après l'infarctus, relarguant ainsi une grande quantité d'histamine et de TNF α (chapitre 2.2.2.1). L'histamine induit l'expression des P-sélectines à la surface des CEs (Asako 1994) alors que le TNF α influence l'expression de cytokines dans le recrutement des monocytes circulants. Des enzymes protéolytiques de type tryptase se retrouvent aussi en grande quantité dans les granules mastocytaires. Les tryptases déclenchent la synthèse de cytokines et de chémokines par les cellules endothéliales (Somasundaram 2005). Par ailleurs, les mastocytes sont une source importante de TGF β , bFGF et VEGF, des facteurs pouvant réguler la croissance des fibroblastes, moduler la matrice extracellulaire et stimuler l'angiogenèse (Shiota 2003).

2.2.3.5 Les fibroblastes

L'environnement inflammatoire provoque la prolifération et l'activation des fibroblastes qui sont la principale source de synthèse de matrice extracellulaire dans la zone infarctée et stimule la formation de néovaisseaux. Quatre à six jours après l'infarctus, des fibroblastes possédant des filaments d'actine (α -SMA) ont été observés dans la cicatrice (Willems 1994). Ces myofibroblastes possèdent la structure et les caractéristiques phénotypiques, notamment l'appareil contractile, des CMLs (Tomasek 2002). La différenciation des fibroblastes en myofibroblastes dépend de différents facteurs comme le TGF β qui régule l'expression de α -

SMA (Desmoulière 1993) et la tension mécanique qui règne dans la cicatrice (MacKenna 2000).

2.2.3.6 Les cellules vasculaires

L'angiogenèse est un phénomène important dans la réparation du tissu myocardique. L'angiogenèse fait référence à la formation de nouveaux capillaires par excroissance cellulaire à partir de micro vaisseaux préexistants (Battegay 1995, Tucker 2006). Ces néovaisseaux permettent de fournir les nutriments et l'oxygène nécessaire à la vie cellulaire. Durant les premières heures qui suivent l'ischémie myocardique, des facteurs pro angiogéniques tels que le « basic fibroblast growth factor » (bFGF) et le « vascular endothelial growth factor » (VEGF), l'angiopoïétine (ang) et le TGF- β sont induits et relargués ce qui a pour effet la croissance des néovaisseaux (Lee 2000, Li 1996). En effet, un large réseau de capillaires nouvellement formés a été observé durant la phase proliférative de la réparation, lui conférant un aspect granuleux (Ren 2002). A ce stade, la paroi de ces vaisseaux n'est composée que d'une simple couche de CE. Les néovaisseaux ayant acquis une maturité par un renforcement lié à des péricytes perdurent dans la phase de maturation alors que le reste du réseau entre en apoptose et disparaît.

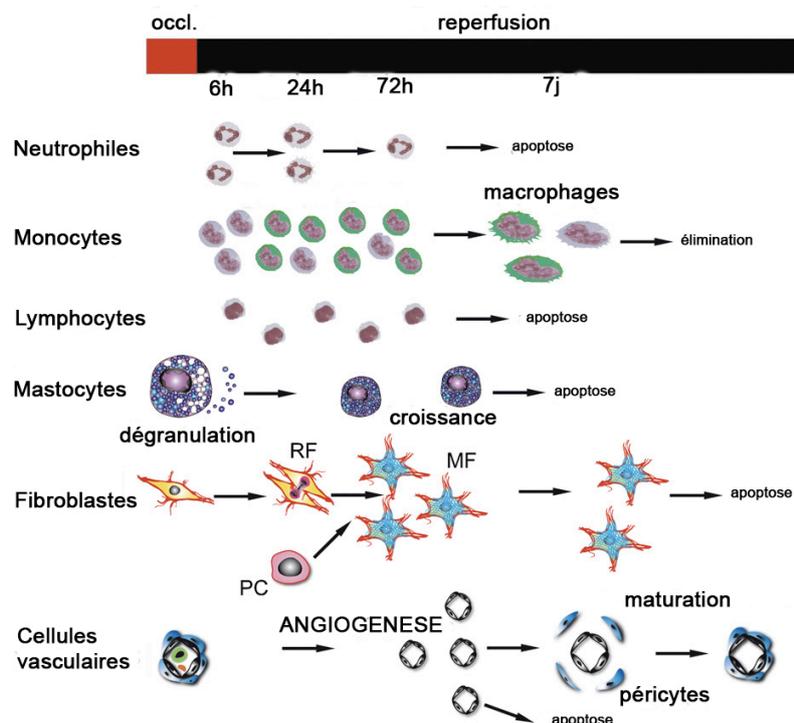


Figure 37

Schéma récapitulatif de l'implication cellulaire dans la réparation post infarctus. RF : fibroblastes résidents ; MF : myofibroblastes ; PC : cellules progénitrices (D'après Frangogiannis 2008).

2.2.3.7 Induction de l'angiogenèse

Par définition, l'oxygénation tissulaire au cœur de l'infarctus du myocarde est très faible. Cette hypoxie tissulaire est le principal stimulus permettant d'induire l'angiogenèse (Shweiki 1992). Le processus angiogénique est aussi modulé par la composition de la matrice extracellulaire et par les adhésions intercellulaires créées grâce aux intégrines (Brooks 1994).

2.2.3.7.1 Induction de l'angiogenèse myocardique par l'hypoxie

L'hypoxie représente le principal stimulus endogène pour l'angiogenèse (Shweiki 1992). L'hypoxie consiste en une diminution de la concentration d'oxygène dans le sang suffisante pour amener des signes d'une oxygénation inadéquate des tissus. Par conséquent, l'angiogenèse permet une adaptation à l'hypoxie en augmentant la perfusion et ainsi l'oxygénation des tissus à travers les microvaisseaux nouvellement formés (Banai 1994). Ce phénomène de compensation est précédé par des changements transcriptionnels. Les « hypoxia-inducible factors » (HIFs) hétérodimériques ont un rôle clé dans l'activation des gènes sensibles à l'hypoxie (Semenza 2001). Dans un tissu bien oxygéné, l'action des HIFs est inhibée par ubiquitination et dégradation protéosomale. Par contre, dans un tissu devenu hypoxique, les HIFs sont activés, se lient rapidement sur le promoteur et induisent la transcription des gènes sensibles à l'hypoxie (Figure 38). Après réoxygénation, les HIFs sont de nouveau régulés négativement (Jewell 2001). Par ailleurs, l'interleukine-1 et PR39 sécrétées par les macrophages permettent d'augmenter l'activité des HIFs (Hellwig-Burgel 1999, Li 2000). Le VEGF est l'une des molécules les plus importantes parmi les molécules dont l'expression est induite par HIF. C'est un hétérodimère appartenant à la famille des facteurs de croissance « knot cystine » et qui possède plusieurs isoformes (VEGF 121, 145, 165, 189 et 206) (Robinson 2001). Deux récepteurs VEGF à tyrosine kinase ont été identifiés, le récepteur VEGF1 (Flt-1) et le récepteur VEGF2 (KDR). Tous deux s'expriment à la surface des cellules endothéliales (Marti 1998) mais ont des effets différents. Le récepteur VEGF1 a une action sur la prolifération et la survie des cellules endothéliales alors que le récepteur VEGF2 n'a pas d'activité mitotique mais aurait un rôle dans l'organisation du système vasculaire durant le développement embryonnaire (Ferrara 2003).

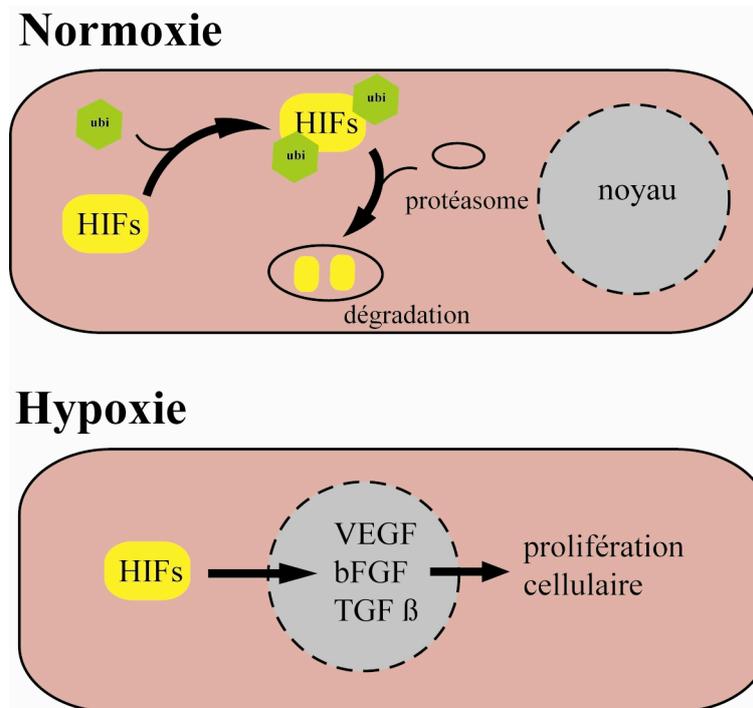


Figure 38

Mécanisme d'action des HIFs en condition normoxique et hypoxique. HIFs :Hypoxia-inducible factors; Ubi : ubiquitine; VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor; bFGF: basic Fibroblast Growth Factor ; TGF β : Transforming Growth Factor β .

2.2.3.7.2 Rôle de la matrice extracellulaire dans l'angiogenèse myocardique

Le processus angiogénique implique plusieurs événements. En premier lieu une dégradation de la membrane basale entourant le vaisseau « mère ». Cette désintégration s'opère grâce à des enzymes protéolytiques comme l'« urokinase-type plasminogen activator (u-PA) et des métalloprotéinases (MMPs) relarguées par les phagocytes résidents (Shapiro 1998, Pepper 2001). Les cellules musculaires lisses vasculaires et les cellules endothéliales prolifèrent ensuite localement et migrent en créant des points d'ancrage sur la matrice extracellulaire notamment grâce aux intégrines.

Les intégrines sont des récepteurs hétérodimériques surfaciques capable de réguler différents phénomènes cellulaires comme l'adhésion, la migration, la prolifération et la survie (Schwartz 1995). De plus, les cellules endothéliales adhèrent entre elles ainsi qu'à la matrice extracellulaire afin de construire et d'étendre le nouveau réseau vasculaire. Il existe 18 sous unités α , 9 sous-unités β différentes et 24 combinaisons des sous unités α et β qui composent cette famille d'intégrines (van der Flier 2001). Parmi toutes ces combinaisons, seules les intégrines $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ et $\alpha_2\beta_1$ ne sont pas exprimées par des cellules quiescentes mais sont surexprimées sur les cellules endothéliales durant l'angiogenèse (Max 1997). L'intégrine $\alpha_v\beta_3$

a été identifiée comme ayant l'un des rôles les plus importants dans la médiation de l'angiogénèse (Brooks 1994). De ce fait, un grand nombre d'investigateurs ont utilisée $\alpha_v\beta_3$ comme cible moléculaire pour le développement d'un traceur de l'angiogénèse.

Récemment, Jin et al. ont montré que les cellules progénitrices circulantes CD34+ provenant de la moelle osseuse sont aussi impliquées dans la réparation tissulaire et la formation de neovaisseaux en pénétrant à l'intérieur du tissu grâce à des interactions VLA-4/VCAM-1 puis en se différenciant en CEs, en cellules hématopoïétiques et autres types cellulaires (Jin 2006). Enfin l'organisation des cellules endothéliales permet de donner au capillaire sa forme cylindrique (Folkman 1992, Carmeliet 2003).

2.2.4 Résolution de la réponse inflammatoire

La réponse inflammatoire décrite précédemment est un phénomène nécessaire pour éliminer les cellules apoptotiques et les débris cellulaires de la zone myocardique infarctie. Cependant, cette inflammation est une phase aigue transitoire qui se termine par l'arrêt de l'infiltration des cellules inflammatoires et qui cède la place à un dépôt de tissu cicatriciel fibreux (Dewald 2004). Cet arrêt de l'infiltration leucocytaire se traduit par l'inhibition de la synthèse de chémokines et de cytokines.

La clairance de l'infiltrat granulocytaire par les phagocytes présents est un prérequis pour la résolution du processus inflammatoire. L'ingestion des cellules apoptotiques par les macrophages a un puissant effet anti-inflammatoire et immunosuppresseur (Savill 2002). En effet, le TGF- β et l'IL-10 sécrétés par les macrophages ayant ingéré les cellules apoptotiques exercent un effet inhibiteur sur les neutrophiles (Byrne 2002). La reconnaissance des cellules apoptotiques et le relargage du TGF- β et de l'Il-10 par les phagocytes passent par différentes voies de signalisation déclenchées par la liaison des ligands aux récepteurs à la phosphatidylsérine, CD36 et $\alpha_v\beta_3$ (Savill 2002).

L'élimination des débris de matrice extracellulaire est aussi un prérequis pour la résolution du processus inflammatoire. Le hyaluronane est un des constituants de la matrice extracellulaire. Il module ses effets sur la réponse inflammatoire via le récepteur membranaire CD44 présent sur la plupart des cellules (Ponta 2003). Le hyaluronane existe sous une forme à poids moléculaire élevé (PM>10000kDa) mais aussi sous forme fragmentée avec un PM faible suite à sa dégradation (Cichy 2003). Taylor et al. ont montré que les fragments de hyaluronane stimulaient l'inflammation à travers la reconnaissance de la blessure par les TLR4 (Taylor

2004). Par conséquent, l'élimination des fragments par les phagocytes contribue à la résolution du phénomène inflammatoire.

La phase proliférative implique les myofibroblastes activés qui produisent des protéines de la matrice extracellulaire ainsi qu'un intense réseau de microvasculaire. Durant la phase de maturation, ces myofibroblastes entrent en apoptose laissant la place à une cicatrice riche en collagène (Frangogiannis 2008).

Différents facteurs influencent la mise en place de ces événements, notamment la reperfusion de la zone ischémisée qui accentue la phase inflammatoire et accélère la réparation tout en réduisant la taille de la cicatrice. En effet, des études ont montré que la mortalité des patients dont le territoire infarcté a été reperfusé à l'aide d'un thrombolytique diminuait de 40% par rapport aux patients dont l'obstruction de l'artère coronaire persistait (Dalen 1988). Cette étude a montré pour la première fois que la reperfusion réalisée rapidement après l'obstruction de l'artère diminuait la nécrose myocardique et augmentait la fonction ventriculaire gauche et par conséquent la survie des patients.

2.2.5 Conclusion

Les études biologiques ont démontré que l'angiogenèse myocardique post-infarctus est un phénomène important initié par l'hypoxie et la réaction inflammatoire en réponse à la nécrose cellulaire. La présence d'angiogenèse est systématique au stade aigu de l'infarctus du myocarde, mais son ampleur peut varier d'un individu à l'autre et sa fonctionnalité est à démontrer (Simons 2003). Plusieurs approches ont alors été mises en place afin de moduler l'angiogenèse myocardique post-infarctus et d'observer l'effet des traitements pro-angiogéniques sur la fonction cardiaque.

3 Modulation de l'angiogenèse myocardique

Différentes stratégies sont évaluées afin de stimuler la formation de nouveaux vaisseaux. Ces stratégies reposent sur l'administration de protéines recombinantes, de plasmides contenant des gènes d'intérêt ou bien de cellules permettant de former un réseau vasculaire dans un environnement adéquat. Ces différentes méthodes ont été testées chez l'animal et certaines molécules ont également été administrées à l'homme dans le cadre d'études cliniques. Celles-ci ont été listées récemment par Renault et al. (Renault 2007).

3.1 *Fonction cardiaque*

La fonction cardiaque est la résultante de caractéristiques myocardiques, d'influences veineuses centrales, de facteurs humoraux, du volume sanguin circulant et de la résistance vasculaire périphérique. Un déterminant essentiel de la fonction cardiaque est la fonction ventriculaire systolique, qui est régulée par 4 mécanismes : la fréquence cardiaque, le pré-charge, la contractilité et la post-charge. Ces 4 mécanismes permettent au cœur de maintenir la perfusion des organes lors de diminution de la fonction ventriculaire. La précharge peut être estimée par la mesure de la pression ou du volume télédiastolique. La post-charge est estimée par la mesure de la pression aortique systolique. La contractilité myocardique est difficile à mesurer sur un plan individuel, mais elle peut être estimée par la mesure de la vitesse de raccourcissement des éléments contractiles. Les méthodes les plus utilisées en clinique pour mesurer la fonction ventriculaire gauche sont l'échocardiographie et la médecine nucléaire, qui permettent de mesurer la fraction d'éjection du ventricule gauche. Des tests d'effort associés à ces techniques d'imagerie ont une valeur pronostique sur l'état des patients. Les études cliniques utilisent ces techniques afin d'évaluer les effets de traitements pro-angiogéniques sur la fonction cardiaque.

3.2 *Thérapie utilisant des protéines recombinantes*

La première stratégie visant à moduler l'angiogénèse myocardique consiste à mimer les cytokines proangiogéniques grâce à des protéines recombinantes (Renault 2007).

3.2.1 *Etudes expérimentales*

Différentes études visant à moduler l'angiogénèse myocardique ont été menées dans des modèles expérimentaux d'ischémie myocardique. En effet, après avoir administré du VEGF à des chiens ayant subi une occlusion de l'artère coronaire circonflexe gauche (LCx) à des doses allant de 2 à 45 µg / jour pendant une durée de traitement d'environ 4 semaines, les investigateurs ont montré une augmentation du flux sanguin collatéral de 40 % grâce à la technique des microsphères (Banai 1994, Harada 1996). Pearlman et al. ont aussi montré une amélioration de la fraction d'éjection (Pearlman 1995). Récemment, Villanueva et al. ont également mis en évidence l'augmentation du flux sanguin collatéral après un traitement au VEGF administré à des chiens ayant subi une occlusion de l'artère coronaire antérieure descendante par échographie de contraste en utilisant des microbulles (Villanueva 2002). Le

bFGF a également fait l'objet d'études expérimentales. En effet, Unger et al. ont montré qu'en injectant 110 µg / jour de bFGF en bolus pendant 4 semaines dans un modèle canin d'occlusion de la LCx, le flux sanguin collatéral était amélioré de 30% (Unger 1994). En augmentant la durée de traitement à 9 semaines ainsi que la dose administrée à 1,74 mg/jour dans un modèle expérimental similaire, Lazarous et al. ont observé une augmentation de 49% de la densité des vaisseaux collatéraux et de 21% du flux sanguin dans ces régions. Les effets bénéfiques les plus convaincants ont été observés entre 1 et 2 semaines de traitement (Lazarous 1995).

3.2.2 Etudes cliniques

Plusieurs études cliniques utilisant des protéines recombinantes ont été menées. L'étude clinique de phase II « VIVA » (VEGF in Ischemia for Vascular Angiogenesis) a consisté à tester le VEGF₁₆₅ recombinant humain en l'administrant par voie intracoronarienne (IC) et intraveineuse (IV) à une cohorte de 178 patients ayant un angor stable et ne convenant pas à une revascularisation standard (Henry 2003). Les résultats n'ont montré aucun bénéfice significatif sur la perfusion myocardique à l'effort chez les patients ayant pris le VEGF à 60 jours après administration d'une faible ($47 \pm 12\%$ (Baseline) vs. $48 \pm 12,3\%$ (60 jours)) ou d'une forte dose ($47 \pm 13\%$ (Baseline) vs. $48 \pm 13,2\%$ (60 jours)). Par contre, une amélioration significative des performances cardiaque à l'effort a été observée à 120 jours chez le groupe ayant pris une forte dose de VEGF₁₆₅ avec une amélioration passant de 30 secondes (60 jours) à 48 secondes (120 jours). Malheureusement, la perfusion myocardique n'a pas été contrôlée à 120 jours en utilisant le ²⁰¹Tl comme cela avait été réalisé à 60 jours. Par ailleurs, l'administration de VEGF₁₆₅ semble être sans risque et bien tolérée puisque aucune hypotension ni protéinurie n'ont été observées.

L'étude clinique de phase II « FIRST » (FGF Initiating Revascularization Trial) a consisté à tester le FGF-2 recombinant, en l'administrant seulement par voie intracardiaque (IC), à une cohorte de 337 patients (Simons 2002). Les résultats montrent d'une part que le FGF-2 recombinant semble être bien toléré et d'autre part, qu'il n'y a aucune amélioration de la perfusion myocardique contrôlée en imagerie SPECT. Une tendance à l'amélioration des symptômes comme la tolérance à l'effort semble voir le jour à 90 jours mais celle-ci disparaît à 180 jours.

Les techniques d'imagerie mises en œuvre afin de mesurer la perfusion myocardique dans chacune de ses études n'ont pas permis de mettre en évidence des différences significatives de

perfusion entre les groupes traités et non traités malgré l'amélioration de la fonction cardiaque observée.

3.3 Thérapie génique

Les cytokines pro angiogéniques peuvent aussi être délivrées par l'intermédiaire de la thérapie génique qui permet la transcription et la traduction de protéines recombinantes dans le tissu cible. Cette technique nécessite l'injection d'un gène d'intérêt accompagné ou non d'un vecteur lui permettant d'atteindre sa cible. Ce transfert de gène peut être réalisé grâce à des méthodes virales et non virales. La thérapie génique peut s'opérer de deux manières différentes (Figure 39). Une voie « in vivo » par injection directe du gène et de son vecteur et une voie « ex vivo » qui consiste à prélever des cellules malades chez le patient, à les mettre en culture en présence d'un rétrovirus contenant le gène à transférer et à réinjecter les cellules modifiées chez ce même patient. Wolff et al. ont montré la faisabilité de la thérapie génique dans le muscle cardiaque murin en injectant un vecteur ADN contenant des gènes codant pour la β -galactosidase ou pour la luciférase directement dans le quadriceps de la souris (Wolff 1990). Des fibres musculaires de couleur bleue sont apparues démontrant l'activité de la galactosidase. De plus l'activité de la luciférase a été observée pendant 2 mois.

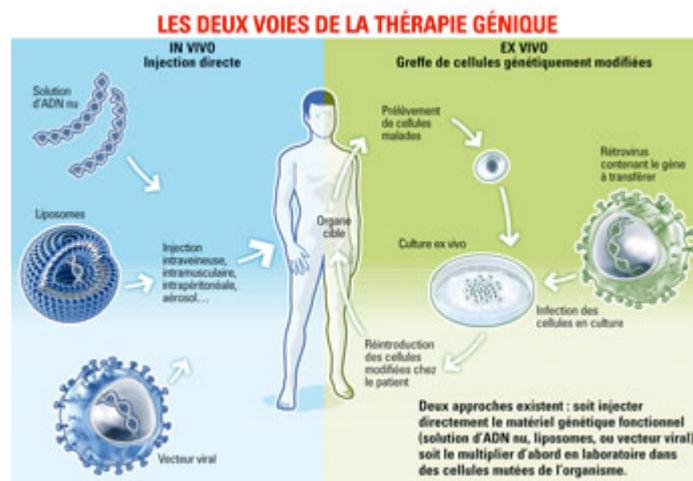


Figure 39

Représentation simplifiée des deux voies utilisées en thérapie génique.

3.3.1 Etudes expérimentales

Le VEGF et le FGF ont fait l'objet d'études expérimentales de thérapie génique. La preuve du concept a été apportée par Giordano et al. qui ont injecté dans un modèle d'ischémie

myocardique chez le cochon un adénovirus de sérotype 2 contenant le gène codant pour le FGF4 (Ad5FGF4) par voie intracoronaire (Giordano 1996). L'expression de l'ARNm et de la protéine ont été observée. Deux semaines après l'injection, le flux sanguin régional a été amélioré en accord avec la présence d'angiogénèse démontrée histologiquement. De plus, les effets ont persisté durant 12 semaines. Récemment, l'injection intramyocardique de plasmides contenant le gène codant pour VEGF₁₆₅ chez le mouton a entraîné une diminution de la taille de la zone infarctée par rapport au groupe contrôle 10 à 15 jours après l'ischémie myocardique (Vera Janavel 2006). De plus, cette réduction de la zone infarctée est corrélée à une augmentation de l'expression du VEGF et de l'angiogénèse. Par ailleurs, l'Ad5FGF4 a aussi été évalué chez des animaux préimmunisés contre l'Ad5FGF4, c'est-à-dire des animaux possédant des anticorps dirigés contre l'Ad5FGF4. Les résultats n'ont pas indiqué de différences par rapport à ceux obtenus avec des animaux non immunisés (Grines 2002).

3.3.2 Etudes cliniques

Plusieurs études cliniques utilisant la thérapie génique ont été menées. Ces essais visaient à évaluer des gènes comme phVEGF₁₆₅ dans l'étude Euroinject One (Kastrup 2005), AdVEGF₁₂₁ dans l'étude REVASC (Stewart 2002) chez des patients ayant un angor stable et n'étant pas retenus pour une revascularisation conventionnelle. La première étude, qui comportait 80 patients, n'a pas montré d'amélioration significative de la perfusion myocardique sous stress 3 mois après traitement entre le groupe phVEGF₁₆₅ et le groupe placebo (44±8% vs. 38±3%, respectivement). La deuxième étude, qui comportait 67 patients, a montré une amélioration du temps de survenue de l'ischémie lors d'un test sur tapis roulant chez les patients traités avec l'AdVEGF₁₂₁. Cependant cette étude n'étant pas menée en aveugle à cause des risques encourus par les patients dus à la chirurgie nécessaire à l'administration du vecteur, on ne peut pas exclure l'effet placebo comme seule cause d'amélioration dans le groupe AdVEGF₁₂₁. Une autre étude nommée « AGENT » (Angiogenic Gene Therapy) a été menée chez 79 patients atteints d'un angor stable à qui un gène codant pour FGF-4 vectorisé par un adénovirus (AdFGF-4) a été administré par voie intramyocardique (Grines 2002). Cette étude n'a montré aucune amélioration significative à l'épreuve du tapis roulant au sein du groupe AdFGF-4 (1,3±2,5 minutes (4 semaines PI) vs. 1,7±2,9 minutes (12 semaines PI) en variation du temps d'exercice). Les résultats obtenus en imagerie de la perfusion myocardique ne diffèrent pas entre le groupe traité et le groupe contrôle (fraction d'éjection : 58,9±12,4% (groupe placebo) vs. 59,1±10,6% (groupe traité)).

Récemment, les résultats de l'essai clinique NORTHERN ont été dévoilés. Cet essai clinique visait à étudier les effets de la thérapie génique du VEGF165 intramyocardique sur des patients ayant effectué un événement coronarien. Cette étude a été réalisée en double aveugle avec placebo sur 7 sites canadiens. Quarante-trois patients ont reçu 2 mg de l'ADN plasmidique du VEGF ou un placebo par voie endocardiaque en utilisant un cathéter NOGA (Stewart 2009). Les résultats ne montrent aucune différence significative de perfusion myocardique observée en imagerie tomographique entre le groupe traité au VEGF et le groupe placebo (21% vs. 20%, respectivement à 6 mois), ainsi que pour les tests d'effort réalisés (6 minutes vs. 6 minutes, respectivement à 6 mois).

Les méthodes utilisées afin de mesurer les effets de la thérapie génique pro angiogénique ne permettent pas de comprendre l'origine exacte des résultats contradictoires obtenus lors de ces différentes études cliniques. En effet, lors de ces études, la fonction cardiaque a été améliorée alors qu'aucune variation de la perfusion myocardique n'a pu être mise en évidence.

3.4 Thérapie cellulaire

Dans le cadre des biothérapies, la thérapie cellulaire vise à soigner des organes par l'apport de cellules particulières. Les types cellulaires les plus utilisés sont les cellules endothéliales progénitrices (CEPs) et les cellules souches mésenchymateuses (CSMs). Les CEPs ont soit été isolées du sang contenu dans le cordon ombilical humain soit sont des mononucléaires de la moelle osseuse ou des cellules souches hématopoïétiques et sont dans tous les cas capables de se différencier en cellules endothéliales. Les CSMs proviennent de la moelle osseuse et du tissu adipeux et possèdent la faculté de pouvoir se différencier en différents types cellulaires. Cette population a pour avantage d'être facile d'obtention et de culture.

3.4.1 Etudes expérimentales

Il a été démontré par Kawamoto et al. qu'une injection IV de CEPs diminuait la taille de l'infarctus, augmentait la densité capillaire et inhibait le remodelage ventriculaire gauche dans un modèle expérimental d'ischémie chez le rat (Kawamoto 2004). D'autres expérimentations menées par la même équipe chez le porc, ont également démontré qu'il était possible d'obtenir une néovascularisation de la zone ischémisée grâce aux CEPs.

3.4.2 Essais cliniques

Assmus et al. ont traité 59 patients victimes d'un infarctus du myocarde aigu par infusion IC de CEPs provenant de la moelle osseuse ou du sang périphérique. Les résultats ont montré une amélioration de la fonction ventriculaire 4 semaines après l'intervention (Schächinger 2004). Ces résultats prometteurs ouvrent la voie à une étude clinique randomisée plus large et menée en double aveugle. Plus récemment, Erbs et al. ont traité 58 patients reperfusés après avoir été victime d'un infarctus aigu du myocarde, avec des cellules progénitrices provenant de la moelle osseuse (Erbs 2007). Les résultats ont montré une restauration de la fonction microvasculaire associée à l'artère concernée par l'infarctus.

3.5 Conclusions

Globalement, la grande majorité des études expérimentales utilisant la thérapie protéique, la thérapie génique ou la thérapie cellulaire ont montré leur efficacité en améliorant la perfusion myocardique post ischémie grâce à l'induction d'angiogénèse. Afin de contrôler la perfusion myocardique des animaux, les investigateurs ont utilisé la technique des microsphères. Cette technique permet d'obtenir des informations sur le débit régional après sacrifice de l'animal et prélèvement d'organes. Il est donc inenvisageable d'utiliser cette technique traumatique chez l'homme. Des études précliniques ont été réalisées visant à corréler des méthodes d'imagerie non invasive avec la technique des microsphères. Cependant, l'emploi de ces outils n'a pas encore été validé.

Les résultats des études cliniques sont plus variables. Plusieurs hypothèses peuvent alors être émises sur l'origine de cette variabilité. Tout d'abord, l'âge de la cohorte de patients choisie peut avoir une influence sur la réponse des traitements pro-angiogéniques. En effet, la capacité d'un individu à développer de nouveaux vaisseaux diminue avec l'âge. Les études décrites précédemment emploient une cohorte de patients âgés dont la faculté à développer un réseau vasculaire est donc diminuée. Ensuite, toutes choses étant égales par ailleurs, les différences génétiques inter-individus peuvent aussi être impliquées dans la capacité d'un individu à développer un réseau vasculaire en réponse à une occlusion artérielle. Ces différences génétiques inter individus peuvent donc intervenir dans la faculté des patients à répondre à un traitement pro-angiogénique. Par ailleurs, aucune variation de la perfusion myocardique n'a été observée dans ces études en utilisant des techniques d'imagerie traditionnelles de la perfusion. La présence et la fonctionnalité du réseau vasculaire généré par la prise de traitement pro-angiogénique reste donc à démontrer. Il n'existe aucune technique

d'évaluation non invasive de l'angiogenèse utilisable chez l'homme. Un traceur ciblant l'angiogenèse myocardique post ischémie permettrait de contrôler les effets d'un traitement pro-angiogénique et de mieux comprendre les mécanismes sous jacents à l'amélioration éventuelle de la fonction cardiaque. Plusieurs approches sont en cours de développement afin de réaliser l'imagerie du phénomène angiogénique.

4 Imagerie de l'angiogenèse

Les techniques d'imagerie de l'angiogenèse se basent sur deux stratégies différentes. Une approche directe des nouveaux vaisseaux formés en ciblant directement des marqueurs moléculaires caractéristiques du phénomène a été utilisée. Cette approche est utilisée essentiellement en médecine nucléaire grâce à la haute sensibilité de cette modalité. Une approche indirecte visant à mesurer les conséquences de l'angiogenèse sur le tissu ischémié et notamment les variations de perfusion myocardique locale a aussi été utilisée. Cette stratégie est employée non seulement en médecine nucléaire mais aussi avec d'autres modalités d'imagerie comme l'IRM et l'échographie.

4.1 Imagerie moléculaire des marqueurs de l'angiogenèse

4.1.1 Imagerie de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

Comme nous l'avons vu ci-dessus, l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est augmentée sur les cellules endothéliales durant l'angiogenèse. De plus cette expression est fondamentale pour la prolifération et la survie de ces cellules. Cette cible est donc un bon candidat pour l'imagerie moléculaire de l'angiogenèse.

Différents traceurs ciblant l'expression d' $\alpha_v\beta_3$ ont été évalués en imagerie scintigraphique SPECT et TEP sur des modèles expérimentaux d'ischémie-reperfusion. Ainsi, Meoli et al. ont évalué dans un modèle d'ischémie-reperfusion chez le rat un radiotracer spécifique d' $\alpha_v\beta_3$, l' $^{111}\text{In-RP748}$ (Meoli 2004). L'imagerie a été réalisée 2 semaines après 45 minutes d'occlusion de l'artère coronaire. Une surexpression d' α_v et de β_3 dans la zone infarctée a été observée par immunohistochimie et la captation du radiotracer dans la zone ischémiée est 2 fois supérieure à la zone normale par comptage du myocarde par prélèvement. Cette équipe a aussi réalisé de l'imagerie in vivo sur un modèle canin d'occlusion coronaire. L' $^{111}\text{In-RP748}$ a été injecté 1 et 3 semaines après l'occlusion. La captation d' $^{111}\text{In-RP748}$ a été maximale au

bout d'une semaine dans les zones faiblement perfusées identifiées grâce au ^{99m}Tc -MIBI (Figure 40).

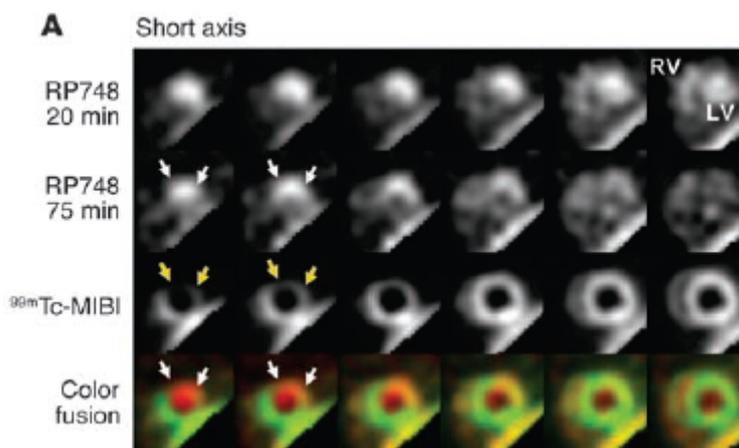


Figure 40

Images tomographique in vivo de coupes petit axe d' ^{111}In -RP748 couplées à des images SPECT de perfusion de ^{99m}Tc -MIBI en coupes petit axe chez le rat. (Meoli 2004)

Des acquisitions tomographiques ont aussi été réalisées par Hua et al. (Hua 2005). Dans cette étude, un modèle murin d'occlusion de l'artère fémorale a été employé. Le radiotracer technétié ^{99m}Tc -NC100692 possédant un motif RGD a été injecté 1, 3, 7 et 14 jours après l'occlusion, une acquisition planaire de 15 minutes a été réalisée après chaque injection. Le pic de captation du traceur a été obtenu à 7 jours.

Récemment, une équipe a réalisé des images TEP après injection d'un traceur fluoré le ^{18}F -galacto-RGD (Higuchi 2008). Les auteurs ont utilisé un modèle expérimental d'ischémie-reperfusion chez le rat. L'occlusion a duré 20 minutes et le radiotracer a été injecté à 1, 2, 7 et 21 jours après. Une acquisition TEP de 30 minutes a été effectuée 1h30 après l'injection. Parallèlement, un traceur de perfusion azoté, le ^{13}N - NH_3 , a également été injecté. Les auteurs ont mesuré un rapport d'activité en ^{18}F -galacto-RGD entre la zone infarctée et normale d'environ 3,5 en autoradiographie. La captation du ^{18}F -galacto-RGD a été observée in vivo dans la zone ischémisée caractérisée par une hypoperfusion en ^{13}N - NH_3 (Figure 41). Ce traceur déjà utilisé en recherche clinique dans le domaine de la cancérologie a été utilisé dans pour une étude de cas. En effet, ce traceur a été injecté chez un sujet âgé de 35 ans deux semaines après la pose d'un stent. L'imagerie de perfusion réalisée avec le ^{13}N - NH_3 a mis en évidence une zone antérolatéral hypoperfusée. L'imagerie de l'angiogénèse réalisée avec le ^{18}F -galacto-RGD a montré une accumulation du traceur dans la zone hypoperfusée. Cependant,

ces résultats sont préliminaires et la méthode reste à être validée avec des cohortes de patients adéquats (Makowski 2008).

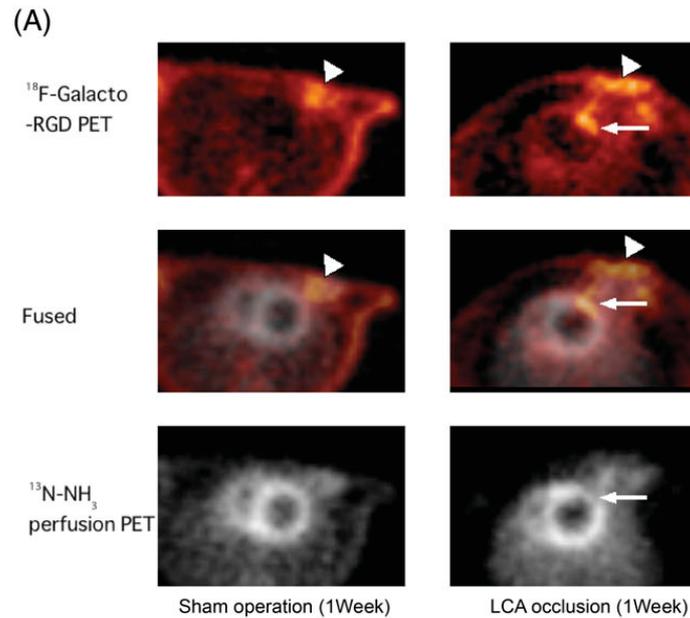


Figure 41

Images TEP en coupes petit axe du [¹⁸F]-galacto-RGD couplées à des images TEP de perfusion utilisant le ¹³N-NH₃ (Higuchi 2008).

4.1.2 Imagerie du VEGF

Le VEGF est le plus important des facteurs angiogéniques dans la régulation de la prolifération et de la survie des CE. L'expression du gène VEGF ainsi que celle des récepteurs au VEGF est fortement amplifiée par l'hypoxie dans le processus angiogénique. De ce fait, les récepteurs du VEGF sont de bons candidats pour l'imagerie de l'angiogénèse dans les tissus ischémiés.

Le VEGF121 recombinant humain radiomarqué à l'indium-111 a été testé dans un modèle expérimental d'ischémie unilatérale des membres inférieurs chez le lapin (Lu 2003). Dix jours après l'occlusion de l'artère fémorale, les images scintigraphiques planaires ont montré une fixation du traceur dans le muscle hypoxié significativement supérieure au muscle controlatéral. Cependant, un rapport de fixation du radiotraceur entre les deux pattes de 1,3 est faible. Récemment, Rodriguez-Porcel et al. ont développé un traceur utilisable en modalité TEP, le ⁶⁴Cu-DOTA-VEGF121 permettant d'imager l'expression des récepteurs VEGF dans un modèle de ligature coronaire chez le rat (Rodriguez-Porcel 2008). Les auteurs ont observé une captation élevée du traceur dans le myocarde 3 jours après l'ischémie ($0,97 \pm 0,05$ % dose injectée/gramme de tissu frais) par rapport à la captation basale ($0,3 \pm 0,07$ % dose

injectée/gramme de tissu frais). Cette forte captation se maintient jusqu'au 17^{ème} jours (Figure 42).

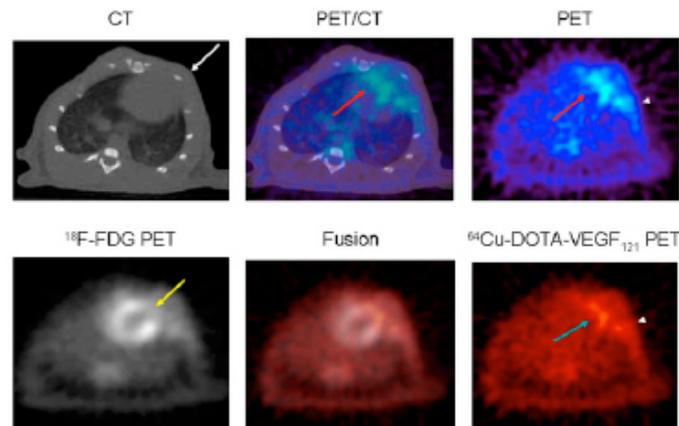


Figure 42

Images représentatives de microCT (à gauche), TEP (à droite) et fusion TEP/CT de myocarde en coupe petit-axe après injection de ⁶⁴Cu-DOTA-VEGF₁₂₁ dans un modèle de ligature coronaire chez le rat (Rodriguez-Porcel 2008).

4.1.3 Imagerie des métalloprotéases

Les MMPs ont un rôle important durant les phénomènes qui se mettent en place en post infarctus. Elles sont responsables du remodelage ventriculaire gauche en dégradant la matrice extracellulaire du myocarde (Creemers 2001). Récemment, Su et al. ont démontré la faisabilité de l'imagerie des MMPs dans un modèle murin d'infarctus du myocarde (Su 2005). Les auteurs ont observé in vivo la fixation du ^{99m}Tc-RP805, une et trois semaines après l'ischémie dans la région infarctée caractérisée par une faible captation en ²⁰¹Tl (Figure 43). Cependant, aucune quantification de images tomographiques n'a été fournie avec l'étude.

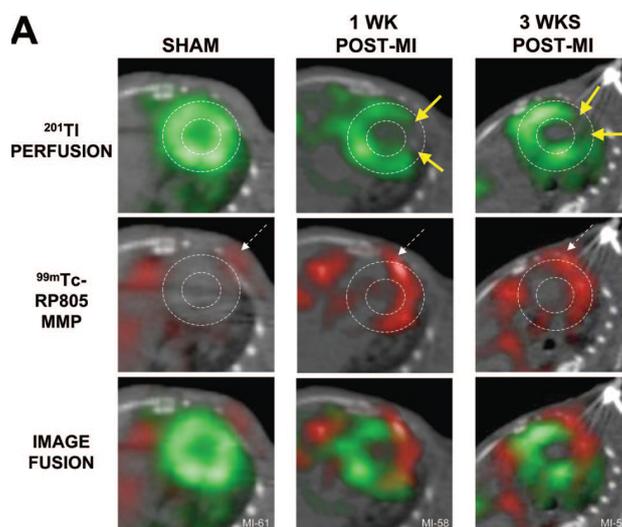


Figure 43

Images microSPECT/CT myocardique en coupes petit axe du ^{99m}Tc -RP805 couplées à des images SPECT de perfusion au ^{201}Tl en coupes petit axe (Su 2005).

4.1.4 Conclusion

Cibles	$\alpha_v\beta_3$				VEGF-R		MMPs
	Rat I/R coronaire	Chien I/R coronaire	Rat I/R coronaire	Souris Ischémie fémorale	Lapin Ischémie fémorale	Rat I/R coronaire	Souris I/R coronaire
Modèles expérimentaux							
Ischémie /Normale	Meoli 2004	Meoli 2004	Higuchi 2008	Hua 2005	Lu 2003	Porcel 2008	Su 2005
Prélèvements d'organes	2	4	-	2,7	2,1	3,2	3,5
autoradiographie	-	-	3,5	-	-	-	-
In vivo	-	1,6	-	1,5	1,3	2,6	-

Tableau 12

Récapitulatifs des principaux rapports obtenus avec les différents radiotraceurs potentiels de l'angiogenèse myocardique.

L'angiogenèse est un phénomène complexe et multiétapes. Différentes stratégies ont été imaginées afin d'imager ce phénomène. Différentes molécules telles que les intégrines, les facteurs de croissance et les MMPs ont été prises pour cible (Tableau 12). De tous les traceurs évalués, le [^{18}F]-galacto-RGD est le plus prometteur et le plus avancé. Cependant, des études

complémentaires sont encore menées. Par conséquent, la recherche de nouveaux traceurs spécifiques de l'angiogenèse myocardique n'est pas encore terminée.

4.2 Imagerie des conséquences physiologiques de l'angiogenèse

Comme décrit précédemment (cf. chapitre 2.2.3.7.1), l'angiogenèse est induit l'hypoxie tissulaire. La conséquence principale de cette angiogenèse est une augmentation locale de la perfusion myocardique induisant une restauration de l'oxygénation tissulaire. Dans ce contexte, la perfusion myocardique et l'hypoxie ont donc été évaluées par différentes modalités.

4.2.1 Imagerie de perfusion

4.2.1.1 Imagerie scintigraphique

Les études cliniques mentionnées précédemment (cf. chapitre 3) ont fait appel à la modalité d'imagerie nucléaire SPECT afin d'observer des variations de la perfusion myocardique mais aucune variation dans la perfusion myocardique n'a été mise en évidence. Pourtant, l'imagerie scintigraphique est une modalité d'imagerie couramment utilisée en clinique afin de d'évaluer la perfusion myocardique des patients. Par ailleurs, l'imagerie SPECT de perfusion permet d'observer les améliorations de perfusion suite à un pontage coronarien ou à une angioplastie (Giedd 2004). Cependant, en admettant que le réseau vasculaire nouvellement formé soit fonctionnel, les changements de perfusion induits par une thérapie angiogénique sont très localisés et de ce fait s'appliquent à des zones restreintes. Selon Simons et al., cette lacune de l'imagerie SPECT dans la détection des petites variations de perfusion myocardique proviendrait essentiellement de sa faible résolution spatiale (Simons 2000).

4.2.1.2 Imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'imagerie par résonance magnétique a aussi été utilisée pour évaluer la perfusion régionale myocardique dans des études cliniques d'angiogenèse. La perfusion est mesurée grâce à un agent de contraste largement répandu, le Gadolinium-DTPA (Mulhing 2003, Klassen 2006). Cet agent de contraste utilisé à temps court reste dans la lumière du vaisseau et donne ainsi des informations sur le flux sanguin. Par contre, à temps long, le gadolinium pénètre dans la paroi du vaisseau et fausse ainsi les informations de perfusion. La haute résolution spatiale de l'IRM est un atout et permet d'observer le flux transmural ainsi que les changements de

perfusion subendocardique. Dans une étude clinique de phase I, Laham et al. ont utilisé l'IRM avec le Gadolinium-DTPA afin de contrôler les effets d'une administration intracoronaire de FGF-2 chez 51 patients souffrant d'une ischémie myocardique (Laham 2000). Les résultats ont montré à la fois une amélioration de la perfusion myocardique régionale indiquée par le gadolinium mais aussi une amélioration de l'épaisseur de la paroi myocardique. Ces données préliminaires démontrent le potentiel de l'IRM pour contrôler l'efficacité des thérapies angiogéniques. Cependant, des études complémentaires sont à mener.

4.2.1.3 Echocardiographie de contraste

Une autre technique d'imagerie non invasive, peu onéreuse et largement disponible dans les services concernés comme l'échocardiographie est aussi utilisée pour évaluer la fonction ventriculaire. L'évaluation de la formation de vaisseaux collatéraux après occlusion coronaire sur un cœur de chien a démontré le potentiel de cette technique (Mills 2000). Dans une autre étude, Villanueva et al. a observé une amélioration du flux sanguin dans les vaisseaux collatéraux après une thérapie pro angiogénique au VEGF, en utilisant l'échocardiographie dans un modèle expérimental canin d'infarctus du myocarde (Villanueva 2002). Cependant, la principale limitation de cette technique reste la grande expérience de l'expérimentateur qu'exige la technique. De plus, l'échocardiographie de contraste n'est pas utilisée en clinique pour évaluer la perfusion myocardique.

4.2.2 Imagerie de l'hypoxie

Comme nous l'avons vu précédemment, l'hypoxie est un puissant stimulus de l'angiogénèse. De ce fait, l'imagerie de l'hypoxie offre une nouvelle méthode dans l'évaluation des conséquences physiologiques de l'angiogénèse. Différentes approches ont été testées en utilisant des dérivés nitroimidazoles radiomarqués au ^{99m}Tc (Sinusas 1999). Les nitroimidazoles sont des composés ayant la faculté d'être retenus par les tissus en hypoxie et pas par les tissus sains (Strauss 1995). En effet, lorsqu'un composé nitroimidazole entre dans une cellule viable, il subit plusieurs réactions. Initialement, la molécule gagne un électron par réaction enzymatique dans le cytoplasme et devient une espèce réactive. En présence d'une quantité adéquate d'oxygène dans la cellule la molécule est réoxydée. Ces réactions se perpétuent jusqu'à ce que la molécule nitroimidazole sorte de la cellule. Par contre, dans les myocytes où la concentration en oxygène est réduite, la réoxydation n'a pas lieu et l'espèce réactive subit de nouvelles réduction et reste piégée dans la cellule. Parmi ces molécules

nitroimidazole, le ^{99m}Tc -BRU-59-21 a été évalué *in vivo* dans un modèle d'occlusion reperfusée chez le cochon (Johnson 2000). Les résultats ont montré une captation du traceur dans la zone à risque chez les animaux injectés 5 et 2 minutes avant l'occlusion.

5 Conclusion

L'augmentation de la durée de vie ainsi que l'amélioration de la qualité de vie par traitements médicamenteux des patients qui ont survécus à la phase aigüe de leur infarctus du myocarde sont des enjeux cliniques importants. En clinique, les stratégies d'imagerie non invasives deviennent nécessaires pour contrôler l'efficacité des traitements pro-angiogéniques.

L'approche consistant à mettre en évidence l'angiogenèse par l'imagerie de marqueurs moléculaires spécifiques reste la plus prometteuse. Différentes études ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ont montré des résultats encourageants dans des modèles expérimentaux d'ischémie/reperfusion myocardique en utilisant la modalité d'imagerie SPECT ou TEP. Cette étude a pour objectif l'évaluation du ^{99m}Tc -RAFT-RGD comme traceur de l'angiogenèse myocardique post infarctus.

Travail expérimental

6 Introduction

Les pathologies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde (Rapport OMS 2008). La majorité de ces décès est dû à la rupture d'une plaque d'athérome vulnérable et à la formation d'un thrombus qui, en oblitérant la lumière d'une artère coronaires, engendre un infarctus du myocarde. Aux Etats-Unis en 2004, on estime à 38 % le nombre de personnes victime d'une attaque cardiaque et qui vont mourir d'insuffisance cardiaque dans les années qui suivent. La prise en charge de ces patients est donc importante afin d'améliorer leur espérance et leur qualité de vie. L'infarctus du myocarde est caractérisé par une nécrose et une apoptose des myocytes qui vont mener à la formation d'une cicatrice, à la dilatation du ventricule gauche et au remodelage de la paroi ventriculaire ce qui peut évoluer à terme vers une insuffisance cardiaque (Sutton 2000, Gheorghiadé 2006). L'angiogenèse est un phénomène important qui est initié par la réaction inflammatoire et par l'hypoxie dans la zone infarctée. L'angiogenèse a pour rôle de soutenir la réaction inflammatoire et ainsi d'améliorer la cicatrisation du myocarde. Différentes thérapies utilisant des cellules souches, des protéines recombinantes et des gènes sont parvenues expérimentalement à induire l'angiogenèse (Kocher 2001, Hao 2007, Okazaki 2007, Chen 2007, Rafii 2003, Hughes 2004, Simons 2003, Freedman 2002). Selon les études expérimentales, l'amplitude de la réponse angiogénique pourrait avoir un impact favorable sur le pronostic vital du patient. L'efficacité des traitements pro angiogéniques a besoin d'être contrôlé. Or, il n'existe à l'heure actuelle aucun outil non-invasif qui ne le permette (Sinusas 2004).

La médecine nucléaire, grâce à sa grande sensibilité, semble adapté pour réaliser l'imagerie de l'angiogenèse myocardique.

Des interactions cellule - cellule et cellule - matrice sont réalisées par les cellules endothéliales durant l'angiogenèse. Ces interactions sont rendues possibles grâce à la présence d'intégrines, des molécules de la famille des récepteurs hétérodimériques composées de sous-unités transmembranaires α et β . L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ joue un rôle majeur lors de l'angiogenèse de par sa surexpression en surface de l'endothélium nouvellement formé (Brooks 1994).

La séquence peptidique cyclique Arg-Gly-Asp (cRGD) se lie spécifiquement à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Ruoslahti 2003) et a permis, après avoir été radiomarqué au [^{18}F] ou $^{99\text{m}}\text{Tc}$, d'imager in vivo l'angiogénèse tumorale (Haubner 2005, Fani 2006). Regioselectivity Addressable Functionalized Template-RGD (RAFT-RGD) est un nouveau composant fait de 4 séquences cRGD montées sur un cyclodécapeptide qui se lie spécifiquement sur l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Boturyn 2004). Sancey et al. ont déjà démontré la faisabilité d'imager in vivo l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans un modèle expérimental d'angiogénèse tumorale avec la molécule tétramérique RAFT-RGD radiomarqué au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Sancey 2007). Récemment, Sancey et al. ont démontré que l'internalisation de la forme monomérique RGD était indépendante à sa fixation sur l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ alors que la forme tétramérique était co-internalisée avec son groupe de récepteur. Ces résultats suggèrent alors une augmentation de l'affinité du ligand pour sa cible dans cette conformation (Sancey 2009). Par conséquent, nous avons évalué le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-RGD dans un modèle expérimental d'angiogénèse myocardique post-infarctus.

7 Matériel & Méthodes

7.1 Synthèse des traceurs

Le RAFT (cyclo[-RGDfK-])₄ (RAFT-RGD) et son contrôle négatif RAFT(cyclo[-RADfK-])₄ (RAFT-RAD) ont été synthétisés selon la méthode déjà décrite par Boturyn et Al. (Boturyn 2004).

7.2 Radiomarquage des traceurs

Le complexe [$^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3$]⁺ a été préparé selon la méthode décrite par Alberto et al. (Alberto 1998). Un (1) mL (~1.85 GBq) de Na^{99m}TcO₄⁻ a été ajouté au kit Isolink® (Mallinckrodt Medical B.V.). La solution est chauffée à 100°C pendant 20 minutes et le pH est ajusté entre 7,0 et 7,5. 1,3 GBq de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Isolink® [$^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3$]⁺ est ajouté dans un tube contenant 100 µl d'une solution de RAFT-RGD ou de RAFT-RAD (0,02 µmol). Après chauffage à 60°C pendant 20 minutes, un contrôle qualité est réalisé en utilisant la chromatographie liquide haute performance avec une colonne RP-C18 (Licrosorb, 5 µm, 4,6 x 250 mm) et un gradient (A, H₂O / acide trifluoroacétique (TFA) (0,1 %); B, acétonitrile / TFA 0,1%). La pureté radiochimique est supérieure à 97% et l'activité spécifique est de 7,4.10⁷ GBq/mol.

7.3 Protocole expérimental

Toutes les expérimentations réalisées lors de cette étude ont été approuvées par le Comité d'éthique du Centre de Recherche du Service de Santé des Armées (CRSSA, autorisation #2006/37.0), Grenoble, France.

7.3.1 Induction de l'angiogenèse myocardique chez le rat

Des rats Wistar mâles ($n = 32$; masse moyenne, 399 ± 9 g) provenant des laboratoires Charles River (Les Oncins, France) ont été utilisés lors de cette étude. Les animaux ont été anesthésiés par une injection intrapéritonéale de Kétamine (10% m/v) et de Xylazine (2% m/v). Ils ont ensuite été intubés et ventilés (Harvard, modèle 683), l'anesthésie étant maintenue avec de l'isoflurane (1,5%).

Chez 29 animaux, une thorcotomie à gauche de l'axe sagittal a été réalisée en condition aseptique au niveau du 4^{ème} espace intercostal. Un collet composé d'un fil de suture 5/0 a été placé autour de l'artère interventriculaire antérieure (IVA gauche, Figure 44) puis serré pendant 45 minutes avant reperfusion. La cage thoracique a été refermée (#2 Tevdek suture, Deknatel, Fall River, MA) et l'isoflurane arrêté. La canule a ensuite été retirée dès que l'animal a pu respirer spontanément.

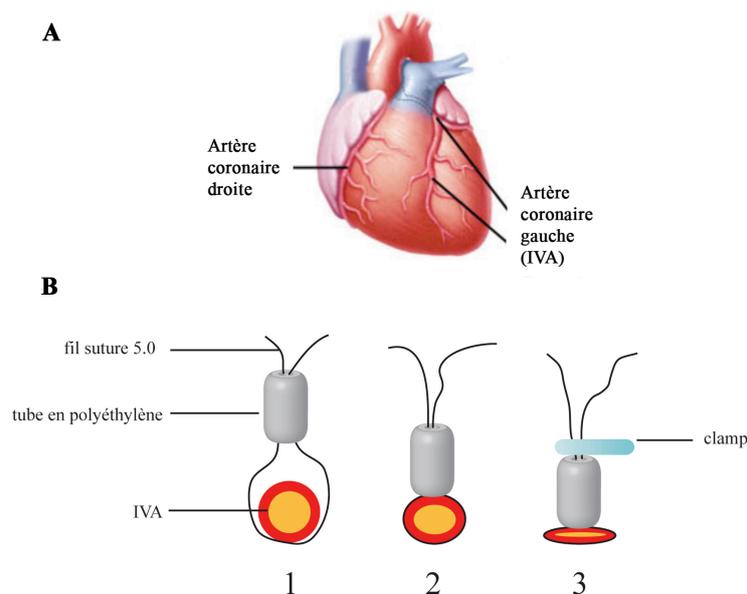


Figure 44

Induction de l'angiogenèse myocardique. (A) Schéma simplifié du cœur sur lequel l'artère interventriculaire antérieure (IVA) est représentée. (B) Mode opératoire d'occlusion de l'IVA. (1) Un fil de suture 5/0 est passé autour de l'artère. Ce dernier est ensuite enfilé à l'intérieur d'un tube en polyéthylène. (2) Le tube va comprimer la paroi artérielle jusqu'à occlusion totale de la lumière du vaisseau. (3) La pression est maintenue par un clamp pendant 45 minutes.

7.4 Imagerie moléculaire de l'angiogenèse myocardique

Quatorze jours après l'infarctus du myocarde reperfusé, les 29 animaux ont été de nouveau anesthésiés comme décrit précédemment.

7.4.1 Biodistribution et imagerie ex vivo

La veine saphène droite a été exposée afin d'injecter le ^{99m}Tc -RAFT-RGD (96 ± 11 MBq ; $n = 11$) ou le ^{99m}Tc -RAFT-RAD (107 ± 30 MBq ; $n = 3$). Les rats ont été euthanasiés 60 minutes après l'injection par une surdose intrapéritonéale de pentobarbital. Ce temps de 60 minutes a été choisi par rapport à la faible activité du ^{99m}Tc -RAFT-RGD sur la base de la cinétique sanguine obtenue sur 3 animaux supplémentaires. Cette cinétique sanguine indique que l'activité circulante du ^{99m}Tc -RAFT-RGD décroît de manière biexponentielle avec $T_{1/2\alpha} = 2,6$ minutes et $T_{1/2\beta} = 230$ minutes (Figure 45). Immédiatement après l'euthanasie, des échantillons de sang et d'organes ont été prélevés, rapidement rincés et pesés pour un comptage gamma.

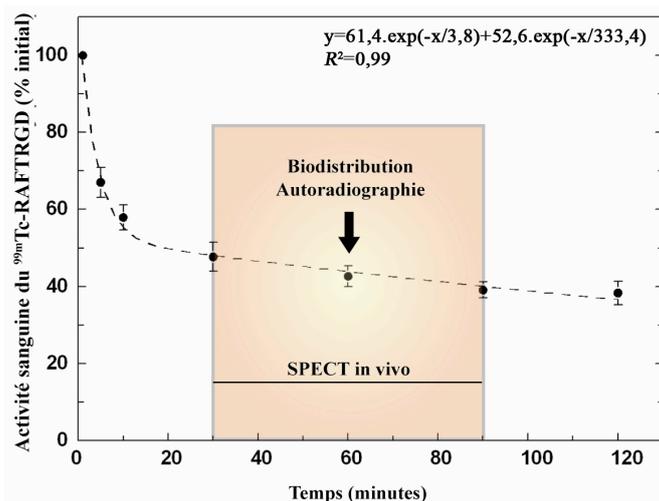


Figure 45

Protocole expérimental basé sur la cinétique sanguine du ^{99m}Tc -RAFT-RGD réalisée chez le rat. La biodistribution et l'autoradiographie ont été réalisées à 60 minutes post injection et l'imagerie SPECT in vivo entre 30 et 90 minutes post injection. L'activité sanguine du ^{99m}Tc -RAFT-RGD dans cette fenêtre de temps ne varie pas. L'activité sanguine est exprimée en pourcentage de l'activité obtenue une minute post injection.

7.4.2 Imagerie SPECT in vivo

Les veines saphènes droite et gauche ont été exposées afin d'injecter simultanément un bolus de ^{201}Tl (37 ± 1 MBq, $n = 11$) et de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-RGD (135 ± 6 MBq, $n = 6$) ou de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-RAD (143 ± 7 MBq, $n = 5$). Trente minutes après l'injection des traceurs, l'imagerie SPECT in vivo double isotope du myocarde a débuté. Le temps total d'acquisition a été de 60 minutes. Cette durée d'acquisition a été centrée à 60 minutes, temps à partir duquel les prélèvements d'organes ont été réalisés (groupe 1). Une gamma-caméra dédiée au petit animal avec un collimateur pinhole de 1mm a été utilisée (Gamma-imager S, Biospace Mesures, Paris, France). Les fenêtres d'énergie étaient 125-150 KeV et 55-85 KeV pour le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ et le ^{201}Tl , respectivement. Les animaux ont été euthanasiés à la fin de l'acquisition comme décrit ci-dessus.

7.5 Analyses postmortem

7.5.1 Immunohistochimie

Quatre animaux ont été dédiés à l'immunomarquage de CD31 et $\alpha_v\beta_3$. Les animaux ont été euthanasiés à l'aide d'une surdose de pentobarbital (Centravet, Lapalisse, France). Le myocarde a été rapidement prélevé, rincé puis congelé dans du 2-méthylbutane refroidi dans de l'azote liquide.

Des coupes petit axe de $6 \mu\text{m}$ d'épaisseur ont été obtenues grâce au cryotome Microm HM 505 E (Francheville, France) puis fixées dans l'acétone froide (-20°C) (Sigma-Aldrich) pendant 20 minutes avant un séchage à l'air ambiant d'environ 1 heure. Après avoir inhibé l'activité peroxydasique endogène et réalisé le blocage avidine/biotine, les coupes ont été dans un premier temps incubées avec un anticorps monoclonal murin anti-CD31 (1/25, BD Biosciences, ref. #550300), un anticorps monoclonal anti- $\alpha_v\beta_3$ (1/50, AbCAM, ref. #ab7166) ou un anticorps monoclonal anti-KiM2R (1/400, BMA Biomedicals, ref. #T-3004) pendant 1 nuit à 4°C , puis dans un second temps avec un anticorps biotinylé de chèvre anti-souris (1/1000, BD Biosciences, ref. #550337) pendant 1 heure à température ambiante. Une solution de streptavidine-peroxydase a ensuite été appliquée sur les échantillons pendant 30 minutes, enfin les coupes ont été colorées à l'aide d'une solution chromogène de diaminobenzidine (DAB, Vector Laboratories). La contre-coloration a été effectuée dans un bain d'hématoxyline (1 minute).

7.5.2 Histologie

Des coupes de 20 µm adjacentes à celles utilisées pour l'immunohistochimie ont été incubées pendant 15 minutes à 37°C dans une solution de Nitroblue Tetrazolium (NBT) (0,04% dans un tampon sodium succinate à 0,05M, pH 7,6) afin de délimiter le tissu infarci.

7.5.3 Biodistribution

Dans le groupe 1, des échantillons de myocarde sain et infarci, de poumon, de foie, de rate, de rein, de muscle squelettique, de graisse, et de sang ont été prélevés, pesés puis passés au compteur gamma en utilisant une fenêtre d'énergie comprise entre 122 et 160KeV (Cobra II, Packard Instruments, Rungis, France). Les comptages obtenus ont été corrigés du bruit de fond et de la décroissance radioactive. Les activités ont ensuite été normalisées à la dose injectée (DI), à la masse de tissu frais et sont exprimées en %DI/g.

7.5.4 Autoradiographie et coloration de la zone infarctée

Des coupes petit axe de 20 µm d'épaisseur ont été obtenues à partir du myocarde prélevé comme décrit précédemment pour l'imagerie autoradiographique (n=3/animal) réalisée à l'aide d'un β-imager (Biospace Mesures, Paris, France). Des coupes de 20 µm d'épaisseur adjacentes à celles utilisées pour l'autoradiographie ont été obtenues pour réaliser une coloration de la zone infarctée avec du NBT comme décrit précédemment. Les échantillons colorés au NBT ont ensuite été numérisés (CanonScan 4200F, Canon). La taille de l'infarctus a ensuite été quantifiée grâce au logiciel ImageJ (NIH) et exprimée en pourcentage de la zone totale du ventricule gauche (%VG). Enfin, cette valeur a été comparée à la zone de captation myocardique du ^{99m}Tc-RAFT-RGD ou ^{99m}Tc-RAFT-RAD déterminée sur une coupe adjacente.

7.6 Analyse des images et quantification

7.6.1 Images autoradiographiques ex vivo (Groupe 1)

Les images autoradiographiques ont été analysées grâce au logiciel β-vision⁺ (Biospace Mesures). Des régions d'intérêt (ROIs) ont été dessinées au niveau des zones normales, intermédiaires (pénombre) et infarctées identifiées par la coloration au NBT. La captation des traceurs a été exprimée en coups/minutes/mm². Le rapport d'activité entre ces différentes

zones a été calculé en faisant la moyenne sur 3 coupes. Les images autoradiographiques ont aussi été utilisées afin de quantifier la zone de captation des traceurs (exprimée en % VG).

7.6.2 Images Tomographiques in vivo (Groupe 2)

La reconstruction des images a été réalisée grâce au logiciel γ -acquisition en utilisant un algorithme de reconstruction « Ordered-Subsets-Expectation-Maximization ». Le traitement des images a été réalisé à l'aide du logiciel Amira®. Des coupes petit axe ont été générées de la base à l'apex du cœur. Ces coupes extraites ont été analysées avec le logiciel γ -vision⁺ (Biospace Mesures). Les activités en ²⁰¹Tl, ^{99m}Tc-RAFT-RGD ou ^{99m}Tc-RAFT-RAD ont été quantifiées au niveau des zones myocardiques infarctées et normale à l'aide de la captation en thallium. Ces données ont permis de déterminer des rapports d'activité in vivo entre la zone infarctée et la zone normale en ²⁰¹Tl, ^{99m}Tc-RAFT-RGD ou ^{99m}Tc-RAFT-RAD.

7.7 Analyse statistique

Les valeurs ont été présentées comme MOYENNE \pm SEM. Les tests statistiques ont été réalisés grâce au logiciel SYSTAT (SPSS, Inc). Les comparaisons entre deux groupes ont été effectuées avec un test *t* de Student pour valeurs non appariées. Les comparaisons au sein d'un même groupe ont fait l'objet d'une analyse de variance. Les valeurs de *P* < 0,05 sont considérées comme statistiquement significatives.

8 Résultats

8.1 Immunohistochimie du CD31, KiM2R et $\alpha_v\beta_3$

Les résultats de l'immunohistochimie de CD31, d' $\alpha_v\beta_3$ et de KiM2R sont présentés sur la Figure 46. L'expression de CD31 a été observée dans les zones normales ainsi qu'en bordure et dans les zones infarctées (b, f, j) identifiées avec la coloration au NBT (a). L'immunomarquage d' $\alpha_v\beta_3$ est observé en bordure et dans les zones infarctées mais pas dans les zones normales du myocarde (c, g, k). La présence de macrophages a été observée en majorité dans la zone en bordure de la zone infarctée (h). Quelques macrophages ont été observés dans la zone infarctée (d). La spécificité de l'immunomarquage a été confirmée par l'absence de coloration en absence d'anticorps primaire (e, i, m).

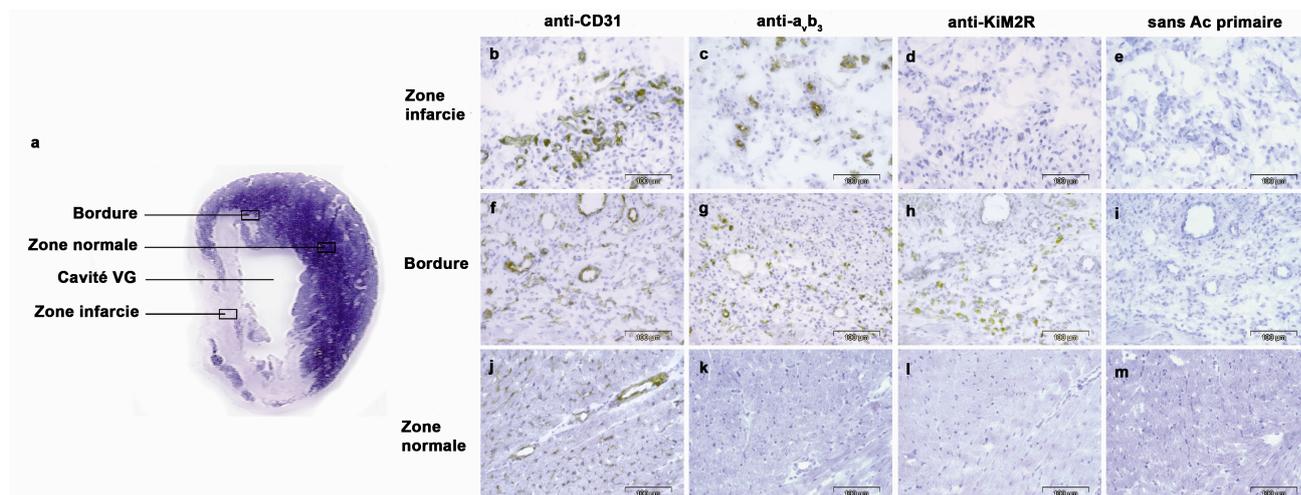


Figure 46

(a) Coloration au NBT de la zone infarctée (blanc) et normale (violet) à partir de coupes petit axe de myocarde. Les rectangles indiquent l'emplacement de la zone infarctée, de la bordure infarctus/zone saine et de la zone saine. Un grossissement de ces zones est représenté à droite (de b à m) afin d'illustrer les résultats obtenus en immunohistochimie. L'expression de CD31 est observée dans la zone infarctée (b), au niveau de la bordure (f) ainsi que dans la zone saine (j), ce qui montre la présence de vaisseaux dans ces zones. Les encadrés c, g et k indiquent que l'expression de $\alpha_v\beta_3$ n'est observée que dans la zone infarctée et dans de la bordure mais pas dans la zone saine, respectivement. La présence de macrophages a été observée en bordure de la zone infarctée (h). Quelques macrophages sont présents dans la zone infarctée (d). La spécificité du marquage a été démontrée par l'absence de coloration en absence d'anticorps primaire (e, i, m).

8.2 Biodistributions du $^{99m}\text{Tc-RAFT-RGD}$ et du $^{99m}\text{Tc-RAFT-RAD}$

Les biodistributions du $^{99m}\text{Tc-RAFT-RGD}$ et du $^{99m}\text{Tc-RAFT-RAD}$ sont présentées dans le Tableau 13. L'élimination du $^{99m}\text{Tc-RAFT-RGD}$ s'effectue principalement par voie rénale alors que l'élimination du $^{99m}\text{Tc-RAFT-RAD}$ se fait majoritairement par voie hépatique. Les captations de $^{99m}\text{Tc-RAFT-RGD}$ et de $^{99m}\text{Tc-RAFT-RAD}$ par les poumons, le foie, le muscle squelettique et la graisse ne sont pas significativement différentes tandis que l'activité sanguine circulante du $^{99m}\text{Tc-RAFT-RGD}$ est légèrement mais significativement plus faible que celle du $^{99m}\text{Tc-RAFT-RAD}$. Des activités similaires en $^{99m}\text{Tc-RAFT-RGD}$ et en $^{99m}\text{Tc-RAFT-RAD}$ ont été observées dans la zone normale. Les activités de ces deux traceurs sont significativement augmentées dans la zone infarctée. Comme le montre la Figure 47, le rapport d'activité en $^{99m}\text{Tc-RAFT-RGD}$ entre la zone infarctée et la zone normale est significativement supérieur à celui du $^{99m}\text{Tc-RAFT-RAD}$ ($2,5 \pm 0,2$ vs. $1,7 \pm 0,1$, respectivement, $p < 0,01$).

Organes	^{99m} Tc-RAFT-RGD	^{99m} Tc-RAFT-RAD
Poumons	0,40±0,04	0,40±0,01
Foie	0,64±0,06	1,20±0,07
Rate	0,40±0,06*	0,23±0,01
Rein	4,74±0,15*	0,23±0,01
Muscle squelet.	0,09±0,01	0,11±0,03
Graisse	0,05±0,01	0,06±0,01
Sang	0,36±0,06*	0,61±0,04
Myocarde		
Zone infarctie	0,42±0,05†*	0,30±0,03†
Zone normale	0,17±0,02	0,18±0,01

* $P < 0,05$ vs. ^{99m}Tc-RAFT-RAD; † $P < 0,05$ vs. zone normale

Tableau 13

Biodistributions de ^{99m}Tc-RAFT-RGD et de ^{99m}Tc-RAFT-RAD 60 minutes après injection des traceurs (% Dose Injectée (DI)/gramme).

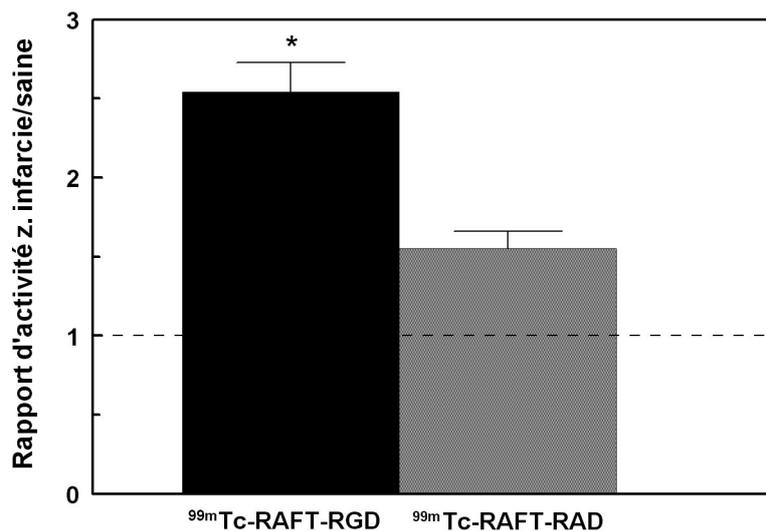


Figure 47

Rapport d'activité entre la zone infarctie et la zone saine obtenue par comptage gamma d'échantillons de myocarde prélevé. * $P < 0,01$ vs. ^{99m}Tc-RAFT-RAD.

8.3 Imagerie moléculaire de l'angiogenèse myocardique avec le ^{99m}Tc -RAFT-RGD

8.3.1 Imagerie autoradiographique ex vivo (Groupe 1)

Des images autoradiographiques représentatives ainsi que les colorations aux NBT correspondantes sont présentés sur la Figure 48. Une forte activité en ^{99m}Tc -RAFT-RGD est observée dans la zone antéro-septale reperfusée avec une faible activité en traceur dans la zone normale. Cette zone de forte activité correspond à la zone infarctée comme le montre la coloration au NBT. De plus, une activité en ^{99m}Tc -RAFT-RGD est aussi visible dans la zone viable adjacente à la zone infarctée. En comparaison, la captation en ^{99m}Tc -RAFT-RAD au niveau de la zone reperfusée est plus faible en taille et en amplitude.

La quantification des images autoradiographiques et de la coloration au NBT indique que le rapport d'activité en ^{99m}Tc -RAFT-RGD entre la zone bordure et la zone normale ainsi que la zone infarctée et normale sont significativement supérieur au rapport obtenu avec le ^{99m}Tc -RAFT-RAD ($1,7\pm 0,5$ vs. $1,1\pm 0,2$ et $4,9\pm 0,4$ vs. $2,2\pm 0,2$, respectivement, $P<0,05$) (Figure 49). De plus, une tendance très marquée vers une zone de captation en ^{99m}Tc -RAFT-RAD plus petite comparée à celle du ^{99m}Tc -RAFT-RGD ($11,5\pm 5,8$ vs. $22,0\pm 1,1$ %VG, respectivement, $P=0,06$) en présence d'un taille d'infarctus similaire a été observée ($20,0\pm 7,0$ vs. $18,2\pm 4,1$ %VG, pour les animaux injectés en ^{99m}Tc -RAFT-RAD et en ^{99m}Tc -RAFT-RGD, respectivement, $P=0,82$).

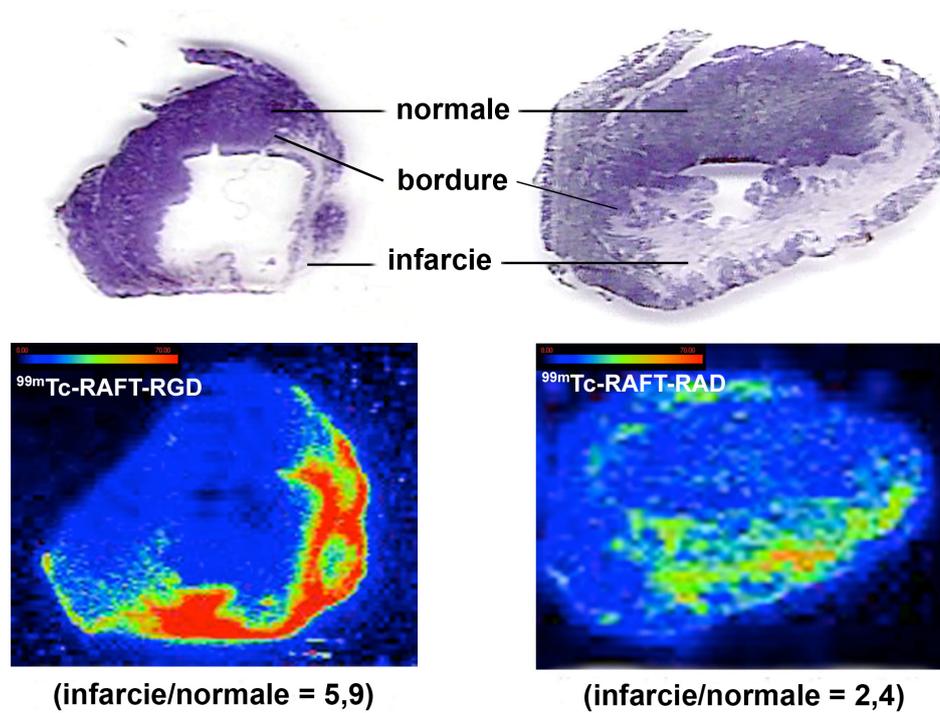


Figure 48

Coloration de la zone infarctie au NBT sur coupes petit axe de myocarde (en haut) et images autoradiographiques correspondantes (en bas) représentant la captation de ^{99m}Tc -RAFT-RGD (à gauche) et de ^{99m}Tc -RAFT-RAD (à droite) sur des coupes adjacentes chez le même animal. Les rapports d'activité entre la zone infarctie et la zone normale sont indiqués entre parenthèses.

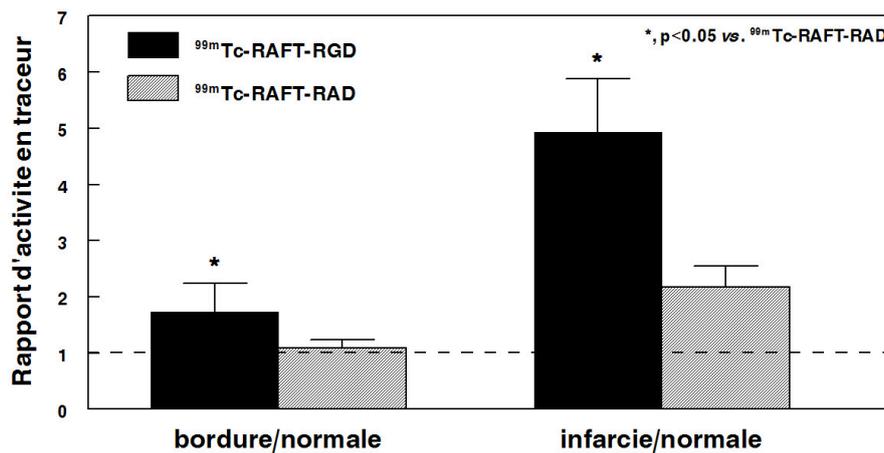


Figure 49

Rapport d'activité entre la zone bordure et la zone normale ainsi que la zone infarctie et la zone normale obtenue après quantification des autoradiographies. * $P < 0,05$ vs. ^{99m}Tc -RAFT-RAD.

8.3.2 Imagerie moléculaire tomographique double isotope in vivo (Groupe 2)

Des coupes sériées petit axe de myocarde, réalisées en imagerie moléculaire tomographique haute résolution in vivo double isotope avec ^{201}Tl et $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-RGD ou $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-RAD sont présentées sur la Figure 50. Le défaut de perfusion en ^{201}Tl délimite la zone infarctée dans laquelle une forte activité en $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-RGD est observée par rapport à la zone saine. A l'inverse, aucune captation préférentielle en $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-RAD n'est observée dans la zone infarctée. Son activité provient essentiellement de la cavité ventriculaire gauche. La quantification des images indique que les rapports d'activité en ^{201}Tl entre la zone infarctée et la zone normale sont similaires chez les animaux ayant reçus du $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-RGD ou du $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-RAD ($0,4\pm 0,0$ vs. $0,4\pm 0,1$, respectivement, $P=\text{NS}$) tandis que le rapport d'activité en $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-RGD entre la zone infarctée et la zone normale est significativement supérieur à celui du $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-RAD ($2,5\pm 0,3$ vs. $1,7\pm 0,3$, respectivement, $P<0,05$) (Figure 51).

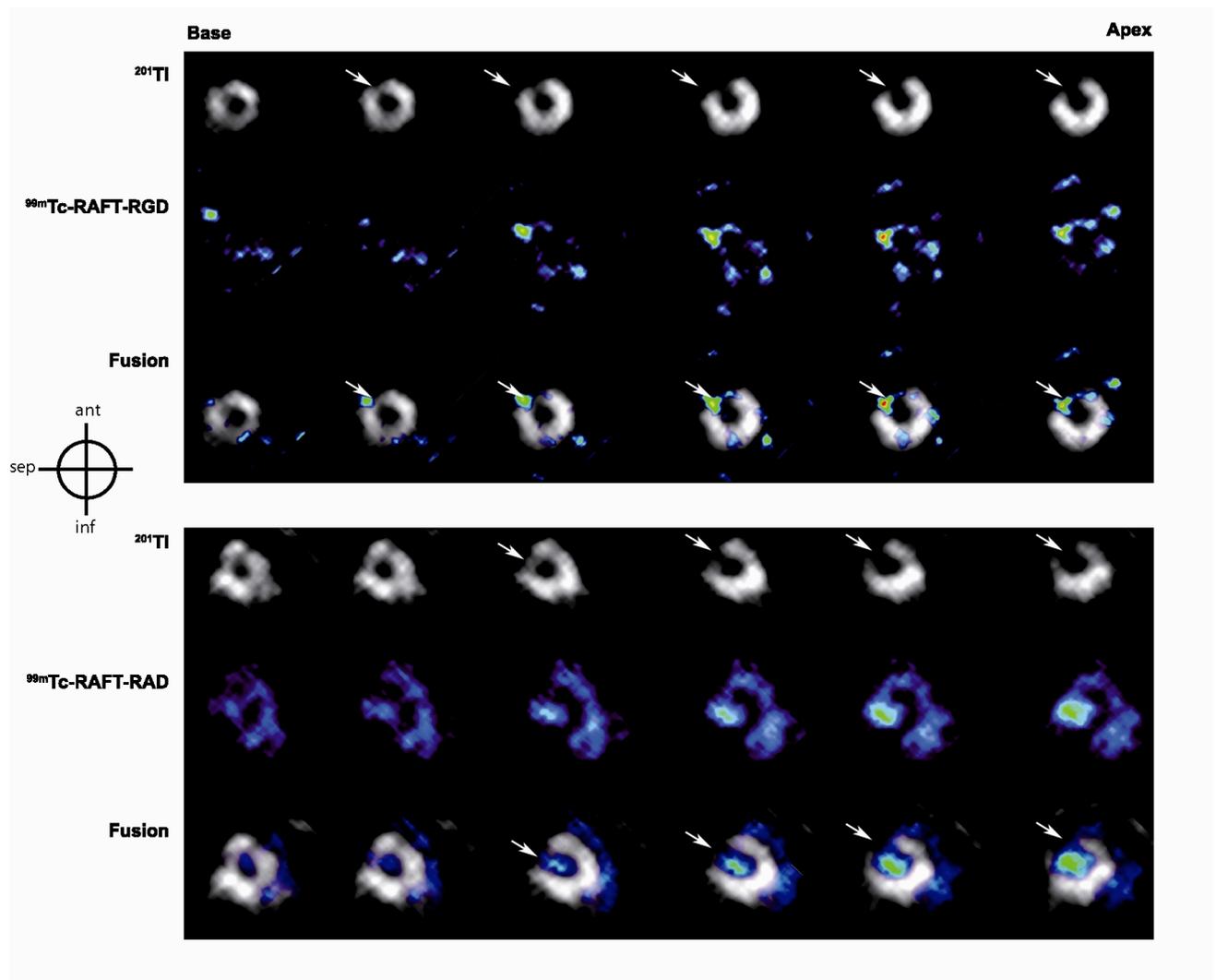


Figure 50

Images SPECT de coupes petit-axe représentatives de la captation myocardique du ^{99m}Tc -RAFT-RGD, du ^{99m}Tc -RAFT-RAD et du ^{201}Tl . Une captation du ^{99m}Tc -RAFT-RGD dans la zone infarctée et reperfusée délimitée par le défaut de captation en ^{201}Tl (flèche) est observée tandis que l'activité du ^{99m}Tc -RAFT-RAD est principalement observée dans la cavité ventriculaire gauche. De plus, des points de forte activité en ^{99m}Tc -RAFT-RGD distincts de la zone infarctée correspondraient à la formation de nouveaux vaisseaux dans des adhérences générées entre le cœur et la cage thoracique à la suite de la perte de péricarde lors de la chirurgie. Paroi ant : antérieure, inf : inférieure, sep : septale.

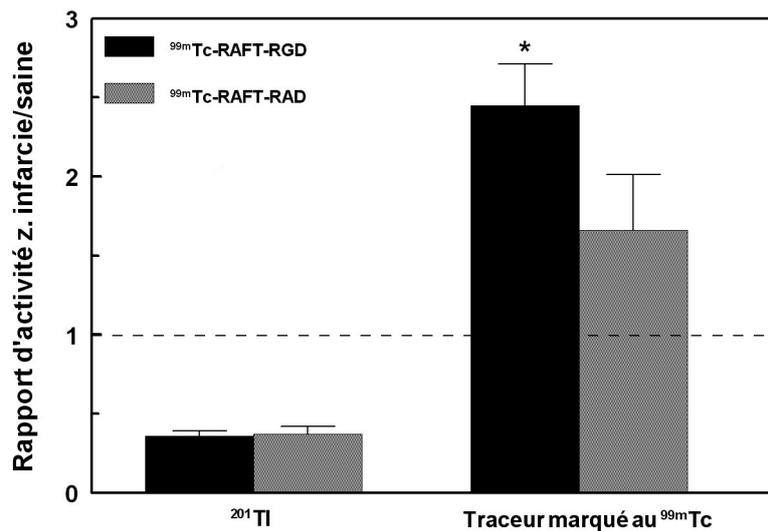


Figure 51

Rapports d'activité entre la zone infarctée et la zone saine en ^{201}Tl , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-RGD et $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-RAD obtenue après quantification des images SPECT in vivo myocardique. * $P < 0,05$ vs. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-RAD.

Le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-RGD a également été injecté dans une population saine de rats jeunes (3 mois) et de rats vieux (24 mois) ayant subi un traitement proangiogénique avec l'administration de VEGF intracardiaque. Les images tomographiques sont présentées sur la Figure 52A et les quantifications correspondantes sur la Figure 52B. Une augmentation significative de la captation en $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-RGD a été observée dans les sites intracardiaques du groupe VEGF jeune et VEGF vieux (flèches) par rapport au groupe contrôle ($p < 0,01$).

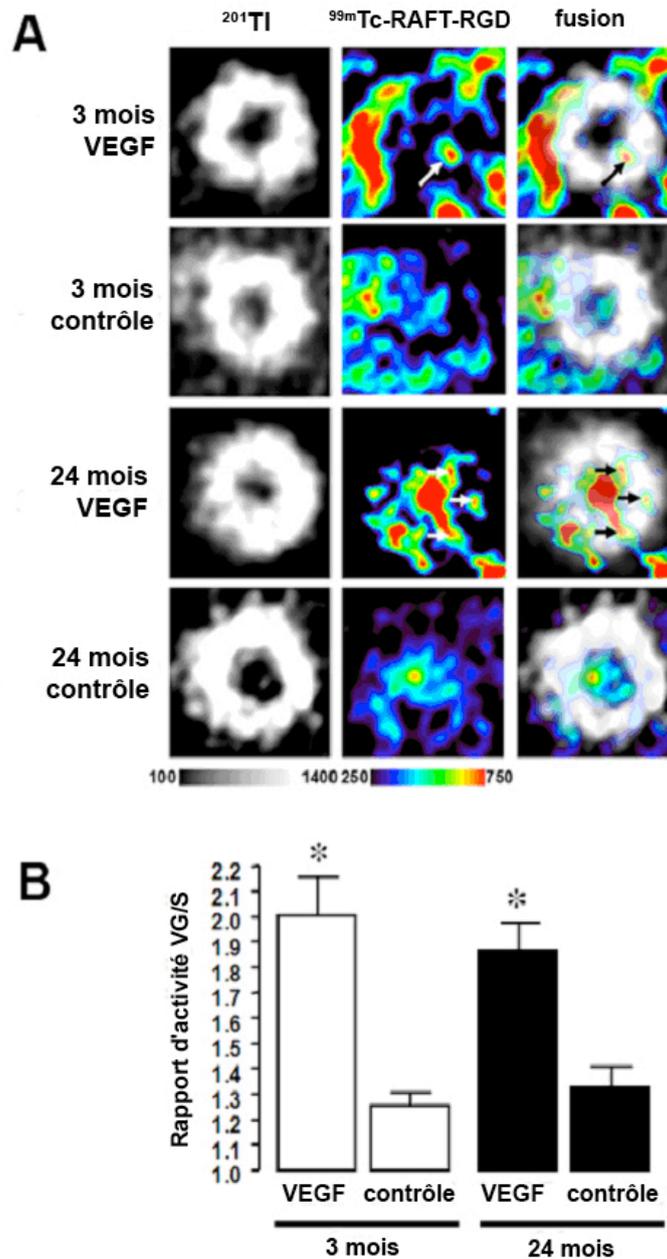


Figure 52

Images SPECT de coupes petit-axe représentatives de la captation myocardique du $^{99\text{m}}\text{Tc-RAFT-RGD}$ et du ^{201}Tl . Une captation du $^{99\text{m}}\text{Tc-RAFT-RGD}$ dans la zone d'administration du VEGF (flèches) est observée sur le ventricule gauche (VG) délimitée par la captation en ^{201}Tl dans les groupes VEGF 3 et 24 mois. Les rapports d'activité entre l'activité en $^{99\text{m}}\text{Tc-RAFT-RGD}$ dans le VG et celle dans le septum (S) indiquent une supériorité de captation en traceur dans les 2 groupes VEGF par rapport à leur groupe contrôle respectif (*, $p > 0,01$).

9 Discussion

Cette étude a montré que le $^{99\text{m}}\text{Tc-RAFT-RGD}$ permet de réaliser l'imagerie moléculaire non invasive in vivo de l'angiogenèse myocardique dans un modèle expérimental d'ischémie myocardique reperfusée.

9.1 Validation du modèle expérimental

Dans ce modèle, l'ischémie reperfusée du myocarde a induit l'angiogenèse en bordure et dans des zones infarciées, comme le montre l'immunohistochimie d' $\alpha_v\beta_3$. L'immunomarquage de CD31 a également révélé la présence de vaisseaux viables dans la zone infarciée, en bordure de cette zone ainsi que dans la zone normale. Ces résultats sont en accord avec Meoli et al. (Meoli 2004). L'immunomarquage $\alpha_v\beta_3$ observé en bordure et dans la zone infarciée peut également être causé par l'expression de l'intégrine par des macrophages infiltrés (Savill 1990). D'ailleurs, l'immunomarquage des macrophages via le marqueur Ki-M2R qui est exprimée uniquement par les macrophages matures, est positif dans la zone en bordure de la zone infarciée et faible au centre de l'infarctus. Ces immunomarquages sont à mettre en parallèle avec les quantifications des images autoradiographiques. En effet, l'activité en traceur est plus élevée dans la zone infarciée qu'en bordure de cette zone (figure 49). De plus, le pic d'accumulation des macrophages dans le tissu a été observé par Sun et al. (Sun 2000) 7 jours post infarctus chez le rat. Dans la présente étude, les expériences ont été réalisées le 14^{ème} jour qui a suivi l'infarctus. Higushi et al. (Higuchi 2008) ont récemment démontré que la captation myocardique de l'agent TEP [¹⁸F]-galacto-RGD corrélait avec la densité vasculaire et non pas avec la quantité de macrophages infiltrés dans un modèle expérimental similaire d'infarctus reperfusé du myocarde chez le rat. Cela suggère que l'angiogenèse représente la principale source pour l'expression d' $\alpha_v\beta_3$ dans les conditions expérimentales de cette étude.

9.2 Choix du traceur de l'angiogenèse

Le cRGD se lie spécifiquement à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Ruoslahti 2003). Il a aussi été montré que les traceurs possédant le cRGD de manière multimérique ont une affinité augmentée pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Dijkgraaf 2007). Le traceur ^{99m}Tc-RAFT-RGD évalué dans cette étude contient 4 cRGD liés sur un cyclodécapeptide (RAFT) et radiomarqué au ^{99m}Tc. La spécificité de liaison du RAFT-RGD à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ en comparaison à celle du RAFT-RAD a déjà été démontrée (Garanger 2006). En effet, des cellules HEK293 surexprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ont été incubées avec du RAFT-RGD ou du RAFT-RAD. Les auteurs ont observé que le RAFT-RGD inhibait l'adhésion des cellules à la vitronectine alors que le RAFT-RAD n'inhibe pas cette adhésion. De plus, la même étude menée sur une lignée cellulaire surexprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_5$ et non $\alpha_v\beta_3$ montre que ni le RAFT-RGD, ni le RAFT-RAD n'inhibe

l'adhésion des cellules à la vitronectine. Récemment, des études menées sur des lignées cellulaires exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ont montré une internalisation du Cy5-RAFT-RGD après fixation sur la forme activée de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Sancey 2009). De plus, les images de fluorescence montrent que le Cy5-RAFT-RGD s'internalise aussi via les intégrines $\alpha_v\beta_3$ situées sur la face libre de la cellule. Ces intégrines sont initialement en conformation inactive. Il semblerait donc que le Cy5-RAFT-RGD se lie aussi sur l'intégrine inactive.

9.3 Biodistribution

Dans cette étude, la biodistribution en ^{99m}Tc -RAFT-RGD et en ^{99m}Tc -RAFT-RAD sont similaires à l'exception des activités rénales et sanguines. Le rapport d'activité en ^{99m}Tc -RAFT-RGD entre la zone infarctée et la zone normale est significativement supérieur à celui du ^{99m}Tc -RAFT-RAD ($2,5 \pm 0,2$ et $1,7 \pm 0,1$, respectivement, $P < 0,01$). Un traceur spécifique de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ marqué à l' ^{111}In (^{111}In -RP748) a récemment été évalué par Meoli et al. (Meoli 2004). Les auteurs ont démontré une activité en ^{111}In -RP748 environ 2 fois plus importante dans la zone ischémique reperfusée en comptage gamma après prélèvement d'organe. Cette valeur est donc comparable à l'augmentation en ^{99m}Tc -RAFT-RGD de 2,5 fois observée dans la présente étude. Par ailleurs, il est à noter qu'un rapport d'activité entre la zone saine et la zone infarctée du myocarde de l'ordre de 2 a aussi été obtenu avec le ^{99m}Tc -cRGD (vs. ^{99m}Tc -RAFT-RGD, $p = \text{NS}$). L'augmentation significative de l'activité en ^{99m}Tc -RAFT-RAD dans les zones ischémiques et reperfusées du myocarde peut être attribuée à la présence d'un œdème interstitiel comme il a déjà été démontré par d'autres (Whalen 1974) et observé récemment dans notre laboratoire (Riou 2007). Cette hypothèse peut être appuyée par des observations sur l'extravasation de traceur contenant le motif RAD en présence d'une perméabilité vasculaire altérée (Mulder 2005). L'activité circulatoire en ^{99m}Tc -RAFT-RAD étant significativement plus élevée que celle du ^{99m}Tc -RAFT-RGD, cela contribue à une plus forte diffusion du contrôle négatif du sang vers l'œdème.

9.4 Imagerie moléculaire ex vivo

L'imagerie moléculaire ex vivo indique une forte captation du ^{99m}Tc -RAFT-RGD dans la zone infarctée siège de l'angiogénèse et non dans la zone normale. On remarque que l'amplitude de captation du ^{99m}Tc -RAFT-RAD est plus faible que celle du ^{99m}Tc -RAFT-RGD. De plus, la captation du ^{99m}Tc -RAFT-RAD reste limitée au centre de la zone infarctée alors que l'expression de $\alpha_v\beta_3$ est localisée dans la zone infarctée ainsi que dans la zone reperfusée.

Par contre, la captation du ^{99m}Tc -RAFT-RGD est observée partout où s'exprime l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, c'est-à-dire dans la partie centrale ainsi que dans les bordures de la zone infarctée. Par conséquent, la captation du ^{99m}Tc -RAFT-RGD correspond aux zones de forte expression d' $\alpha_v\beta_3$. Finalement, le rapport d'activité en ^{99m}Tc -RAFT-RGD entre la zone infarctée et la zone normale est supérieur en imagerie ex vivo et en biodistribution, ce qui est probablement dû au fait qu'un mélange de tissu nécrosé et de tissu normal est prélevé lors des études de biodistribution. L'information obtenue est donc diluée tandis que la sélection des ROIs réalisées sur les autoradiographies est réalisée plus précisément. Le rapport d'activité en ^{99m}Tc -RAFT-RGD entre la zone infarctée et la zone normale ($4,9\pm 0,4$) est comparable à celui observé par Higushi et al. avec un traceur fluoré, le [^{18}F]-Galacto-RGD, 1 ou 3 semaines après la reperfusion dans un modèle expérimental similaire ($3,43\pm 0,57$ et $3,43\pm 0,95$, respectivement) (Higuchi 2008). Par ailleurs, un rapport de $3,3\pm 0,2$ entre les activités des zones normales et infarctées du groupe injecté avec le ^{99m}Tc -RGD a été observé. Ce rapport est significativement inférieur à celui obtenu avec le ^{99m}Tc -RAFT-RGD.

9.5 Imagerie moléculaire tomographique in vivo

Les acquisitions tomographiques double isotope in vivo montrent que les images du ^{201}Tl permettent de localiser la zone infarctée caractérisée par un défaut de perfusion supérieur à 50%. Comme le montre les images fusionnées du ^{201}Tl et du ^{99m}Tc , une activité en ^{99m}Tc -RAFT-RGD est observée dans la zone infarctée (rapport moyen infarct/normale, $2,5\pm 0,3$) alors que l'activité en ^{99m}Tc -RAFT-RAD se trouve principalement dans la cavité ventriculaire gauche. Le résultat est en adéquation avec une activité sanguine significativement plus élevée pour le ^{99m}Tc -RAFT-RAD que pour le ^{99m}Tc -RAFT-RGD (Tableau 13). Pour comparaison, Meoli et al. ont obtenu un rapport d'activité entre la zone infarctée et la zone normale variant entre 1 et 1,6 en réalisant l'imagerie SPECT double isotope ^{111}In -RP748 et ^{99m}Tc -MIBI in vivo chez un modèle canin d'infarctus du myocarde reperfusé (Meoli 2004). Lindsey et al. ont réussi à réaliser l'imagerie SPECT in vivo de la perfusion et de l'angiogénèse en utilisant respectivement le ^{201}Tl et le ^{99m}Tc -NC100692 chez la souris (Lindsey 2006). Cependant, aucune quantification des images SPECT n'a été effectuée, ce qui ne permet pas d'établir de comparaison avec la présente étude. L'étude visant à évaluer l'effet d'une injection intramyocardique de rhVEGF₁₆₅ sur l'angiogénèse chez le rat jeune et vieux a été réalisée en collaboration avec l'équipe de Jean Delbé (EAC CNRS 7249, Paris). Cette étude suggère que la captation de ^{99m}Tc -RAFT-RGD est supérieure aux différents points d'injection du

rhVEGF₁₆₅ par rapport au contrôle et que cette captation a tendance à être plus grande chez le sujet jeune par rapport au sujet âgé ce qui corrobore avec le fait que la réponse angiogénique d'un individu diminue avec l'âge.

9.6 Limitation de l'étude

9.6.1 Etude de la spécificité de fixation

Les études de compétition n'ont pas été réalisées dans cette étude. Cependant, la liaison du RAFT-RGD marqué au Cy5 a déjà été inhibée *in vivo* grâce à une pré-injection de RAFT-RGD ou de cRGD non marqué (Jin 2007). La spécificité de liaison *in vivo* du traceur ^{99m}Tc-RAFT-RGD est difficile à mettre en évidence en raison du fait que l'activité spécifique obtenue avec un marquage au ^{99m}Tc est bien plus faible que celle obtenue après un marquage au Cy5 (Alves 2007). Les études de compétition n'ont, par conséquent, pas été réalisées considérant la grande quantité de traceur froid nécessaire. De plus, d'après l'existence d'une variabilité inter animaux dans les modifications de la zone normale et de la zone reperfusée, une corrélation entre les images *in vivo* et les études histologiques des mêmes animaux aurait apporté des précisions supplémentaires. Finalement, un groupe d'animaux sham n'a pas été expérimenté. Cependant, les expériences contrôles réalisées lors de la présente étude ont consisté à administrer un peptide non spécifique.

10 Conclusion

Le ^{99m}Tc-RAFT-RGD permet de réaliser l'imagerie moléculaire *in vivo* de l'angiogenèse myocardique dans un modèle d'ischémie-reperfusion. Le ^{99m}Tc-RAFT-RGD présente des caractéristiques biologiques meilleures à celles du ^{99m}Tc-cRGD ainsi que celles des traceurs de l'angiogenèse post-infarctus actuellement en développement. D'autres études permettront de déterminer le potentiel du ^{99m}Tc-RAFT-RGD en imagerie clinique de l'angiogenèse, incluant des études de sensibilité faisant appel à des thérapies pro- et anti-angiogénique.

Références bibliographiques

- Abbas** AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. **1996**;383(6603):787-93.
- Achenbach** S, Moselewski F, Ropers D, Ferencik M, Hoffmann U, MacNeill B, Pohle K, Baum U, Anders K, Jang IK, Daniel WG, Brady TJ. Detection of calcified and noncalcified coronary atherosclerotic plaque by contrast-enhanced, submillimeter multidetector spiral computed tomography: a segment-based comparison with intravascular ultrasound. *Circulation*. **2004**;109(1):14-7.
- Acton** SL, Scherer PE, Lodish HF, Krieger M. Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J Biol Chem*. **1994**;269(33):21003-9.
- Akira** S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. **2004**;4(7):499-511.
- Alberto** R, Schilibi R, Egli A, Schubiger PA, Abram U, Kaden TA. A novel organometallic aqua-complex of technetium for the labeling of biomolecules: Synthesis of $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH})_2(\text{CO})_3]^+$ from $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ in aqueous solution and its reaction with bifunctional ligands. *J Am Chem Soc*. **1998**;120:7987-7988.
- Allport** JR, Muller WA, Luscinskas FW. Monocytes induce reversible focal changes in vascular endothelial cadherin complex during transendothelial migration under flow. *J Cell Biol*. **2000**;148(1):203-16.
- Aloya** R, Shirvan A, Grimberg H, Reshef A, Levin G, Kidron D, Cohen A, Ziv I. Molecular imaging of cell death in vivo by a novel small molecule probe. *Apoptosis*. **2006**;11:2089-101.
- Alves** S, Correia JD, Gano L, Rold TL, Prasanphanich A, Haubner R, Rupprich M, Alberto R, Decristoforo C, Santos I, Smith CJ. In vitro and in vivo evaluation of a novel $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -pyrazolyl conjugate of cyclo-(Arg-Gly-Asp-d-Tyr-Lys). *Bioconj Chem*. **2007**;18:530-537.
- Amirbekian** V, Lipinski MJ, Briley-Saebo KC, Amirbekian S, Aguinaldo JG, Weinreb DB, Vucic E, Frias JC, Hyafil F, Mani V, Fisher EA, Fayad ZA. Detecting and assessing macrophages in vivo to evaluate atherosclerosis noninvasively using molecular MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2007**;104(3):961-6.
- Asako** H, Kurose I, Wolf R, DeFrees S, Zheng ZL, Phillips ML, Paulson JC, Granger DN. Role of H1 receptors and P-selectin in histamine-induced leukocyte rolling and adhesion in postcapillary venules. *J Clin Invest*. **1994**;93(4):1508-15.
- Austin** MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC, Krauss RM. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA*. **1988**;260(13):1917-21.
- Babinska** A, Azari BM, Salifu MO, Liu R, Jiang XC, Sobocka MB, Boo D, Al Khoury G, Deitch JS, Marmur JD, Ehrlich YH, Kornecki E. The F11 receptor (F11R/JAM-A) in atherothrombosis: overexpression of F11R in atherosclerotic plaques. *Thromb Haemost*. **2007**;97(2):272-81.
- Banai** S, Jaklitsch MT, Shou M, et al. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation* **1994**;89:2183-9.
- Banchereau** J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. **1998**;392(6673):245-52.
- Barkhausen** J, Ebert W, Heyer C, Debatin JF, Weinmann HJ. Detection of atherosclerotic plaque with Gadofluorine-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation*. **2003**;108(5):605-9.
- Barreiro** O, Yanez-Mo M, Serrador JM, Montoya MC, Vicente-Manzanares M, Tejedor R, Furthmayr H, Sanchez-Madrid F. Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *J Cell Biol*. **2002**;157(7):1233-45.
- Battagay** EJ. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J Mol Med*. **1995** Jul;73(7):333-46.
- Bavendiek** U, Libby P, Kilbride M, Reynolds R, Mackman N, Schonbeck U. Induction of tissue factor expression in human endothelial cells by CD40 ligand is mediated via activator protein 1, nuclear factor kappa B, and Egr-1. *J Biol Chem*. **2002** 277:25032-25039.
- Bauer** C, Bauder-Wuest U, Mier W, Haberkorn U, Eisenhut M. ^{131}I -labeled peptides as caspase substrates for apoptosis imaging. *J Nucl Med*. **2005**;46:1066-74.
- Bazan** JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*. **1997**;385(6617):640-4.
- Beg** AA. Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends Immunol*. **2002**;23(11):509-12.
- Birdsall** HH, Green DM, Trial J, Youker KA, Burns AR, MacKay CR, LaRosa GJ, Hawkins HK, Smith CW, Michael LH, Entman ML, Rossen RD. Complement C5a, TGF-beta 1, and MCP-1, in sequence, induce migration of monocytes into ischemic canine myocardium within the first one to five hours after reperfusion. *Circulation*. **1997**;95(3):684-92.

Références bibliographiques

- Biwa T, Sakai M, Matsumura T, Kobori S, Kaneko K, Miyazaki A, Hakamata H, Horiuchi S, Shichiri M.** Sites of action of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase are distinct in oxidized low density lipoprotein-induced macrophage proliferation. *J Biol Chem.* **2000**;275(8):5810-6.
- Blank A, Alexandrowicz G, Muchnik L, Tidhar G, Schneiderman J, Virmani R, Golan E.** Miniature self-contained intravascular magnetic resonance (IVMI) probe for clinical applications. *Magn Reson Med.* **2005**;54(1):105-12.
- Bobryshev YV.** Dendritic cells in atherosclerosis: current status of the problem and clinical relevance. *Eur Heart J.* **2005**;26(17):1700-4.
- Bogen S, Pak J, Garifallou M, Deng X, Muller WA.** Monoclonal antibody to murine PECAM-1 (CD31) blocks acute inflammation in vivo. *J Exp Med.* **1994**;179(3):1059-64.
- Boggs KP, Rock CO, Jackowski S.** Lysophosphatidylcholine and 1-Octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine inhibit the CDPcholine pathway of phosphatidylcholine synthesis at the CTP: phosphocholine cytidyltransferase step. *J Biol Chem.* **1995**;270: 7757–7764.
- Boisvert WA, Santiago R, Curtiss LK, Terkeltaub RA.** A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest.* **1998**;101(2):353-63.
- Boisvert WA, Rose DM, Johnson KA, Fuentes ME, Lira SA, Curtiss LK, Terkeltaub RA.** Up-regulated expression of the CXCR2 ligand KC/GRO- α in atherosclerotic lesions plays a central role in macrophage accumulation and lesion progression. *Am J Pathol.* **2006**;168(4):1385-95.
- Bond M, Sala-Newby GB, Newby AC.** Focal adhesion kinase (FAK)-dependent regulation of S-phase kinase-associated protein-2 (Skp-2) stability. A novel mechanism regulating smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem.* **2004**;279(36):37304-10.
- Borén J, Gustafsson M, Skälén K, Flood C, Innerarity TL.** Role of extracellular retention of low density lipoproteins in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* **2000**;11(5):451-6.
- Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF.** Decreased lesion formation in CCR2 $^{-/-}$ mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* **1998**;394(6696):894-7.
- Boturyn D, Coll JL, Garanger E, Favrot MC, Dumy P.** Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis. *J Am Chem Soc.* **2004**;126:5730-5739.
- Boyle JJ, Wilson B, Bicknell R, Harrower S, Weissberg PL, Fan TP.** Expression of angiogenic factor thymidine phosphorylase and angiogenesis in human atherosclerosis. *J Pathol.* **2000**;192(2):234–242.
- Breyholz HJ, Schäfers M, Wagner S, Höltnke C, Faust A, Rabeneck H, Levkau B, Schober O, Kopka K.** C-5-disubstituted barbiturates as potential molecular probes for noninvasive matrix metalloproteinase imaging. *J Med Chem.* **2005**;48:3400-3409.
- Breyholz HJ, Wagner S, Levkau B, Schober O, Schäfers M, Kopka K.** A 18F-radiolabeled analogue of CGS 27023A as a potential agent for assessment of matrix-metalloproteinase activity in vivo. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* **2007**;51(1):24-32.
- Brezinski ME, Tearney GJ, Bouma BE, et al.** Imaging of coronary artery microstructure (in vitro) with optical coherence tomography. *Am J Cardiol.* **1996**;77:92–93.
- Brezinski ME, Tearney GJ, Bouma BE, et al.** Optical coherence tomography for optical biopsy: properties and demonstration of vascular pathology. *Circulation* **1996**;93:1206–13.
- Broisat A, Riou LM, Ardisson V, Boturyn D, Dumy P, Fagret D, Ghezzi C.** Molecular imaging of vascular cell adhesion molecule-1 expression in experimental atherosclerotic plaques with radiolabelled B2702-p. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* **2007**;34(6):830-40.
- Brooks P, Montgomery A, Rosenfeld M, et al.** Integrin $\alpha v \beta 3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* **1994**;79:1157-64.
- Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA.** Requirement of vascular integrin $\alpha V \beta 3$ for angiogenesis. *Science.* **1994**;264:569-571.
- Brown MS, Goldstein JL.** A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* **1986**;232(4746):34-47.
- Brown MS, Goldstein JL.** A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1999**;96(20):11041-8.
- Bryant M.** Texas A&M University. Department of Biochemistry and Biophysics. Review of lipoproteins. **2003**. <http://www.tamu.edu/classes/bich/bmiles/lectures/Lipid%20Transport.pdf>.
- Bujak M, Dobaczewski M, Chatila K, Mendoza LH, Li N, Reddy A, Frangogiannis NG.** Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling. *Am J Pathol.* **2008**;173(1):57-67.
- Bural GG, Torigian DA, Chamroonrat W, Houseni M, Chen W, Basu S, Kumar R, Alavi A.** FDG-PET is an effective imaging modality to detect and quantify age-related atherosclerosis in large arteries. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* **2008**;35(3):562-9.
- Byrne A, Reen DJ.** Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. *J Immunol.* **2002**;168(4):1968-77.

Références bibliographiques

- Cai JM**, Hatsukami TS, Ferguson MS, Small R, Polissar NL, Yuan C. Classification of human carotid atherosclerotic lesions with in vivo multicontrast magnetic resonance imaging. *Circulation*. **2002**;106(11):1368-73.
- Camera M**, Giesen PL, Fallon J, Aufiero BM, Taubman M, Tremoli E, Nemerson Y. Cooperation between VEGF and TNF-alpha is necessary for exposure of active tissue factor on the surface of human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **1999**;19:531-537.
- Caplan BA**, Schwartz CJ. Increased endothelial cell turnover in areas of in vivo Evans Blue uptake in the pig aorta. *Atherosclerosis*. **1973**;17(3):401-17.
- Carlos TM**, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*. **1994**;84(7):2068-101.
- Carmeliet P**. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* **2003**;9:653-60.
- Casscells W**, Hathorn B, David M, Krabach T, Vaughn WK, McAllister HA, Bearman G, Willerson JT. Thermal detection of cellular infiltrates in living atherosclerotic plaques: possible implications for plaque rupture and thrombosis. *Lancet*. **1996**;347(9013):1447-51.
- Castrillo A**, Joseph SB, Vaidya SA, Haberland M, Fogelman AM, Cheng G, Tontonoz P. Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Mol Cell*. **2003**;12(4):805-16.
- Cermak J**, Key NS, Bach RR, Balla J, Jacob HS, Vercellotti GM. C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor. *Blood*. **1993**; 82:513-520.
- Chatzizisis YS**, Coskun AU, Jonas M, Edelman ER, Feldman CL, Stone PH. 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(25):2379-93.
- Chatelain P**, Latour JG, Tran D, de Lorgeril M, Dupras G, Bourassa M. Neutrophil accumulation in experimental myocardial infarcts: relation with extent of injury and effect of reperfusion. *Circulation*. **1987**;75(5):1083-90.
- Checovich WJ**, Bolger RE, Burke T. Fluorescence polarization--a new tool for cell and molecular biology. *Nature*. **1995**;375(6528):254-6.
- Chen Z**, Siu B, Ho YS, Vincent R, Chua CC, Hamdy RC, Chua BH. Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol*. **1998**;30(11):2281-9.
- Chen H**, Li D, Saldeen T, Mehta JL. Transforming growth factor-beta(1) modulates oxidatively modified LDL-induced expression of adhesion molecules: role of LOX-1. *Circ Res*. **2001**;89(12):1155-60.
- Chen J**, Tung CH, Mahmood U, Ntziachristos V, Gyurko R, Fishman MC, Huang PL, Weissleder R. In vivo imaging of proteolytic activity in atherosclerosis. *Circulation*. **2002**;105(23):2766-71.
- Chen M**, Masaki T, Sawamura T. LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacol Ther*. **2002**;95(1):89-100.
- Chen LL**, Yin H, Huang J. Inhibition of TGF-beta1 signaling by eNOS gene transfer improves ventricular remodeling after myocardial infarction through angiogenesis and reduction of apoptosis. *Cardiovasc Pathol*. **2007**;16:221-230.
- Cheng C**, Tempel D, van Haperen R, van Damme L, Algür M, Krams R, de Crom R. Activation of MMP8 and MMP13 by angiotensin II correlates to severe intra-plaque hemorrhages and collagen breakdown in atherosclerotic lesions with a vulnerable phenotype. *Atherosclerosis*. **2009**. [Epub ahead of print].
- Cirillo P**, Cali G, Golino P, Calabro P, Forte L, De Rosa S, Pacileo M, Ragni M, Scopacasa F, Nitsche L, Chiariello M. Tissue factor binding of activated factor VII triggers smooth muscle cell proliferation via extracellular signal-regulated kinase activation. *Circulation*. **2004**;109: 2911-2916.
- Cichy J**, Puré E. The liberation of CD44. *J Cell Biol*. **2003**;161(5):839-43.
- Clarke SE**, Hammond RR, Mitchell JR, Rutt BK. Quantitative assessment of carotid plaque composition using multicontrast MRI and registered histology. *Magn Reson Med*. **2003**;50(6):1199-208.
- Clarke MC**, Littlewood TD, Figg N, Maguire JJ, Davenport AP, Goddard M, Bennett MR. Chronic apoptosis of vascular smooth muscle cells accelerates atherosclerosis and promotes calcification and medial degeneration. *Circ Res*. **2008**;102(12):1529-38.
- Collins RG**, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med*. **2000**;191(1):189-94.
- Collins T**, Cybulsky MI. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest*. **2001**;107:255-64.
- Combadière C**, Potteaux S, Gao JL, Esposito B, Casanova S, Lee EJ, Debré P, Tedgui A, Murphy PM, Mallat Z. Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation*. **2003**;107(7):1009-16.
- Correia LC**, Atalar E, Kelemen MD, Ocali O, Hutchins GM, Fleg JL, Gerstenblith G, Zerhouni EA, Lima JA. Intravascular magnetic resonance imaging of aortic atherosclerotic plaque composition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **1997**;17(12):3626-32.
- Couffinhal T**, Kearney M, Witzensichler B, Chen D, Murohara T, Losordo DW, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) in normal and atherosclerotic human arteries. *Am J Pathol*. **1997**;150(5):1673-1685.

- Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ.** Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res* **2001**;89:201–10.
- Cunningham SA, Rodriguez JM, Arrate MP, Tran TM, Brock TA.** JAM2 interacts with alpha4beta1. Facilitation by JAM3. *J Biol Chem* **2002**;277(31):27589-92.
- Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr.** Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* **1991**;251(4995):788-91.
- Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS.** A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* **2001**;107(10):1255-62.
- Dalen JE, Gore JM, Braunwald E, Borer J, Goldberg RJ, Passamani ER, Forman S, Knatterud G.** Six- and twelve-month follow-up of the phase I Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) trial. *Am J Cardiol* **1988**;62(4):179-85.
- Dansky HM, Charlton SA, Harper MM, Smith JD.** T and B lymphocytes play a minor role in atherosclerotic plaque formation in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**;94(9):4642-6.
- Davies MJ.** Anatomic features in victims of sudden coronary death. Coronary artery pathology. *Circulation* **1992**;85(1 Suppl):I19-24.
- Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, Kyriakopoulos A.** The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol* **1993**;171(3):223-9.
- Dawber TR, Moore FE, Mann GV.** Coronary heart disease in the Framingham study. *Am J Public Health Nations Health* **1957**;47(4 Pt 2):4-24.
- De Franco AC, Nissen SE.** Coronary intravascular ultrasound: implications for understanding the development and potential regression of atherosclerosis. *Am J Cardiol* **2001** 21;88:7M-20M.
- Del Prete G, De Carli M, Lammel RM, D'Elisio MM, Daniel KC, Giusti B, Abbate R, Romagnani S.** Th1 and Th2 T-helper cells exert opposite regulatory effects on procoagulant activity and tissue factor production by human monocytes. *Blood* **1995**;86:250–257.
- DeMaria AN, Narula J, Mahmud E, Tsimikas S.** Imaging vulnerable plaque by ultrasound. *J Am Coll Cardiol* **2006**;47(8 Suppl):C32-9.
- De Nigris F, Lerman LO, Rodriguez-Porcel M, De Montis MP, Lerman A, Napoli C.** C-myc activation in early coronary lesions in experimental hypercholesterolemia. *Biochem Biophys Res Commun* **2001**;281:945–50.
- Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G.** Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* **1993**;122(1):103-11.
- Dewald O, Ren G, Duerr GD, Zoerlein M, Klemm C, Gersch C, Tincey S, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG.** Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *Am J Pathol* **2004**;164(2):665-77.
- Dijkgraaf I, Kruijzer JA, Liu S, Soede AC, Oyen WJ, Corstens FH, Liskamp RM, Boerman OC.** Improved targeting of the alpha(v)beta(3) integrin by multimerisation of RGD peptides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2007**;34:267-273.
- Ding ZM, Babensee JE, Simon SI, Lu H, Perrard JL, Bullard DC, Dai XY, Bromley SK, Dustin ML, Entman ML, Smith CW, Ballantyne CM.** Relative contribution of LFA-1 and Mac-1 to neutrophil adhesion and migration. *J Immunol* **1999**;163(9):5029-38.
- Dinkelborg LM, Duda SH, Hanke H, Tepe G, Hilger CS, Semmler W.** Molecular imaging of atherosclerosis using a technetium-99m-labeled endothelin derivative. *J Nucl Med* **1998**;39:1819-22.
- Dollery CM, Libby P.** Atherosclerosis and proteinase activation. *CardiovascRes* **2006**;69:625– 635.
- Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD.** The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest* **1998**;102(1):145-52.
- Dörge H, Schulz R, Belosjorow S, Post H, van de Sand A, Konietzka I, Frede S, Hartung T, Vinten-Johansen J, Youker KA, Entman ML, Erbel R, Heusch G.** Coronary microembolization: the role of TNF-alpha in contractile dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* **2002**;34(1):51-62.
- Drake TA, Hannani K, Fei HH, Lavi S, Berliner JA.** Minimally oxidized low-density lipoprotein induces tissue factor expression in cultured human endothelial cells. *Am J Pathol* **1991**;138:601– 607.
- Dreyer WJ, Michael LH, Nguyen T, Smith CW, Anderson DC, Entman ML, Rossen RD.** Kinetics of C5a release in cardiac lymph of dogs experiencing coronary artery ischemia-reperfusion injury. *Circ Res* **1992**;71(6):1518-24.
- Dufourcq P, Louis H, Moreau C, Daret D, Boisseau MR, Lamazière JM, Bonnet J.** Vitronectin expression and interaction with receptors in smooth muscle cells from human atheromatous plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **1998**;18(2):168-76.
- Dunn S, Vohra RS, Murphy JE, Homer-Vanniasinkam S, Walker JH, Ponnambalam S.** The lectin-like oxidized low-density-lipoprotein receptor: a pro-inflammatory factor in vascular disease. *Biochem J* **2008**;409:349-55.
- Elices MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyj S, Hemler ME, Lobb RR.** VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* **1990**;60(4):577-84.

- Elmaleh** DR, Narula J, Babich JW, Petrov A, Fischman AJ, Khaw BA, Rapaport E, Zamecnik PC. Rapid noninvasive detection of experimental atherosclerotic lesions with novel ^{99m}Tc-labeled diadenosine tetraphosphates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1998**;95:691-5.
- Elrayess** MA, Webb KE, Flavell DM, Syväne M, Taskinen MR, Frick MH, Nieminen MS, Kesäniemi YA, Pasternack A, Jukema JW, Kastelein JJ, Zwinderman AH, Humphries SE. A novel functional polymorphism in the PECAM-1 gene (53G>A) is associated with progression of atherosclerosis in the LOCAT and REGRESS studies. *Atherosclerosis*. **2003**;168(1):131-8.
- Endemann** G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*. **1993**;268(16):11811-6.
- Entman** ML, Youker K, Shappell SB, Siegel C, Rothlein R, Dreyer WJ, Schmalstieg FC, Smith CW. Neutrophil adherence to isolated adult canine myocytes. Evidence for a CD18-dependent mechanism. *J Clin Invest*. **1990**;85(5):1497-506.
- Entman** ML, Youker K, Shoji T, Kukielka G, Shappell SB, Taylor AA, Smith CW. Neutrophil induced oxidative injury of cardiac myocytes. A compartmented system requiring CD11b/CD18-ICAM-1 adherence. *J Clin Invest*. **1992**;90(4):1335-45.
- Erbs** S, Linke A, Schächinger V, Assmus B, Thiele H, Diederich KW, Hoffmann C, Dimmeler S, Tonn T, Hambrecht R, Zeiher AM, Schuler G. Restoration of microvascular function in the infarct-related artery by intracoronary transplantation of bone marrow progenitor cells in patients with acute myocardial infarction: the Doppler Substudy of the Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction (REPAIR-AMI) trial. *Circulation*. **2007**;116(4):366-74.
- Eto** M, Kozai T, Cosentino F, Joch H, Luscher TF. Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways. *Circulation*. **2002**;105:1756–1759.
- Fani** M, Psimadas D, Zikos C, Xanthopoulos S, Loudos GK, Bouziotis P, Varvarigou AD. Comparative evaluation of linear and cyclic ^{99m}Tc-RGD peptides for targeting of integrins in tumor angiogenesis. *Anticancer Res*. **2006**;26:431–434.
- Faust** A, Wagner S, Law MP, Hermann S, Schnöckel U, Keul P, Schober O, Schäfers M, Levkau B, Kopka K. The nonpeptidyl caspase binding radioligand (S)-1-(4-(2-[¹⁸F]Fluoroethoxy)-benzyl)-5-[1-(2-methoxymethylpyrrolidinyl)sulfonyl]isatin ([¹⁸F]CbR) as potential positron emission tomography-compatible apoptosis imaging agent. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. **2007**;51:67-73.
- Fayad** ZA, Fuster V, Fallon JT, Jayasundera T, Worthley SG, Helft G, Aguinaldo JG, Badimon JJ, Sharma SK. Noninvasive in vivo human coronary artery lumen and wall imaging using black-blood magnetic resonance imaging. *Circulation*. **2000**;102(5):506-10.
- Ferrara** N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* **2003**;9:669–76.
- Fisher** SA, Langille BL, Srivastava D. Apoptosis during cardiovascular development. *Circ Res*. **2000**;87(10):856-64.
- Folkman** J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* **1992**;267:10931-4.
- Foteinos** G, Hu Y, Xiao Q, Metzler B, Xu Q. Rapid endothelial turnover in atherosclerosis-prone areas coincides with stem cell repair in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. **2008**;117(14):1856-63.
- Frangogiannis** NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, Bressler RB, Mendoza LH, Spengler RN, Smith CW, Entman ML. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation*. **1998**;98(7):699-710.
- Frangogiannis** NG, Burns AR, Michael LH, Entman ML. Histochemical and morphological characteristics of canine cardiac mast cells. *Histochem J*. **1999**;31(4):221-9.
- Frangogiannis** NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovascular Research*. **2002**;53:31–47.
- Frangogiannis** NG, Mendoza LH, Ren G, Akrvakis S, Jackson PL, Michael LH, Smith CW, Entman ML. MCSF expression is induced in healing myocardial infarcts and may regulate monocyte and endothelial cell phenotype. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2003**;285(2):H483-92.
- Frangogiannis** NG. The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid Redox Signal*. **2006**;8(11-12):1907-39.
- Frangogiannis** NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res*. **2008**. [Epub ahead of print].
- Frantz** S, Vincent KA, Feron O, Kelly RA. Innate immunity and angiogenesis. *Circ Res* **2005**;96(1):15–26.
- Frantz** S, Ertl G, Bauersachs J. Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. **2007**;4(8):444-54.
- Freedman** SB, Isner JM. Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease. *Ann Intern Med*. **2002**;136:54-71.
- Frei** B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1988**;85(24):9748-52.
- Fujimoto** JG, Boppart SA, Tearney GJ, et al. High resolution in vivo intra-arterial imaging with optical coherence tomography. *Heart*. **1999**;82:128–133.

Références bibliographiques

- Fujimoto S**, Hartung D, Ohshima S, Edwards DS, Zhou J, Yalamanchili P, Azure M, Fujimoto A, Isobe S, Matsumoto Y, Boersma H, Wong N, Yamazaki J, Narula N, Petrov A, Narula J. Molecular imaging of matrix metalloproteinase in atherosclerotic lesions: resolution with dietary modification and statin therapy. *J Am Coll Cardiol.* **2008**;52(23):1847-57.
- Fujimura Y**, Hwang PM, Trout Iii H, Kozloff L, Imaizumi M, Innis RB, Fujita M. Increased peripheral benzodiazepine receptors in arterial plaque of patients with atherosclerosis: An autoradiographic study with [(3)H]PK 11195. *Atherosclerosis.* **2008** Mar 14. [Epub ahead of print].
- Furie MB**, Tancinco MC, Smith CW. Monoclonal antibodies to leukocyte integrins CD11a/CD18 and CD11b/CD18 or intercellular adhesion molecule-1 inhibit chemoattractant-stimulated neutrophil transendothelial migration in vitro. *Blood.* **1991**;78(8):2089-97.
- Fuster V**, Fayad ZA, Badimon JJ. Acute coronary syndromes: biology. *Lancet.* **1999**;353 Suppl 2:SI15-9.
- Fuster V**, Moreno PR. Atherothrombosis as a systemic, often silent, disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* **2005**;2(9):431.
- Galis ZS**. Vulnerable plaque: the devil is in the details. *Circulation.* **2004**;110(3):244-6.
- Gallucci RM**, Simeonova PP, Matheson JM, Kommineni C, Gurjel JL, Sugawara T, Luster MI. Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice. *FASEB J.* **2000**;14(15):2525-31.
- Garanger E**, Boturnyn D, Coll JL, Favrot MC, Dumy P. Multivalent RGD synthetic peptides as potent alphaVbeta3 integrin ligands. *Org Biomol Chem.* **2006**; 4:1958-1965.
- Gawaz M**, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest.* **2005**;115(12):3378-84.
- Gebuhrer V**, Murphy JF, Bordet JC, Reck MP, McGregor JL. Oxidized low-density lipoprotein induces the expression of P-selectin (GMP140/PADGEM/CD62) on human endothelial cells. *Biochem J.* **1995**;306 (Pt 1):293-8.
- Gheorghide M**, Sopko G, De Luca L, Velazquez EJ, Parker JD, Binkley PF, Sadowski Z, Golba KS, Prior DL, Rouleau JL, Bonow RO. Navigating the crossroads of coronary artery disease and heart failure. *Circulation.* **2006**; 114:1202-1213.
- Gibson WJ**, Gibson CM. The association of impaired myocardial perfusion and monocytosis with late recovery of left ventricular function following primary percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J.* **2006**;27(21):2487-8.
- Giedd KN**, Bergmann SR. Myocardial perfusion imaging following percutaneous coronary intervention: the importance of restenosis, disease progression, and directed reintervention. *J Am Coll Cardiol.* **2004**;43(3):328-36.
- Gilles S**, Zahler S, Welsch U, Sommerhoff CP, Becker BF. Release of TNF-alpha during myocardial reperfusion depends on oxidative stress and is prevented by mast cell stabilizers. *Cardiovasc Res.* **2003**;60(3):608-16.
- Ginsberg MH**, Du X, Plow EF. Inside-out integrin signalling. *Curr Opin Cell Biol.* **1992**;4(5):766-71.
- Giordano FJ**, Ping P, McKirnan MD, Nozaki S, DeMaria AN, Dillmann WH, Mathieu-Costello O, Hammond HK. Intracoronary gene transfer of fibroblast growth factor-4 increases blood flow and contractile function in an ischemic region of the heart. *Nat Med.* **1996**;2(5):534-9.
- Glagov S**, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med.* **1987**;316(22):1371-5.
- Glass CK**, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell.* **2001**;104(4):503-16.
- Godbole AS**, Lu X, Guo X, Kassab GS. NADPH oxidase has a directional response to shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2009**;296(1):H152-8.
- Goldstein JL**, Brown MS. Molecular medicine. The cholesterol quartet. *Science.* **2001**;292(5520):1310-2.
- Gordon JR**, Galli SJ. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature.* **1990**;346(6281):274-6.
- Grainger DJ**, Metcalfe JC, Grace AA, Mosedale DE. Transforming growth factor-beta dynamically regulates vascular smooth muscle differentiation in vivo. *J Cell Sci.* **1998**;111 (Pt 19):2977-88.
- Greaves DR**, Häkkinen T, Lucas AD, Liddiard K, Jones E, Quinn CM, Senaratne J, Green FR, Tyson K, Boyle J, Shanahan C, Weissberg PL, Gordon S, Ylä-Herttua S. Linked chromosome 16q13 chemokines, macrophage-derived chemokine, fractalkine, and thymus- and activation-regulated chemokine, are expressed in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2001**;21(6):923-9.
- Griendling KK**, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation.* **2003**;108(16):1912-6.
- Grines CL**, Watkins MW, Helmer G, Penny W, Brinker J, Marmur JD, West A, Rade JJ, Marrott P, Hammond HK, Engler RL. Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation.* **2002**;105(11):1291-7.
- Gumina RJ**, el Schultz J, Yao Z, Kenny D, Warltier DC, Newman PJ, Gross GJ. Antibody to platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 reduces myocardial infarct size in a rat model of ischemia-reperfusion injury. *Circulation.* **1996**;94(12):3327-33.

Références bibliographiques

- Gupta S, Pablo AM, Jiang X, Wang N, Tall AR, Schindler C.** IFN-gamma potentiates atherosclerosis in Apo E knock-out mice. *J Clin Invest.* **1997**;99(11):2752-61.
- Guillén I, Blanes M, Gómez-Lechón MJ, Castell JV.** Cytokine signaling during myocardial infarction: sequential appearance of IL-1 beta and IL-6. *Am J Physiol.* **1995**;269(2 Pt 2):R229-35.
- Hahn C, Schwartz MA.** Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2009**;10(1):53-62.
- Haider N, Hartung D, Fujimoto S, Petrov A, Kolodgie FD, Virmani R, Ohshima S, Liu H, Zhou J, Fujimoto A, Tahara A, Hofstra L, Narula N, Reutelingsperger C, Narula J.** Dual molecular imaging for targeting metalloproteinase activity and apoptosis in atherosclerosis: molecular imaging facilitates understanding of pathogenesis. *J Nucl Cardiol.* **2009**;16(5):753-62.
- Hamilton AJ, Huang SL, Warnick D, Rabbat M, Kane B, Nagaraj A, Klegerman M, McPherson DD.** Intravascular ultrasound molecular imaging of atheroma components in vivo. *J Am Coll Cardiol.* **2004** Feb 4;43(3):453-60.
- Hamm CW, Bertrand M, Braunwald E.** Acute coronary syndrome without ST elevation: implementation of new guidelines. *Lancet.* **2001**;358(9292):1533-8.
- Han DK, Haudenschild CC, Hong MK, Tinkle BT, Leon MB, Liao G.** Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol.* **1995**;147(2):267-77.
- Han KH, Tangirala RK, Green SR, Quehenberger O.** Chemokine receptor CCR2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis in human monocytes. A regulatory role for plasma LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **1998**;18(12):1983-91.
- Han KH, Chang MK, Boullier A, Green SR, Li A, Glass CK, Quehenberger O.** Oxidized LDL reduces monocyte CCR2 expression through pathways involving peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Clin Invest.* **2000**;106(6):793-802.
- Hansson GK.** Cell-mediated immunity in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* **1997**;8(5):301-11.
- Hansson GK.** Mechanisms of disease - Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* **2005**;352:1685-1695.
- Hao X, Mansson-Broberg A, Grinnemo KH, Siddiqui AJ, Dellgren G, Brodin LA, Sylvén C.** Myocardial angiogenesis after plasmid or adenoviral VEGF-A(165) gene transfer in rat myocardial infarction model. *Cardiovasc Res.* **2007**; 73:481-487.
- Harada K, Friedman M, Lopez JJ, Wang SY, Li J, Prasad PV, Pearlman JD, Edelman ER, Sellke FW, Simons M.** Vascular endothelial growth factor administration in chronic myocardial ischemia. *Am J Physiol.* **1996**;270(5 Pt 2):H1791-802.
- Harry BL, Sanders JM, Feaver RE, Lansey M, Deem TL, Zarbock A, Bruce AC, Pryor AW, Gelfand BD, Blackman BR, Schwartz MA, Ley K.** Endothelial cell PECAM-1 promotes atherosclerotic lesions in areas of disturbed flow in Apo E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2008**;28(11):2003-8.
- Hartung D, Sarai M, Petrov A, Kolodgie F, Narula N, Verjans J, Virmani R, Reutelingsperger C, Hofstra L, Narula J.** Resolution of apoptosis in atherosclerotic plaque by dietary modification and statin therapy. *J Nucl Med.* **2005**;46:2051-6.
- Hartung D, Petrov A, Haider N, Fujimoto S, Blankenberg F, Fujimoto A, Virmani R, Kolodgie FD, Strauss HW, Narula J.** Radiolabeled Monocyte Chemoattractant Protein 1 for the detection of inflammation in experimental atherosclerosis. *J Nucl Med.* **2007**;48:1816-21.
- Haubner R, Weber WA, Beer AJ, Vabulien E, Reim D, Sarbia M, Becker KF, Goebel M, Hein R, Wester HJ, Kessler H, Schwaiger M.** Non-invasive visualization of the activated $\alpha V\beta 3$ integrin in cancer patients by positron emission tomography and [18F]-galacto-RGD. *PLoS Med.* **2005**;2:244-252.
- Hay RV, Fleming RM, ryan JW, Williams KA, stark VJ, Lathrop KA, Harper PV.** Nuclear imaging analysis of human low-density lipoprotein biodistribution in rabbits and monkeys. *J Nucl Med.* **1991**;32:1239-1245.
- Hayden MR, Clee SM, Brooks-Wilson A, Genest J Jr, Attie A, Kastelein JJ.** Cholesterol efflux regulatory protein, Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Curr Opin Lipidol.* **2000**;11(2):117-22.
- He M, He X, Xie Q, Chen F, He S.** Angiotensin II induces the expression of tissue factor and its mechanism in human monocytes. *Thromb Res.* Published online June 10, **2005**. DOI: 10.1016/j.thromres.2005.04.033.
- Heart disease and stroke statistics – 2007 update.** A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation.* **2007**;115:e69-e171.
- Heinecke JW.** Mass spectrometric quantification of amino acid oxidation products in proteins: insights into pathways that promote LDL oxidation in the human artery wall. *FASEB J.* **1999**;13: 1113– 1120.
- Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W.** Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* **1999**;94:1561-7.
- Henry TD, Annex BH, et al.** The VIVA trial: vascular endothelial growth factor in ischemia or vascular angiogenesis. *Circulation* **2003**;107(10):1359-1365.
- Herskowitz A, Choi S, Ansari AA, Wesselingh S.** Cytokine mRNA expression in posts ischemic/reperfused myocardium. *Am J Pathol.* **1995**;146(2):419-28.

Références bibliographiques

- Higuchi T**, Bengel FM, Seidl S, Watzlowik P, Kessler H, Hegenloh R, Reder S, Nekolla SG, Wester HJ, Schwaiger M. Assessment of alphavbeta3 integrin expression after myocardial infarction by positron emission tomography. *Cardiovasc Res*. **2008** May 1;78(2):395-403.
- Hill JH**, Ward PA. The phlogistic role of C3 leukotactic fragments in myocardial infarcts of rats. *J Exp Med*. **1971**;133(4):885-900.
- Hixenbaugh EA**, Goeckeler ZM, Papaiya NN, Wysolmerski RB, Silverstein SC, Huang AJ. Stimulated neutrophils induce myosin light chain phosphorylation and isometric tension in endothelial cells. *Am J Physiol*. **1997**;273(2 Pt 2):H981-8.
- Hosokawa R**, Kambara N, Ohba M, Mukai T, Ogawa M, Motomura H, Kume N, Saji H, Kita T, Nohara R. A catheter-based intravascular radiation detector of vulnerable plaques. *J Nucl Med*. **2006**;47:863-867.
- Hua J**, Dobrucki LW, Sadeghi MM, Zhang J, Bourke BN, Cavaliere P, et al. Noninvasive imaging of angiogenesis with a ^{99m}Tc-labeled peptide targeted at alphavbeta3 integrin after murine hindlimb ischemia. *Circulation* **2005**;111:3255-60.
- Huber SA**, Sakkinen P, David C, Newell MK, Tracy RP. T helper-cell phenotype regulates atherosclerosis in mice under conditions of mild hypercholesterolemia. *Circulation*. **2001**;103:2610-2616.
- Hughes GC**, Biswas SS, Yin B, Coleman RE, DeGrado TR, Landolfo CK, Lowe JE, Annex BH, Landolfo KP. Therapeutic angiogenesis in chronically ischemic porcine myocardium: comparative effects of bFGF and VEGF. *Ann Thorac Surg*. **2004**;77:812-818.
- Huo Y**, Weber C, Forlow SB, Sperandio M, Thatte J, Mack M, Jung S, Littman DR, Ley K. The chemokine KC, but not monocyte chemoattractant protein-1, triggers monocyte arrest on early atherosclerotic endothelium. *J Clin Invest*. **2001**;108(9):1307-14.
- Hyafil F**, Cornily JC, Feig JE, Gordon R, Vucic E, Amirbekian V, Fisher EA, Fuster V, Feldman LJ, Fayad ZA. Noninvasive detection of macrophages using a nanoparticulate contrast agent for computed tomography. *Nat Med*. **2007**;13(5):636-41.
- Hyafil F**, Cornily JC, Rudd JH, Machac J, Feldman LJ, Fayad ZA. Quantification of inflammation within rabbit atherosclerotic plaques using the macrophage-specific CT contrast agent N1177: a comparison with 18F-FDG PET/CT and histology. *J Nucl Med*. **2009**;50(6):959-65.
- Hynes RO**. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. **1992**;69(1):11-25.
- Ignatescu MC**, Gharehbaghi-Schnell E, Hassan A, Rezaie-Majd S, Korschineck I, Schleaf RR, et al. Expression of the angiogenic protein, platelet-derived endothelial cell growth factor, in coronary atherosclerotic plaques: In vivo correlation of lesional microvessel density and constrictive vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **1999**;19(10):2340-2347.
- Iiyama K**, Hajra L, Iiyama M, Li H, DiChiara M, Medoff BD, Cybulsky MI. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res*. **1999**;85(2):199-207.
- Imhof BA**, Aurrand-Lions M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol*. **2004**;4(6):432-44.
- Inoue F**, Sato Y, Matsumoto N, Tani S, Uchiyama T. Evaluation of plaque texture by means of multislice computed tomography in patients with acute coronary syndrome and stable angina. *Circ J*. **2004**;68(9):840-4.
- Iuliano L**, Signore A, Vallabajosula S, Colavita AR, Camastra C, Ronga G, Alessandri C, Sbarigia E, Fiorani P, Violi F. Preparation and biodistribution of 99m technetium labelled oxidized LDL in man. *Atherosclerosis*. **1996**;126:131-41.
- Ishino S**, Kuge Y, Takai N, Tamaki N, Strauss HW, Blankenberg FG, Shiomi M, Saji H. ^{99m}Tc-Annexin A5 for noninvasive characterization of atherosclerotic lesions: imaging and histological studies in myocardial infarction-prone Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. **2007**;34:889-99.
- Ishino S**, Mukai T, Kuge Y, Kume N, Ogawa M, Takai N, Kamihashi J, Shiomi M, Minami M, Kita T, Saji H. Targeting of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) with 99mTc-labeled anti-LOX-1 antibody: potential agent for imaging of vulnerable plaque. *J Nucl Med*. **2008**;49(10):1677-85.
- Isobe S**, Tsimikas S, Zhou J, Fujimoto S, Sarai M, Branks MJ, Fujimoto A, Hofstra L, Reutelingsperger CP, Murohara T, Virmani R, Kolodgie FD, Narula N, Petrov A, Narula J. Noninvasive imaging of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient and low-density-lipoprotein receptor-deficient mice with annexin A5. *J Nucl Med*. **2006**;47:1497-505.
- Ivan E**, Khatri JJ, Johnson C, Magid R, Godin D, Nandi S, Lessner S, Galis ZS. Expansive arterial remodeling is associated with increased neointimal macrophage foam cell content: the murine model of macrophage-rich carotid artery lesions. *Circulation*. **2002**;105(22):2686-91.
- Jaffer FA**, Vinegoni C, John MC, Aikawa E, Gold HK, Finn AV, Ntziachristos V, Libby P, Weissleder R. Real-time catheter molecular sensing of inflammation in proteolytically active atherosclerosis. *Circulation*. **2008**;118(18):1802-9.
- Janecek M**, Patt BE, Iwanczyk JS, MacDonald L, Yamaguchi Y, William Strauss H, Tsugita R, Ghazarossian V, Hoffman EJ. Intravascular probe for detection of vulnerable plaque. *Mol Imaging Biol*. **2004**;6(3):131-8.
- Jang IK**, Tearney GJ, Bouma BE. Visualization of tissue prolapse between coronary stent struts by optical coherence tomography: comparison with intravascular ultrasound. *Circulation*. **2001**;104:2754.
- Jennings RB**, Murry CE, Steenbergen C Jr, Reimer KA. Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation*. **1990**;82(3 Suppl):II2-12.
- Jewell UR**, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M. Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *Faseb J*. **2001**;15:1312-4.

Références bibliographiques

- Jeziorska M, Woolley DE.** Local neovascularization and cellular composition within vulnerable regions of atherosclerotic plaques of human carotid arteries. *J Pathol.* **1999**;188(2):189–196.
- Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, Moya ML, Phillips MC, Rothblat GH, Swaney JB, Tall AR.** Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem.* **1997**;272(34):20982-5.
- Jin H, Aiyyer A, Su J, Borgstrom P, Stupack D, Friedlander M, Varner J.** A homing mechanism for bone marrow-derived progenitor cell recruitment to the neovasculature. *J Clin Invest.* **2006**;116(3):652-62.
- Jin ZH, Josserand V, Foillard S, Boturny D, Dumy P, Favrot MC, Coll JL.** In vivo optical imaging of integrin alphaV-beta3 in mice using multivalent or monovalent cRGD targeting vectors. *Mol Cancer.* **2007**;6:41.
- Johnson LL, Schofield L, Donahay T, Mastrofrancesco P.** Myocardial uptake of a (99m)Tc-nitroheterocycle in a swine model of occlusion and reperfusion. *J Nucl Med.* **2000** Jul;41(7):1237-43.
- Johnson LL, Schofield L, Donahay T, Narula N, Narula J.** ^{99m}Tc-annexin V imaging for in vivo detection of atherosclerotic lesions in porcine coronary arteries. *J Nucl Med.* **2005**;46:1186-93.
- Johnson-Léger CA, Aurrand-Lions M, Beltraminelli N, Fasel N, Imhof BA.** Junctional adhesion molecule-2 (JAM-2) promotes lymphocyte transendothelial migration. *Blood.* **2002**;100(7):2479-86.
- Johnson-Tidey RR, McGregor JL, Taylor PR, Poston RN.** Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques. Coexpression with intercellular adhesion molecule-1. *Am J Pathol.* **1994**;144(5):952-61.
- Johnston GI, Cook RG, McEver RP.** Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. *Cell.* **1989**;56(6):1033-44.
- Jolly SR, Kane WJ, Bailie MB, Abrams GD, Lucchesi BR.** Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Circ Res.* **1984**;54(3):277-85.
- Joseph SB, McKilligin E, Pei L, Watson MA, Collins AR, Laffitte BA, Chen M, Noh G, Goodman J, Hagger GN, Tran J, Tippin TK, Wang X, Lusis AJ, Hsueh WA, Law RE, Collins JL, Willson TM, Tontonoz P.** Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2002**;99(11):7604-9.
- Kadokami T, McTiernan CF, Kubota T, Frye CS, Feldman AM.** Sex-related survival differences in murine cardiomyopathy are associated with differences in TNF-receptor expression. *J Clin Invest.* **2000**;106(4):589-97.
- Kakehi K, Oda Y, Kinoshita M.** Fluorescence polarization: analysis of carbohydrate-protein interaction. *Anal Biochem.* **2001**;297(2):111-6.
- Kanai H, Hasegawa H, Ichiki M, Tezuka F, Koiwa Y.** Elasticity imaging of atheroma with transcutaneous ultrasound: preliminary study. *Circulation.* **2003**;107(24):3018-21.
- Kastrup J, Jørgensen E, Rück A, Tägil K, Glogar D, Ruzyllo W, Bøtker HE, Dudek D, Drvota V, Hesse B, Thuesen L, Blomberg P, Gyöngyösi M, Sylvén C; Euroinject One Group.** Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris A randomized double-blind placebo-controlled study: the Euroinject One trial. *J Am Coll Cardiol.* **2005**;45(7):982-8.
- Katsuda S, Okada Y, Minamoto T, et al.** Collagens in human atherosclerosis. Immunohistochemical analysis using collagen type-specific antibodies. *Arterioscler Thromb* **1992**;12:494–502.
- Kaufmann BA, Sanders JM, Davis C, Xie A, Aldred P, Sarembock IJ, Lindner JR.** Molecular imaging of inflammation in atherosclerosis with targeted ultrasound detection of vascular cell adhesion molecule-1. *Circulation.* **2007** Jul 17;116(3):276-84.
- Kawamoto A, Murayama T, Kusano K, Ii M, Tkebuchava T, Shintani S, Iwakura A, Johnson I, von Samson P, Hanley A, Gavin M, Curry C, Silver M, Ma H, Kearney M, Losordo DW.** Synergistic effect of bone marrow mobilization and vascular endothelial growth factor-2 gene therapy in myocardial ischemia. *Circulation.* **2004**;110(11):1398-405.
- Kelly KA, Allport JR, Tsourkas A, Shinde-Patil VR, Josephson L, Weissleder R.** Detection of vascular adhesion molecule-1 expression using a novel multimodal nanoparticle. *Circ Res.* **2005**;96(3):327-36.
- Kemerink GJ, Liu X, Kieffer D, Ceysens S, Mortelmans L, Verbruggen AM, Steinmetz ND, Vanderheyden JL, Green AM, Verbeke K.** Safety, biodistribution, and dosimetry of ^{99m}Tc-HYNIC-annexin V, a novel human recombinant annexin V for human application. *J Nucl Med.* **2003**;44:947-52.
- Kietselaer BL, Reutelingsperger CP, Heidendal GA, Daemen MJ, Mess WH, Hofstra L, Narula J.** Noninvasive detection of plaque instability with use of radiolabeled annexin A5 in patients with carotid-artery atherosclerosis. *N Engl J Med.* **2004** ;350:1472-3.
- King VL, Cassis LA, Daugherty A.** Interleukin-4 does not influence development of hypercholesterolemia or angiotensin II-induced atherosclerotic lesions in mice. *Am J Pathol.* **2007**;171:2040-2047.
- Kinlay S, Libby P, Ganz P.** Endothelial function and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol.* **2001**;12:383-9.
- Kircher MF, Grimm J, Swirski FK, Libby P, Gerszten RE, Allport JR, Weissleder R.** Noninvasive in vivo imaging of monocyte trafficking to atherosclerotic lesions. *Circulation.* **2008**;22:388-95.

Références bibliographiques

- Klassen C**, Nguyen M, Siuciak A, Wilke NM. Magnetic resonance first pass perfusion imaging for detecting coronary artery disease. *Eur J Radiol* **2006**;57:412–6.
- Kocher AA**, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*. **2001**;7:430-436.
- Kopka K**, Breyholz HJ, Wagner S, Law MP, Riemann B, Schröer S, Trub M, Guilbert B, Levkau B, Schober O, Schäfers M. Synthesis and preliminary biological evaluation of new radioiodinated MMP inhibitors for imaging MMP activity in vivo. *Nucl Med Biol*. **2004**;31:257-67.
- Kolodgie FD**, Petrov A, Virmani R, Narula N, Verjans JW, Weber DK, Hartung D, Steinmetz N, Vanderheyden JL, Vannan MA, Gold HK, Reutelingsperger CP, Hofstra L, Narula J. Targeting of apoptotic macrophages and experimental atheroma with radiolabeled annexin V: a technique with potential for noninvasive imaging of vulnerable plaque *Circulation*. **2003**;108:3134-9.
- Kooi ME**, Cappendijk VC, Cleutjens KB, Kessels AG, Kitslaar PJ, Borgers M, Frederik PM, Daemen MJ, van Engelshoven JM. Accumulation of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in human atherosclerotic plaques can be detected by in vivo magnetic resonance imaging. *Circulation*. **2003**;107(19):2453-8.
- Kumar A**, Lindner V. Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **1997**;17(10):2238-44.
- Kunjathoor VV**, Febbraio M, Podrez EA, Moore KJ, Andersson L, Koehn S, Rhee JS, Silverstein R, Hoff HF, Freeman MW. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem*. **2002**;277(51):49982-8.
- Laham RJ**, Chronos NA, Pike M, Leimbach ME, Udelson JE, Pearlman JD, et al. Intracoronary basic fibroblast growth factor (FGF-2) in patients with severe ischemic heart disease: results of a phase I open-label dose escalation study. *J Am Coll Cardiol* **2000**;36:2132–9.
- Lancelot E**, Amirbekian V, Brigger I, Raynaud JS, Ballet S, David C, Rousseaux O, Le Greneur S, Port M, Lijnen HR, Bruneval P, Michel JB, Ouimet T, Roques B, Amirbekian S, Hyafil F, Vucic E, Aguinaldo JG, Corot C, Fayad ZA. Evaluation of matrix metalloproteinases in atherosclerosis using a novel noninvasive imaging approach. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2008**;28(3):425-32.
- Larose E**, Yeghiazarians Y, Libby P, Yucel EK, Aikawa M, Kacher DF, Aikawa E, Kinlay S, Schoen FJ, Selwyn AP, Ganz P. Characterization of human atherosclerotic plaques by intravascular magnetic resonance imaging. *Circulation*. **2005**;112(15):2324-31.
- Larose E**, Kinlay S, Selwyn AP, Yeghiazarians Y, Yucel EK, Kacher DF, Libby P, Ganz P. Improved characterization of atherosclerotic plaques by gadolinium contrast during intravascular magnetic resonance imaging of human arteries. *Atherosclerosis*. **2008**;196(2):919-25.
- Laurberg JM**, Olsen AK, Hansen SB, Bottcher M, Morrison M, Ricketts SA, Falk E. Imaging of vulnerable atherosclerotic plaques with FDG-microPET: no FDG accumulation. *Atherosclerosis*. **2007**;192(2):275-82.
- Lazarous DF**, Scheinowitz M, Shou M, Hodge E, Rajanayagam S, Hunsberger S, Robison WG Jr, Stiber JA, Correa R, Epstein SE, et al. Effects of chronic systemic administration of basic fibroblast growth factor on collateral development in the canine heart. *Circulation*. **1995**;91(1):145-53.
- Leber AW**, Knez A, Becker A, Becker C, von Ziegler F, Nikolaou K, Rist C, Reiser M, White C, Steinbeck G, Boekstegers P. Accuracy of multidetector spiral computed tomography in identifying and differentiating the composition of coronary atherosclerotic plaques: a comparative study with intracoronary ultrasound. *J Am Coll Cardiol*. **2004**;43(7):1241-7.
- Lederman RJ**, Raylman RR, Fisher SJ, Kison PV, san H, Nabel EG, wahl RL. Detection of atherosclerosis using a novel positron-sensitive probe and 18-fluorodeoxyglucose (FDG). *Nucl Med Commun*. **2001**;22:747-753.
- Lee SH**, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med*. **2000**;342(9):626-33.
- Lees RS**, Lees AM, Strauss HW. External imaging of human atherosclerosis. *J Nucl Med*. **1983**;24:154-156.
- Lees RS**, Garabedian HD, Lees AM, Schumacher DJ, Miller A, Isaacsohn JL, Derksen A, Strauss HW. Technetium-99m low density lipoproteins: preparation and biodistribution. *J Nucl Med*. **1985**;26:1056-62.
- Lees AM**, Lees RS, Schoen FJ, Isaacsohn JL, fischman AJ, McKusick KA, Strauss HW. Imaging human atherosclerosis with ^{99m}Tc-labeled low density lipoproteins. *Arteriosclerosis*. **1988**;8:461-470.
- Lei ZB**, Zhang Z, Jing Q, Qin YW, Pei G, Cao BZ, Li XY. OxLDL upregulates CXCR2 expression in monocytes via scavenger receptors and activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Cardiovasc Res*. **2002**;53(2):524-32.
- Ley K**, Huo Y. VCAM-1 is critical in atherosclerosis. *J Clin Invest*. **2001**;107(10):1209-10.
- Lerakis S**, Synetos A, Toutouzias K, Vavuranakis M, Tsiamis E, Stefanadis C. Imaging of the vulnerable plaque: noninvasive and invasive techniques. *Am J Med Sci*. **2008**;336(4):342-8.
- Lessner SM**, Prado HL, Waller EK, Galis ZS. Atherosclerotic lesions grow through recruitment and proliferation of circulating monocytes in a murine model. *Am J Pathol*. **2002**;160(6):2145-55.
- Li J**, Brown LF, Hibberd MG, Grossman JD, Morgan JP, Simons M. VEGF, flk-1, and flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol*. **1996**;270(5 Pt 2):H1803-11.

- Li D, Yang B, Mehta JL. Ox-LDL induces apoptosis in human coronary artery endothelial cells: role of PKC, PTK, bcl-2, and Fas. *Am J Physiol*. **1998**;275(2Pt2):H568-76.
- Li J, Post M, Volk R, Gao Y, Li M, Metais C, et al. PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nat Med* **2000**;6:49–55.
- Liao F, Huynh HK, Eiroa A, Greene T, Polizzi E, Muller WA. Migration of monocytes across endothelium and passage through extracellular matrix involve separate molecular domains of PECAM-1. *J Exp Med*. **1995**;182(5):1337-43.
- Lindsey ML, Escobar PG, Dobrucki LW, Goshorn DK, Bouges S, Mingoa JT, McClister DM Jr, Su H, Gannon J, MacGillivray C, Lee RT, Sinusas AJ, Spinale FG. Matrix metalloproteinase-9 gene deletion facilitates angiogenesis after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; **2006**;290:H232-239.
- Ling X, Tamaki T, Xiao Y, Kamangar S, Clayberger C, Lewis DB, Krensky AM. An immunosuppressive and anti-inflammatory HLA class I-derived peptide binds vascular cell adhesion molecule-1. *Transplantation*. **2000**;27:662-7.
- Lipinski MJ, Frias JC, Amirbekian V, Briley-Saebo KC, Mani V, Samber D, Abbate A, Aguinaldo JG, Massey D, Fuster V, Vetrovec GW, Fayad ZA. Macrophage-specific lipid-based nanoparticles improve cardiac magnetic resonance detection and characterization of human atherosclerosis. *JACC Cardiovasc Imaging*. **2009**;2(5):637-47.
- Litovsky S, Madjid M, Zarrabi A, Casscells SW, Willerson JT, Naghavi M. Superparamagnetic iron oxide-based method for quantifying recruitment of monocytes to mouse atherosclerotic lesions in vivo: enhancement by tissue necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interferon-gamma. *Circulation*. **2003**;107(11):1545-9.
- Littlewood TD, Bennett MR. Apoptotic cell death in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. **2003**;14(5):469-75.
- Lu E, Wagner WR, Schellenberger U, et al. Targeted in vivo labeling of receptors for vascular endothelial growth factor: approach to identification of ischemic tissue. *Circulation* **2003**; 108:97-103.
- Luo QY, Wang F, Zhang ZY, Zhang Y, Lu HK, Sun SH, Zhu RS. Preparation and bioevaluation of (99m)Tc-HYNIC-annexin B1 as a novel radioligand for apoptosis imaging. *Apoptosis*. **2008**;13:600-8.
- Ma XL, Weyrich AS, Lefler DJ, Buerke M, Albertine KH, Kishimoto TK, Lefler AM. Monoclonal antibody to L-selectin attenuates neutrophil accumulation and protects ischemic reperfused cat myocardium. *Circulation*. **1993**;88(2):649-58.
- McDermott DH, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Merrell MN, Epstein N, Quyyumi AA, Murphy PM. Association between polymorphism in the chemokine receptor CX3CR1 and coronary vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Circ Res*. **2001**;89(5):401-7.
- McDermott DH, Fong AM, Yang Q, Sechler JM, Cupples LA, Merrell MN, Wilson PW, D'Agostino RB, O'Donnell CJ, Patel DD, Murphy PM. Chemokine receptor mutant CX3CR1-M280 has impaired adhesive function and correlates with protection from cardiovascular disease in humans. *J Clin Invest*. **2003**;111(8):1241-50.
- Mach F, Schonbeck U, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation*. **1997**;96:396–399.
- MacKenna D, Summerour SR, Villarreal FJ. Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis. *Cardiovasc Res*. **2000**;46(2):257-63.
- MacNeill BD, Jang IK, Bouma BE, et al. Focal and multi-focal plaque macrophage distributions in patients with acute and stable presentations of coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* **2004**;44:972–9.
- Maddux JT, Wink O, Messenger JC, Groves BM, Liao R, Strzelczyk J, Chen SY, Carroll JD. Randomized study of the safety and clinical utility of rotational angiography versus standard angiography in the diagnosis of coronary artery disease. *Catheter Cardiovasc Interv*. **2004**;62(2):167-74.
- Makowski MR, Ebersberger U, Nekolla S, Schwaiger M. In vivo molecular imaging of angiogenesis, targeting alphavbeta3 integrin expression, in a patient after acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. **2008**;29(18):2201.
- Malek AM, Alper SL, Izumo S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA*. **1999**;282(21):2035-42.
- Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. **2000**;101:841–843.
- Mallat Z, Tedgui A. Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. *Br J Pharmacol*. **2000**;130(5):947-62.
- Manka D, Forlow SB, Sanders JM, Hurwitz D, Bennett DK, Green SA, Ley K, Sarembock IJ. Critical role of platelet P-selectin in the response to arterial injury in apolipoprotein-E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2004**;24(6):1124-9.
- Marti HH, Risau W. Systemic hypoxia changes the organspecific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **1998**;95:15809–14.
- Martin AJ, Gotlieb AI, Henkelman RM. High-resolution MR imaging of human arteries. *J Magn Reson Imaging*. **1995**;5(1):93-100.
- Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol*. **2005**;15(11):599-607.

Références bibliographiques

- Martinet W**, De Meyer GR. Autophagy in atherosclerosis: a cell survival and death phenomenon with therapeutic potential. *Circ Res*. **2009**;104(3):304-17.
- Mason DP**, Kenagy RD, Hasenstab D, Bowen-Pope DF, Seifert RA, Coats S, Hawkins SM, Clowes AW. Matrix metalloproteinase-9 overexpression enhances vascular smooth muscle cell migration and alters remodeling in the injured rat carotid artery. *Circ Res*. **1999**;85(12):1179-85.
- Matsumura T**, Sakai M, Kobori S, Biwa T, Takemura T, Matsuda H, Hakamata H, Horiuchi S, Shichiri M. Two intracellular signaling pathways for activation of protein kinase C are involved in oxidized low-density lipoprotein-induced macrophage growth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **1997**;17(11):3013-20.
- Matter CM**, Schuler PK, Alessi P, Meier P, Ricci R, Zhang D, Halin C, Castellani P, Zardi L, Hofer CK, Montani M, Neri D, Lüscher TF. Molecular imaging of atherosclerotic plaques using a human antibody against the extra-domain B of fibronectin. *Circ Res*. **2004**;95:1225-33.
- Matter CM**, Wyss MT, Meier P, Späth N, von Lukowicz T, Lohmann C, Weber B, Ramirez de Molina A, Lacal JC, Ametamey SM, von Schulthess GK, Lüscher TF, Kaufmann PA, Buck A. 18F-choline images murine atherosclerotic plaques ex vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2006**;26:584-9.
- Max R**, Gerritsen RR, Nooijen PT, Goodman SL, Sutter A, Keilholz U, et al. Immunohistochemical analysis of integrin alpha vbeta3 expression on tumor-associated vessels of human carcinomas. *Int J Cancer* **1997**;71:320-4.
- Maxfield FR**, Tabas I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature*. **2005**;438(7068):612-21.
- Meding J**, Dinkelborg LM, Grieshaber MK, Semmler W. Targeting of endothelin receptors for molecular imaging of atherosclerosis in rabbits. *J Nucl Med*. **2002**;43:400-5.
- Meisel SR**, Xu XP, Edgington TS, Dimayuga P, Kaul S, Lee S, Fishbein MC, Cercek B, Shah PK. Differentiation of adherent human monocytes into macrophages markedly enhances tissue factor protein expression and procoagulant activity. *Atherosclerosis*. **2002**;161:35-43.
- Meoli DF**, Sadeghi MM, Krassilnikova S, Bourke BN, Giordano FJ, Dione DP, Su H, Edwards DS, Liu S, Harris TD, Madri JA, Zaret BL, Sinusas AJ. Noninvasive imaging of myocardial angiogenesis following experimental myocardial infarction. *J Clin Invest*. **2004**;113:1684-1691.
- Mills JD**, Fischer D, Villanueva FS. Coronary collateral development during chronic ischemia: serial assessment using harmonic myocardial contrast echocardiography. *J Am Coll Cardiol* **2000**;36:618-24.
- Moore KJ**, Kunjathoor VV, Koehn SL, Manning JJ, Tseng AA, Silver JM, McKee M, Freeman MW. Loss of receptor-mediated lipid uptake via scavenger receptor A or CD36 pathways does not ameliorate atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *J Clin Invest*. **2005**;115(8):2192-201.
- Moreno PR**, Lodder RA, Purushothaman KR, Charash WE, O'Connor WN, Muller JE. Detection of lipid pool, thin fibrous cap, and inflammatory cells in human aortic atherosclerotic plaques by near-infrared spectroscopy. *Circulation*. **2002**;105(8):923-7.
- Moreno PR**, Purushothaman KR, Fuster V, Echeverri D, Trusczynska H, Sharma SK, Badimon JJ, O'Connor WN. Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation*. **2004**;110:2032-8.
- Morris JB**, Olzinski AR, Bernard RE, Aravindhan K, Mirabile RC, Boyce R, Willette RN, Jucker BM. p38 MAPK inhibition reduces aortic ultrasmall superparamagnetic iron oxide uptake in a mouse model of atherosclerosis: MRI assessment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2008**;28(2):265-71.
- Muhling O**, Jerosch-Herold M, Nabauer M, Wilke N. Assessment of ischemic heart disease using magnetic resonance firstpass perfusion imaging. *Herz* **2003**;28:82-9.
- Mukai T**, Nohara R, Ogawa M, Ishino S, Kambara N, Kataoka N, Kanoi T, Saito K, Motomura H, Konishi J, Saji H. A catheter-based radiation detector for endovascular detection of atheromatous plaques. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. **2004**;31:1299-1303.
- Mulder WJ**, Strijkers GJ, Habets JW, Bleeker EJ, van der Schaft DW, Storm G, Koning GA, Griffioen AW, Nicolay K. MR molecular imaging and fluorescence microscopy for identification of activated tumor endothelium using a bimodal lipidic nanoparticle. *FASEB J*. **2005**;19:2008-2010.
- Muller WA**. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol*. **2003**;24(6):327-34.
- Nagase H**, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*. **2006**;69:562-573.
- Naghavi M**, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G, Fayad Z, Stone PH, Waxman S, Raggi P, Madjid M, Zarrabi A, Burke A, Yuan C, Fitzgerald PJ, Siscovick DS, de Korte CL, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation*. **2003**;108(14):1664-72.
- Naghavi M**, Falk E, Hecht HS, Jamieson MJ, Kaul S, Berman D, Fayad Z, Budoff MJ, Rumberger J, Naqvi TZ, Shaw LJ, Faergeman O, Cohn J, Bahr R, Koenig W, Demirovic J, Arking D, Herrera VL, Badimon J, Goldstein JA, Rudy Y, Airaksinen J, Schwartz RS, Riley WA, Mendes RA, Douglas P, Shah PK; SHAPE Task Force. From vulnerable plaque to vulnerable patient--Part III: Executive summary of the Screening for Heart Attack Prevention and Education (SHAPE) Task Force report. *Am J Cardiol*. **2006**;98(2A):2H-15H.

Références bibliographiques

- Nahrendorf M**, Jaffer FA, Kelly KA, Sosnovik DE, Aikawa E, Libby P, Weissleder R. Noninvasive vascular cell adhesion molecule-1 imaging identifies inflammatory activation of cells in atherosclerosis. *Circulation*. **2006**;114(14):1504-11.
- Nahrendorf M**, Zhang H, Hembrador S, Panizzi P, Sosnovik DE, Aikawa E, Libby P, Swirski FK, Weissleder R. Nanoparticle PET-CT imaging of macrophages in inflammatory atherosclerosis. *Circulation*. **2008**;117:379-87.
- Nahrendorf M**, Keliher E, Panizzi P, Zhang H, Hembrador S, Figueiredo JL, Aikawa E, Kelly K, Libby P, Weissleder R. 18F-4V for PET-CT imaging of VCAM-1 expression in atherosclerosis. *JACC Cardiovasc Imaging*. **2009**;2(10):1213-22.
- Nakashima Y**, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **1998**;18(5):842-51.
- Napoleone E**, Di Santo A, Lorenzet R. Monocytes upregulate endothelial cell expression of tissue factor: a role for cell-cell contact and cross-talk. *Blood*. **1997**;89:541-549.
- Navarro P**, Caveda L, Breviario F, Mândoteanu I, Lampugnani MG, Dejana E. Catenin-dependent and -independent functions of vascular endothelial cadherin. *J Biol Chem*. **1995**;270(52):30965-72.
- Newby AC**. Do metalloproteinases destabilize vulnerable atherosclerotic plaques? *Curr Opin Lipidol*. **2006**;17:556-61.
- Newman PJ**, Berndt MC, Gorski J, White GC 2nd, Lyman S, Paddock C, Muller WA. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*. **1990**;247(4947):1219-22.
- Nickel T**, Schmauss D, Hanssen H, Sivic Z, Krebs B, Jankl S, Summo C, Fraunberger P, Walli AK, Pfeiler S, Weis M. oxLDL uptake by dendritic cells induces upregulation of scavenger-receptors, maturation and differentiation. *Atherosclerosis*. **2009**;205(2):442-50.
- Nielsen LB**. Transfer of low density lipoprotein into the arterial wall and risk of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. **1996**;123(1-2):1-15.
- Nissen SE**, Yock P. Intravascular ultrasound: novel pathophysiological insights and current clinical applications. *Circulation*. **2001** Jan 30;103(4):604-16.
- Nordlie MA**, Wold LE, Simkhovich BZ, Sesti C, Kloner RA. Molecular aspects of ischemic heart disease: ischemia/reperfusion-induced genetic changes and potential applications of gene and RNA interference therapy. *Cardiovasc Pharmacol Ther*. **2006**;11-17.
- North S**, Moenner M, Bikfalvi A. Recent developments in the regulation of the angiogenic switch by cellular stress factors in tumors. *Cancer Lett*. **2005**;218(1):1-14.
- O'Brien ER**, Alpers CE, Stewart DK, Ferguson M, Tran N, Gordon D, Benditt EP, Hinohara T, Simpson JB, Schwartz SM. Proliferation in primary and restenotic coronary atherectomy tissue. Implications for antiproliferative therapy. *Circ Res*. **1993**;73(2):223-31.
- O'Brien KD**, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation*. **1996**;93:672-82.
- O'Brien KD**, Olin KL, Alpers CE, Chiu W, Ferguson M, Hudkins K, Wight TN, Chait A. Comparison of apolipoprotein and proteoglycan deposits in human coronary atherosclerotic plaques: colocalization of biglycan with apolipoproteins. *Circulation*. **1998**;98(6):519-27.
- Ogawa M**, Ishino S, Mukai T, Asano D, Teramoto N, Watabe H, Kudomi N, Shiomi M, Magata Y, Iida H, Saji H. (18)F-FDG accumulation in atherosclerotic plaques: immunohistochemical and PET imaging study. *J Nucl Med*. **2004**;45:1245-1250.
- Ogawa M**, Magata Y, Kato T, et al. Application of 18F-FDG-PET for monitoring the therapeutic effect of antiinflammatory drugs on stabilization of vulnerable atherosclerotic plaques. *J Nucl Med* **2006**; 47:1845-50.
- Ohtsuki K**, Hayase M, Akashi K, Kapiwoda S, Strauss HW. Detection of monocyte chemoattractant protein-1 receptor expression in experimental atherosclerotic lesions: an autoradiographic study. *Circulation*. **2001**;104:203-8.
- Ohshima S**, Petrov A, Fujimoto S, Zhou J, Azure M, Edwards DS, Murohara T, Narula N, Tsimikas S, Narula J. Molecular imaging of matrix metalloproteinase expression in atherosclerotic plaques of mice deficient in apolipoprotein e or low-density-lipoprotein receptor. *J Nucl Med*. **2009**;50(4):612-7.
- Okazaki T**, Ebihara S, Asada M, Yamada S, Saijo Y, Shiraishi Y, Ebihara T, Niu K, Mei H, Arai H, Yambe T. Macrophage Colony-Stimulating Factor Improves Cardiac Function after Ischemic Injury by Inducing Vascular Endothelial Growth Factor Production and Survival of Cardiomyocytes. *Am J Pathol*. **2007**;71:1093-1103.
- Okimoto H**, Ishigaki Y, Koiwa Y, Hinokio Y, Ogihara T, Suzuki S, Katagiri H, Ohkubo T, Hasegawa H, Kanai H, Oka Y. A novel method for evaluating human carotid artery elasticity: possible detection of early stage atherosclerosis in subjects with type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. **2008**;196(1):391-7.
- Orr AW**, Stockton R, Simmers MB, Sanders JM, Sarembock IJ, Blackman BR, Schwartz MA. Matrix-specific p21-activated kinase activation regulates vascular permeability in atherogenesis. *J Cell Biol*. **2007**;176(5):719-27.
- Osborn L**, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Luhowskyj S, Chi-Rosso G, Lobb R. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell*. **1989**;59(6):1203-11.
- Ostermann G**, Weber KS, Zerneck A, Schröder A, Weber C. JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat Immunol*. **2002**;3(2):151-8.

Références bibliographiques

- Ostermann G**, Fraemohs L, Baltus T, Schober A, Lietz M, Zerneck A, Liehn EA, Weber C. Involvement of JAM-A in mononuclear cell recruitment on inflamed or atherosclerotic endothelium: inhibition by soluble JAM-A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2005**;25(4):729-35.
- Oyama J**, Blais C Jr, Liu X, Pu M, Kobzik L, Kelly RA, Bourcier T. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation.* **2004**;109(6):784-9.
- Palazzo AJ**, Jones SP, Anderson DC, Granger DN, Lefer DJ. Coronary endothelial P-selectin in pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol.* **1998**;275(5 Pt 2):H1865-72.
- Pasterkamp G**, Van Keulen JK, De Kleijn DP. Role of Toll-like receptor 4 in the initiation and progression of atherosclerotic disease. *Eur J Clin Invest.* **2004**;34:328-34.
- Patel KD**, Zimmerman GA, Prescott SM, McEver RP, McIntyre TM. Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophils. *J Cell Biol.* **1991**;112(4):749-59.
- Pearlman JD**, Hibberd MG, Chuang ML, Harada K, Lopez JJ, Gladstone SR, Friedman M, Sellke FW, Simons M. Magnetic resonance mapping demonstrates benefits of VEGF-induced myocardial angiogenesis. *Nat Med.* **1995**;1(10):1085-9.
- Penn MS**, Patel CV, Cui MZ, DiCorleto PE, Chisolm GM. LDL increases inactive tissue factor on vascular smooth muscle cell surfaces: hydrogen peroxide activates latent cell surface tissue factor. *Circulation.* **1999**;99:1753-1759.
- Pepper MS**. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2001**;21:1104-17.
- Podrez EA**, Abu-Soud HM, Hazen SL. Myeloperoxidase generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.* **2000**;28: 1717-1725.
- Polverini PJ**, Cotran PS, Gimbrone MA Jr, Unanue ER. Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature.* **1977**;269(5631):804-6.
- Ponta H**, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2003**;4(1):33-45.
- Pinckard RN**, Olson MS, Giclas PC, Terry R, Boyer JT, O'Rourke RA. Consumption of classical complement components by heart subcellular membranes in vitro and in patients after acute myocardial infarction. *J Clin Invest.* **1975**;56(3):740-50.
- Pirich C**, sinzinger H. Evidence for lipid regression in humans in vivo performed by 123Iodine-low-density lipoprotein scintiscanning. *Ann N Y Acad Sci.* **1995**;748:613-621.
- Qiao JH**, Tripathi J, Mishra NK, Cai Y, Tripathi S, Wang XP, Imes S, Fishbein MC, Clinton SK, Libby P, Lusis AJ, Rajavashisth TB. Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice. *Am J Pathol.* **1997**;150(5):1687-99.
- Qin G**, Zhang Y, Cao W, An R, Gao Z, Li G, Xu W, Zhang K, Li S. Molecular imaging of atherosclerotic plaques with technetium-99m-labelled antisense oligonucleotides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* **2005**;32:6-14.
- Rader DJ**, Daugherty A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature.* **2008**;451(7181):904-13.
- Raffel OC**, Akasaka T, Jang IK. Cardiac optical coherence tomography. *Heart.* **2008 Sep**;94(9):1200-10.
- Raffi S**, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med.* **2003**; 9:702-712.
- Ramos CL**, Huo Y, Jung U, Ghosh S, Manka DR, Sarembock IJ, Ley K. Direct demonstration of P-selectin- and VCAM-1-dependent mononuclear cell rolling in early atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. *Circ Res.* **1999**;84(11):1237-44.
- Randolph GJ**, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science.* **1998**;282(5388):480-3.
- Ren G**, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG. Morphological characteristics of the microvasculature in healing myocardial infarcts. *J Histochem Cytochem.* **2002**;50(1):71-9.
- Renault MA**, Losordo DW. Therapeutic myocardial angiogenesis. *Microvasc Res.* **2007**;74(2-3):159-71.
- Reimer KA**, Murry CE, Richard VJ. The role of neutrophils and free radicals in the ischemic-reperfused heart: why the confusion and controversy? *J Mol Cell Cardiol.* **1989**;21(12):1225-39.
- Riou LM**, Broisat A, Lartzien C, Toufektsian MC, Maitrejean S, Janier M, Vanzetto G, Fagret D, Ghezzi C. Assessment of non-reperfused and reperfused myocardial infarction using diffusible or deposited radiolabelled perfusion imaging agents. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* **2007**;34:330-337.
- Robinson CJ**, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* **2001**;114:853-65.
- Rocha R**, Silveira L Jr, Villaverde AB, Pasqualucci CA, Costa MS, Brugnera A Jr, Pacheco MT. Use of near-infrared Raman spectroscopy for identification of atherosclerotic plaques in the carotid artery. *Photomed Laser Surg.* **2007**;25(6):482-6.
- Rodriguez-Porcel M**, Cai W, Gheysens O, Willmann JK, Chen K, Wang H, Chen IY, He L, Wu JC, Li ZB, Mohamedali KA, Kim S, Rosenblum MG, Chen X, Gambhir SS. Imaging of VEGF receptor in a rat myocardial infarction model using PET. *J Nucl Med.* **2008 Apr**;49(4):667-73.

- Rogers** WJ, Prichard JW, Hu YL, Olson PR, Benckart DH, Kramer CM, Vido DA, Reichek N. Characterization of signal properties in atherosclerotic plaque components by intravascular MRI. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2000**;20(7):1824-30.
- Rosen** JM, Butler SP, Meinken GE, Wang TS, ramakrishnan R, Sristava SC, Alderson PO, Ginsberg HN. Indium-111-labeled LDL: a potential agent for imaging atherosclerotic disease and lipoprotein biodistribution. *J Nucl Med.* **1990**;31:343-350.
- Rosenfeld** ME, Ylä-Herttua S, Lipton BA, Ord VA, Witztum JL, Steinberg D. Macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein in atherosclerotic lesions of rabbits and humans. *Am J Pathol.* **1992**;140(2):291-300.
- Ross** R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* **1999**;340(2):115-26.
- Rossen** RD, Michael LH, Kagiyaama A, Savage HE, Hanson G, Reisberg MA, Moake JN, Kim SH, Self D, Weakley S. Mechanism of complement activation after coronary artery occlusion: evidence that myocardial ischemia in dogs causes release of constituents of myocardial subcellular origin that complex with human C1q in vivo. *Circ Res.* **1988**;62(3):572-84.
- Roy** J, Tran PK, Religa P, Kazi M, Henderson B, Lundmark K, Hedin U. Fibronectin promotes cell cycle entry in smooth muscle cells in primary culture. *Exp Cell Res.* **2002**;273(2):169-77.
- Rudd** JH, Warburton EA, Fryer TD, et al. Imaging atherosclerotic plaque inflammation with [18F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Circulation* **2002**;105:2708-11.
- Rudd** JH, Fayad ZA, Machac J, Weissberg PL, Davies JR, Warburton EA, Tawakol AA, Strauss HW, Fuster V. Response to 'Laurberg JM, Olsen AK, Hansen SB, et al. Imaging of vulnerable atherosclerotic plaques with FDG-microPET: no FDG accumulation' [Atherosclerosis 2006]. *Atherosclerosis.* **2007**;192:453-4; author reply 451-2.
- Rudd** JH, Myers KS, Bansilal S, Machac J, Rafique A, Farkouh M, Fuster V, Fayad ZA. (18)Fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging of atherosclerotic plaque inflammation is highly reproducible: implications for atherosclerosis therapy trials. *J Am Coll Cardiol.* **2007**;50:892-6.
- Rudd** JH, Myers KS, Bansilal S, Machac J, Pinto CA, Tong C, Rafique A, Hargeaves R, Farkouh M, Fuster V, Fayad ZA. Atherosclerosis inflammation imaging with 18F-FDG PET: carotid, iliac, and femoral uptake reproducibility, quantification methods, and recommendations. *J Nucl Med.* **2008**;49(6):871-8.
- Ruehm** SG, Corot C, Vogt P, Kolb S, Debatin JF. Magnetic resonance imaging of atherosclerotic plaque with ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in hyperlipidemic rabbits. *Circulation.* **2001**;103(3):415-22.
- Ruoslahti** E. The RGD story: a personal account. *Matrix Biology.* **2003**;22:459-465.
- Rusiñol** AE, Yang L, Thewke D, Panini SR, Kramer MF, Sinensky MS. Isolation of a somatic cell mutant resistant to the induction of apoptosis by oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem.* **2000**;275(10):7296-303.
- Saam** T, Ferguson MS, Yarnykh VL, Takaya N, Xu D, Polissar NL, Hatsukami TS, Yuan C. Quantitative evaluation of carotid plaque composition by in vivo MRI. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2005**;25(1):234-9.
- Sadeghi** MM, Krassilnikova S, Zhang J, Gharaei AA, Fassaei HR, Esmailzadeh L, Kooshkabadi A, Edwards S, Yalamanchili P, Harris TD, Sinusas AJ, Zaret BL, Bender JR. Detection of injury-induced vascular remodeling by targeting activated alphavbeta3 integrin in vivo. *Circulation.* **2004**;110(1):84-90.
- Saito** H, Minamiya Y, Kitamura M, Saito S, Enomoto K, Terada K, Ogawa J. Endothelial myosin light chain kinase regulates neutrophil migration across human umbilical vein endothelial cell monolayer. *J Immunol.* **1998**;161(3):1533-40.
- Sakai** A, Kume N, Nishi E, Tanoue K, Miyasaka M, Kita T. P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 are focally expressed in aortas of hypercholesterolemic rabbits before intimal accumulation of macrophages and T lymphocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **1997**;17(2):310-6.
- Sakai** M, Miyazaki A, Hakamata H, Kodama T, Suzuki H, Kobori S, Shichiri M, Horiuchi S. The scavenger receptor serves as a route for internalization of lysophosphatidylcholine in oxidized low density lipoprotein-induced macrophage proliferation. *J Biol Chem.* **1996**;271(44):27346-52.
- Sakai** M, Miyazaki A, Hakamata H, Sato Y, Matsumura T, Kobori S, Shichiri M, Horiuchi S. Lysophosphatidylcholine potentiates the mitogenic activity of modified LDL for human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **1996**;16(4):600-5.
- Sancey** L, Ardisson V, Riou LM, Ahmadi M, Marti-Batlle D, Boturyn D, Dumy P, Fagret D, Ghezzi C, Vuillez JP. In vivo imaging of tumour angiogenesis in mice with the alpha(v)beta (3) integrin-targeted tracer 99mTc-RAFT-RGD. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* **2007**;34(12):2037-47.
- Sancey** L, Garanger E, Foillard S, Schoehn G, Hurbin A, Albiges-Rizo C, Boturyn D, Souchier C, Grichine A, Dumy P, Coll JL. Clustering and internalization of integrin alphavbeta3 with a tetrameric RGD-synthetic peptide. *Mol Ther.* **2009**;17(5):837-43.
- Santoso** S, Sachs UJ, Kröll H, Linder M, Ruf A, Preissner KT, Chavakis T. The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1. *J Exp Med.* **2002** Sep 2;196(5):679-91.
- Sarai** M, Hartung D, Petrov A, Zhou J, Narula N, Hofstra L, Kolodgie F, Isobe S, Fujimoto S, Vanderheyden JL, Virmani R, Reutelingsperger C, Wong ND, Gupta S, Narula J. Broad and specific caspase inhibitor-induced acute repression of apoptosis in atherosclerotic lesions evaluated by radiolabeled annexin A5 imaging. *J Am Coll Cardiol.* **2007**;50:2305-12.

- Sata M**, Walsh K. Oxidized LDL activates fas-mediated endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest*. **1998**;102(9):1682-9.
- Savill J**, Dransfield I, Hogg N, Haslett C. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature*. **1990**;343:170-173.
- Savill J**, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol*. **2002**;2(12):965-75.
- Sawamura T**, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, Tanaka T, Miwa S, Katsura Y, Kita T, Masaki T. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature*. **1997**;386(6620):73-7.
- Schaar JA**, van der Steen AF, Mastik F, Baldewings RA, Serruys PW. Intravascular palpography for vulnerable plaque assessment. *J Am Coll Cardiol*. **2006** Apr 18;47(8 Suppl):C86-91.
- Schächinger V**, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol*. **2004**;44(8):1690-9.
- Schäfers M**, Riemann B, Kopka K, Breyholz HJ, Wagner S, Schäfers KP, Law MP, Schober O, Levkau B. Scintigraphic imaging of matrix metalloproteinase activity in the arterial wall in vivo. *Circulation*. **2004**;109(21):2554-9.
- Schecter AD**, Giesen PL, Taby O, Rosenfield CL, Rossikhina M, FyfeBS, Kohtz DS, Fallon JT, Nemerson Y, Taubman MB. Tissue factor expression in human arterial smooth muscle cells: TF is present in three cellular pools after growth factor stimulation. *J Clin Invest*. **1997**;100:2276-2285.
- Schenkel AR**, Mamdouh Z, Chen X, Liebman RM, Muller WA. CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat Immunol*. **2002**;3(2):143-50.
- Schmid DT**, John H, Zweifel R, cservenyak T, westera G, goerres GW, von schulthess GK, hany TF. Fluorocholine PET/CT in patients with prostate cancer: initial experience. *Radiology*. **2005**;235:623-628.
- Schneiderman J**, Wilensky RL, Weiss A, Samouha E, Muchnik L, Chen-Zion M, Ilovitch M, Golan E, Blank A, Flugelman M, Rozenman Y, Virmani R. Diagnosis of thin-cap fibroatheromas by a self-contained intravascular magnetic resonance imaging probe in ex vivo human aortas and in situ coronary arteries. *J Am Coll Cardiol*. **2005**;45(12):1961-9.
- Schulz R**, Heusch G. Tumor necrosis factor-alpha and its receptors 1 and 2: Yin and Yang in myocardial infarction? *Circulation*. **2009**;119(10):1355-7.
- Schwartz M**, Schaller M, Ginsberg M. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol* **1995**;11:549-99.
- Schwenke DC**, Carew TE. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. I. Focal increases in arterial LDL concentration precede development of fatty streak lesions. *Arteriosclerosis*. **1989**;9(6):895-907.
- Sellak H**, Franzini E, Hakim J, Pasquier C. Reactive oxygen species rapidly increase endothelial ICAM-1 ability to bind neutrophils without detectable upregulation. *Blood*. **1994**;83(9):2669-77.
- Semenza GL**. HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* **2001**;107:1-3.
- Sendobry SM**, Cornicelli JA, Welch K, Bocan T, Tait B, Trivedi BK, Colbry N, Dyer RD, Feinmark SJ, Daugherty A. Attenuation of diet-induced atherosclerosis in rabbits with a highly selective 15-lipoxygenase inhibitor lacking significant antioxidant properties. *Br J Pharmacol*. **1997**;120:1199-1206.
- Shapiro SD**. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol*. **1998**;10:602-8.
- Shaw PX**, Hörkkö S, Tsimikas S, Chang MK, Palinski W, Silverman GJ, Chen PP, Witztum JL. Human-derived anti-oxidized LDL autoantibody blocks uptake of oxidized LDL by macrophages and localizes to atherosclerotic lesions in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2001**;21:1333-9.
- Shaw SK**, Bamba PS, Perkins BN, Luscinskas FW. Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. *J Immunol*. **2001**;167(4):2323-30.
- Shikhaliev PM**, Xu T, Ducote JL, Easwaramoorthy B, mukherjee J, Molloi S. Positron autoradiography for intravascular imaging: feasibility evaluation. *Phys Med Biol*. **2006**;51:963-979.
- Shiota N**, Rysä J, Kovanen PT, Ruskoaho H, Kokkonen JO, Lindstedt KA. A role for cardiac mast cells in the pathogenesis of hypertensive heart disease. *J Hypertens*. **2003**;21(10):1935-44.
- Shishido T**, Nozaki N, Yamaguchi S, Shibata Y, Nitobe J, Miyamoto T, Takahashi H, Arimoto T, Maeda K, Yamakawa M, Takeuchi O, Akira S, Takeishi Y, Kubota I. Toll-like receptor-2 modulates ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation*. **2003**;108(23):2905-10.
- Shweiki D**, Itin A, Soffer D, et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **1992**;359:843-5.

Références bibliographiques

- Simons M**, Bonow RO, Chronos NA, Cohen DJ, Giordano FJ, Hammond HK, Laham RJ, Li W, Pike M, Sellke FW, Stegmann TJ, Udelson JE, Rosengart TK. Clinical trials in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus: An expert panel summary. *Circulation*. **2000** Sep 12;102(11):E73-86.
- Simons M**, Annex BH, Laham RJ, Kleiman N, Henry T, Dauerman H, Udelson JE, Gervino EV, Pike M, Whitehouse MJ, Moon T, Chronos NA. Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation*. **2002**;105(7):788-93.
- Simons M**, Ware JA. Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov*. **2003**;2:863-871.
- Sinusas A**. The potential for myocardial imaging with hypoxia markers. *Semin Nucl Med* **1999**;29:330-8.
- Sinusas AJ**. Imaging of angiogenesis. *J Nucl Cardiol*. **2004**;11:617-33.
- Sluijter JC**, Daemen MJ. Novel concepts in atherogenesis: angiogenesis and hypoxia in atherosclerosis. *J Pathol*. **2009**. [Epub ahead of print].
- Smirnova IV**, Kajstura M, Sawamura T, Goligorsky MS. Asymmetric dimethylarginine upregulates LOX-1 in activated macrophages: role in foam cell formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2004**;287(2):H782-90.
- Somasundaram P**, Ren G, Nagar H, Kraemer D, Mendoza L, Michael LH, Caughey GH, Entman ML, Frangogiannis NG. Mast cell tryptase may modulate endothelial cell phenotype in healing myocardial infarcts. *J Pathol*. **2005**;205(1):102-11.
- Spaeth N**, Wyss MT, Weber B, Scheidegger S, Lutz A, Verwey J, Radovanovic I, Pahnke J, Wild D, Westera G, Weishaupt D, Hermann DM, Kaser-Hotz B, Aguzzi A, Buck A. Uptake of 18F-fluorocholine, 18F-fluoroethyl-L-tyrosine, and 18F-FDG in acute cerebral radiation injury in the rat: implications for separation of radiation necrosis from tumor recurrence. *J Nucl Med*. **2004**;45:1931-1938.
- Springer TA**. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. **1990**;346(6283):425-34.
- Stamper D**, Weissman NJ, Brezinski M. Plaque characterization with optical coherence tomography. *J Am Coll Cardiol*. **2006** Apr 18;47(8 Suppl):C69-79.
- Stary HC**. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2000**;20(5):1177-8.
- Stefanadis C**, Diamantopoulos L, Vlachopoulos C, Tsiamis E, Dernelis J, Toutouzas K, Stefanadi E, Toutouzas P. Thermal heterogeneity within human atherosclerotic coronary arteries detected in vivo: A new method of detection by application of a special thermography catheter. *Circulation*. **1999**;99(15):1965-71.
- Stefanadis C**, Toutouzas K, Tsiamis E, Mitropoulos I, Tsioufis C, Kallikazaros I, Pitsavos C, Toutouzas P. Thermal heterogeneity in stable human coronary atherosclerotic plaques is underestimated in vivo: the "cooling effect" of blood flow. *J Am Coll Cardiol*. **2003**;41(3):403-8.
- Steffel J**, Akhmedov A, Greutert H, Luscher TF, Tanner FC. Histamine induces tissue factor expression: implications for acute coronary syndromes. *Circulation*. **2005**;112:341-349.
- Steffel J**, Hermann M, Greutert H, Gay S, Luscher TF, Ruschitzka F, Tanner FC. Celecoxib decreases endothelial tissue factor expression through inhibition of c-Jun terminal NH2 kinase phosphorylation. *Circulation*. **2005**;111:1685-1689.
- Steffel J**, Luscher TF, Tanner FC. Tissue factor in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical implications. *Circulation*. **2006**;113(5):722-31.
- Stender S**, Hjelm E. In vivo transfer of cholesteryl ester from high and low density plasma lipoproteins into human aortic tissue. *Arteriosclerosis*. **1988**;8(3):252-62.
- Stewart DJ**. A phase 2 randomized, multicenter, 26-week study to assess the efficacy and safety of BIOBYPASS (AdgfVEGF121.10) delivered through maximally invasive surgery versus maximal medical treatment in patients with severe angina, advanced coronary artery disease and no options for revascularization. *Circulation* **2002**;106:2986-a.
- Stewart DJ**, Kutryk MJ, Fitchett D, Freeman M, Camack N, Su Y, Della Siega A, Bilodeau L, Burton JR, Proulx G, Radhakrishnan S; NORTHERN Trial Investigators. VEGF gene therapy fails to improve perfusion of ischemic myocardium in patients with advanced coronary disease: results of the NORTHERN trial. *Mol Ther*. **2009**;17(6):1109-15.
- Stocker CJ**, Sugars KL, Harari OA, Landis RC, Morley BJ, Haskard DO. TNF-alpha, IL-4, and IFN-gamma regulate differential expression of P-selectin expression by porcine aortic endothelial cells. *J Immunol*. **2000**;164:3309-3315.
- Stocker R**. Antioxidant defenses in the vascular wall. In: *Oxidative Stress and Vascular Disease*, edited by Keaney JF Jr. Boston: Kluwer Academic, **2000**, p. 27-47.
- Strauss HW**, Nunn A, Linder K. Nitroimidazoles for imaging hypoxic myocardium. *J Nucl Cardiol*. **1995** Sep-Oct;2(5):437-45.
- Strauss HW**, Mari C, Patt BE, Ghazrossian V. Intravascular radiation detectors for the detection of vulnerable atheroma. *J Am Coll Cardiol*. **2006**;47:C97-C100.
- Su WH**, Chen HI, Huang JP, Jen CJ. Endothelial [Ca(2+)]_i signaling during transmigration of polymorphonuclear leukocytes. *Blood*. **2000**;96(12):3816-22.

Références bibliographiques

- Su H**, Spinale FG, Dobrucki LW, Song J, Hua J, Sweterlitsch S, et al. Noninvasive targeted imaging of matrix metalloproteinase activation in a murine model of postinfarction remodeling. *Circulation* **2005**;112:3157–67.
- Sun Y**, Zhang JQ, Zhang J, Lamparter S. Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats. *J. Lab. Clin. Med.* **2000**;135:316-23.
- Sutton MG**, Sharpe N. Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction - Pathophysiology and Therapy. *Circulation*. **2000**;101:2981-2988.
- Tabas I**. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J Clin Invest.* **2002**;110(7):905-11.
- Tahara N**, Kai H, Ishibashi M, et al. Simvastatin attenuates plaque inflammation: evaluation by fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *J Am Coll Cardiol* **2006**;48:1825–31.
- Tangirala RK**, Bischoff ED, Joseph SB, Wagner BL, Walczak R, Laffitte BA, Daige CL, Thomas D, Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Wang X, Lusis AJ, Tontonoz P, Schulman IG. Identification of macrophage liver X receptors as inhibitors of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2002**;99(18):11896-901.
- Tawakol A**, Migrino RQ, Bashian GG, et al. In vivo ¹⁸Ffluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging provides a noninvasive measure of carotid plaque inflammation in patients. *J Am Coll Cardiol* **2006**;48:1818–24.
- Taylor KR**, Trowbridge JM, Rudisill JA, Termeer CC, Simon JC, Gallo RL. Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *J Biol Chem.* **2004**;279(17):17079-84.
- Tearney GJ**, Jang IK, Kang DH, et al. Porcine coronary imaging in vivo by optical coherence tomography. *Acta Cardiol.* **2000**;55:233–237.
- Tearney GJ**, Yabushita H, Houser SL, Aretz HT, Jang IK, Schlendorf KH, Kauffman CR, Shishkov M, Halpern EF, Bouma BE. Quantification of macrophage content in atherosclerotic plaques by optical coherence tomography. *Circulation.* **2003**;107(1):113-9.
- Tedgui A**, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev.* **2006**;86(2):515-81.
- Tepe G**, Duda SH, Meding J, Brehme U, Ritter J, Hanke H, Hilger CS, Claussen CD, Dinkelborg LM. Tc-99m-labeled endothelin derivative for imaging of experimentally induced atherosclerosis. *Atherosclerosis.* **2001**;157(2):383-92.
- Terkeltaub R**, Boisvert WA, Curtiss LK. Chemokines and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* **1998**;9(5):397-405.
- Thiruvikraman SV**, Guha A, Roboz J, Taubman MB, Nemerson Y, Fallon JT. In situ localization of tissue factor in human atherosclerotic plaques by binding of digoxigenin-labeled factors VIIa and X. *Lab Invest.* **1996**;75:451– 461.
- Thorp E**, Tabas I. Mechanisms and consequences of efferocytosis in advanced atherosclerosis. *J Leukoc Biol.* **2009** May 4. [Epub ahead of print].
- Thurberg BL**, Collins T. The nuclear factor-kappa B/inhibitor of kappa B autoregulatory system and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **1998**;9:387–96.
- Tomasek JJ**, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2002**;3(5):349-63.
- Torzewski M**, Shaw PX, Han KR, Shortal B, Lackner KJ, Witztum JL, Palinski W, Tsimikas S. Reduced in vivo aortic uptake of radiolabeled oxidation-specific antibodies reflects changes in plaque composition consistent with plaque stabilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2004**;24:2307-12.
- Toussaint JF**, Southern JF, Fuster V, Kantor HL. T2-weighted contrast for NMR characterization of human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **1995**;15(10):1533-42.
- Toutouzias K**, Drakopoulou M, Mitropoulos J, Tsiamis E, Vaina S, Vavuranakis M, Markou V, Bosinakou E, Stefanadis C. Elevated plaque temperature in non-culprit de novo atheromatous lesions of patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol.* **2006** ;47(2):301-6.
- Toutouzias K**, Synetos A, Stefanadi E, Vaina S, Markou V, Vavuranakis M, Tsiamis E, Tousoulis D, Stefanadis C. Correlation between morphologic characteristics and local temperature differences in culprit lesions of patients with symptomatic coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* **2007**;49(23):2264-71.
- Tsimikas S**, Palinski W, Halpern SE, Yeung DW, Curtiss LK, Witztum JL. Radiolabeled MDA2, an oxidation-specific, monoclonal antibody, identifies native atherosclerotic lesions in vivo. *J Nucl Cardiol.* **1999**;6:41-53.
- Tsimikas S**, Shortal BP, Witztum JL, Palinski W. In vivo uptake of radiolabeled MDA2, an oxidation-specific monoclonal antibody, provides an accurate measure of atherosclerotic lesions rich in oxidized LDL and is highly sensitive to their regression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2000**;20:689-97.
- Tsimikas S**. Noninvasive imaging of oxidized low-density lipoprotein in atherosclerotic plaques with tagged oxidation-specific antibodies. *Am J Cardiol.* **2002**;90:22L-27L.
- Tucker GC**. Integrins: molecular targets in cancer therapy. *Curr Oncol Rep.* **2006**;8:96–103.
- Tzima E**, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Dejana E, Schultz DA, Engelhardt B, Cao G, DeLisser H, Schwartz MA. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature.* **2005**;437(7057):426-31.

- Ueda Y**, Ohtani T, Shimizu M, Hirayama A, Kodama K. Assessment of plaque vulnerability by angioscopic classification of plaque color. *Am Heart J*. **2004**;148(2):333-5.
- Unger EF**, Banai S, Shou M, Lazarous DF, Jaklitsch MT, Scheinowitz M, Correa R, Klingbeil C, Epstein SE. Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in a canine model. *Am J Physiol*. **1994**;266(4 Pt 2):H1588-95.
- Vallabhajosula S**, Paidi M, Badimon JJ, Le NA, Goldsmith SJ, Fuster V, Ginsberg HN. Radiotracers for low density lipoprotein biodistribution studies in vivo: technetium-99m low density lipoprotein versus radioiodinated low density lipoprotein preparations. *J Nucl Med*. **1988**;29:1237-45.
- van der Flier A**, Sonnenberg A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* **2001**;305:285–98.
- van de Poll SW**, Kastelijm K, Bakker Schut TC, Strijder C, Pasterkamp G, Puppels GJ, van der Laarse A. On-line detection of cholesterol and calcification by catheter based Raman spectroscopy in human atherosclerotic plaque ex vivo. *Heart*. **2003**;89(9):1078-82.
- van Wanrooij EJ**, de Vos P, Bixel MG, Vestweber D, van Berkel TJ, Kuiper J. Vaccination against CD99 inhibits atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Cardiovasc Res*. **2008**;78(3):590-6.
- Vasile E**, Simionescu M, Simionescu N. Visualization of the binding, endocytosis, and transcytosis of low-density lipoprotein in the arterial endothelium in situ. *J Cell Biol*. **1983**;96(6):1677-89.
- Vera Janavel G**, Crottogini A, Cabeza Meckert P, Cuniberti L, Mele A, Papouchado M, Fernández N, Bercovich A, Criscuolo M, Melo C, Laguens R. Plasmid-mediated VEGF gene transfer induces cardiomyogenesis and reduces myocardial infarct size in sheep. *Gene Ther*. **2006**;13(15):1133-42.
- Viles-Gonzalez JF**, Poon M, Sanz J, Rius T, Nikolaou K, Fayad ZA, Fuster V, Badimon JJ. In vivo 16-slice, multidetector-row computed tomography for the assessment of experimental atherosclerosis: comparison with magnetic resonance imaging and histopathology. *Circulation*. **2004**;110(11):1467-72.
- Villanueva FS**, Jankowski RJ, Klivanov S, Pina ML, Alber SM, Watkins SC, Brandenburger GH, Wagner WR. Microbubbles targeted to intercellular adhesion molecule-1 bind to activated coronary artery endothelial cells. *Circulation*. **1998 Jul 7**;98(1):1-5.
- Villanueva FS**, Abraham JA, Schreiner GF, Csikari M, Fischer D, Mills JD, et al. Myocardial contrast echocardiography can be used to assess the microvascular response to vascular endothelial growth factor-121. *Circulation* **2002**;105:759–65.
- Virgolini I**, Angelberger P, O'Grady J, Sinzinger H. Low density lipoprotein labelling characterizes experimentally induced atherosclerotic lesions in rabbits in vivo as to presence of foam cells and endothelial coverage. *Eur J Nucl Med*. **1991**;18:944-947.
- Virmani R**, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol*. **2006**;47(8 Suppl):C13-8.
- von Hundelshausen P**, Weber C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res*. **2007**;100(1):27-40.
- von Lukowicz T**, Silacci M, Wyss MT, Trachsel E, Lohmann C, Buck A, Lüscher TF, Neri D, Matter CM. Human antibody against C domain of tenascin-C visualizes murine atherosclerotic plaques ex vivo. *J Nucl Med*. **2007**;48:582-7.
- Wada H**, Kaneko T, Wakita Y, Minamikawa K, Nagaya S, Tamaki S, Deguchi K, Shirakawa S. Effect of lipoproteins on tissue factor activity and PAI-II antigen in human monocytes and macrophages. *Int J Cardiol*. **1994**;47:S21–S25.
- Wagner S**, Breyholz HJ, Law MP, Faust A, höltke C, Schröer S, haufe G, Levkau B, Schober O, Schäfers M, Kopka K. Novel fluorinated derivatives of the broad-spectrum MMP inhibitors N-hydroxy-2(R)-[[[4-methoxyphenyl)sulfonyl](benzyl)- and (3-picolyl)-amino]-3-methylbutanamide as potential tools for the molecular imaging of activated MMPs with PET. *J Med Chem*. **2007**;50:5752-5764.
- Wang P**, Chen H, Qin H, Sankarapandi S, Becher MW, Wong PC, Zweier JL. Overexpression of human copper, zinc-superoxide dismutase (SOD1) prevents posts ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1998**;95(8):4556-60.
- Weber KS**, von Hundelshausen P, Clark-Lewis I, Weber PC, Weber C. Differential immobilization and hierarchical involvement of chemokines in monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow. *Eur J Immunol*. **1999**;29(2):700-12.
- Weber C**, Zernecke A, Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat Rev Immunol*. **2008**;8(10):802-15.
- Weinbaum S**, Tzeghai G, Ganatos P, Pfeffer R, Chien S. Effect of cell turnover and leaky junctions on arterial macromolecular transport. *Am J Physiol*. **1985**;248(6 Pt 2):H945-60.
- Weyrich AS**, Ma XY, Lefer DJ, Albertine KH, Lefer AM. In vivo neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Clin Invest*. **1993**;91(6):2620-9.
- Whalen DA**, Hamilton DG, Ganote CE, Jennings RB. Effect of a transient period of ischemia on myocardial cells. I. Effects on cell volume regulation. *Am J Pathol*. **1974**;74:381–397.
- Wilcox JN**, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1989**;86:2839–2843.
- Willems IE**, Havenith MG, De Mey JG, Daemen MJ. The alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars. *Am J Pathol*. **1994**;145(4):868-75.

Références bibliographiques

- Winter** PM, Morawski AM, Caruthers SD, Fuhrhop RW, Zhang H, Williams TA, Allen JS, Lacy EK, Robertson JD, Lanza GM, Wickline SA. Molecular imaging of angiogenesis in early-stage atherosclerosis with alpha(v)beta3-integrin-targeted nanoparticles. *Circulation*. **2003**;108(18):2270-4.
- Whitman** SC, Ravisankar P, Elam H, Daugherty A. Exogenous interferon-gamma enhances atherosclerosis in apolipoprotein E^{-/-} mice. *Am J Pathol*. **2000**;157:1819-1824.
- World Health Organization**, cardiovascular diseases, fact sheet #317, **2007**. Available at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>
- Wolff** JA, Malone RW. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **1990**;247:1465-1468.
- Wykrzykowska** J, Lehman S, Williams G, Parker JA, Palmer MR, Varkey S, Kolodny G, Laham R. Imaging of inflamed and vulnerable plaque in coronary arteries with 18F-FDG PET/CT in patients with suppression of myocardial uptake using a low-carbohydrate, high-fat preparation. *J Nucl Med*. **2009**;50(4):563-8.
- Wyss** MT, Weber B, hoenr M, Späth N, Ametamey SM, westera G, Bode B, Kaim AH, buck A. 18F-choline in experimental soft tissue infection assessed with autoradiography and high-resolution PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. **2004**;31:312-316.
- Yamada** Y, Doi T, Hamakubo T, Kodama T. Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci*. **1998**;54(7):628-40.
- Yamamoto** M, Okamatsu K, Inami S, Takano M, Yokoyama S, Ohba T, Ibuki C, Hata N, Seino Y, Mizuno K. Relationship between neointimal coverage of sirolimus-eluting stents and lesion characteristics: a study with serial coronary angiography. *Am Heart J*. **2009**;158(1):99-104.
- Yang** QW, Mou L, Lv FL, Wang JZ, Wang L, Zhou HJ, Gao D. Role of Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in monocyte-endothelial adhesion induced by low shear stress and ox-LDL. *Biorheology*. **2005**;42(3):225-36.
- Yang** XP, Mattagajasingh S, Su S, Chen G, Cai Z, Fox-Talbot K, Irani K, Becker LC. Fractalkine upregulates intercellular adhesion molecule-1 in endothelial cells through CX3CR1 and the Jak Stat5 pathway. *Circ Res*. **2007**;101(10):1001-8.
- Yasojima** K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Human heart generates complement proteins that are upregulated and activated after myocardial infarction. *Circ Res*. **1998**;83(8):860-9.
- Yilmaz** A, Lipfert B, Cicha I, Schubert K, Klein M, Raithel D, et al. Accumulation of immune cells and high expression of chemokines/chemokine receptors in the upstream shoulder of atherosclerotic carotid plaques. *Exp Mol Pathol*. **2007**;82(3):245-255.
- Ylä-Herttuala** S, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Glass CK, Sigal E, Witztum JL, and Steinberg D. Colocalization of 15-lipoxygenase mRNA and protein with epitopes of oxidized low density lipoprotein in macrophage-rich areas of atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA*. **1990**;87: 6959-6963.
- Ylä-Herttuala** S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol*. **2007**; 49:1015-1026.
- Yuan** C, Mitsumori LM, Ferguson MS, Polissar NL, Echelard D, Ortiz G, Small R, Davies JW, Kerwin WS, Hatsukami TS. In vivo accuracy of multispectral magnetic resonance imaging for identifying lipid-rich necrotic cores and intraplaque hemorrhage in advanced human carotid plaques. *Circulation*. **2001**;104(17):2051-6.
- Yuan** C, Kerwin WS, Ferguson MS, Polissar N, Zhang S, Cai J, Hatsukami TS. Contrast-enhanced high resolution MRI for atherosclerotic carotid artery tissue characterization. *J Magn Reson Imaging*. **2002**;15(1):62-7.
- Zernecke** A, Liehn EA, Fraemohs L, von Hundelshausen P, Koenen RR, Corada M, Dejana E, Weber C. Importance of junctional adhesion molecule-A for neointimal lesion formation and infiltration in atherosclerosis-prone mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2006**;26(2):e10-3.
- Zhao** ZQ, Nakamura M, Wang NP, Wilcox JN, Shearer S, Ronson RS, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovasc Res*. **2000**;45(3):651-60.
- Zhao** Y, Kuge Y, Zhao S, Morita K, Inubushi M, Strauss HW, Blankenberg FG, Tamaki N. Comparison of ^{99m}Tc-annexin A5 with 18F-FDG for the detection of atherosclerosis in Apo E^{-/-} mice. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. **2007**;34:1747-1755.
- Zhao** Y, Kuge Y, Zhao S, Strauss HW, Blankenberg FG, Tamaki N. Prolonged high-fat feeding enhances aortic 18F-FDG and ^{99m}Tc-annexin A5 uptake in apolipoprotein E-deficient and wild-type C57BL/6J mice. *J Nucl Med*. **2008**;49(10):1707-14.
- Zhou** X, Robertson AK, Hjerpe C, Hansson GK. Adoptive transfer of CD4⁺ T cells reactive to modified low-density lipoprotein aggravates atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2006**;26:864-870.

Résumé :

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde. Plus de 42 % de cette mortalité est imputable à la maladie coronaire causée par la rupture ou l'érosion de plaques d'athérome vulnérable. A l'heure actuelle, aucune technique ne permet de détecter de manière non invasive les plaques d'athérome vulnérables. **La 1^{ère} partie de cette thèse porte sur l'évaluation de nouveaux radiotraceurs pour la détection des plaques d'athérome vulnérables.** Les radiotraceurs ^{99m}Tc -B2702p, ses 20 dérivés, ^{99m}Tc -VP et ^{99m}Tc -VINP28, ont été évalués dans un modèle expérimentale de lésion athérosclérotique induite par ligature de la carotide gauche chez la souris Apo E^{-/-} hypercholestérolémique. Seul le dérivé ^{99m}Tc -B2702p1 a permis de réaliser l'imagerie de la lésion athérosclérotique chez la souris Apo E^{-/-}.

L'angiogenèse myocardique est un phénomène important qui se met en place après un infarctus du myocarde. Expérimentalement, les traitements pro-angiogéniques améliorent les paramètres cardiaques. Cependant, les études cliniques réalisées ne présentent pas de consensus sur l'amélioration de la perfusion myocardique suite à l'administration de ces mêmes traitements. Les techniques d'imagerie utilisées actuellement en clinique ne permettent pas de contrôler l'efficacité des traitements pro-angiogéniques administrés après un infarctus du myocarde. **La 2^{ème} partie de cette thèse porte sur la validation du ^{99m}Tc -RAFT-RGD dans la détection de l'angiogenèse myocardique.** Le ^{99m}Tc -RAFT-RGD, administré dans un modèle d'ischémie-reperfusion de rat, a permis de réaliser l'imagerie non invasive de l'angiogenèse myocardique.

Mots-clés : Médecine nucléaire, imagerie moléculaire, athéroclérose, angiogenèse myocardique.

Summary :

Cardiovascular diseases are the leading cause of mortality worldwide. Coronary events are mainly caused by coronary plaque rupture or erosion. However, at present, there is no noninvasive tool available for the detection of vulnerable plaques. **The first part of thesis is about evaluation of new radiotracers for the detection of atherosclerotic vulnerable plaques.** ^{99m}Tc -B2702p, 20 derivatives, ^{99m}Tc -VP and ^{99m}Tc -VINP28 were evaluated in an experimental model of atherosclerosis (ApoE^{-/-} mice with left carotid artery ligation). ^{99m}Tc -B2702p1 is a potentially useful radiotracer for the in vivo molecular imaging of VCAM-1 expression in atherosclerotic plaques.

Myocardial angiogenesis is an important post infarction phenomenon. Angiogenic therapy improves experimentally cardiac parameters. However, clinical trials using the same therapy are more controversial. At present, clinical imaging tools don't allow us to assess angiogenesis therapy. **The second part of thesis is about validation of ^{99m}Tc -RAFT-RGD in the detection of myocardial angiogenesis.** ^{99m}Tc -RAFT-RGD allow us to perform noninvasive molecular imaging of myocardial angiogenesis in an experimental model.

Keywords : Nuclear medicine, molecular imaging, atherosclerosis, myocardial angiogenesis.