



**HAL**  
open science

# Implication des macrophages M1/M2 dans les pathologies vasculaires et valvulaires humaines

Charlotte Lavisse

► **To cite this version:**

Charlotte Lavisse. Implication des macrophages M1/M2 dans les pathologies vasculaires et valvulaires humaines. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2015. Français. NNT : 2015LIL2S063 . tel-01344322

**HAL Id: tel-01344322**

**<https://theses.hal.science/tel-01344322>**

Submitted on 11 Jul 2016

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

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

**UNIVERSITÉ LILLE 2 – DROIT ET SANTÉ  
ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ DE LILLE**

**THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE**

**DISCIPLINE : Physiologie, Physiopathologie, Biologie systémique médicale**

**SPECIALITE : Sciences Biologiques (Pharmacie)**

**IMPLICATIONS DES MACROPHAGES M1/M2  
DANS LES PATHOLOGIES VASCULAIRES  
ET VALVULAIRES HUMAINES**

**Thèse soutenue publiquement le 18 décembre 2015 par**

**Charlotte ROMA née LAVISSE**

**Devant le jury composé de :**

**Madame le Professeur Sophie SUSEN  
Monsieur le Professeur Philippe NGUYEN  
Monsieur le Professeur David SMADJA  
Madame le Professeur Annabelle DUPONT**

**Président du jury  
Rapporteur  
Rapporteur  
Directrice de Thèse**

## Remerciements

---

Je souhaite tout d'abord remercier les Professeurs Brigitte Jude et Sophie Susen pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ces travaux de thèse au sein de leur laboratoire. J'ai apprécié travailler avec vous, votre rigueur, votre sens critique ont été de vrais atouts pour mon travail. Sophie me fait l'honneur d'être présidente de ce jury de thèse.

J'adresse mes plus sincères remerciements aux Professeurs Philippe Nguyen et David Smadja pour me faire l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteurs.

Je remercie également le Professeur Annabelle Dupont qui m'a accompagné depuis le Master 2. Vous m'avez donné l'opportunité de m'initier à la recherche et m'avez confié ce projet de thèse par la suite. Je vous suis très reconnaissante de m'avoir guidée lors de mes travaux et pour toute l'aide que vous m'avez apporté tout au long de ma thèse et de ma formation de biologiste au CH de Valenciennes.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail :

### **Les membres de l'équipe :**

Pr Bart Staels, pour m'avoir accueilli dans son unité pour ma dernière année de thèse

Madjid Tagzirt, pour son aide précieuse, son partage de connaissances méthodologiques et son soutien

Bertrand Vaast, pour ses précieux conseils et son aide technique à la réalisation des analyses de biologie moléculaire, sa bonne humeur et sa sympathie

Dr Christophe Zawadzki, avec qui j'ai apprécié de travailler au cours de mes semestres d'interne en hémostase, au cours de ce travail de recherche et encore aujourd'hui sur la thrombophilie

Delphine Corseaux, pour son expertise scientifique, ses excellents conseils au cours des réunions de travail et sa grande disponibilité

Dr Emmanuelle Jeanpierre, pour son expertise biologique sur le test de génération de thrombine

Les chirurgiens cardiaques et vasculaires, Pr André Vincentelli, Dr Carlo Banfi, Pr Stéphane Haulon et Dr Richard Azzaoui, pour leur implication dans le recrutement des patients inclus et dans la collecte des plaques d'endartériectomie et des valves pathologiques

Véronique et Marie-Pascale, techniciennes en culture cellulaire, pour leur partage d'expérience, leurs excellents conseils techniques ainsi que pour leur disponibilité et leur gentillesse

Jonathan Vanhoutte, pour son aide aux techniques d'immuno-histochimie, à la quantification des marquages et au traitement des données

Rodrigo Lorenzi, pour son soutien et ses corrections en anglais

Mickaël, Anaïs, Nicolas, pour leur soutien, leur bonne humeur et leur sympathie

**Les personnes qui ont collaboré à la réalisation de ces travaux :**

Pr Giulia Chinetti, pour ses conseils dans la culture et la différenciation des macrophages et son aide dans ce projet

Pr Claude Preudhomme, qui m'a permis d'utiliser la plateforme de Biologie moléculaire du Centre de Biologie Pathologie du CHRU de Lille. J'ai également apprécié son enseignement et sa formation en cytologie pendant mon internat

Drs Bernadette Hennache, Brigitte Onraed et Patrice Maboudou, pour m'avoir permis d'effectuer les dosages chromatographiques et immunométriques au sein du laboratoire de Biochimie spécialisée du Pôle de Biologie

**Mes collègues biologistes :**

Pr Patrick Duthilleul, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de biologistes de l'UF d'Hématologie-Hémostase du Pôle de Biologie-Hygiène du CH de Valenciennes et d'avoir soutenu ce projet de recherche. Merci pour l'enseignement de grande qualité et pour m'avoir fait tant aimer l'Hématologie

Mes collègues biologistes Fabienne Le Baron, Stéphanie Poulain et Hervé Bisiau qui ont soutenu la réalisation de ce travail

**Ma famille et mes amis :**

Mes parents, tout particulièrement, pour leur soutien de tous les jours, leur amour, cette réussite professionnelle est pour eux une grande fierté, je leur en serai éternellement reconnaissante

Mon mari, pour son amour, sa patience, sa grande disponibilité. Merci d'être à mes côtés et de me soutenir dans mes choix

Mon fils, Clément, qui illumine mes journées et mes nuits...

Mes amis, pour les moments de joie partagés et leur soutien

## Publications et Communications

---

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

### Publications dans des revues internationales à comité de lecture

C. ROMA-LAVISSE, M. TAGZIRT, C. ZAWADZKI, R. LORENZI, A. VINCENTELLI, S. HAULON, F. JUTHIER, A. RAUCH, D. CORSEaux, B. STAELS, B. JUDE, E. VAN BELLE, S. SUSEN, G. CHINETTI-GBAGUIDI, A. DUPONT. M1 and M2 macrophage proteolytic and angiogenic profile analysis in atherosclerotic patients reveals a distinctive profile in type 2 diabetes. *Diab Vasc Dis Res*. 2015; 12(4):279-89

M. TAGZIRT, D. CORSEaux, L. PASQUESOONE, F. MOUQUET, C. ROMA-LAVISSE, A. UNG, R. LORENZI, B. JUDE, A; ELKALIOUBIE, E. VAN BELLE, S. SUSEN, A. DUPONT, Alterations in neutrophil production and functions at an early stage in the high fructose rat model of metabolic syndrome. *Am J Hypertens*, 2014, 27(8):1096-104

A. ELKALIOUBIE, C. ZAWADZKI, C. LAVISSE, G. CHINETTI-GBAGUIDI, M. TAGZIRT, D. CORSEaux, F. JUTHIER, B. VAAST, J. VANHOUTTE, A. UNG, E. JEAN-PIERRE, F. RICHARD, A. VINCENTELLI, B. JUDE, S. HAULON, B. STAELS, S. SUSEN, E. VAN BELLE, A. DUPONT, Free leptin, carotid plaque phenotype and relevance to related symptomatology: insights from the OPAL-Lille carotid endarterectomy study. *Int J Cardiol*, 2013, 168(5):4879-81

### Communications orales (o) ou par affiches (p)

#### *Congrès internationaux*

C. ROMA, M. TAGZIRT, C. ZAWADZKI, R. LORENZI, A. VINCENTELLI, S. HAULON, F. JUTHIER, B. STAELS, B. JUDE, E. VAN BELLE, G. CHINETTI-GBAGUIDI, S. SUSEN, A. DUPONT, M1 and M2 macrophage proteolytic and angiogenic profiles analysis in atherosclerotic patients reveals a distinctive profile in type 2 diabetes, XV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Juin 2015, Toronto, Canada In : *J Thromb Haemost*, 2015, 13(Suppl 2) (o)

M. TAGZIRT, D. CORSEaux, L. PASQUESOONE, F. MOUQUET, C. ZAWADZKI, A. UNG, M. BARTHELEMY, C. LAVISSE, J. BREYNE, A. ELKALIOUBIE, B. JUDE, E. VAN BELLE, S. SUSEN, A. DUPONT, Alterations of neutrophils production and functions at early stage of metabolic syndrome in a high fructose rat model. XIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Juillet 2013, Amsterdam. In : *J Thromb Haemost*, 2013, 11(Suppl S2) (p)

A. ELKALIOUBIE, C. ZAWADZKI, C. LAVISSE, G. CHINETTI-GBAGUIDI, M. TAGZIRT, D. CORSEaux, F. JUTHIER, B. VAAST, J. VANHOUTTE, A. UNG, E. JEAN-

PIERRE, A. VINCENTELLI, B. JUDE, S. HAULON, B. STAELS, S. SUSEN, E. VAN BELLE, A. DUPONT, Free leptin and soluble leptin receptor: novel circulating markers of carotid plaque-related symptomatology and potential role in plaque stability (from the OPAL-Lille carotid endarterectomy study), International Stroke Conference, Février 2013, Hawaii. In: *Stroke*, 2013, 44:ATP433 (p)

**C. ROMA-LAVISSE**, C. ZAWADZKI, M. TAGZIRT, C. BANFI, S. HAULON, G. CHINETTI-GBAGUIDI, B. JUDE, S. SUSEN, E. VAN BELLE, A. DUPONT, M1 and M2 macrophages expression profiles in human atherosclerosis and modulation by cardiovascular risk factors, European Society of Cardiology Congress, Août 2012, Munich, In: *Eur Heart J*, 2012, 33, Suppl. 1, 945 (o)

A. DUPONT, A. EL KALIOUBIE, C. ZAWADZKI, M. TAGZIRT, **C. LAVISSE**, B. STAELS, S. HAULON, B. JUDE, S. SUSEN, E. VAN BELLE, Leptin is expressed in human carotid atherosclerotic plaques and plays an active role in plaque stability via its effects on human vascular smooth muscle cells phenotype, European Society of Cardiology Congress, Août 2012, Munich, In: *Eur Heart J*, 2012, 33, Suppl. 1, 749 (p)

A. ELKALIOUBIE, C. ZAWADZKI, **C. LAVISSE**, G. CHINETTI-GBAGUIDI, B. STAELS, B. JUDE, S. HAULON, S. SUSEN, E. VAN BELLE, A. DUPONT, Serum and carotid plaque leptin are major determinants of a stable plaque phenotype, insights from the OPAL study, European Society of Cardiology Congress, Août 2012, Munich. In: *Eur Heart J*, 2012, 33, Suppl. 1, 398 (p)

A. ELKALIOUBIE, C. ZAWADZKI, A. UNG, **C. LAVISSE**, M. TAGZIRT, G. CHINETTI-GBAGUIDI, B. STAELS, S. HAULON, B. JUDE, E. VAN BELLE, A. DUPONT, Role of Leptin on Plaque Stability: Insights From the Opal (OPTimized management of Atherosclerosis in various Localizations) Carotid Endarterectomy Study, American Heart Association, Novembre 2011, Orlando. In: *Circulation*, 2011; 124, A15299 (o)

### ***Congrès nationaux***

M. TAGZIRT, **C. ROMA-LAVISSE**, Y. BENCHEIKH, M. ROSA, A. ARBESU Y MIAR, R. LORENZI, B. VAAST, A. UNG, A. RAUCH, D. CORSEAU, R. JASHARI, C. ZAWADZKI, F. JUTHIER, E. VAN BELLE, S. SUSEN, B. STAELS, A. DUPON, Effet paracrine des cellules interstitielles de valve sur le phénotype des macrophages M1 : implication dans la progression de la fibrose associée à la sténose valvulaire aortique. Congrès Annuel de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose (NSFA), Juin 2015, Biarritz (p)

**C. ROMA-LAVISSE**, M. TAGZIRT, C. ZAWADZKI, R. LORENZI, A. VINCENTELLI, S. HAULON, F. JUTHIER, E. VAN BELLE, G. CHINETTI-GBAGUIDI, B. STAELS, S. SUSEN, A. DUPONT, L'analyse des profils angiogéniques et protéolytiques des macrophages M1 et M2 de patients athéroscléreux révèle un profil particulier chez les patients diabétiques de type 2. Société Française d'Hématologie (SFH) Avril 2015, Paris (o)

A. ELKALIOUBIE, C. ZAWADZKI, **C. LAVISSE**, G. CHINETTI-GBAGUIDI, M. TAGZIRT, D. CORSEAU, F. JUTHIER, B. VAAST, J. VANHOUTTE, A. UNG, E. JEAN-PIERRE, A. VINCENTELLI, B. JUDE, S. HAULON, B. STAELS, S. SUSEN, E. VAN BELLE, A. DUPONT, Free leptin and soluble leptin receptor: novel circulating markers of carotid plaque-related symptomatology and potential role in plaque stability (from the OPAL-Lille carotid endarterectomy study. Symposium of European Genomic Institute of Diabetes (EGID), Octobre 2012, Lille **(p)**)

**C. ROMA-LAVISSE**, C. ZAWADZKI, M. TAGZIRT, A. ELKALIOUBIE, C. BANFI, D. CORSEAU, B. VAAST, J. VANHOUTTE, A. UNG, S. HAULON, A. VINCENTELLI, F. JUTHIER, G. CHINETTI-GBAGUIDI, B. JUDE, B. STAELS, S. SUSEN, E. VAN BELLE, A. DUPONT, Differential expression profiles of M1 and M2 macrophages in human atherosclerosis and potential implications in diabetes-related atherosclerosis, Symposium of European Genomic Institute of Diabetes (EGID), Octobre 2012, Lille **(p)**

**C. ROMA-LAVISSE**, C. ZAWADZKI, M. TAGZIRT, A. ELKALIOUBIE, A. VINCENTELLI, C. BANFI, S. HAULON, G. CHINETTI, B. STAELS, B. JUDE, A. DUPONT, M1 and M2 macrophages expression profiles in human atherosclerosis and modulation by cardiovascular risk factors, NSFA (Nouvelle Société Française d'Athérosclérose), Juin 2012, Biarritz *Arch Cardiovasc Dis*, 2012, 2, 7 **(o + p)**

A. ELKALIOUBIE, C. ZAWADZKI, **C. LAVISSE**, M. TAGZIRT, G. CHINETTI-GBAGUIDI, B. STAELS, S. HAULON, B. JUDE, S. SUSEN, E. VAN BELLE, A. DUPONT, Serum and carotid plaque levels of free leptin are significantly related to plaque stability and clinical manifestations : Opal Carotid Endarterectomy Study, Congrès Annuel de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose (NSFA), Juin 2012, Biarritz **(p)**

A. DUPONT, A. ELKALIOUBIE, C. ZAWADZKI, **C. LAVISSE**, M. TAGZIRT, G. CHINETTI-GBAGUIDI, B. STAELS, S. HAULON, B. JUDE, S. SUSEN, E. VAN BELLE, Effects of leptin on proliferation, migration and collagen synthesis of human vascular smooth muscle cells: potential relevance to carotid atherosclerotic plaque vulnerability, Congrès Annuel de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose (NSFA), Juin 2012, Biarritz **(p)**

**C. ROMA-LAVISSE**, C. ZAWADZKI, M. TAGZIRT, A. ELKALIOUBIE, A. VINCENTELLI, C. BANFI, S. HAULON, G. CHINETTI, B. STAELS, B. JUDE, A. DUPONT, M1 and M2 macrophages expression profiles in human atherosclerosis and modulation by cardiovascular risk factors, Printemps de la Cardiologie, Avril 2012, Bordeaux **(p)**

## Résumé

### IMPLICATION DES MACROPHAGES M1/M2 DANS LES PATHOLOGIES VASCULAIRES ET VALVULAIRES HUMAINES

Les maladies cardiovasculaires, conséquence le plus souvent de l'athérosclérose, sont la première cause de morbi-mortalité dans le monde et voient leur incidence et sévérité augmenter avec l'expansion de leurs principaux facteurs de risque, tels que l'âge, l'obésité et le diabète. La sténose valvulaire aortique (SVA), valvulopathie la plus fréquemment rencontrée dans les pays occidentaux essentiellement chez le sujet vieillissant, partage de fortes similitudes avec l'athérosclérose vasculaire. En effet, les plaques athéroscléreuses et les lésions valvulaires sont le siège de processus d'inflammation, d'angiogenèse, de fibrose et de calcification. Les macrophages, issus de la différenciation tissulaire des monocytes infiltrés, jouent un rôle clé dans l'apparition des lésions athéroscléreuses vasculaires et leur devenir. Leur rôle dans l'état inflammatoire des lésions est aujourd'hui bien établi avec de récentes publications qui font état des propriétés plastiques des macrophages, selon leur microenvironnement. Deux principaux sous-types de macrophages ont été décrits dans les plaques athéroscléreuses, les macrophages M1 dit « classiques » et M2 dits « alternatifs ». Leur rôle respectifs dans la thrombogénécité, la protéolyse et l'angiogenèse, processus impliqués dans l'instabilité de la plaque, ont été moins étudiés. Concernant la pathologie valvulaire, les macrophages sont peu décrits dans la valve, à l'inverse des cellules interstitielles de valves (VIC), qui sont cruciales pour le maintien de l'homéostasie et la fonction valvulaire et sont impliquées dans la fibrose et la rigidité des feuillets valvulaires. Ce travail de thèse a pour objectif d'étudier les rôles des macrophages M1/M2 dans les pathologies vasculaires et valvulaires chez l'homme. Nous nous sommes focalisés sur leurs rôles dans l'instabilité de la plaque athéroscléreuse (processus de coagulation et de remodelage vasculaire) et dans la fibrose valvulaire ainsi que sur leur modulation phénotypique par d'autres types cellulaires présents dans les lésions, les polynucléaires neutrophiles (PNN) dans la plaque et les VIC dans la valve.

Nos résultats suggèrent que les macrophages M1 et M2 pourraient moduler différemment des processus physiopathologiques majeurs de l'athérosclérose. Par ailleurs, les macrophages M1 de patients diabétiques présentent un phénotype délétère qui pourrait expliquer la plus grande vulnérabilité des plaques d'athérosclérose observée chez ces sujets. Nous montrons également l'importance des PNN et de leurs produits de sécrétion dans la régulation du phénotype inflammatoire des macrophages. Concernant la pathologie valvulaire, après avoir caractérisé par analyse histologique les macrophages M1 et M2 dans les valves aortiques humaines, nous avons montré que, les macrophages M1 pourraient être impliqués dans la progression de la fibrose observée dans la SVA, via la modulation de leur répertoire sécrétoire par les VIC.

Cette thèse apporte de nouveaux indices sur les processus physiopathologiques impliqués dans les maladies vasculaires et valvulaires humaines. Elle met l'accent sur le rôle délétère des macrophages M1 chez les sujets diabétiques en pathologie vasculaire et identifie également une fonction jusque-là méconnue des macrophages M1 dans la progression de la fibrose, en lien avec une coopération avec les VIC. Il conviendra par la suite d'identifier les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces interactions, ce qui devrait permettre d'envisager de nouvelles voies thérapeutiques visant à moduler l'effet de ce sous-type cellulaire dans ces pathologies.

**Mots clés :** athérosclérose, sténose valvulaire aortique, macrophages, diabète, angiogenèse, protéolyse, coagulation, fibrose, polynucléaires neutrophiles, cellules interstitielles de valves



## **Abstract**

### **M1/M2 MACROPHAGES IMPLICATION IN HUMAN VASCULAR AND VALVULAR DISEASES**

Cardiovascular diseases, as a result of atherosclerosis, are the main cause of morbidity and mortality worldwide. Their incidence and severity increase with the expansion of their major risk factors such as age, obesity and diabetes. Aortic valve stenosis, the most frequent valve disease in Western countries, mainly in elderly subjects, shares strong similarities with vascular atherosclerosis. Indeed, atherosclerotic plaques and valvular lesions are the site of inflammation, angiogenesis, fibrosis and calcification processes. Macrophages, derived from monocytes differentiation, play a key role in vascular atherosclerotic lesions development and fate. Their role in the inflammatory state of lesions is now well established with recent publications on macrophage plasticity, according to their microenvironment. Two major subtypes of macrophages have been described in atherosclerotic plaques, classically (*M1*) or alternatively (*M2*) activated macrophages. Their respective roles in thrombogenic, proteolytic and angiogenic processes, involved in plaque instability, remain unclear. On the other hand, macrophages are less studied in the aortic valve, compared to the valvular interstitial cells (VIC), which are crucial for the maintenance of homeostasis and the valvular function, but also participate in the progression of leaflet fibrosis and rigidity. My thesis aims to study the role of macrophages M1/M2 in vascular and valvular diseases in humans. We focused on their roles in atherosclerotic plaque instability (haemostatic process and vascular remodeling) and valvular fibrosis. Moreover, we also investigated the potential modulation of macrophage phenotypes by other cell types present in lesions: neutrophils (PMN) in the plaque and VIC in the valve.

Our results suggest that M1 and M2 macrophages may differently modulate major pathophysiological processes of atherosclerosis. In addition, M1 macrophages from diabetic patients present a deleterious phenotype that could explain the increased vulnerability of atherosclerotic plaques observed in these subjects. We also show the importance of PMN and their secretion products in regulating the inflammatory phenotype of macrophages. Concerning aortic valve stenosis, after histological characterization of M1 / M2 in human aortic valves, we show that M1 macrophages are involved in the progression of fibrosis through the modulation of their secretory repertoire by VIC.

This work provides new data about the pathophysiological processes involved in vascular and valvular diseases. It focuses on the deleterious role of M1 macrophages in diabetic subjects in vascular pathology and also identifies a previously unknown function of M1 in the progression of fibrosis, associated with "cross-talk" with VIC. It will be necessary to further identify the molecular mechanisms underlying these interactions, which may lead to novel therapeutic approaches to modulate the effect of this cell subtype in these diseases.

**Key words:** atherosclerosis, valvular aortic stenosis, macrophages, diabetes, angiogenesis, proteolysis, coagulation, fibrosis, neutrophils, valvular interstitial cells

# SOMMAIRE

---

Remerciements.....	i
Publications et Communications.....	iii
SOMMAIRE.....	1
Liste des abréviations.....	6

## **INTRODUCTION GENERALE ..... 10**

## **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE ..... 13**

### **I. L'athérosclérose vasculaire..... 14**

I.1. La paroi artérielle normale.....	14
I.2. Définition.....	15
I.3. Epidémiologie.....	16
I.4. Manifestation clinique de la maladie athéroscléreuse.....	17
I.5. Localisation préférentielle des lésions.....	18
I.6. Classification des lésions athéroscléreuses.....	19
I.7. Les principales étapes de l'athérogenèse.....	21
I.7.1. Initiation des lésions athéroscléreuses.....	22
I.7.2. Progression des lésions et formation de la plaque athéroscléreuse.....	23
I.7.3. Vulnérabilité de la plaque.....	25
I.8. Facteurs de risque cardiovasculaire.....	28
I.8.1. Les facteurs non modifiables.....	28
I.8.2. Les facteurs modifiables.....	29
I.9. Revascularisation chirurgicale et prévention thérapeutique.....	32
I.9.1. Le pontage aorto-coronarien.....	32
I.9.2. L'angioplastie coronaire.....	33
I.9.3. L'endartériectomie carotidienne.....	33
I.9.4. Prévention de la stabilisation de la plaque.....	34

### **II. La sténose valvulaire aortique..... 35**

II.1. La valve aortique normale.....	35
II.1.1. Structure et composition.....	35
II.1.2. Propriété et fonction.....	36
II.2. Définition.....	37

II.3. Epidémiologie des pathologies valvulaires et facteurs de risque .....	38
II.4. Symptomatologie clinique et évaluation diagnostique .....	39
II.5. Etiologie de la sténose aortique .....	40
II.5.1. La malformation congénitale .....	41
II.5.2. Le rhumatisme articulaire .....	41
II.5.3. La dégénérescence sénile ou maladie active calcifiante .....	42
II.6. Physiopathologie .....	42
II.7. Traitement chirurgical : le remplacement valvulaire aortique .....	47
II.7.1. Les prothèses valvulaires .....	47
II.7.2. Le remplacement valvulaire aortique par voie chirurgicale .....	48
II.7.3. Le remplacement valvulaire aortique par voie percutanée .....	49
<b>III. Monocytes et Macrophages .....</b>	<b>51</b>
III.1. Monocytes et macrophages, cellules du système des phagocytes mononucléés .....	51
III.1.1. Origine cellulaire .....	51
III.1.2. Hétérogénéité des monocytes humains .....	51
III.1.3. Fonctions physiologiques .....	52
III.1.4. Hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des macrophages .....	54
III.2. Macrophages et plaques d'athérosclérose .....	54
III.2.1. Répertoire membranaire et sécrétoire des macrophages .....	54
III.2.2. Différenciation des monocytes/macrophages et polarisation dans l'athérosclérose .....	57
III.2.2.1. Description et rôle des phénotypes conventionnels .....	57
III.2.2.1.1. Les macrophages M1 .....	57
III.2.2.1.2. Les macrophages M2 .....	57
III.2.2.2. Autres phénotypes de macrophages .....	60
III.2.2.2.1. Les macrophages Mox .....	60
III.2.2.2.2. Les macrophages M(Hb) et Mhem.....	61
III.2.2.2.3. Les macrophages M4 .....	61
III.2.3. Distribution des macrophages M1/M2 au sein des lésions athéroscléreuses .....	63
III.2.3.1. Distribution spatiale .....	63
III.2.3.2. Distribution selon la sévérité des lésions .....	64
III.3. Macrophages et lésions valvulaires .....	65
<b>OBJECTIFS DE LA THESE .....</b>	<b>66</b>
<b>TRAVAUX DE RECHERCHE - PUBLICATIONS.....</b>	<b>69</b>

<b>I. Macrophages M1/M2 et athérosclérose vasculaire .....</b>	<b>70</b>
I.1. Macrophages M1/M2 dans les plaques carotidiennes et lien avec la symptomatologie clinique.....	70
I.1.1. Introduction .....	70
I.1.2. Matériel et méthodes .....	70
I.1.2.1. Cohorte de patients .....	70
I.1.2.2. Prélèvement et traitement des échantillons biologiques .....	70
I.1.2.2.1. Echantillons sanguins et dosages sériques .....	70
I.1.2.2.2. Pièces opératoires d'endartériectomie .....	71
I.1.2.3. Extraction des ARN à partir des broyats de plaques .....	71
I.1.2.4. Quantification de transcrits par RT-PCR quantitative .....	71
I.1.2.5. Exploitation statistique des données .....	74
I.1.3. Résultats .....	74
I.1.3.1. Caractéristiques de la population.....	74
I.1.3.2. Expression génique des divers acteurs de l'athérogenèse dans les lésions athéroscléreuses .....	75
I.1.3.3. Relation entre la polarisation des macrophages M1/M2 et l'évolution clinique.....	76
I.1.4. Discussion .....	79
I.2. L'analyse des profils protéolytique et angiogéniques des macrophages M1 et M2 de patients athéroscléreux révèle un profil distinct chez les sujets diabétiques .....	81
I.2.1. Article: L'analyse des profils protéolytique et angiogéniques des macrophages M1 et M2 de patients athéroscléreux révèle un profil distinct chez les sujets diabétiques - <i>M1 and M2 macrophage proteolytic and angiogenic profiles analysis in atherosclerotic patients reveals a distinctive profile in type 2 diabetes</i> .....	83
I.2.2. Résultats complémentaires .....	103
I.2.2.1. Matériel et méthodes .....	103
I.2.2.1.1. Surnageants de macrophages .....	103
I.2.2.1.2. Lysats cellulaires de macrophages.....	103
I.2.2.1.3. Dosages protéiques et d'activité dans les surnageants de macrophages .....	103
I.2.2.1.4. Test de génération de thrombine.....	104
I.2.2.1.5. Analyse statistique des résultats.....	107
I.2.2.2. Résultats .....	107
I.2.2.2.1. Sécrétion des macrophages .....	107
I.2.2.2.2. Génération de thrombine.....	108
I.2.2.3. Discussion .....	110
I.3. Modulation du phénotype des macrophages par les polynucléaires neutrophiles (PNN) .....	113
I.3.1. Introduction .....	113
I.3.2. Matériel et méthodes .....	115
I.3.2.1. Isolement des monocytes sanguins.....	115
I.3.2.2. Isolement des PNN et préparation des milieux conditionnés .....	116

I.3.2.3. Différenciation in vitro des monocytes sanguins en macrophages. ....	116
I.3.2.4. Extraction des ARN et mesure de l'expression des gènes par RT-PCR quantitative de type TaqMan® .....	117
I.3.2.5. Exploitation statistique des données .....	118
I.3.3. Résultats .....	119
I.3.3.1. Modulation de la différenciation des macrophages M1/M2 par le milieu conditionné de PNN..	119
I.3.3.2. Influence des PNN sur l'expression des médiateurs de l'athérosclérose dans les macrophages .	120
I.3.4. Discussion .....	121
I.4. Conclusion .....	125
<b>II. Macrophages M1/M2 et pathologies valvulaires : Rôle des macrophages M1 dans la progression de la fibrose dans la sténose valvulaire aortique .....</b>	<b>126</b>
II.1. Introduction .....	126
II.2. Matériel et méthodes .....	127
II.2.1. Patients et échantillons de valve étudiés .....	127
II.2.2. Collecte et traitement des valves aortiques humaines .....	127
II.2.3. Immunohistochimie.....	128
II.2.4. Préparation des milieux conditionnés de VIC (MC-VIC) .....	128
II.2.5. Isolement et culture des macrophages M1/M2 .....	129
II.2.6. Quantification de l'expression des ARNm.....	130
II.2.7. Détection de l'activité gélatinolytique des MMP.....	130
II.2.8. Dosage du collagène.....	130
II.2.9. Technique de micro-array protéique .....	131
II.2.10. Exploitation statistique des données.....	132
II.3. Résultats.....	132
II.3.1. Description de la population .....	132
II.3.2. Expression des marqueurs des macrophages M1 et M2 dans les valves aortiques humaines .....	133
II.3.3. Expression des médiateurs physiopathologiques de la SVA dans les valves contrôles et pathologiques.....	135
II.3.4. Relation entre l'expression des marqueurs des macrophages M1 et M2 ou de médiateurs physiopathologiques de la SVA et la sévérité de la maladie.....	136
II.3.5. Influence des milieux conditionnés de VIC sur l'expression de la MMP-9 et du collagène par les macrophages M1 .....	140
II.3.6. Identification des facteurs solubles sécrétés par les VIC potentiellement responsables des effets sur les macrophages M1 .....	142
II.4. Discussion.....	143
II.5. Conclusion .....	145

**CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES..... 147**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 154**

## Liste des abréviations

---

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

AGE : advanced glycation end-product

Ag II : angiotensine II

AHA : American Heart Association

AIT : accident ischémique transitoire

ALD : affection longue durée

AMAC-1 : alternative activated macrophage associated CC-Chemokine

AMI : artère mammaire interne

APMA : 4 amino-phenylmercuric-acétate

ANAES : Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé

AOMI : artériopathie oblitérante des membres inférieurs

Apo : apolipoprotéine

ARNm : acide ribonucléique messenger

AVC : accident vasculaire cérébral

BCA: bicinchoninic acid Assay

BGLAP : bone gamma-carboxyglumatate (ostéocalcine)

BMP : bone morphogenic proteins

CaCl<sub>2</sub> : chlorure de calcium

CAT : calibrated automated thrombogram

CBP : Centre de Biologie Pathologie

CD : cluster de différenciation

CFU-GEMM : colony forming unit-granulocyte erythrocyte monocyte macrophage megakaryocyte

CFU-GM : colony forming unit-granulocyte monocyte

CFU-M : colony forming unit-monocyte macrophage

CHRU : Centre Hospitalier Régional et Universitaire

CMLV : cellule musculaire lisse vasculaire

CPP : comité de protection des personnes

CRP : protéine C réactive

Ct : critical threshold

CV : cardiovasculaire

CXCL4 : chimiokine CXC Ligand 4

dNTP: désoxyribonucléotides  
ELISA : enzyme linked immunosorbent assay  
EFS: Etablissement Français du Sang  
EHB : European Homograft Bank  
ETP: endogenous thrombin potential  
FEVG : fraction d'éjection du ventricule gauche  
FT : facteur tissulaire  
G-CSF : granulocyte colony stimulating factor  
GM-CSF : granulocyte macrophage colony stimulating factor  
GT : génération de thrombine  
HAS: Haute Autorité de Santé  
Hb : hémoglobine  
HbA1c : hémoglobine A1 glyquée  
HDL : high density lipoprotein  
HLA: human leucocyte antigen  
HOMA-IR : homeostatic model assessment of insulin resistance  
Hp : haptoglobine  
HTA : hypertension artérielle  
ICAM-1 : intercellular adhesion molecule 1  
IDM : infarctus du myocarde  
IEC : inhibiteur de l'enzyme de conversion  
IFN- $\gamma$  : interféron-gamma  
IL : interleukine  
IL-1Ra: antagoniste du récepteur à l'IL-1 $\beta$   
IMC : indice de masse corporelle  
LDL : low density lipoprotein  
LDL-C : LDL cholestérol  
LDLox : LDL oxydées  
LPS : lipopolysaccharide  
MC: milieu conditionné  
MCP-1 : monocyte chemoattractant protein 1  
M-CSF : monocyte colony stimulating factor  
MDM: macrophages dérivés des monocytes  
MEC : matrice extracellulaire



MGG : may-grünwald-giemsa  
MMP : métalloprotéinase  
MONICA : Multinational MONItoring of trends and determinants in CARdiovascular disease  
MPO : myéloperoxydase  
MR : mannose receptor  
MRC1 : mannose receptor C type 1  
NET : neutrophils extracellular traps  
NO : monoxyde d'azote  
Nrf2 : nuclear factor erythroid 2 [NF-E2]-related factor 2  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
OPAL : OPTimized management of Atherosclerosis in various Localizations  
PAL: phosphatase alcaline  
PAI-1 : plasminogen activator inhibitor-1  
PBMC: peripheral blood mononuclear cell  
PBS: tampon phosphate salin  
PCR: réaction en chaîne de la polymérase  
PDGF : platelet-derived growth factor  
PF4 : platelet factor 4  
PGI<sub>2</sub> : prostacycline  
PNN : polynucléaire neutrophile  
PPP : plasma pauvre en plaquettes  
RA : rétrécissement aortique  
RANK-L : ligand pour le récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B  
ROS : espèces réactives de l'oxygène  
RPMI : roswell park memorial institute medium  
RT: rétrotranscription  
RVA : remplacement valvulaire aortique  
SCA : syndrome coronarien aigu  
SEM : écart-type de la moyenne  
SR : scavenger receptor  
SVA : sténose valvulaire aortique  
TAVI : transcatheter aortic valve implantation  
TCA: temps de céphaline activée  
TFPI: tissue factor pathway inhibitor

TFPI-2: tissue factor pathway inhibitor 2  
TGF- $\beta$ : transforming growth factor beta  
TIMP : tissue inhibitor of metalloproteinase  
TLR: toll like receptor  
TMB : tétraméthylbenzidine  
TNF $\alpha$  : tumor necrosis factor alpha  
TP : taux de prothrombine  
t-PA : tissue plaminogen activator  
u-PA : urokinase  
VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule 1  
VEGF: vascular endothelial growth factor  
VIC : cellules interstitielles de valves  
VLDL: very low density lipoprotein  
vWF : facteur de Willebrand

## INTRODUCTION GENERALE

L'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires (CV) qui lui sont associées, représentent aujourd'hui la première cause de mortalité dans le monde. Elle se caractérise par un processus inflammatoire chronique de la paroi artérielle, initié par l'accumulation excessive de lipides, conduisant à des remaniements et à la formation de la plaque athéroscléreuse. Elle peut engendrer des lésions qui obstruent la lumière des vaisseaux, directement ou via des complications thrombotiques à l'origine d'accidents vasculaires aigus graves. Plusieurs théories sont mises en avant pour expliquer la pathogenèse de l'athérosclérose. L'hypothèse inflammatoire semble de loin, la plus recevable; en effet de nombreuses études montrent le rôle clé de l'inflammation dans les différents stades de cette pathologie. Les macrophages, dérivés des monocytes sanguins, les polynucléaires neutrophiles (PNN) et les lymphocytes, recrutés et infiltrés au sein de la plaque athéroscléreuse, sont décrits comme les cellules orchestrant ce processus inflammatoire.

Les macrophages jouent un rôle majeur dans le développement et le devenir de la lésion athéroscléreuse, notamment par leur aptitude à produire et à sécréter plusieurs molécules impliquées dans ce processus. Cette population macrophagique présente une diversité phénotypique et fonctionnelle distincte selon le microenvironnement tissulaire. Deux sous-populations macrophagiques principales ont été identifiées dans les plaques d'athérosclérose: les macrophages M1 dits « classiques » pro-inflammatoires et les macrophages M2 dits « alternatifs » anti-inflammatoires impliqués dans la réparation et le remodelage tissulaire. Ce concept M1/M2 est décrit dans plusieurs pathologies. Bien que ces 2 sous-populations aient été caractérisées dans de nombreux travaux, leur rôle exact dans l'initiation et le développement des plaques d'athérosclérose est encore mal défini. Dans une première partie, nous tentons de comprendre le rôle respectif de ces macrophages dans la fragilité de la plaque athéroscléreuse. Nous avons ainsi analysé et comparé les niveaux d'expression de divers médiateurs impliqués dans la physiopathologie de l'athérosclérose dans les macrophages M1 et M2, dérivés des monocytes sanguins (MDM) isolés de patients athéroscléreux ayant bénéficié d'un pontage aorto-coronarien et/ou d'une endartériectomie carotidienne.

Par ailleurs, de nombreux facteurs de risque CV participent au développement de l'athérosclérose, à la progression des lésions vers des formes compliquées. Le diabète de type 2, par exemple, est associé à un risque élevé de morbi-mortalité CV, en lien avec des plaques d'athérosclérose plus étendues et plus fragiles chez les patients diabétiques. Nous avons ainsi étudié l'impact du diabète sur la polarisation des macrophages M1/M2 et sur leur profil d'expression. Sur le plan histologique, nous avons évalué leur niveau d'infiltration et certains

processus de l'athérogenèse notamment l'angiogenèse dans les plaques carotidiennes de ces patients.

Les polynucléaires neutrophiles (PNN), autres cellules inflammatoires de l'immunité innée, sont également décrits au sein de la lésion d'athérosclérose. Les données actuelles suggèrent un rôle important des PNN dans l'initiation de l'athérosclérose. De par leur dégranulation et leur sécrétion, ils favorisent et participent au microenvironnement proathérogénique. Ils ont également été retrouvés au sein de sites de rupture, d'érosion de plaques et de thrombi chez des patients symptomatiques. Bien que plusieurs travaux aient étudié le rôle des monocytes/macrophages et des PNN dans le développement de l'athérosclérose, les mécanismes cellulaires et moléculaires de ces interactions restent incomplètement caractérisés. Nous compléterons donc ce premier travail par l'étude du rôle potentiel des PNN, producteurs de cytokines, dans la modulation phénotypique des macrophages chez l'homme.

Enfin, la sténose valvulaire aortique (SVA) est la valvulopathie la plus fréquente dans les pays dits développés. Elle a été décrite comme une pathologie « atheroclerotic like », partageant de fortes similitudes avec les processus physiopathologiques impliqués dans l'athérosclérose vasculaire. Les cellules interstitielles de valves (VIC) sont le principal type cellulaire composant la valve. Elles y sont abondantes et y jouent un rôle crucial pour le maintien de l'homéostasie et la fonction valvulaire. Elles participent à la synthèse et au remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) à l'origine de la fibrose. Les macrophages, quant à eux, sont très peu décrits dans la valve; à ce jour, 2 études seulement ont mis en évidence la présence de macrophages M2 et/ou M1 dans les lésions valvulaires sans préciser leur rôle exact. Ces 2 types cellulaires sont capables de synthétiser des métalloprotéinases (MMP) qui participent à la progression de la fibrose et à la rigidité des feuillets de valves. Dans cette deuxième partie, les sous-populations M1/M2 ont été caractérisées d'un point de vue immunohistologique, dans les valves aortiques humaines. La culture et la différenciation M1/M2 *in vitro* des macrophages en présence ou non de milieu conditionné de VIC a permis l'étude de la coopération macrophages/VIC en lien avec la progression de la fibrose observée dans la SVA.

## REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

# I. L'athérosclérose vasculaire

## I.1. La paroi artérielle normale

La paroi artérielle est organisée en 3 couches ou tuniques concentriques morphologiquement distinctes, dénommées, de la lumière vers l'extérieur des artères, l'*intima*, la *media* et l'*adventice* (figure 1).

L'*intima* est la tunique la plus interne et la plus fine. Elle se compose d'une monocouche de cellules endothéliales.

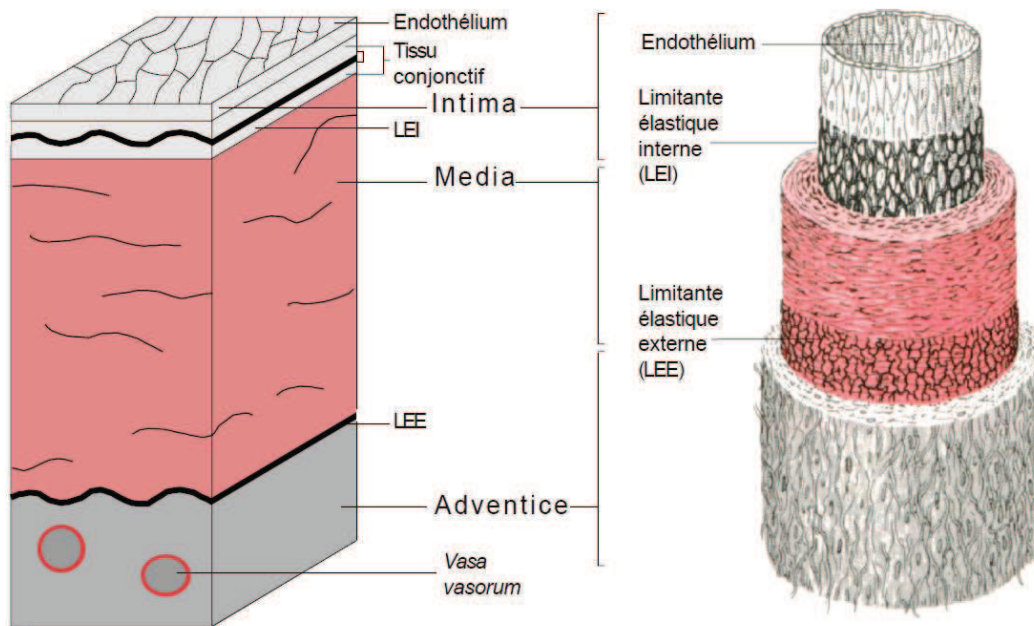
Interface physiologique entre le sang circulant et la paroi artérielle, l'endothélium vasculaire joue un rôle essentiel dans l'homéostasie vasculaire, notamment dans l'étroite régulation de la vasorelaxation. En effet, il synthétise et libère de nombreuses molécules aux propriétés vasorelaxantes, notamment le monoxyde d'azote (NO) et la prostacycline (PGI<sub>2</sub>), et vasoprotectrices. Ainsi, le NO libéré, possède des effets anti-oxydants et anti-inflammatoires, inhibe l'adhésion et l'aggrégation plaquettaire, et agit comme agent anticoagulant et profibrinolytique. La dysfonction endothéliale précoce est une étape clé dans la physiopathologie de l'athérosclérose.

Le sous-endothélium est constitué essentiellement de tissu conjonctif fibro-élastique et de quelques éléments cellulaires, cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) et macrophages. C'est à partir de cette couche sous-endothéliale que se développent les plaques d'athérosclérose. Une lamelle élastique interne (limitante élastique interne) sépare l'*intima* de la *media* et se compose majoritairement d'élastine.

La *media* est la tunique intermédiaire et principale de l'artère. Partie musculaire de l'artère, elle renferme notamment des CMLV disposées en couches concentriques et des fibres élastiques et de collagène, constituants de la MEC. Elle est séparée de l'*adventice* par la limitante élastique externe (lamelle élastique externe), retrouvée uniquement dans les vaisseaux de gros calibre.

L'*adventice* est la tunique la plus externe de la paroi vasculaire. Elle se compose de tissu conjonctif peu organisé (constitué essentiellement de collagène et de fibres élastiques) et de fibroblastes. Elle permet l'ancrage des artères aux structures avoisinantes. Des vaisseaux

nourriciers, les *vasa vasorum*, système capillaire des vaisseaux de gros calibre, irriguent l'adventice et se prolongent dans la partie externe de la *media*.



**Figure 1 : Représentation schématique de la paroi artérielle normale (Stevens A, 1997)**

## I.2. Définition

L'athérosclérose a été définie en 1958 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme « une association variable de remaniements de l'*intima* des artères de gros et moyen calibre, consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires, le tout s'accompagnant de modifications de la *media* ». Cette définition évoque des particularités des lésions athéroscléreuses (leur siège intimal, leurs territoires préférentiels et enfin leur retentissement sur la *media*). Cependant elle correspond à celle des lésions évoluées (plaque fibrolipidique non compliquée ou plaque d'athérome) et ne souligne pas les nouvelles notions de lésions initiales, de progression des lésions, ni de complications. Il est aujourd'hui clairement établi que l'athérosclérose est une pathologie inflammatoire chronique, évolutive et dynamique, définie par différents stades, qui seront décrits ultérieurement.



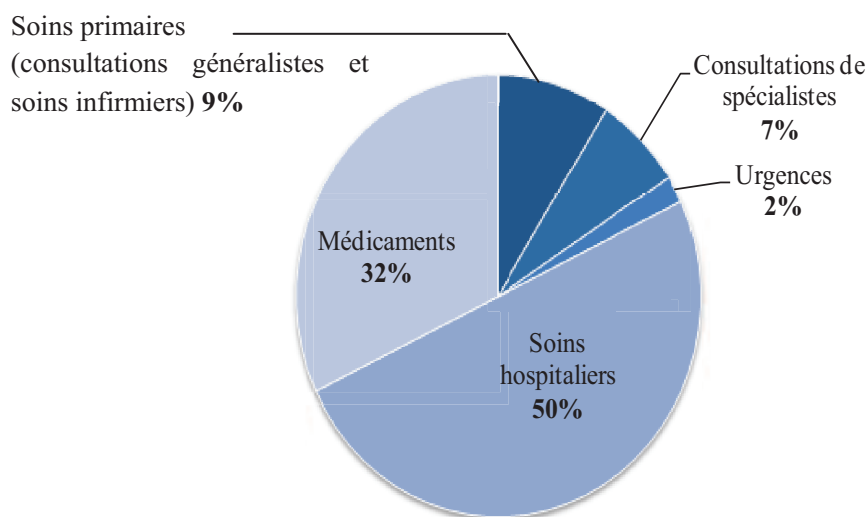
### I.3. Epidémiologie

Les maladies CV, dans lesquelles l'athérosclérose joue un rôle majeur, représentent la première cause de morbi-mortalité dans le monde et figurent au deuxième rang des causes de décès en France après les cancers (avec près de 150 000 décès par an en France) (InVS, 2011). L'OMS estime à 17,5 millions le nombre d'individus qui décèdent chaque année dans le monde de maladies CV, elles sont suivies par les cancers, les pathologies respiratoires et le diabète (OMS, 2014). La figure 2 précise le classement des différentes causes de décès dans le monde selon des données récentes de l'OMS (OMS, 2014). Ainsi l'athérosclérose constitue donc un réel enjeu de santé publique.



Figure 2 : Causes principales de décès dans le monde en 2012 (OMS, 2014)

Les maladies CV nécessitent généralement la prise de traitements chroniques, elles sont associées à une part importante des dépenses de santé. En France, les coûts liés à la prise en charge des ALD (affections de longue durée) CV s'élèvent à 18 milliards d'euros par an selon la Caisse Nationale de l'Assurance Maladie. La figure 3 rend compte de la répartition des dépenses directes en lien avec les pathologies CV en France.



**Figure 3 : Répartition des dépenses directes des pathologies cardiovasculaires en France en 2006, d'après (ENH, 2008)**

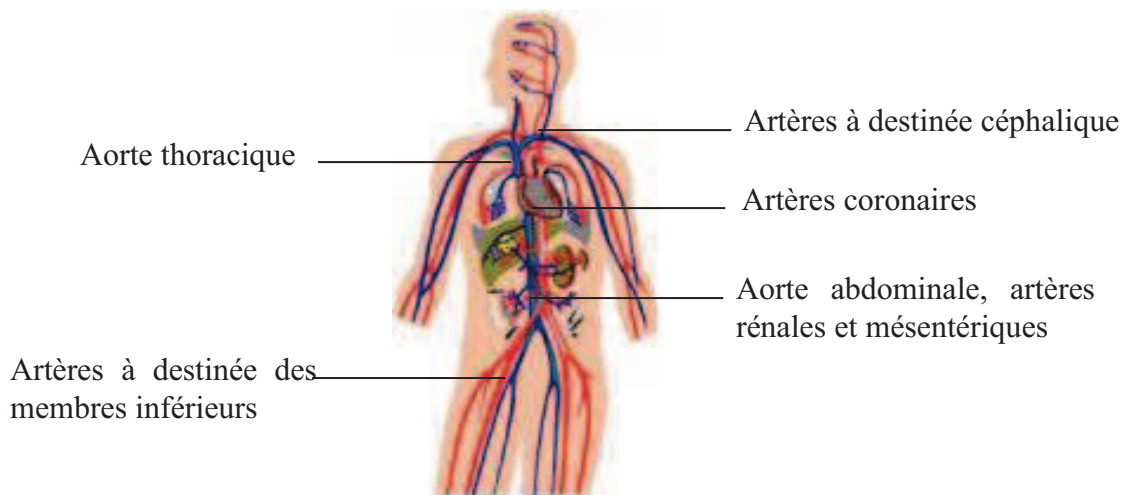
#### **I.4. Manifestation clinique de la maladie athéroscléreuse**

La maladie athéroscléreuse évolue de façon lente et progressive. La strie lipidique, premier stade de la maladie, est retrouvée chez les jeunes enfants (Napoli *et al*, 1997). Cette lésion asymptomatique peut soit évoluer en lésion complexe plus grave, soit disparaître. L'évolution des lésions est lente et se déroule sur plusieurs années, en général. Les lésions peuvent progresser en plaques stables ou instables, susceptibles de se rompre et de conduire à la formation d'un thrombus artériel obstruant la lumière du vaisseau, menant à de graves complications, telles que les accidents CV aigus.

Les présentations cliniques de l'athérosclérose sont nombreuses et dépendent du territoire artériel touché (figure 4). Il s'agit d'affections aiguës :

- les coronaropathies ischémiques telles que l'angor instable et l'infarctus du myocarde (IDM) lorsque les artères coronaires sont touchées,
- les accidents vasculaires cérébraux (AVC) lorsque l'athérosclérose touche les artères cérébrales ou à visée encéphalique,
- l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI), lorsque la maladie touche les artères des membres inférieurs.

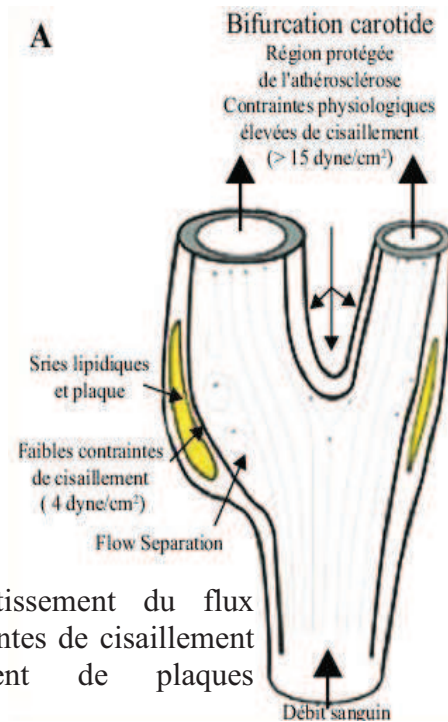
Ces accidents, lorsqu'ils ne sont pas fatals, peuvent être responsables de séquelles fonctionnelles importantes : paralysie, troubles sensitifs, trouble du langage, dans le cas des AVC ou développement de troubles cardiaques dans le cadre de l'IDM.



**Figure 4 : L'athérosclérose, maladie des artères de gros et moyen calibre. Schéma illustrant les différentes artères le plus souvent touchées**

### **I.5. Localisation préférentielle des lésions**

Le développement des lésions athéroscléreuses se fait majoritairement dans les artères de gros et moyen calibre, essentiellement dans les zones de bifurcations et de courbure de troncs artériels. Ces zones de forte contrainte mécanique sont caractérisées par des forces de cisaillement ou « shear stress » très faibles. Ces conditions hémodynamiques sont responsables d'une activation des cellules endothéliales qui voient une modification de leur expression génique, de leur métabolisme et de leur morphologie (figure 5). En effet, en condition de « shear stress » bas, ces cellules acquièrent un phénotype proathérogène lié à une induction de l'expression de molécules d'adhésion et d'activation des monocytes et de la synthèse de molécules prothombogènes pouvant expliquer l'état procoagulant associé (Malek *et al*, 1999). Par ailleurs, la stase des éléments circulants dans ces zones de courbure et l'exposition accrue de l'endothélium et de la paroi artérielle aux agents athérogènes contribuent au développement préférentiel des lésions athéroscléreuses dans ces territoires (Chatzizisis *et al*, 2007).



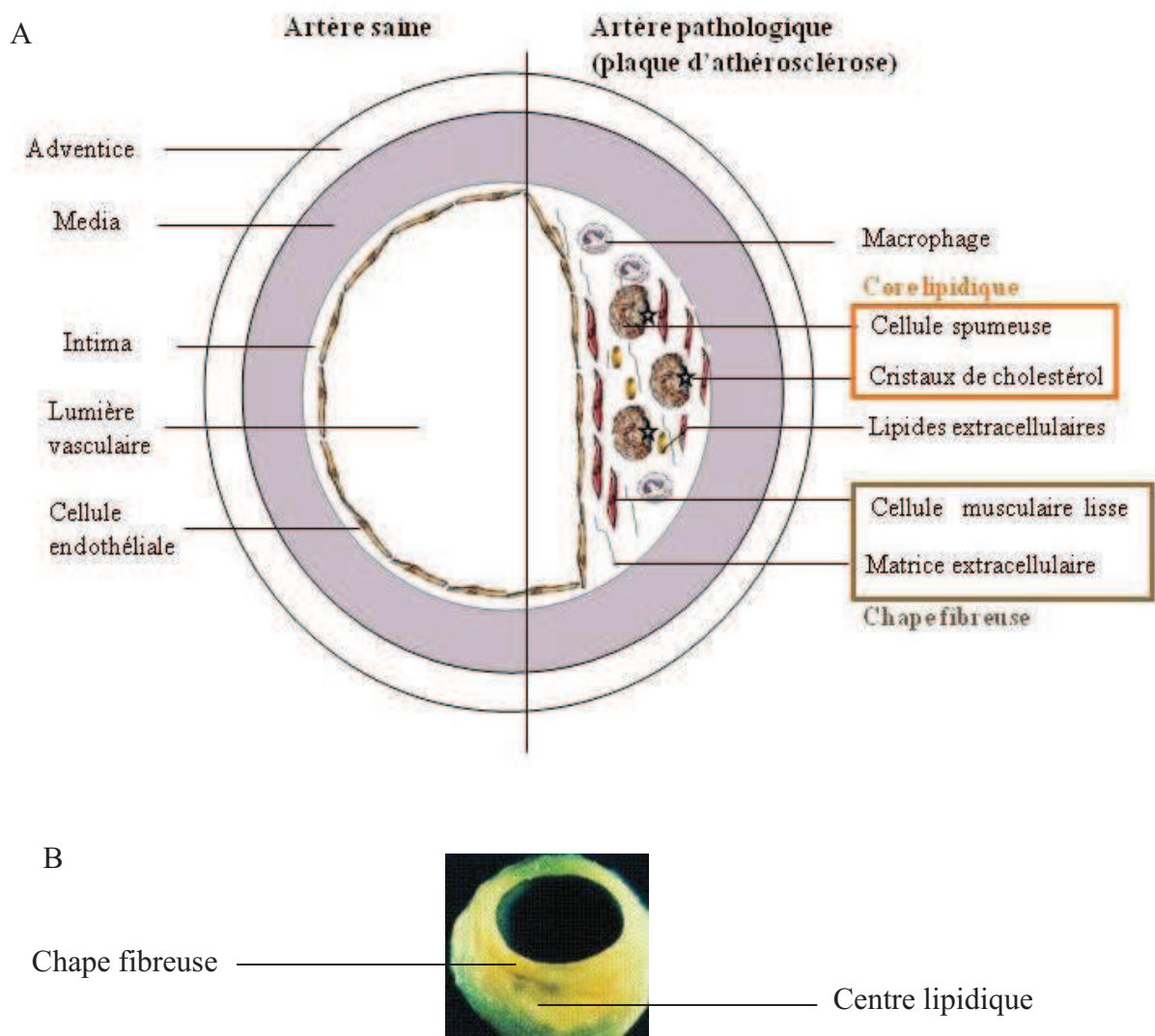
Zones de ralentissement du flux  
 → faibles contraintes de cisaillement  
 = développement de plaques  
 d'athérosclérose

**Figure 5 :** Schéma représentatif de la localisation préférentielle des plaques d'athérosclérose au niveau de la paroi externe des bifurcations vasculaires en fonction des forces de cisaillement, d'après (Malek *et al*, 1999)

## I.6. Classification des lésions athéroscléreuses

Comme évoqué précédemment, la formation des lésions athéroscléreuses est un processus inflammatoire évolutif, caractérisé par une accumulation de lipides associée à l'infiltration de différents types cellulaires dans l'*intima* (figure 6) (Ross, 1999).

Ces lésions ont été classées sur des critères anatomo-pathologiques, en tenant compte du caractère évolutif et dynamique de l'athérosclérose. L'AHA (American Heart Association) a ainsi proposé une classification des lésions comprenant 8 principaux types lésionnels de gravité croissante (tableau I) (Stary *et al*, 1995). Cette classification a été modifiée plus récemment par Virmani *et coll.* et Naghavi *et coll.* (tableau I) (Virmani *et al*, 2000; Naghavi *et al*, 2003).









**Figure 6 : Remaniement de la paroi artérielle au cours de l'athérosclérose**

A : Comparaison de la structure d'une artère saine et d'une artère lésée par l'athérosclérose.

B : Coupe transversale d'une plaque d'athérosclérose fibrolipidique

**Tableau I : Caractéristiques des lésions d'athérosclérose aux différents stades évolutifs selon la classification de l'American Heart Association (Stary, 2000), illustrées par des coupes transversales d'artère, d'après (Libby, 2002)**

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

## I.7. Les principales étapes de l'athérogenèse

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

La théorie lipidique a longtemps été mise en avant pour expliquer la pathogenèse de l'athérosclérose. Le rôle des lipides a été mis en évidence dès 1913, dans un modèle expérimental d'athérosclérose grâce aux travaux d'Anitschkov. Ils évoquent pour la première fois l'hypothèse d'une accumulation progressive de lipides dans la paroi artérielle dans un modèle de lapin, soumis à un régime riche en lipides, qui développe des plaques d'athérosclérose. Depuis les années 1970, une nouvelle théorie inflammatoire a émergé (Ross

and Glomset, 1976). En effet, l'inflammation est impliquée dans les différents stades de l'athérosclérose : de l'initiation de la constitution de la plaque à sa progression et à son instabilité responsable des complications aiguës telles que la rupture de plaque et les hémorragies (Ross, 1999).

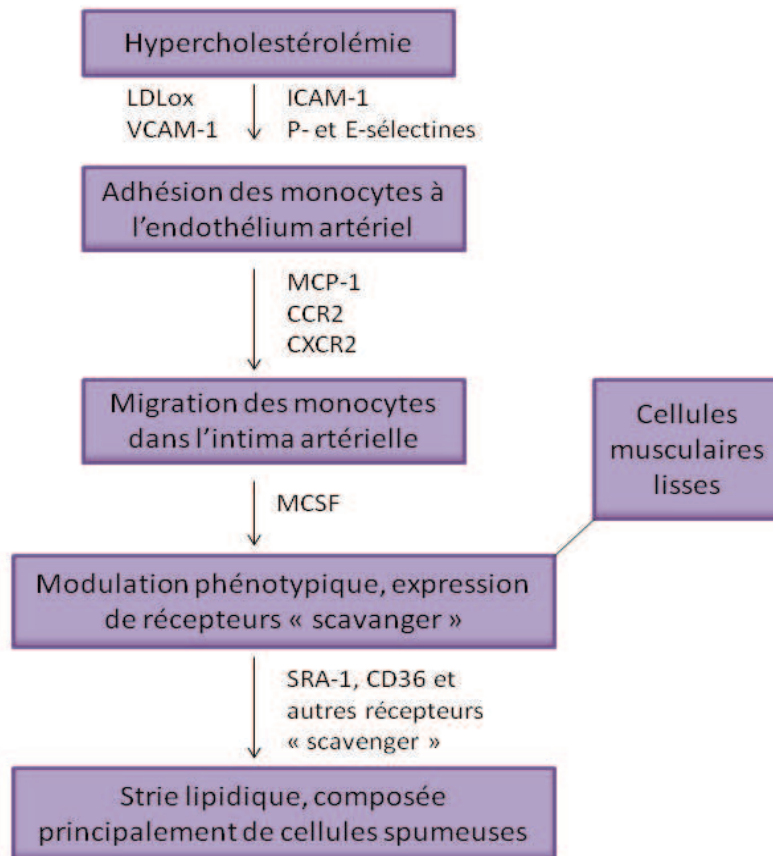
#### I.7.1. Initiation des lésions athéroscléreuses

La dysfonction endothéliale est un événement clé et précoce de l'athérogenèse (Ross, 1999). Différentes causes peuvent être à l'origine de la lésion de l'endothélium : biochimiques (lipoprotéines), hémodynamiques (cisaillement, hypertension artérielle (HTA)) ou toxiques (tabac, inflammation) (Lusis, 2000; Ross, 1999; Zeiher *et al*, 1995).

Au cours de la phase initiale, les conditions hémodynamiques, en lien avec les perturbations de flux sanguin au niveau des embranchements artériels, induisent des modifications de l'expression génique et du métabolisme des cellules endothéliales, conduisant à une augmentation de la perméabilité de la paroi endothéliale. L'accumulation et l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) dans l'espace sous-endothélial de l'*intima* des artères favorisent la dysfonction endothéliale. Ces formes modifiées des LDL ont un potentiel proathérogène plus important que les formes natives. Elles activent le recrutement et l'adhésion *in vivo* des monocytes à l'endothélium par différents mécanismes : elles induisent l'expression par l'endothélium de molécules d'adhésion à sa surface (P-sélectine, ICAM-1), de facteurs chimioattractants et de facteurs de croissance qui participent au recrutement des leucocytes inflammatoires (PNN, lymphocytes T et monocytes) du sang circulant (Gleissner *et al*, 2007). Le facteur de Willebrand (vWF) semble également être impliqué dans l'adhésion monocyttaire ; il a été observé, dans un modèle murin d'athérosclérose (LDL receptor (LDL-R) *-/-*) délété également en vWF, une forte réduction du rolling leucocytaire (comparé aux souris déficientes seulement pour le LDL-R) associée avec une réduction de la taille des lésions aortiques (Methia *et al*, 2001).

Des facteurs chimioattractants comme le MCP-1 (Monocyte Chimoattractant Protein 1) permettent le recrutement et l'infiltration, via les mécanismes de diapedèse et de transmigration, des monocytes circulants dans l'*intima*. Ces derniers, sous l'action du facteur de croissance M-CSF (Monocyte Colony Stimulating Factor), se différencient en macrophages. Ils acquièrent alors la capacité d'internaliser les LDL oxydées (LDLox) grâce à leurs récepteurs éboueurs (« scavenger »), SR-A et CD36, par un mécanisme non soumis à régulation

(Steinberg, 2002). Ainsi les capacités des macrophages à dégrader les lipides étant dépassées, ils se transforment alors en cellules spumeuses (« foam cells ») qui constituent la strie lipidique, premier stade de la lésion athéroscléreuse (Libby, 2002). Ultérieurement, ces cellules spumeuses composeront le noyau lipidique de la plaque athéroscléreuse (figure 7).



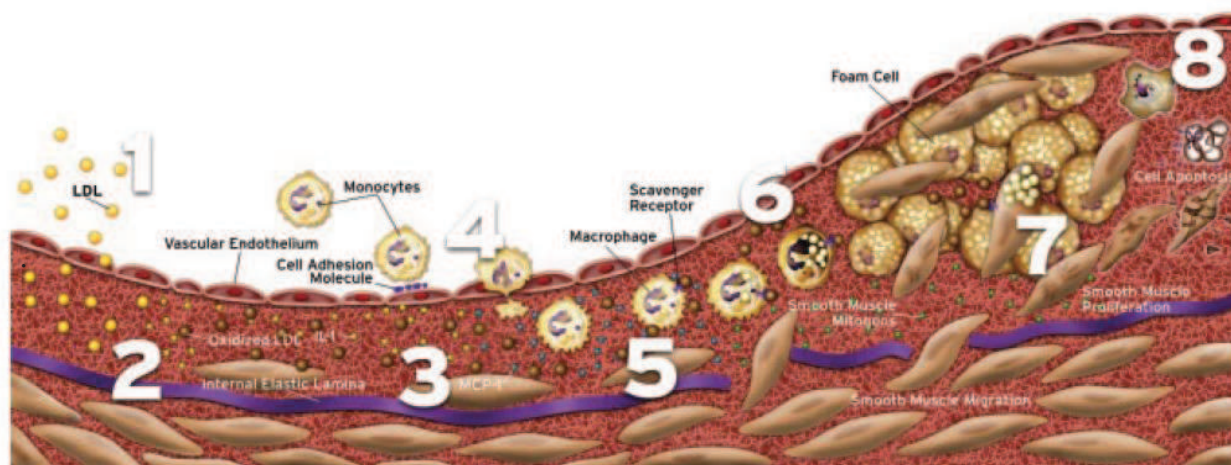
**Figure 7 : Suite d'événements générant la strie lipidique, adapté de (Steinberg, 2002)**

### I.7.2. Progression des lésions et formation de la plaque athéroscléreuse

Les macrophages infiltrés produisent et sécrètent alors une variété de cytokines pro-inflammatoires telles que le tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), les interleukines IL-1 $\beta$  et IL-12, qui renforcent la réponse inflammatoire locale et le recrutement *in situ* d'autres leucocytes. Ces cytokines inflammatoires contribuent à la croissance et à la fragilisation de la plaque (Tedgui and Mallat, 2006).

Les cellules infiltrées libèrent également des facteurs de croissance tels que le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) qui amplifient la migration cellulaire de la *media* vers l'*intima* et la prolifération des CMLV qui possèdent également la capacité de se transformer en cellules spumeuses (figure 8) (Glass and Witztum, 2001).





**Figure 8 : Chronologie de la formation des lésions d'athérosclérose.** Stades 1 et 2 : accumulation et oxydation des LDL dans le sous-endothélium, stades 3 et 4 : recrutement et infiltration des monocytes sanguins circulants, stades 5 à 8 : transformation des macrophages gorgés de lipides en cellules spumeuses, migration et prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires. Extrait de (Faxon *et al*, 2004)

Sous l'action du PDGF, les CMLV perdent progressivement leur capacité contractile et acquièrent plutôt un phénotype sécrétoire. Elles synthétisent alors des protéines de la MEC (fibrinogène, collagène, élastine, protéoglycannes), qui consolident la chape fibreuse recouvrant et stabilisant la plaque athéroscléreuse. A l'inverse, les macrophages expriment des MMP participant au devenir de la plaque.

D'importants processus apoptotiques sont décrits dans les lésions athéroscléreuses. Ils sont induits par la production de radicaux libres et par l'accumulation des LDLox toxiques (Mallat and Tedgui, 2004). L'apoptose des macrophages entraîne l'accumulation de corps apoptotiques, formant le noyau lipidique et nécrotique dont la taille est proportionnelle au risque de rupture de la plaque.

L'évolution progressive de la plaque d'athérosclérose se fait généralement sur plusieurs années, selon 2 phénotypes de plaque (stable ou instable) qui informent de sa gravité (figure 9) :

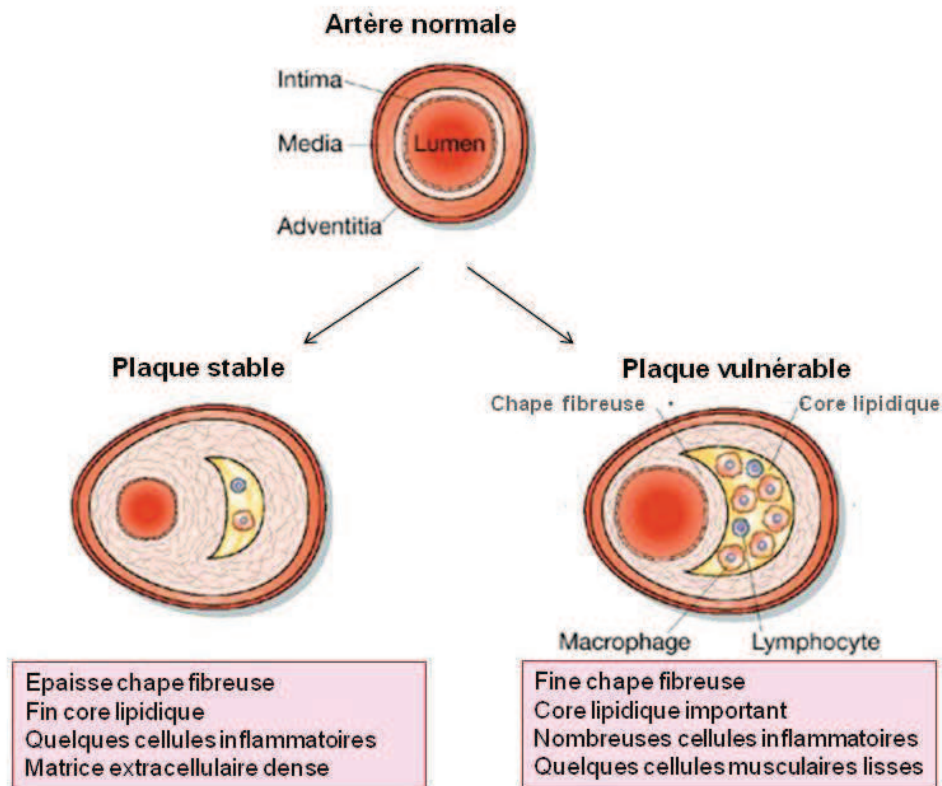
- le phénotype « stable » ou évolution fibreuse de la plaque. La plaque est stabilisée par une épaisse chape fibreuse. De plus, un calibre vasculaire de taille suffisante pour permettre une circulation sanguine satisfaisante est maintenu grâce à un remodelage artériel compensateur (Glagov *et al*, 1987).

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

### I.7.3. Vulnérabilité de la plaque

Les plaques vulnérables désignent les plaques compliquées susceptibles de se rompre et d'être sources de complications emboliques ou thrombotiques (Naghavi *et al*, 2003). Elles sont responsables de la morbi-mortalité imputable à l'athérosclérose. En effet, elles conduisent à la majorité des accidents CV aigus par ischémie, pouvant mettre en jeu le pronostic vital ou fonctionnel du patient.

Ces plaques vulnérables sont définies par certains critères morphologiques. Ainsi, elles sont caractérisées par un large infiltrat lipidique inflammatoire (macrophages essentiellement) séparé de la lumière du vaisseau par une fine couche fibreuse (Virmani *et al*, 2002; Moreno *et al*, 1994). Cette dernière constitue une barrière antithrombotique entre le core lipido-nécrotique riche en facteur tissulaire (FT) donc fortement thrombogène et les facteurs procoagulants circulants.



**Figure 9 : Evolution de la plaque athéroscléreuse en phénotype stable ou vulnérable, d'après (Libby and Aikawa, 2002)**

Par ailleurs, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs de croissance et l'activité d'enzymes lytiques telles que les MMP produites et libérées par divers types cellulaires de la plaque dont les macrophages/cellules spumeuses et les polynucléaires neutrophiles (PNN) intensifient l'instabilité de la plaque. La plupart des MMP sont impliquées dans la dégradation et le remodelage des composants de la MEC, elles jouent donc un rôle important dans la fragilité de la plaque (Newby, 2007). Des taux élevés de MMP-9 plasmatique et tissulaire sont associés à l'instabilité de la plaque athéroscléreuse et constituent donc un risque plus élevé de syndromes coronariens aigus (SCA) (Blankenberg *et al*, 2003; Hobeika *et al*, 2007). L'activité des MMP *in vivo* est régulée par des inhibiteurs endogènes spécifiques, les Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP) (Visse and Nagase, 2003) et par d'autres antiprotéases telles que l' $\alpha$ 2-macroglobuline (Nagase *et al*, 2006), le TFPI-2 (Herman *et al*, 2001) et le PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) (Oh *et al*, 2002). De plus, le renouvellement des constituants de la MEC dégradés par les macrophages, est limité par la faible proportion de CMLV composant la chape fibreuse mince des plaques « instables ».

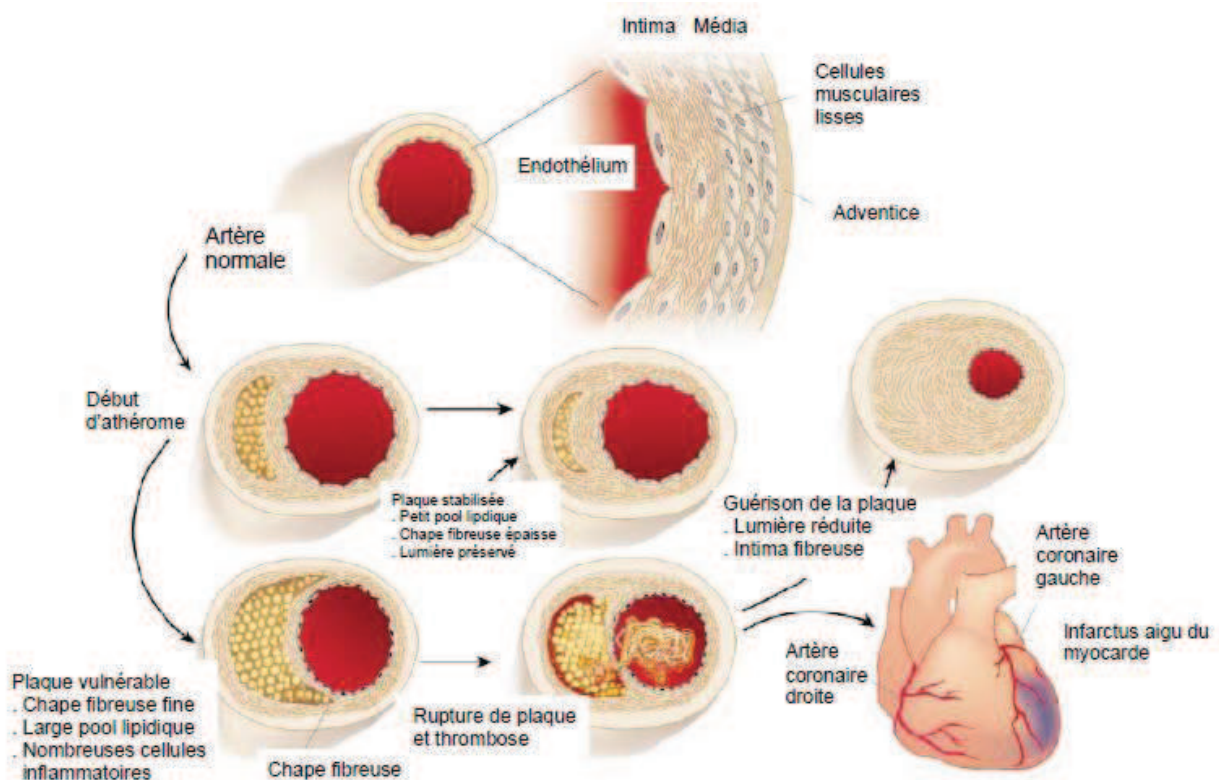
Les plaques vulnérables sont le siège d'importants processus apoptotiques favorisés par des cycles inflammatoires répétés (Mallat and Tedgui, 2004). Même si cette apoptose est bénéfique aux stades précoces de l'athérosclérose, permettant l'élimination et la réduction des cellules au sein des lésions, elle s'avère néfaste au cours de l'évolution de la maladie en participant dans les lésions avancées, à la constitution du core nécrotique qui déstabilise la plaque (Andres *et al*, 2012). De plus, l'apoptose des CMLV participe également indirectement à la fragilité de la plaque ; l'extension et la prolifération des CMLV est diminuée, limitant ainsi le développement de la chape fibreuse protégeant normalement la plaque.

Des contraintes mécaniques contribuent également à l'instabilité de la plaque. En effet, les forces de cisaillement et des vasospasmes peuvent déclencher la rupture soudaine de celle-ci (Falk *et al*, 1995).

Enfin, la néoangiogenèse joue un rôle important dans le développement de la plaque. Ces nouveaux vaisseaux néoformés en apportant des nutriments permettent le développement et l'expansion de l'*intima*, empêchent la mort cellulaire et contribuent à la croissance de la plaque et à sa stabilisation dans les lésions précoces. Cependant dans les plaques avancées, cette néovascularisation participe à l'exacerbation de la réponse inflammatoire en permettant le recrutement et l'infiltration de nouvelles cellules inflammatoires (de Boer *et al*, 1999; Moulton *et al*, 2003). La production concomitante de nombreuses cytokines pro-angiogéniques est

responsable de la prolifération néo-intimale incontrôlée de microvaisseaux conduisant à la formation et au développement de néovaisseaux souvent immatures et fragiles, à l'origine d'hémorragies intraplaques fragilisant la plaque. Ces hémorragies accroissent la pression dans la plaque et favorisent l'expansion du core lipidique par l'apport du cholestérol membranaire érythrocytaire (Kolodgie *et al*, 2003; Virmani *et al*, 2005). La densité de microvaisseaux est 2 à 4 fois plus élevée dans les plaques vulnérables instables que dans les plaques stables quelque soit le territoire vasculaire (carotidien et coronarien) et est corrélée au taux d'évènements thrombotiques (von Birgelen *et al*, 2001; Schoenhagen *et al*, 2000; Juan-Babot *et al*, 2003).

Enfin, le FT, principal initiateur de la coagulation, dont l'expression est accrue dans l'environnement inflammatoire des plaques athéroscléreuses, joue un rôle central dans la formation du thrombus au cours de la progression de l'athérosclérose (Badimon *et al*, 1999). En effet, lorsque la rupture de plaque survient, le FT contenu dans la plaque, est exposé, libéré et mis en contact avec les facteurs procoagulants plasmatiques, aboutissant à un processus thrombotique. Le thrombus formé peut oblitérer partiellement ou obstruer complètement la lumière vasculaire et être à l'origine, par exemple, dans le territoire coronaire, d'angor instable ou d'ischémie aigüe du territoire en aval définissant ainsi l'IDM (figure 10).



**Figure 10 :** Evolution progressive de la plaque d'athérosclérose vers un phénotype « stable » ou « vulnérable », adapté de (Libby, 2002)

## **I.8. Facteurs de risque cardiovasculaire**

Un facteur de risque CV est défini comme « un état clinique ou biologique qui augmente le risque ou la probabilité de survenue d'un événement CV donné » selon l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANAES, 2004). Des études épidémiologiques ont permis d'identifier ces facteurs de risque prédisposant aux pathologies CV et donc à l'athérosclérose. L'étude internationale MONICA (Multinational MONItoring of trends and determinants in CARdiovascular disease), coordonnée par l'OMS, a conduit à une meilleure prise en charge de la prévention CV (Tunstall-Pedoe *et al*, 1999). De même, 2 enquêtes prospectives de population ont été réalisées en France à 10 ans d'intervalle (de 1985 à 1987 et de 1995 à 1997) pour évaluer les facteurs de risque CV dans la région Lilloise, dans le Bas-Rhin et en Haute-Garonne (Gourdy *et al*, 2001). Des liens entre l'évolution de l'incidence et de la mortalité des maladies CV et les facteurs de risque CV ont ainsi pu être établis et des facteurs prédictifs de la survenue des événements CV aigus liés à l'athérosclérose ont été mis en évidence. L'athérosclérose est une maladie multifactorielle résultant de la combinaison de facteurs de risque non modifiables (âge, sexe, hérédité) et de facteurs environnementaux ou comportementaux modifiables (alimentation riche en graisses et sucres, tabagisme, sédentarité, stress...) favorisant l'installation d'une HTA, d'un diabète de type 2, de dyslipidémies et de l'obésité. Ces différents facteurs de risque CV participent à la modulation de l'âge de survenue des lésions et à la progression des lésions athéroscléreuses vers des formes compliquées (Luisi, 2000).

### **I.8.1. Les facteurs non modifiables**

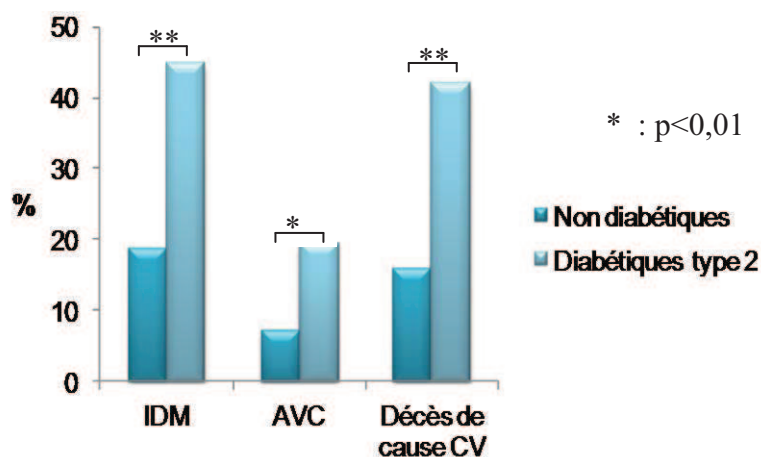
Les lésions athéroscléreuses apparaissent très précocément et s'aggravent avec l'âge. L'homme a un risque d'athérosclérose plus élevé que la femme. Cette protection chez la femme est expliquée notamment par l'influence bénéfique des oestrogènes naturels sur le profil lipidique. Elle disparaît quelques années après la ménopause et explique l'âge tardif de survenue des complications de l'athérosclérose chez la femme. Les recommandations de l'HAS de 2005 proposent de considérer l'âge comme un facteur de risque à partir de 50 ans chez l'homme et de 60 ans chez la femme. L'incidence est similaire pour les 2 sexes à partir de 65 ans.

Concernant le déterminisme génétique, les antécédents familiaux de maladie CV qui touchent un parent du premier degré sont un facteur de risque d'autant plus important que l'âge de survenue des événements a été précoce dans la famille (avant 55 ans chez le père ou un parent

du premier degré de sexe masculin ou avant 65 ans chez la mère ou un parent du premier degré de sexe féminin).

### I.8.2. Les facteurs modifiables

Les diabètes insulino- (type 1) et non insulino-dépendants (type 2) sont associés à une augmentation du risque CV. Le diabète de type 2, plus fréquemment rencontré chez les sujets en âge avancé, est souvent associé à d'autres facteurs de risque CV (dyslipidémie, HTA, obésité...). Le diabète est actuellement défini par une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/L à 2 reprises. La persistance de l'hyperglycémie chez le sujet diabétique conduit à la formation de produits de glycation avancés (AGE) responsables d'une inflammation de la paroi artérielle contribuant ainsi au développement de la maladie athéroscléreuse (Schmidt *et al*, 1999). Cette glucotoxicité induit également une production accrue de cytokines pro-inflammatoires et un stress oxydatif impliqué dans l'oxydation des LDL devenant ainsi plus athérogènes (Libby, 2002). Plusieurs études mettent en évidence un risque plus élevé de complications CV chez les patients diabétiques par rapport aux sujets non diabétiques (figure 11) (Haffner *et al*, 1998; Dale *et al*, 2008). En effet, des plaques d'athérosclérose plus étendues et plus vulnérables (large infiltrat macrophagique) sont observées chez ces patients (Moreno *et al*, 2000; Burke *et al*, 2004; Hong *et al*, 2009).



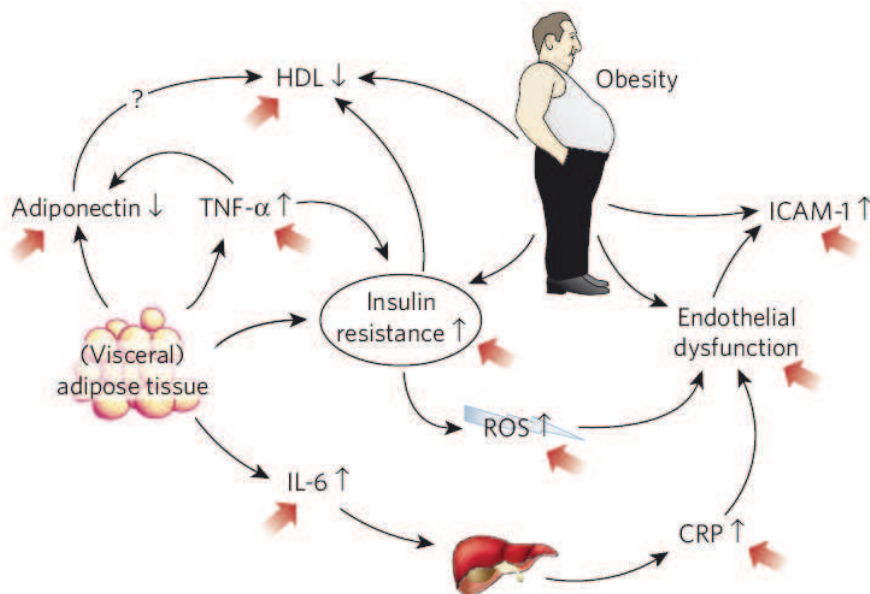
**Figure 11 : Incidence de diverses manifestations cliniques de l'athérosclérose : infarctus du myocarde (IDM), accident vasculaire cérébral (AVC) et mortalité d'origine CV à 7 ans chez des patients diabétiques (n=1059) versus non diabétiques (n=1373), d'après (Haffner *et al*, 1998)**

Différentes lipoprotéines classées selon leur densité, les VLDL et LDL (Very Low et Low Density Lipoprotein) et les HDL (High Density Lipoprotein) sont impliquées dans le transport des lipides dans la circulation sanguine. Chez un sujet sans facteur de risque, le bilan lipidique suivant sera considéré comme normal : LDL-cholestérol (LDL-C) <1,6 g/l, triglycérides <1,4 g/l et HDL-cholestérol (HDL-C) >0,4 g/L chez l'homme ou >0,5 g/L chez la femme. Mais le diagnostic de dyslipidémie repose sur les examens biologiques et les antécédents. En effet, les objectifs à atteindre de LDL-C sont fonction des autres facteurs de risque associés. L'hypercholestérolémie et principalement le LDL-C sont des facteurs de risque majeurs de l'athérosclérose. De par leur forte teneur en cholestérol, les LDL sont pro-athérogènes ; elles sont responsables, sous leur forme oxydée, de l'initiation de l'inflammation lors de l'athérosclérose. Leur accumulation et leur oxydation dans l'*intima* expliquent leur toxicité directe sur l'endothélium (Lusis, 2000). Les statines, classe de médicaments hypocholestérolémiants, ont été développées sur la base de la compréhension des mécanismes moléculaires régulant le métabolisme du cholestérol. Elles réduisent significativement le risque de mortalité lié aux pathologies CV par la réduction significative du taux de cholestérol plasmatique.

L'HTA, autre facteur de risque CV important, se définit par une pression artérielle systolique supérieure à 140 mmHg ou une pression artérielle diastolique supérieure à 90 mmHg. Elle touche environ 31% de la population française (InVS, 2008). Les effets de la pression artérielle sur la paroi vasculaire sont complexes ; l'angiotensine II (Ang II) est un des mécanismes proathérogènes de l'HTA. L'Ang II possède des propriétés vasoconstrictrices et induit également une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 6 (IL-6) dans les CMLV ainsi que de la molécule d'adhésion VCAM-1 sur les cellules endothéliales (Ross, 1999).

Le tabac est un facteur de risque majeur de l'athérosclérose. Les divers mécanismes athérogènes du tabac sont décrits dans la figure 12. Outre leur effet toxique direct sur l'endothélium artériel, les divers composés de la fumée de cigarette (NO, nicotine...) induisent à la fois un stress oxydatif important aboutissant à une modification des LDL (par peroxydation lipidique) et à un dysfonctionnement endothélial (Zeiber *et al*, 1995) et un environnement pro-thrombogène favorisant l'activation et l'agrégabilité plaquettaire et la libération du thromboxane A2 (Pittilo, 2000).

L'obésité, caractérisée par l'accumulation de tissu adipeux, est définie historiquement par des catégories d'indice de masse corporelle ( $IMC = \text{poids}/\text{taille}^2$ ). Les normales sont comprises entre 20 à 25. On parle de surpoids ou surcharge pondérale lorsque l'IMC est supérieur à 25 et d'obésité au-delà de 30. L'obésité est dite morbide pour des IMC supérieurs à 40. Cette obésité peut être gynoïde ou androïde, or c'est la répartition androïde des graisses avec une augmentation de la masse graisseuse intra-abdominale qui augmente le plus le risque CV. Ainsi, cette obésité viscérale est actuellement appréciée par la mesure du tour de taille ou circonférence abdominale (>102 cm chez l'homme et > 88 cm chez la femme). Ce critère est plus spécifique sur le risque CV que la surcharge pondérale seule. L'obésité prédispose non seulement à la résistance à l'insuline et donc au diabète mais aussi à la dyslipidémie. Les adipocytes constituant le tissu adipeux, sont capables de sécréter de nombreuses adipokines dont la leptine et l'adiponectine qui modulent la sensibilité à l'insuline et le métabolisme tissulaire des lipides et du glucose, ainsi que des cytokines pro-inflammatoires telles que le  $TNF\alpha$  et l'IL-6 (figure 12) (Van Gaal *et al*, 2006).



**Figure 12 : Implication de l'obésité (flèches noires) et du tabagisme (flèches rouges) dans le développement des maladies CV (Van Gaal *et al*, 2006)**

Par ailleurs, le manque d'activité physique régulière est associé à une augmentation du risque de mortalité CV dans la plupart des études épidémiologiques (Manini *et al*, 2006; Kokkinos and Myers, 2010).



D'autres facteurs de risque CV sont étudiés, notamment la Protéine C réactive (CRP) plasmatique, lorsqu'elle est dosée par méthode ultrasensible, son élévation est un facteur de risque d'évènements CV (Ridker, 2003). L'hyperhomocystéinémie est également associée à un risque ischémique coronarien et cérébral accru, avec un rôle dans la dysfonction endothéliale et la thrombogénèse (Wald *et al*, 2002).

Ces derniers facteurs de risque peuvent être modifiables, ce qui les rend accessibles à des mesures de prévention destinées à diminuer l'incidence de survenue d'évènement CV. La prévention primaire concerne les sujets indemnes de toute pathologie CV cliniquement décelable. A l'inverse, la prévention secondaire, c'est-à-dire après l'apparition d'évènements CV, devient impérative pour lutter contre les facteurs de risque afin d'éviter la récurrence ultérieure d'accident CV, de réduire la morbi-mortalité et de dépister les autres localisations de la maladie athéroscléreuse. Les actions de prévention sont nombreuses : traitement et contrôle de l'HTA, du diabète et des dyslipidémies avec des suivis biologiques réguliers (HbA1c pour le diabète, bilan lipidique...) et des règles hygiéno-diététiques telles que le régime, la maîtrise du poids, la reprise d'une activité physique régulière et le sevrage tabagique.

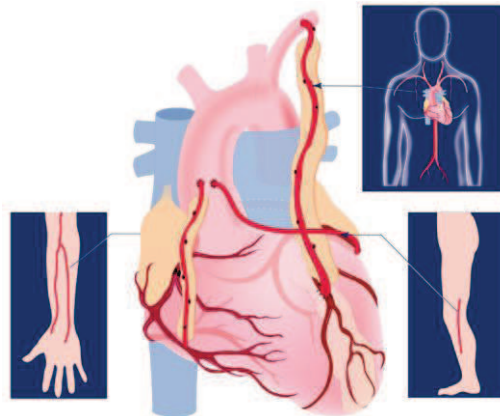
## **I.9. Revascularisation chirurgicale et prévention thérapeutique**

### **I.9.1. Le pontage aorto-coronarien**

Le pontage aorto-coronarien est le traitement chirurgical des lésions athéroscléreuses coronariennes sténosantes confirmées par coronarographie. Il est proposé dès lors que le traitement médicamenteux est insuffisant à la réduction des symptômes de l'insuffisance coronarienne. Il constitue donc le traitement chirurgical de choix pour la prévention de l'IDM.

Il est décidé lorsque les lésions sont nombreuses et/ou inaccessibles à une revascularisation par angioplastie ou lorsqu'une obstruction de l'origine de l'artère coronaire gauche (tronc coronaire gauche), menace un important territoire cardiaque. Le geste chirurgical consiste à contourner une artère coronaire dont la lumière est rétrécie par de l'athérome ou obstruée, en implantant un autre vaisseau en aval et en amont de cette dernière, afin de rétablir une circulation sanguine satisfaisante et d'éviter l'ischémie voire la mort du territoire cardiaque mal perfusé. Un greffon veineux ou artériel peut être utilisé (figure 13). Dans le premier cas, l'intervention consiste à prélever un segment de veine au niveau des membres inférieurs (le plus souvent saphène interne du patient) et à l'implanter en amont et en aval du rétrécissement coronarien, de façon à

réaliser un "pont" entre l'aorte et le(s) artère(s) coronaire(s) malade(s). L'artère radiale ou l'artère mammaire interne (AMI) peuvent être utilisées comme greffons artériels, avec de meilleurs résultats à long terme pour les AMI, généralement indemnes de maladie athéroscléreuse. Dans ce cas, l'AMI est dérivée de son parcours normal et est reliée directement à l'artère coronaire en aval du rétrécissement.



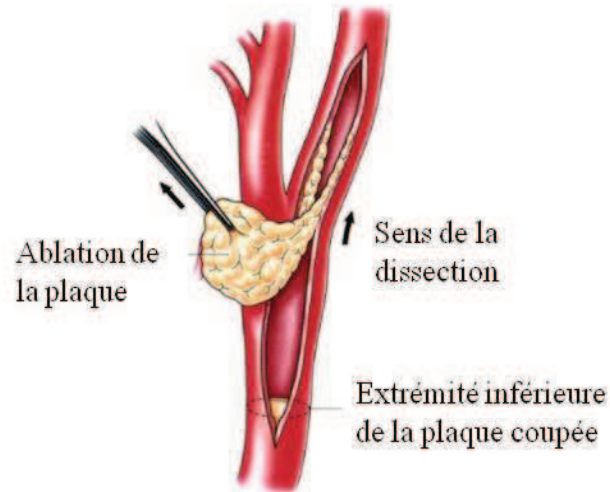
**Figure 13 : Greffons veineux ou artériels utilisés dans les pontages coronariens, (BHC, 2015a)**

#### I.9.2. L'angioplastie coronaire

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

#### I.9.3. L'endartériectomie carotidienne

L'endartériectomie carotidienne représente l'une des interventions vasculaires les plus fréquemment pratiquées. Elle consiste à enlever la plaque d'athérome qui obstrue la carotide (figure 14). Elle concerne les plaques sténosantes d'origine athéromateuse touchant le plus communément la bifurcation carotidienne. Ces lésions entraînent un rétrécissement artériel avec réduction du flux sanguin et parfois des migrations d'embols responsables d'AVC.



**Figure 14 : Technique d'endartériectomie carotidienne, (CCVC, 2015)**

#### I.9.4. Prévention de la stabilisation de la plaque

Il existe actuellement plusieurs options thérapeutiques permettant de prévenir les différents processus impliqués dans la physiopathologie de l'athérosclérose :

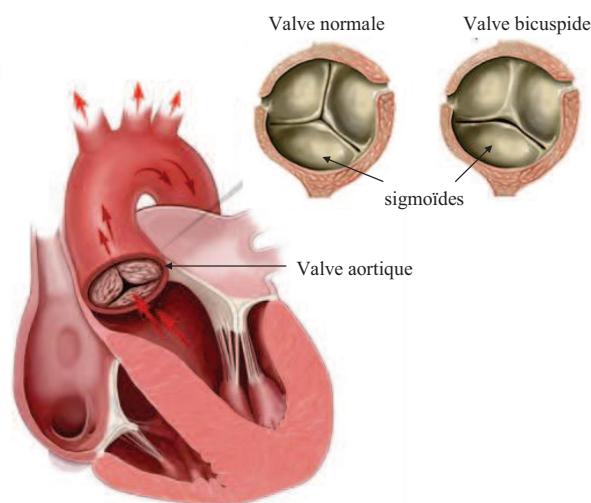
- les statines, molécules hypocholestérolémiantes par leur action inhibitrice sur une enzyme clé de la synthèse de cholestérol, l'HMG-CoA réductase. La diminution du contenu lipidique et de la composante inflammatoire permet de prévenir l'ulcération et la fragilisation de la plaque
- les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) et les statines, pour améliorer la fonction endothéliale
- les antiplaquettaires et les anticoagulants pour prévenir la thrombose

## II. La sténose valvulaire aortique

### II.1. La valve aortique normale

#### II.1.1. Structure et composition

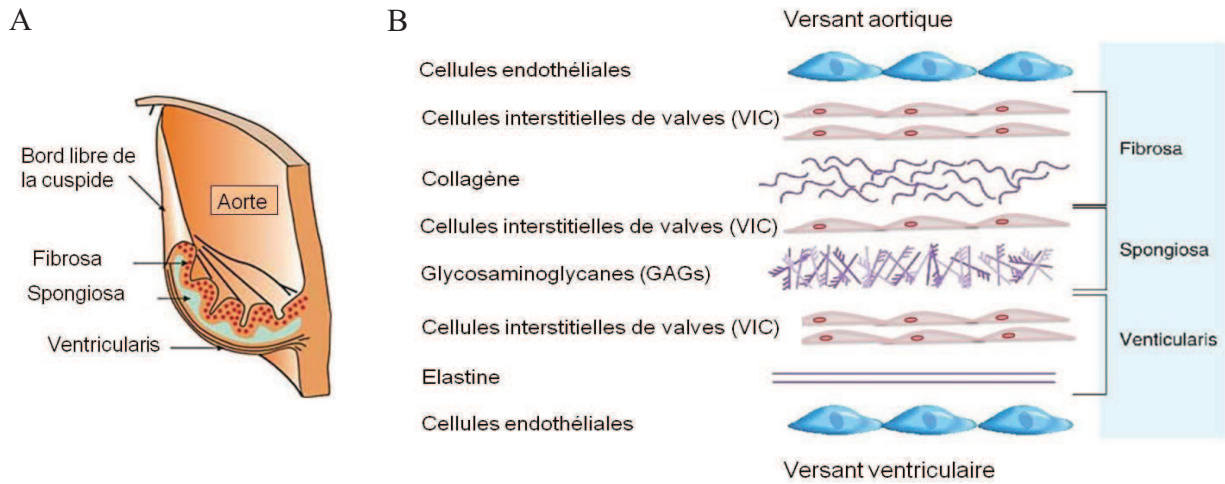
La valve aortique normale est située entre le ventricule gauche du cœur et l'aorte ascendante. Elle est constituée de 3 feuillets souples attachés à la *media* de l'aorte à la manière de demi-lunes appelés sigmoïdes aortiques ou cuspidés, séparés par des commissures, lui conférant ainsi le nom de valve tricuspide (figure 15). Cependant, pour 1 % de la population, la valve aortique est composée de seulement 2 sigmoïdes, on parle alors de valve bicuspide (Roos-Hesselink *et al*, 2003).



**Figure 15 : Schéma d'une valve aortique normale et d'une valve bicuspide, d'après (CC, 2015)**

Histologiquement, les feuillets de valves normales sont macroscopiquement lisses, minces, opalescents et composés de couches de tissus bien définies. Au niveau microscopique, ils sont avasculaires et ont très peu de cellules (Cowell *et al*, 2004; Yetkin and Waltenberger, 2009). Ils sont constitués de différents types cellulaires : cellules endothéliales à l'interface valve-sang, cellules interstitielles de valve (VIC), myofibroblastes, et de MEC (fibres de collagène et d'élastine). Entre les couches endothéliales, chaque sigmoïde est composée de 3 entités, appelées *fibrosa*, *spongiosa* et *ventricularis*, correspondant respectivement aux couches

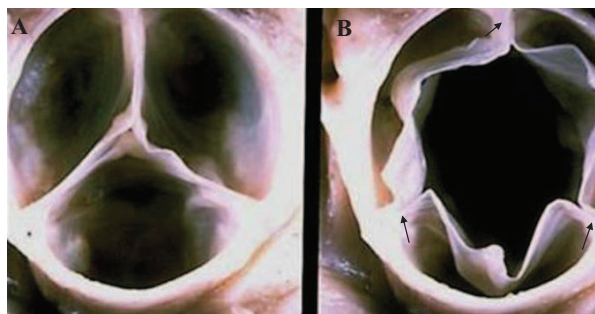
aortique, intermédiaire et ventriculaire (figure 16). La *fibrosa* est composée essentiellement de myofibroblastes ou VIC et de quelques fibres de collagène. La *spongiosa* comprend en plus des protéoglycanes tandis que la *ventricularis* est caractérisée par une quantité d'élastine plus importante (Rajamannan *et al*, 2011).



**Figure 16 : Structure schématique (A) et architecture cellulaire (B) d'une sigmoïde de valve aortique, d'après (Rajamannan *et al*, 2011)**

### II.1.2. Propriété et fonction

Les mouvements valvulaires sont dépendants de la pression dans les 2 secteurs vasculaires adjacents (ventricule et aorte). Lorsque la pression ventriculaire dépasse la pression aortique, la valve s'ouvre et inversement, lorsque la pression dans l'aorte dépasse la pression dans le ventricule gauche, la valve se ferme. Ainsi elle se ferme au début de la relaxation du cœur afin d'éviter le reflux du sang dans le ventricule gauche. Les feuillets s'apposent parfaitement, des commissures jusqu'au centre de la valve (figure 17).



**Figure 17 : Valve aortique normale en position fermée (A) et ouverte (B). Les commissures sont indiquées par les flèches**

Les VIC sont le principal type cellulaire de la valve. Elles ne présentent ni marqueur endothélial (CD31), ni marqueur macrophagique (CD68) (Mulholland and Gotlieb, 1996). Elles sont cruciales au maintien de l'homéostasie et à la fonction valvulaire. Elles secrètent de nombreux médiateurs (cytokines, facteurs de croissance, facteurs procalcifiants, MMP...) (Alexopoulos *et al*, 2010; Rajamannan *et al*, 2003). Elles participent à la synthèse des protéines de la MEC (collagène, élastine, glycosaminoglycanes) et au remodelage de celle-ci (Rabkin *et al*, 2001).

Elles présentent une grande plasticité de différenciation (Rabkin-Aikawa *et al*, 2004). Plusieurs phénotypes ont été identifiés sur la base de leurs fonctions spécifiques : les cellules progénitrices provenant d'une transition endothélio-mésenchymateuse, les cellules interstitielles valvulaires quiescentes « fibroblastic-like », les VIC activées et les VIC « osteoblastic-like » (Liu *et al*, 2007; Rajamannan *et al*, 2003). Ce dernier phénotype contribue à la minéralisation de la valve et au rétrécissement aortique (Chen *et al*, 2009).

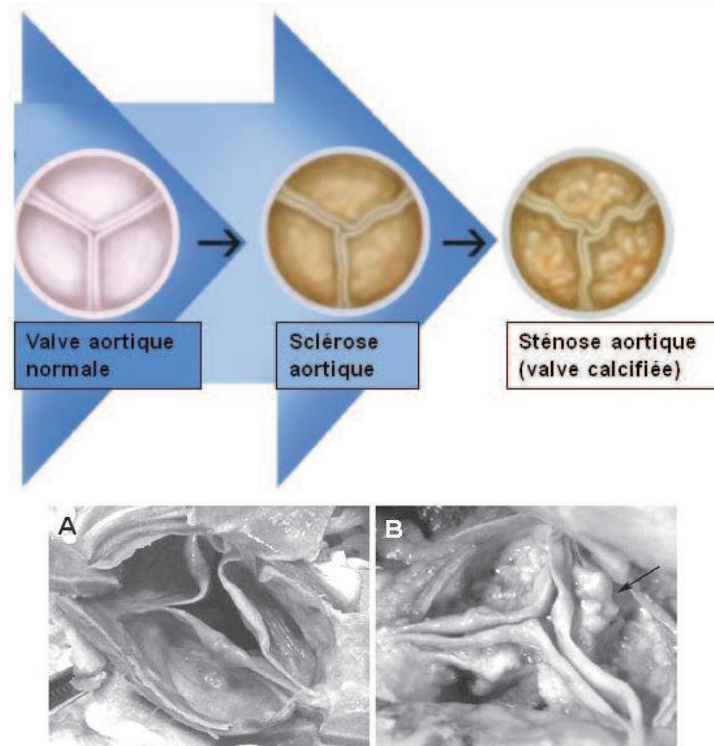
## **II.2. Définition**

La sténose valvulaire aortique (SVA) est une dégénérescence des valves aortiques aboutissant à un rétrécissement aortique (RA) (Stewart *et al*, 1997). Cette pathologie a été décrite pour la première fois en 1904 par Mönckeberg (Mönckeberg, 1904; Cowell *et al*, 2004).

La phase initiale de ce processus est la sclérose aortique qui est un épaissement ponctuel des feuillets aortiques sur leur face aortique sans entraîner d'obstruction à l'éjection du sang à travers la valve. Cette manifestation, extrêmement fréquente touche près de la moitié des patients de plus de 80 ans (Stewart *et al*, 1997; Lindroos *et al*, 1993).

La SVA se caractérise par un épaissement des feuillets de la valve, qui se calcifient. Cette calcification provoque une ouverture incomplète de la valve engendrant une obstruction à l'éjection du sang du ventricule gauche. Cette gêne à l'évacuation du sang hors du cœur implique sur le myocarde des modifications hémodynamiques : la pression dans le ventricule gauche augmente et conduit à son hypertrophie. Lors d'un rétrécissement aortique, l'intensité de l'insuffisance aortique dépend du diamètre de l'orifice valvulaire incompetent, de la durée de la relaxation du cœur et de la différence des pressions diastoliques entre l'aorte et le ventricule gauche.

La sclérose aortique (épaississement sans sténose) et la SVA ont longtemps été considérées comme 2 entités pathologiques différentes. Des données récentes suggèrent que la sclérose et la sténose correspondent à différents processus d'une même maladie, vus à différents stades d'évolution (Faggiano *et al*, 2003; O'Brien, 2007; Rajamannan *et al*, 2011). En effet, la sclérose évolue lentement vers la calcification pour créer la sténose (Cowell *et al*, 2004) (figure 18). La frontière entre sclérose et sténose est basée sur la vitesse du jet à travers la valve aortique. Il y a, par définition, sténose lorsque la vitesse transvalvulaire est  $> 2,5$  m/s (Otto, 2006).



**Figure 18 : Continuum schématique de la sténose aortique (en haut, d'après (Rajamannan *et al*, 2011)). Photographies de valves aortiques (en bas) : A. léger épaississement des feuillets d'une valve (début de la maladie aortique). B. sténose aortique sévère (→ : calcifications), selon (Freeman and Otto, 2005)**

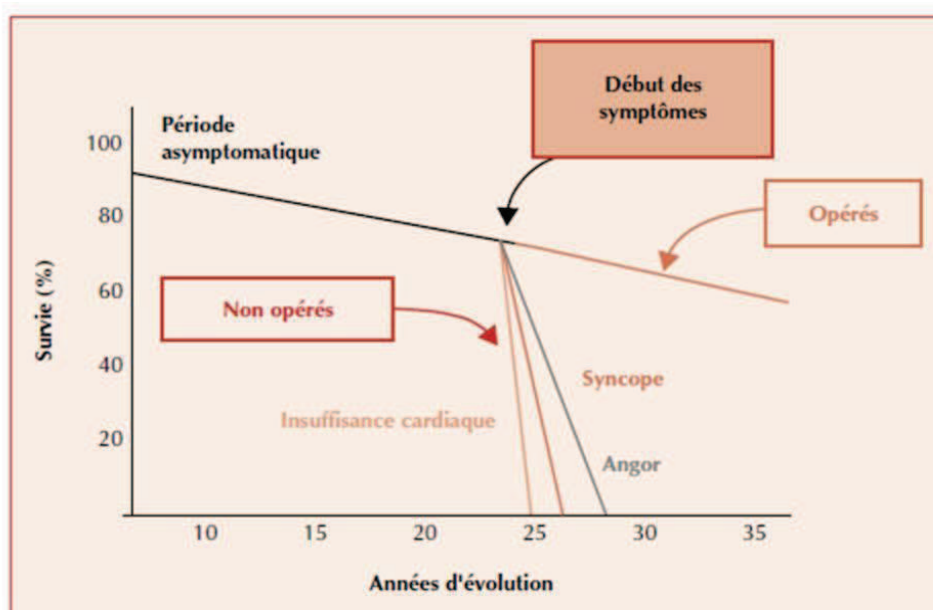
### II.3. Epidémiologie des pathologies valvulaires et facteurs de risque

La SVA est la valvulopathie la plus fréquemment rencontrée dans les pays occidentaux (Iung *et al*, 2003), et sa prévalence est en constante augmentation du fait du vieillissement de la population (Akat *et al*, 2009). Elle concerne 2 à 4% de la population de plus de 65 ans (Stewart *et al*, 1997; Lindroos *et al*, 1993).

La pathologie valvulaire est associée aux facteurs de risque CV retrouvés dans l'athérosclérose tels que l'âge, le tabagisme, l'HTA, la dyslipidémie et moins communément au diabète (Nassimiha *et al*, 2001; Deutscher *et al*, 1984; Palta *et al*, 2000; Pohle *et al*, 2001). Les patients présentant une calcification de la valve aortique ont une prévalence de maladie athéroscléreuse coronarienne plus élevée associée à des formes plus sévères (Qian *et al*, 2010).

## II.4. Symptomatologie clinique et évaluation diagnostique

La SVA est une affection lentement progressive, elle reste longtemps silencieuse avec une morbi-mortalité très faible. Les signes fonctionnels apparaissent au décours de l'évolution et dépendent de la capacité d'adaptation du ventricule gauche à la diminution fonctionnelle de la valve aortique due au rétrécissement (Carabello and Paulus, 2009; Baumgartner *et al*, 2009). Les symptômes apparaissent habituellement lorsque la surface d'ouverture valvulaire aortique devient inférieure ou égale à  $1 \text{ cm}^2$  (un des critères définissant la SVA) entraînant une gêne à l'éjection du sang hors du ventricule gauche qui compense pour s'adapter à cette nouvelle condition de fonctionnement. Les signes cliniques surviennent d'abord à l'effort, parfois au repos. Ce sont des douleurs thoraciques (angor d'effort), des difficultés respiratoires (dyspnée d'effort) et des syncopes et lipothymies. Dès l'apparition des symptômes, la survie est fortement impactée si la maladie n'est pas prise en charge (figure 19).






**Figure 19: Histoire naturelle de la sténose valvulaire aortique.** Survie avant et après l'apparition des symptômes chez les patients opérés et non opérés (Tribouilloy C *et al*, 2007)



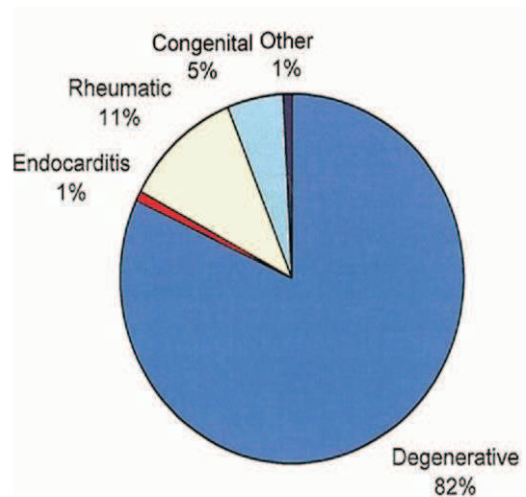
L'évaluation précise de la sévérité du RA est essentielle au suivi des patients. L'échographie couplée au Doppler est l'examen-clé du diagnostic de la SVA (Baumgartner *et al*, 2009). Elle permet de mettre en évidence l'épaississement des feuillets de la valve aortique et très souvent des calcifications et de préciser la tri- ou bicuspidie. L'imagerie permet également de mesurer 3 paramètres échographiques couramment utilisés pour le diagnostic et la classification de la SVA de la forme légère à la forme sévère (tableau II). Ces 3 indices de sévérité sont le jet de vélocité (vitesse sanguine trans-valvulaire) et le gradient moyen de pression transvalvulaire (représentant la différence de pression entre le ventricule gauche et l'aorte en systole) qui sont augmentés dans la SVA et l'aire valvulaire ou surface aortique (comprise normalement entre 2,5 et 3 cm<sup>2</sup>) qui diminue en cas de SVA (la surface aortique indexée à la surface corporelle peut également être utilisée) (Maganti *et al*, 2010).

**Tableau II : Recommandation pour la classification de la sévérité de la sténose aortique, d'après (Bonow *et al*, 2006)**

Paramètres échographiques	Sténose aortique		
	Légère	Modérée	Sévère
			
Jet de vélocité (m/sec)	< 3	3-4	> 4
Gradient moyen de pression (mm Hg)	<25	25-40	>40
Surface valvulaire aortique (cm <sup>2</sup> )	>1,5	1-1,5	<1
Surface valvulaire indexée (cm <sup>2</sup> /m <sup>2</sup> )			<0,6

## II.5. Etiologie de la sténose aortique

Il existe 3 étiologies principales à la SVA (figure 20) (Goldbarg *et al*, 2007).



**Figure 20 : Etiologie de la SVA (Goldbarg *et al*, 2007)**

### II.5.1. La malformation congénitale

Les malformations congénitales à l'origine d'une sténose aortique sont majoritairement valvulaires. Elles sont principalement de type bicuspidie (seulement 2 feuillets aortiques), il peut s'agir exceptionnellement d'unicuspidie (un seul feuillet) ou de quadricuspidie (un feuillet supplémentaire).

Concernant la bicuspidie, elle touche entre 0,5% et 2% des sujets (Braverman *et al*, 2005; Yener *et al*, 2002; Ward, 2000), préférentiellement les hommes (Basso *et al*, 2004). Elle est liée à une anomalie du tissu conjonctif associée à un remaniement de la paroi aortique, avant l'apparition de contraintes hémodynamiques anormales liée à une évolution sténosante (Ward, 2000). De plus, les valves bicuspidies sont particulièrement sujettes à une calcification précoce (Beppu *et al*, 1993). Ainsi les patients avec une valve bicuspidie développeront des anomalies structurelles valvulaires semblables à celles observées dans la SVA dégénérative, mais à un âge plus jeune.

### II.5.2. Le rhumatisme articulaire

La sténose aortique d'origine rhumatismale est liée aux séquelles d'une infection au streptocoque pyogène à *Streptococcus*  $\beta$ -hémolytique du groupe A responsable notamment de pharyngite et d'infections ORL. Cette étiologie est de plus en plus rare du fait de la quasi-disparition du rhumatisme articulaire dans les pays développés. Elle est habituellement d'évolution très lente. Il s'agit d'un mécanisme auto-immun, principalement médié par les

lymphocytes T (OMS, 2001), par analogie structurelle entre certaines glycoprotéines de la capsule de la bactérie (notamment la protéine M) et des glycoprotéines valvulaires. L'atteinte cardiaque peut concerner le péricarde, l'endocarde et/ou le myocarde. C'est l'endocardite rhumatismale qui altère les feuillets valvulaires aortiques. Il existerait également des facteurs génétiques, en effet seul 1 à 3% des patients atteints d'infections ORL à ce germe non soignés développeront un rhumatisme articulaire aigu (OMS, 1988). Classiquement, une valve aortique rhumatismale présente de petites végétations et de la fibrose puis au cours de l'évolution, les feuillets s'épaississent et se rétractent et peuvent se calcifier à un degré moindre que dans les 2 autres étiologies.

### II.5.3. La dégénérescence sénile ou maladie active calcifiante

La SVA d'origine dégénérative ou maladie de Mönckeberg est la forme la plus fréquente et représente 60% des cas de SVA dans les pays occidentaux. Elle résulte d'un épaissement sous-endothélial et d'une calcification progressive des valves et des sigmoïdes. C'est cette forme qui a été prise en compte dans ce travail.

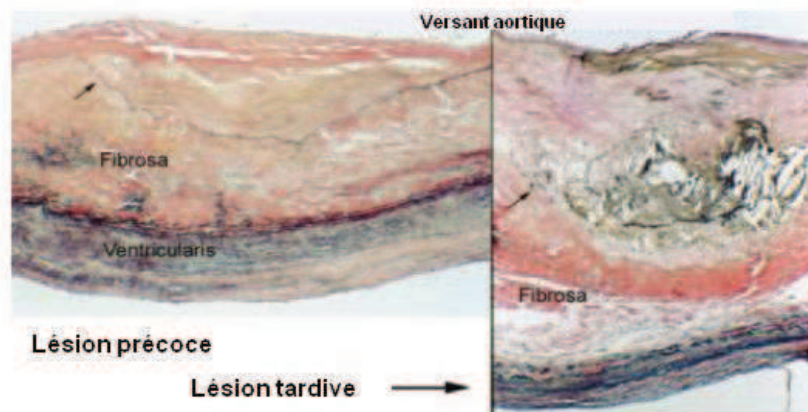
La valve est soumise à des contraintes mécaniques particulièrement importantes au cours de la vie. Les feuillets s'épaississent et sont déformés par de petits nodules de calcium qui se constituent dans la *fibrosa*. Ce processus de fibrose et de calcification peut, avec le temps, entraîner des modifications structurelles et fonctionnelles importantes de la valve aortique. Cette hypothèse d'usure de la valve a longtemps été l'unique théorie de la genèse de la SVA chez les patients âgés, et est à l'origine du terme « SVA dégénérative sénile ». Mais, il est désormais clairement établi qu'il s'agit d'un processus actif biologiquement régulé.

## II.6. Physiopathologie

Longtemps estimée comme un processus dégénératif passif lié à l'âge, la SVA calcifiante est aujourd'hui considérée comme un processus actif de remodelage tissulaire pathologique biologiquement régulé (Helske *et al*, 2007). Des études expérimentales et épidémiologiques ont montré récemment que les processus physiopathologiques initiaux impliqués dans la SVA partagent de fortes similitudes avec ceux impliqués dans l'athérosclérose vasculaire, à savoir l'inflammation, l'angiogenèse, la fibrose et la calcification (tableau III) (Mazzone *et al*, 2006).

En effet, sur le plan anatomopathologique, les lésions valvulaires aortiques précoces s'apparentent aux plaques d'athérosclérose dans lesquelles on observe un processus inflammatoire chronique (figure 21). Au niveau de ces lésions, ont été décrits des dépôts lipidiques (principalement des LDL athérogènes), une accumulation de cellules inflammatoires, ainsi qu'une activation des processus d'oxydation des LDL, puis de calcification (Otto *et al*, 1994; O'Brien *et al*, 1996; Olsson *et al*, 1999; Freeman and Otto, 2005; O'Brien *et al*, 1995). Mais des différences existent : les cellules musculaires lisses constituant la chape fibreuse de la plaque d'athérome sont absentes dans les lésions valvulaires qui renferment des myofibroblastes. Bien que la calcification soit décrite dans les plaques athéroscléreuse, elle survient plus tôt dans les lésions valvulaires et est un processus important dans la SVA. En effet, il est décrit au cours de SVA un processus de calcification et d'ossification avec l'apparition de foyers de minéralisation et d'ostéoblastes/ostéoclastes dans le tissu valvulaire (Mohler *et al*, 2001). L'accumulation progressive de dépôts calciques (cristaux d'hydroxyapatite) et le remodelage tissulaire aboutissent à une diminution de la surface fonctionnelle et structurale de l'orifice aortique et donc à un obstacle à l'éjection ventriculaire.

De plus, la SVA et les pathologies coronariennes ont des facteurs de risque communs tels que le tabagisme, le sexe masculin, l'HTA, l'obésité, la dyslipidémie, des niveaux élevés de CRP et l'hyperhomocystéinémie (Stewart *et al*, 1997; Freeman and Otto, 2005) (tableau III).



**Figure 21 : Coupes histologiques de lésions précoces et tardives de la sténose valvulaire aortique** (Freeman and Otto, 2005). Lésions précoces : accumulation de cellules et de lipides extracellulaires, lésions tardives : accumulation prédominante de lipides et de matrice extracellulaire et présence de zones calcifiées

**Tableau III : Comparaison entre la sténose aortique calcifiée et l’athérosclérose, d’après (Otto and O'Brien, 2001; Freeman and Otto, 2005).**

	<b>Sténose aortique calcifiée</b>	<b>Athérosclérose</b>
<b><i>Caractéristiques histopathologiques</i></b>		
Accumulation lipoprotéines	++++	++++
Oxydation des lipides	++++	++++
Calcification	+++++	++
Inflammation	++++	++++
Marqueurs inflammatoires systémiques	++	++
Polymorphisme génétique	++	+++
Type cellulaire majoritaire	Fibroblastes, VIC	Cellules musculaire lisse, macrophage
<b><i>Mécanisme des évènements cliniques</i></b>	Rigidité valvulaire	Instabilité de plaque
<b><i>Facteurs de risque</i></b>		
Âge	++++	++++
Dysfonction rénale	++++	++++
Tabagisme	+++	++++
Hypertension	+++	++++
Dyslipidémie	+++	++++
Diabète	+	+++++
Dysfonction endothéliale	++	++++

Par ailleurs, plusieurs auteurs ont décrit la coexistence de sclérose ou sténose aortique chez des patients atteints de pathologies coronariennes (Vandeplass *et al*, 1988; Losi *et al*, 2010; Stewart *et al*, 1997) confortant l’hypothèse que la sténose aortique puisse être une localisation méconnue de la maladie athérosclérotique plutôt qu’un processus dégénératif passif (Freeman and Otto, 2005; Mazzone *et al*, 2006). Il est désormais admis que le SVA est une pathologie « atherosclerotic-like » (Breyne *et al*, 2010).

La pathogénie reste encore mal connue. Jusqu’à présent, plusieurs travaux soutiennent l’hypothèse selon laquelle la calcification de la valve aortique est un processus cellulaire actif impliquant plusieurs composantes lipidiques, inflammatoires, et phosphocalciques (figure 22) (Bosse *et al*, 2008).

Les contraintes mécaniques et le « shear stress » (ou forces de cisaillement) semblent être à l'origine de l'initiation de ces processus pathologiques via une lésion endothéliale. En effet, les calcifications prédominent aux endroits soumis aux plus fortes contraintes mécaniques, sur la face aortique des valves, au niveau de l'attachement à la racine aortique (Freeman and Otto, 2005; Goldberg *et al*, 2007). La dégénérescence des valves bicuspidées est plus rapide, du fait d'un stress mécanique plus important dans une conformation à 2 feuillets (Beppu *et al*, 1993).

La lésion endothéliale favorise l'infiltration dans le tissu interstitiel des lipides circulants principalement les LDL qui subissent une étape d'oxydation. Cet environnement facilite le recrutement et l'infiltration des monocytes qui se différencient en macrophages, capables de phagocyter les LDLox hautement cytotoxiques et de se transformer en cellules spumeuses identiques à celles des plaques d'athérosclérose (Olsson *et al*, 1999; Freeman and Otto, 2005). L'infiltration de cellules inflammatoires telles que les lymphocytes T et les macrophages est responsable de la réaction inflammatoire locale par sécrétion de diverses cytokines pro-inflammatoires. Les dépôts lipidiques et l'infiltration cellulaire activent un sous-type de fibroblastes valvulaires ou VIC en myofibroblastes qui possèdent des propriétés de CML, promouvant la prolifération cellulaire puis le remodelage tissulaire par l'intermédiaire des enzymes impliquées dans la dégradation de la MEC telles que les MMP. La production accrue de collagène par les fibroblastes et l'accumulation des composantes de la MEC conduisent à un épaissement des feuillets de la valve (Helske *et al*, 2007).

En pathologie, la *fibrosa* est particulièrement enclin à un processus de remodelage, caractérisé par une désorganisation des fibres de collagène, une fragmentation de l'élastine et une augmentation des dépôts de protéoglycanes. Les MMP sont impliquées dans ce remodelage et donc dans la progression de la maladie valvulaire (Satta *et al*, 2003; Koullias *et al*, 2004). La libération de cytokines pro-inflammatoires au sein des lésions valvulaires induit l'augmentation d'expression des MMP (Kaden *et al*, 2003). Deux isoformes (MMP-2 et MMP-9) ont été détectées dans les calcifications valvulaires (Soini *et al*, 2001).

La littérature actuelle suggère que ces 2 isoformes produites par les cellules inflammatoires dont les macrophages et les VIC, peuvent participer au remodelage pathologique de la MEC des valves sténosées en induisant une augmentation de la dégradation des fibres élastiques conduisant à la fibrose (Edep *et al*, 2000; Fondard *et al*, 2005). Enfin, l'augmentation de la production du collagène et de la dégradation de l'élastine conduit à une diminution du ratio élastine/collagène au niveau de la valve, contribuant à la rigidité valvulaire. Par ailleurs, ces

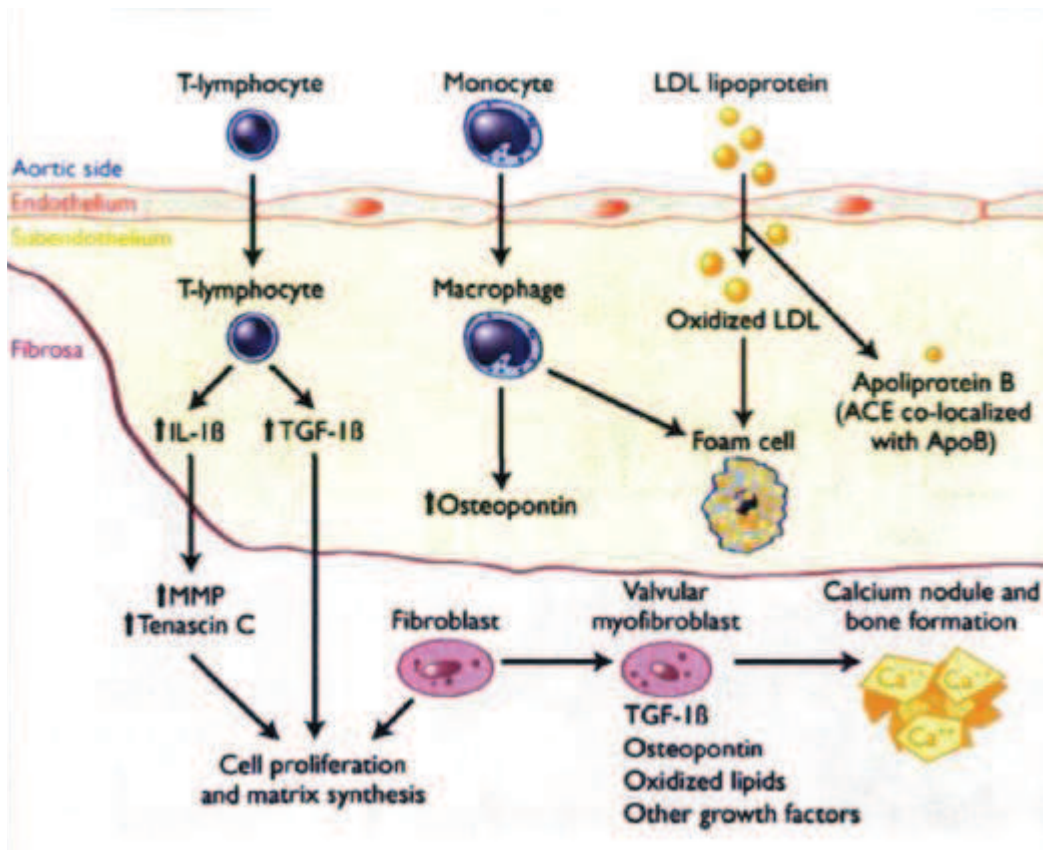
enzymes élastolytiques sont localisées dans les valves au niveau des calcifications et leur action de digestion de la MEC rend possible les dépôts calciques (Perrotta *et al*, 2011).

De plus, l'angiogenèse et la formation de néovaisseaux, induits par les cytokines inflammatoires, interviennent dans la physiopathologie de la SVA. Alors que les valves aortiques humaines saines sont des structures avasculaires, un processus angiogénique a été mis en évidence dans les valves pathologiques, près des nodules de calcifications et proche des zones d'infiltration des cellules inflammatoires (Mohler *et al*, 2001). Ces phénomènes vont encore exacerber l'infiltration de lipides et de cellules inflammatoires et aggraver la progression de la maladie (Chalajour *et al*, 2004).

Enfin concernant la composante phosphocalcique, cet environnement inflammatoire va favoriser l'initiation de la calcification, notamment la différenciation d'un sous-type de VIC en cellules « osteoblast-like » capables de produire des dépôts calciques et du tissu osseux (Kaden *et al*, 2005b; Rajamannan *et al*, 2003).

Ces dépôts calciques évoluent vers d'importantes lésions macroscopiques qui peuvent, au stade terminal de la SVA, prendre la forme d'os lamellaire mature associé à la présence de néovaisseaux, d'ostéoblastes, d'ostéoclastes et de microfractures (Mohler *et al*, 2001).

Plusieurs protéines spécifiques de la matrice osseuse et du métabolisme phosphocalcique sont décrites dans le processus de calcification de la SVA (Garg, 2006). L'ostéopontine, l'ostéocalcine, les BMP (bone morphogenic proteins), la phosphatase alcaline ou encore le ligand pour le récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B (RANK-L) exprimés par les ostéoblastes dans les zones de remodelage osseux actif, ont été détectés dans les valves aortiques calcifiées (Shetty *et al*, 2006; O'Brien *et al*, 1995; Mohler *et al*, 2001; Cappelli *et al*, 2010). L'expression d'ostéopontine (OPN) augmente progressivement avec la calcification valvulaire, suggérant son importance dans le développement de la maladie (Pohjolainen *et al*, 2008). Ce processus de calcification résulte d'un déséquilibre dans la balance entre les facteurs pro- et anti-calcifiants. La voie ostéogénique Runx2 via BMP2 est l'une des voies majeures dans la calcification valvulaire (O'Brien, 2006).



**Figure 22 : Schéma des processus impliqués dans la genèse de la sclérose et de la sténose aortique.** (Foam cell : cellule spumeuse, IL : interleukine, TGF : facteur de croissance transformant, MMP : métalloprotéinases de la matrice) (Freeman and Otto, 2005).

## II.7. Traitement chirurgical : le remplacement valvulaire aortique

Le seul traitement efficace de la SVA est la chirurgie de remplacement valvulaire aortique (RVA) réservée aux formes sévères (Rodes-Cabau, 2011).

### II.7.1. Les prothèses valvulaires

Deux types de prothèses valvulaires existent :

- les prothèses mécaniques ont été les premières à être développées. Elles ont, en l'absence de dysfonction structurelle, une excellente durabilité. Cependant, elles nécessitent une anticoagulation définitive.
- les bioprothèses ou valves biologiques sont initialement d'origine animale principalement porcine mais des allogreffes provenant de dons humains sont également réalisées mais sont

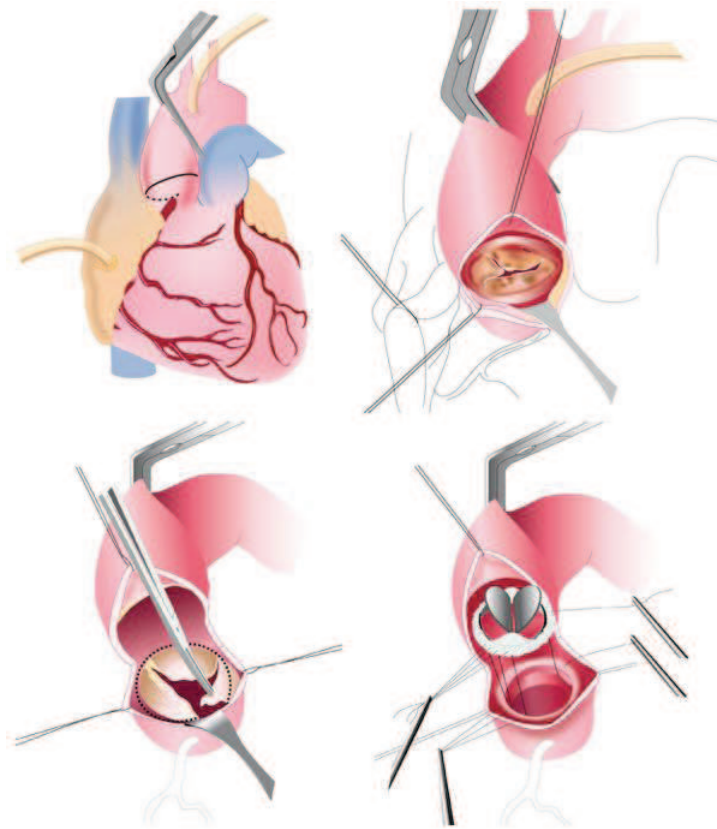


limitées par leur faible disponibilité. Ces substituts valvulaires ont des performances hémodynamiques exceptionnelles et ne nécessitent pas d'anticoagulation définitive, ce qui représente un avantage certain. Cependant elles se détériorent avec le temps, la durée de vie d'une bioprothèse en position aortique implique que 20% d'entre elles soient réopérées entre 15 et 18 ans après leur implantation. Grâce à la faible cellularité du tissu valvulaire, il y a une bonne tolérance biologique sans problème de rejet de la valve et aucune thérapie immunosuppressive n'est nécessaire.

#### II.7.2. Le remplacement valvulaire aortique par voie chirurgicale

Cette technique chirurgicale de RVA est une opération lourde, à cœur ouvert, réalisée sous circulation extracorporelle. Elle consiste à enlever la valve abîmée et à la remplacer par une prothèse valvulaire (figure 23).

Elle peut être associée à différentes complications selon le type de prothèse : thromboemboliques, infectieuses, de dégénération tissulaire, de défaillance de la prothèse et hémorragique si une thérapie anticoagulante est nécessaire. Le risque de complications sérieuses en lien avec la prothèse est estimé entre 1 et 2% par année (Vesey and Otto, 2004; Lester *et al*, 1998). Ainsi les recommandations actuelles préconisent d'attendre l'apparition des symptômes avant d'effectuer le RVA.



**Figure 23 : Technique chirurgicale classique de remplacement valvulaire aortique (BHC, 2015b)**

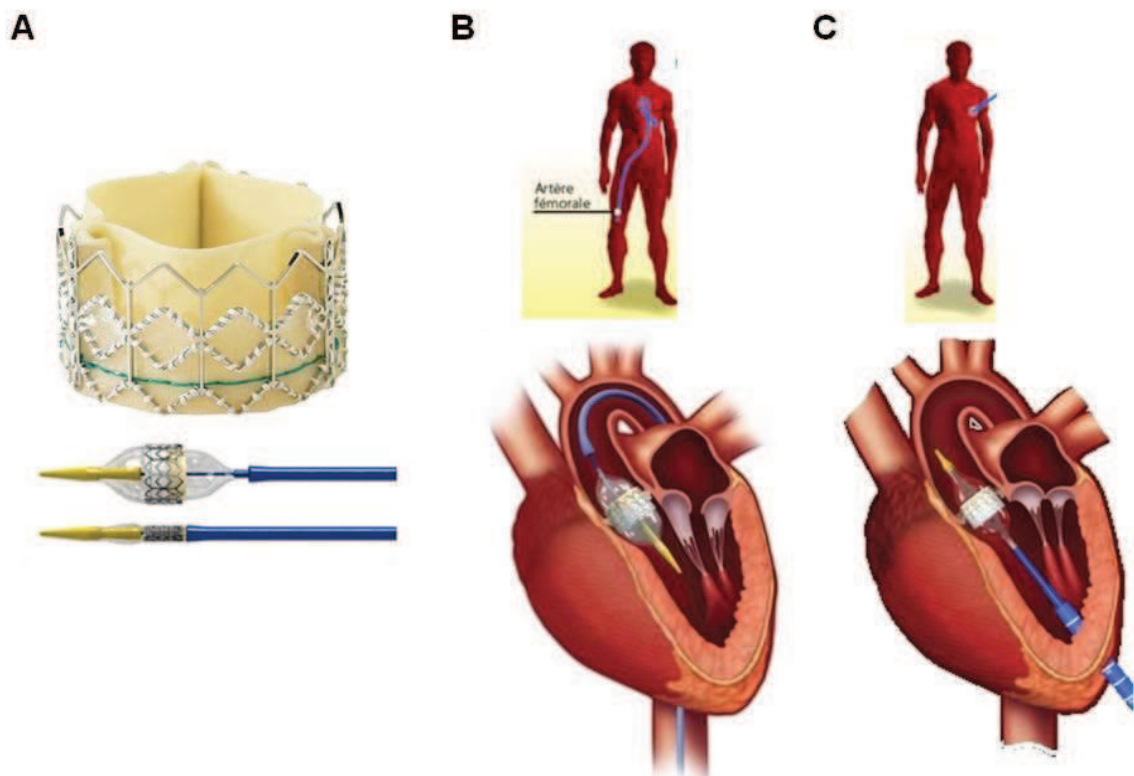
### II.7.3. Le remplacement valvulaire aortique par voie percutanée

Plus récemment, la valvuloplastie aortique par voie percutanée (TAVI : Transcatheter Aortic Valve Implantation) a été développée notamment pour les patients ne pouvant pas bénéficier d'une chirurgie classique de RVA, du fait d'un risque opératoire élevé, ce qui est le cas pour environ 40% des patients atteints de SVA sévère. L'implantation de la valve se fait, soit par l'artère fémorale, soit par voie transapicale, sans ouvrir la cavité thoracique. Le principe est de déployer une prothèse valvulaire aortique biologique spécifique (figure 24-A) montée sur une armature métallique (stent) à l'aide d'un ballonnet sur la valve aortique malade, sans ôter cette dernière qui est écrasée lors du déploiement de la nouvelle valve. Cette nouvelle technique est moins lourde et moins invasive que la technique classique (ne nécessitant pas de circulation extracorporelle, ni de sternotomie), la durée d'intervention est moins longue et les suites opératoires sont plus simples.

Il existe 2 voies de positionnement :

- la voie transfémorale (figure 24-B), via une incision inguinale, la prothèse est introduite dans l'artère fémorale puis remontée dans l'aorte à l'aide d'un cathéter jusqu'à la valve où elle est déployée. Il s'agit de la technique de premier choix, si les artères fémorales et iliaques ne sont pas trop abimées par d'importantes plaques d'athérome.

- la voie transapicale (figure 24-C), via une mini-incision thoracique latérale, la prothèse est introduite par ponction du ventricule gauche au niveau de la pointe du cœur à l'aide d'un cathéter spécial et amenée sur la valve aortique où elle est déployée.



**Figure 24 : la valvuloplastie aortique par voie percutanée.**

A. Valve biologique spécifique utilisée ; B. Technique par voie transfémorale ; C. Technique par voie apicale.

Le choix de la meilleure option chirurgicale doit être individualisé selon les caractéristiques du patient (âge, comorbidités, espérance de vie, style de vie, caractéristiques individuelles modifiant le risque d'une thérapie anticoagulante à long terme et durabilité de la prothèse doivent être pris en compte). La meilleure décision possible sera prise en mettant en balance les risques et les bénéfices des différentes options, après discussion entre le patient, le cardiologue et le chirurgien.

### III. Monocytes et Macrophages

#### III.1. Monocytes et macrophages, cellules du système des phagocytes mononucléés

##### III.1.1. Origine cellulaire

Les monocytes appartiennent au système des phagocytes mononucléés. Ils sont issus de progéniteurs très indifférenciés pluripotents (CFU-GEMM), plus différenciés (CFU-GM puis CFU-M) et de précurseurs médullaires. La différenciation monocyttaire médullaire (du stade CFU-GEMM au stade mature de monocytes) a lieu sur plusieurs jours (environ 4-5 jours). Après 24 heures dans la moelle osseuse, les monocytes migrent dans la circulation périphérique où ils séjournent de quelques heures à quelques jours, avant de migrer dans les tissus par diapédèse et de se différencier en macrophages tissulaires de durée de vie plus longue (figure 25). Les monocytes représentent moins de 10% des leucocytes sanguins circulants chez l'homme. Les monocytes circulants sont les précurseurs des cellules phagocytaires et présentatrices d'antigène dans les tissus, que sont les macrophages et les cellules dendritiques.

##### III.1.2. Hétérogénéité des monocytes humains

Les monocytes sanguins humains sont morphologiquement et fonctionnellement hétérogènes. La cytométrie en flux a permis une classification et une description de l'hétérogénéité des monocytes, basée sur l'analyse de l'expression de molécules de surface spécifiques notamment le CD14 et le CD16 (FcγR-III) (Grage-Griebenow *et al*, 2001; Geissmann *et al*, 2003). Les monocytes sont ainsi divisés en 3 sous-ensembles: la population majoritaire (plus de 80-85% des monocytes), n'exprimant pas le CD16 (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), appelée monocytes « classiques » ; est très phagocytaire et pro-inflammatoires par production de cytokines telles que le TNFα, l'IL-1β et l'IL-6 (Belge *et al*, 2002), les monocytes « intermédiaires » CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> et les monocytes « non-classiques » CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>, représentant, respectivement, 4 à 5% et 7 à 10% des monocytes (figure 26) (Passlick *et al*, 1989; Ziegler-Heitbrock *et al*). Ces sous-types de monocytes expriment différemment des molécules d'adhésion et des récepteurs aux chimiokines impliqués dans l'adhésion et le recrutement de monocytes (Wong *et al*, 2011).

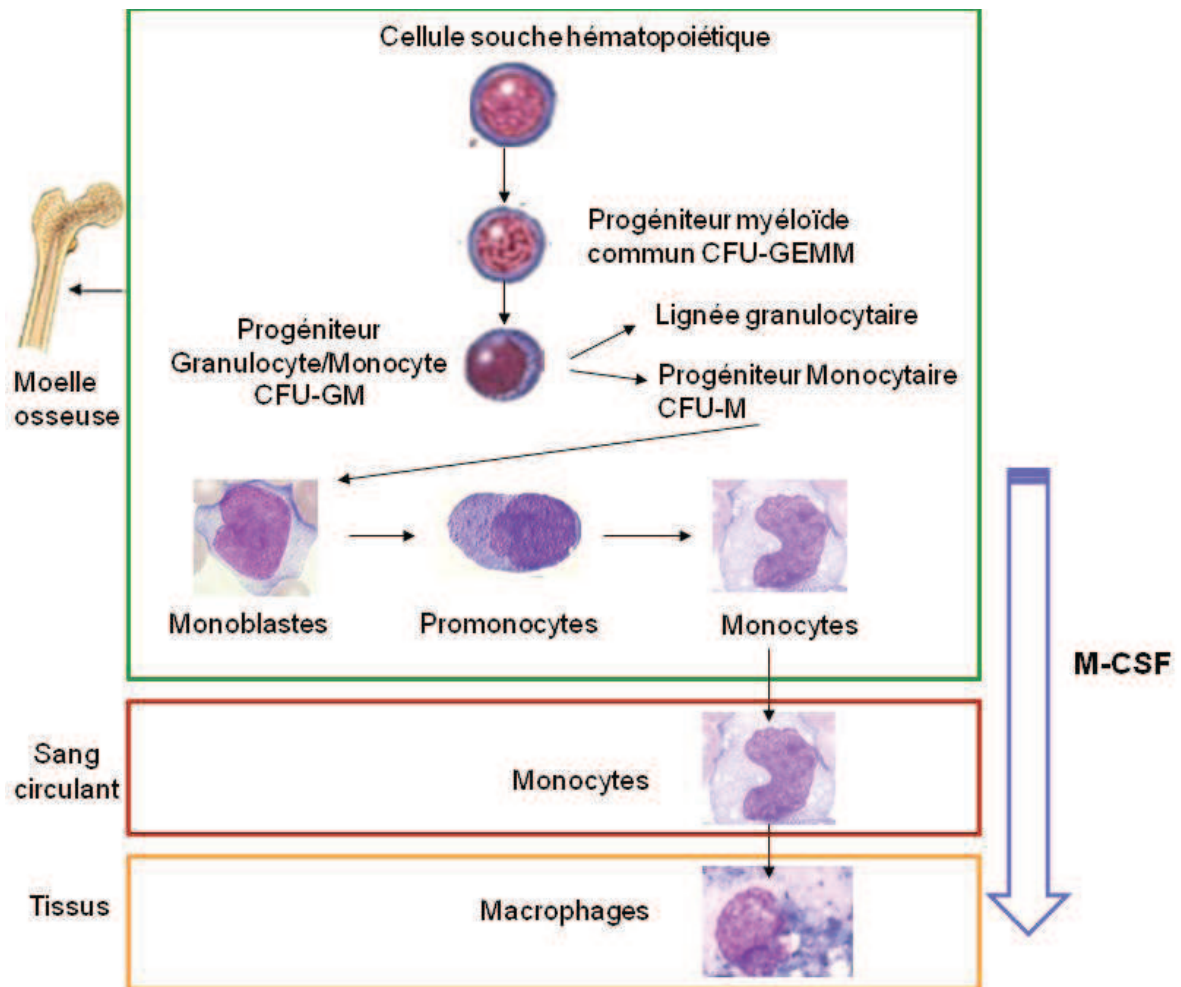


Figure 25 : Maturation médullaire du monocyte

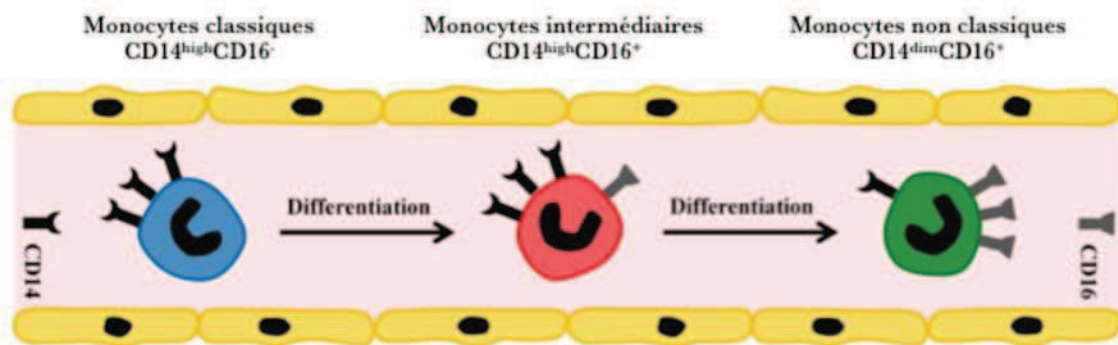


Figure 26 : Principaux sous-types monocytaires chez l'homme

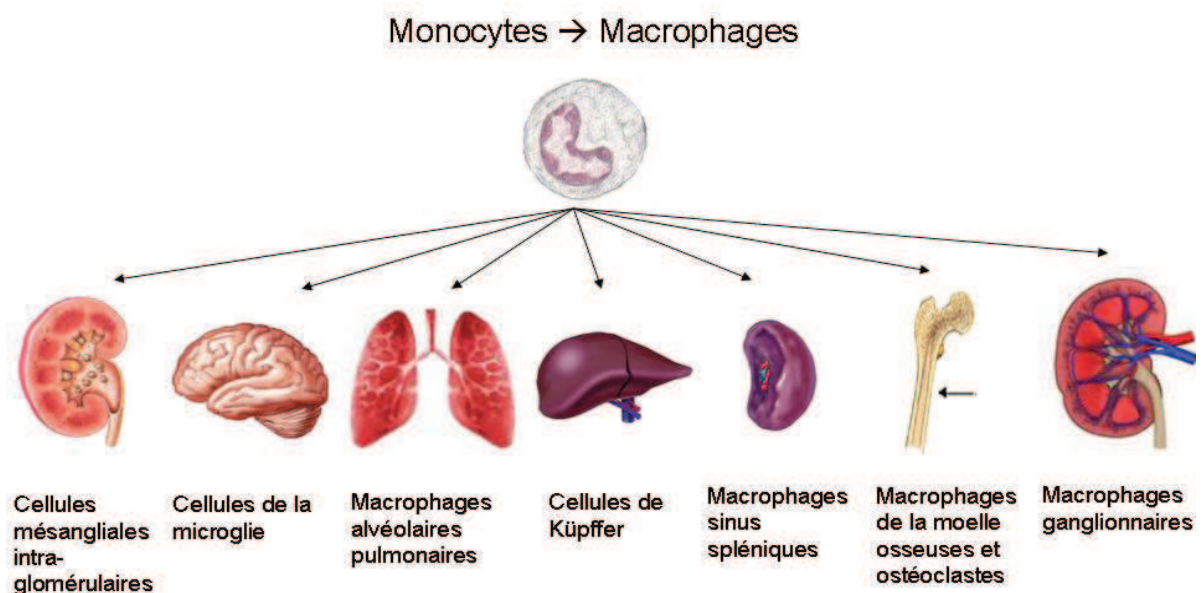
### III.1.3. Fonctions physiologiques

Les monocytes font partie du système phagocytaire et jouent un rôle important dans l'immunité innée et acquise de l'organisme. Ils permettent le renouvellement continu des populations de

macrophages et/ou de cellules dendritiques afin de maintenir l'homéostasie cellulaire et d'assurer l'immunité innée et adaptative lors de l'inflammation.

Les macrophages tissulaires dérivent du réservoir monocyttaire sanguin au niveau de la plupart des organes dans un contexte inflammatoire. Toutefois, il a été montré que les macrophages tissulaires résidents à l'état basal peuvent, dans certains organes, se renouveler d'eux-mêmes, par leur prolifération locale indépendamment du recrutement monocyttaire, comme c'est le cas pour les macrophages alvéolaires (Tarling *et al*, 1987; Jenkins *et al*, 2011).

Les macrophages présentent différentes morphologies et acquièrent diverses compétences selon les organes, en lien avec leurs interactions avec les autres types cellulaires de leur environnement et la MEC (figure 27).



**Figure 27 : Système des phagocytes mononucléés**

Les macrophages participent à de nombreuses fonctions physiologiques et processus pathologiques. Ils exercent diverses fonctions dans le maintien de l'homéostasie du tissu, notamment à travers la clairance de cellules apoptotiques, la production de facteurs de croissance, le remodelage tissulaire, la réparation et la résolution de la réponse inflammatoire (Lawrence *et al*, 2002; Gilroy *et al*, 2004; Gordon, 2007).

Ils jouent un rôle dans la surveillance immunitaire; en tant que cellules présentatrices d'antigènes dégradés à leur surface cellulaire via l'expression des molécules HLA de classe II, ils initient la réponse immunitaire acquise des lymphocytes T (Jung *et al*, 2002).

Ce sont des cellules « scavenger » par leur fonction de phagocytose, des cellules immunitaires de lutte anti-infectieuse par libération d'agents bactéricides, et des cellules sources de nombreuses substances dont la sécrétion est souvent inductible par divers stimuli. Parmi ces substances, on trouve des cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-10, IL-12...), des chimiokines (MCP-1), des facteurs de croissance (G-CSF, GM-CSF, M-CSF...), des substances cytotoxiques dérivées de l'oxygène, des prostaglandines et leucotriènes (éicosanoïdes), des protéases (élastase, MMP...), du collagène, de la fibronectine et du FT, cette liste n'étant pas exhaustive.

#### III.1.4. Hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des macrophages

Diverses publications rendent compte de la diversité phénotypique et fonctionnelle des macrophages en réponse à des signaux du microenvironnement (Gordon, 2003; Mills *et al*, 2000). En effet, différents sous-types de macrophages ont été décrits, sur la base de l'expression différentielle de marqueurs membranaires, de la production de facteurs spécifiques et de fonctions biologiques. Ces sous-types sont précisés ci-dessous.

### **III.2. Macrophages et plaques d'athérosclérose**

Les monocytes/macrophages sont l'une des principales cellules inflammatoires impliquées dans les différentes étapes du développement des lésions athéroscléreuses, de l'initiation, à la progression vers la rupture de la plaque. Le recrutement des monocytes, leur infiltration dans l'espace sous-endothélial de l'*intima* des artères et leur différenciation en macrophages puis en cellules spumeuses sont considérés comme les premières étapes clés de l'athérogenèse, comme en témoigne la richesse en macrophages des plaques athéroscléreuses humaines et l'absence quasi-totale de lésions athéroscléreuses chez les souris ApoE $^{-/-}$  (modèle murin d'athérosclérose) déficientes en M-CSF, dépourvues de monocytes circulants (Smith *et al*, 1995).

#### III.2.1. Répertoire membranaire et sécrétoire des macrophages

Le répertoire membranaire et sécrétoire des macrophages peut expliquer leurs rôles et leurs implications dans le développement de la plaque athéroscléreuse (figure 28).

Les macrophages présentent à leur surface membranaire différents récepteurs impliqués dans diverses voies métaboliques :

- des « Toll like receptor » (TLR) impliqués dans la reconnaissance de pathogènes et donc dans la défense de l'hôte contre les microorganismes mais aussi dans le processus d'athérogenèse. Le rôle de TLR2 et TLR4 a été largement étudié dans l'athérosclérose (Edfeldt *et al*, 2002). L'expression macrophagique du TLR4 a été mise en évidence dans les lésions athéroscléreuses humaines et est accrue par les LDLox (Xu *et al*, 2001). Ce récepteur sert de médiateur aux voies de signalisation intracellulaire induisant l'expression de cytokines inflammatoires, de protéases et de molécules cytotoxiques dérivées de l'oxygène via l'activation de NFκB (Li and Sun, 2007). Par ailleurs, l'inactivation du TLR9 dans un modèle murin d'athérosclérose réduit la vulnérabilité des plaques (Ma *et al*, 2015).

- des récepteurs dit « scavenger » tels que le CD36 et le SR-A impliqués dans la phagocytose et l'élimination des cellules apoptotiques. Grâce à ces récepteurs, les macrophages sont capables de capter et d'internaliser massivement les LDL oxydées accumulées dans l'espace sous-endothélial, et de se transformer ensuite en cellules spumeuses. Ces récepteurs ne sont pas sous le contrôle du contenu intracellulaire en cholestérol (Steinberg, 2002).

Les macrophages produisent et sécrètent une variété de molécules impliquées dans l'athérogenèse :

- des substances chimioattractantes telles que M-CSF et MCP-1 qui favorisent le recrutement d'autres monocytes et de cellules inflammatoires dans la plaque,

- des facteurs de croissance tels que GM-CSF et M-CSF fortement surexprimés dans les plaques athéroscléreuses humaines et qui jouent un rôle important dans le développement, la prolifération et la survie des macrophages (Clinton *et al*, 1992; Smith *et al*, 1995).

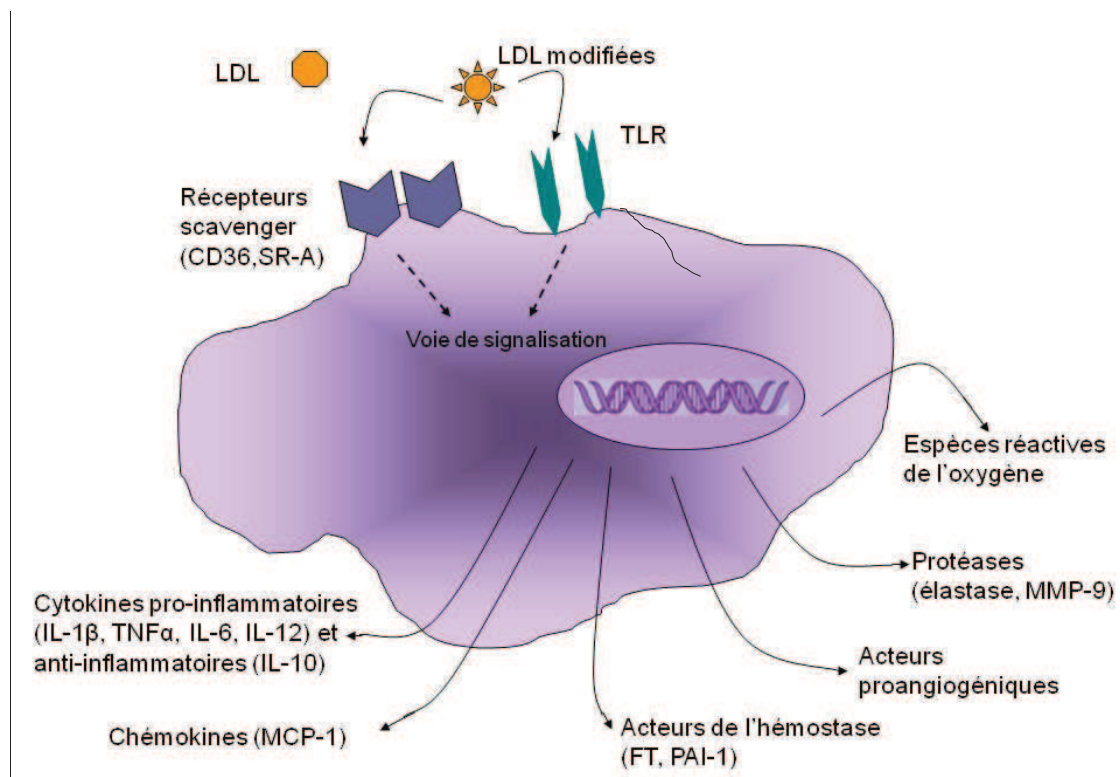
- un panel de cytokines qui régulent ou modulent l'inflammation, cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-6, TNFα) et anti-inflammatoires (IL-10, TGF-β) en fonction du stade pathologique. La réaction inflammatoire qui en résulte entraîne une activation locale des cellules vasculaires et des macrophages favorisant la croissance et la fragilisation des plaques.

- des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) attribuant aux macrophages un rôle important dans l'angiogenèse et la réparation tissulaire (Ramos *et al*, 1998).



- des acteurs de l'hémostase (FT ou l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1)). Principal initiateur de la voie extrinsèque de la coagulation, le FT se lie au facteur VII pour activer le facteur X et aboutir à la formation de thrombine (IIa), à partir de la prothrombine (facteur II). La thrombine convertira, ensuite, le fibrinogène, protéine soluble, en fibrine insoluble, principal composant du caillot sanguin (Mackman, 2004). La différenciation des monocytes en macrophages induit une augmentation de la synthèse et de la sécrétion de FT et donc de l'activité procoagulante de ces cellules (Meisel *et al*, 2002). Cette sécrétion est fortement amplifiée sous l'action d'endotoxines telles que le lipopolysaccharide (LPS). L'activité biologique du FT est régulée par les Tissue Factor Pathway Inhibitor, TFPI et TFPI-2. Outre ses propriétés coagulantes, le FT participe aux phénomènes d'inflammation, de migration, de prolifération cellulaire et d'angiogenèse très présents au sein de la lésion (Pyo *et al*, 2004). Enfin, les macrophages libèrent du PAI-1, principal inhibiteur des activateurs du plasminogène, le t-PA (activateur tissulaire du plasminogène) et l'urokinase (u-PA), impliqués dans la fibrinolyse, processus de lyse de la fibrine.

- des protéases telles que les MMP et élastase impliquées dans la dégradation de la MEC et donc l'instabilité des lésions athérosclérotiques (Newby, 2008).



**Figure 28 : Répertoire membranaire et sécrétoire du macrophage dans l'athérosclérose**

### III.2.2. Différenciation des monocytes/macrophages et polarisation dans l'athérosclérose

La plaque athéroscléreuse est caractérisée par une population hétérogène de macrophages, reflétant la complexité et la diversité du microenvironnement auxquels sont exposées les cellules après leur entrée dans la paroi artérielle (Wolfs *et al*, 2011). Après différenciation des monocytes en macrophages, ces derniers se polarisent et voient leur phénotype et leur fonction se modifier sous l'influence de cytokines et de facteurs de croissance différents. Plusieurs de ces phénotypes présents dans les lésions athéroscléreuses ont été décrits (Butcher and Galkina, 2012).

#### III.2.2.1. *Description et rôle des phénotypes conventionnels*

Les sous-types les plus « communs » et les plus largement étudiés sont les macrophages M1 et M2.

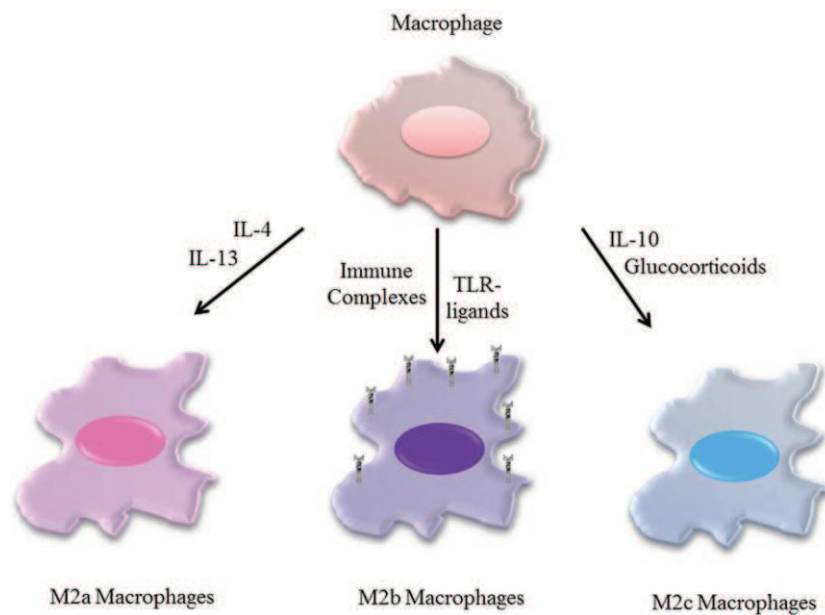
##### III.2.2.1.1. Les macrophages M1

Les macrophages dit « classiques » ou M1 sont induits par des cytokines de type Th1, telles que le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  ou encore l'interféron-gamma (IFN- $\gamma$ ) seul ou en association avec le LPS. Ces macrophages sont des cellules de l'immunité innée, effectrices de lutte contre les microorganismes et productrices des cytokines principalement pro-inflammatoires telles que le TNF $\alpha$ , l'IL-6, l'IL-1 $\beta$  et l'IL-12 (figure 31) (Mosser, 2003). Au sein de la plaque, l'accumulation des lipides et leur oxydation sont responsables de l'activation inflammatoire des macrophages (phénotype M1) (Dewell *et al*, 2010). L'activation continue de ces macrophages ne contribue pas à la résolution de l'état inflammatoire des lésions mais peut induire des dommages des tissus et altérer leur réparation. Les macrophages M1 favorisent la formation du core nécrotique et la déstabilisation de la plaque conduisant à des événements thrombotiques (Butcher and Galkina, 2012).

##### III.2.2.1.2. Les macrophages M2

Une seconde population de macrophages a été mise évidence pour la première fois *in vitro*, en 1992, par l'induction par l'IL-4 du récepteur au mannose (MR, CD206 ou MRC1) à la surface des macrophages (Stein *et al*, 1992). Ces macrophages sont aujourd'hui désignés sous le terme de macrophages « alternatifs » ou de type M2 et l'IL-13 a été décrite comme un autre inducteur

de cette sous-population de macrophages (figure 31). Trois sous-types de macrophages M2 ont été identifiés (M2a, M2b et M2c) en fonction des signaux inducteurs : l'IL-4 et l'IL-13 conduisent à l'activation des M2a, les immuns complexes en combinaison avec l'IL-1 $\beta$  ou le LPS aux M2b et l'IL-10, le TGF- $\beta$  ou les glucocorticoïdes induisent un phénotype M2c (figure 29) (Mantovani *et al*, 2004; Gordon and Taylor, 2005; Martinez *et al*, 2008; Mosser and Edwards, 2008).

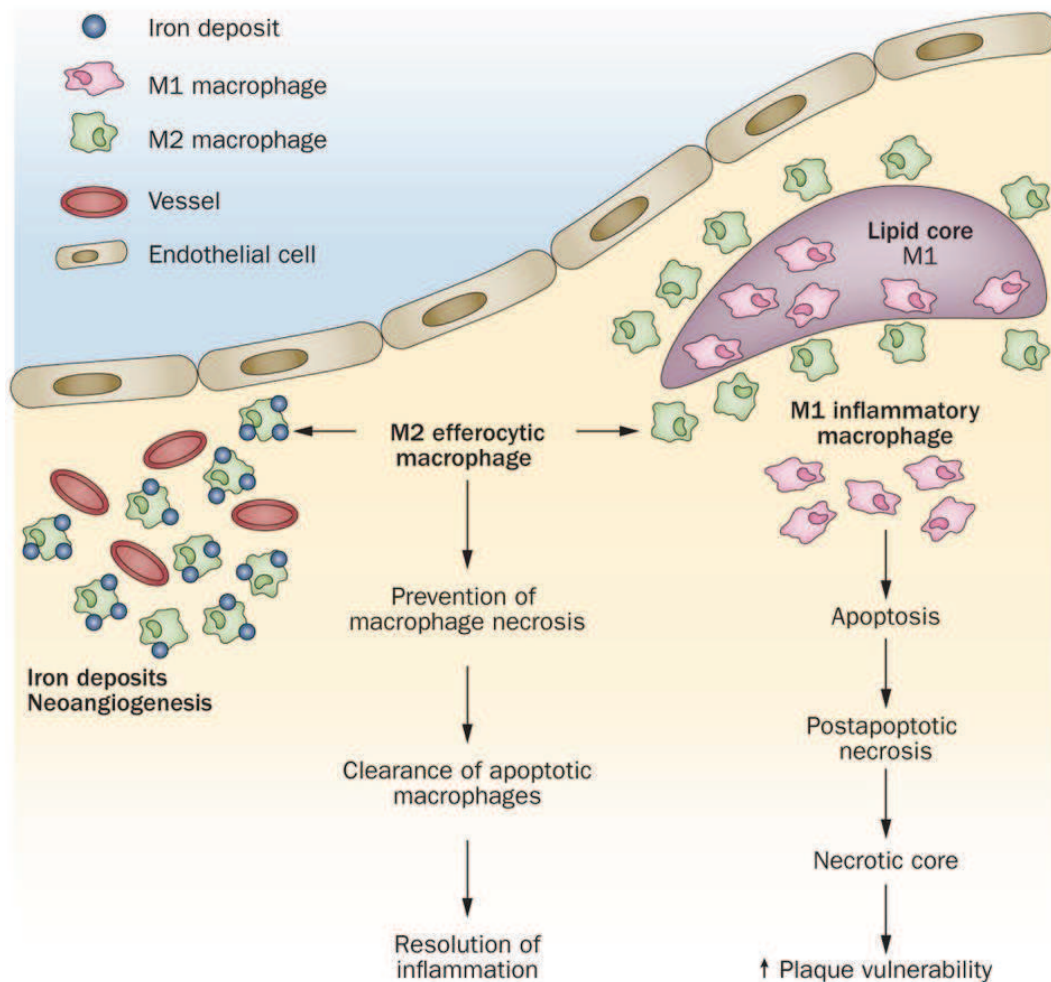


**Figure 29 : Trois sous-populations de macrophages M2 et leur stimuli respectifs, d'après (Obeid *et al*, 2013)**

Ces macrophages M2 modulent la progression de la maladie en atténuant la réponse inflammatoire via la sécrétion de facteurs anti-inflammatoires tels que l'IL-10 et l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 $\beta$  (IL-1Ra) (Mosser and Edwards, 2008). Ils sont également capables d'épurer les débris et les cellules apoptotiques (Zizzo *et al*, 2012). Ils contribuent à la résolution de l'inflammation en phagocytant les macrophages M1 en apoptose. En cas d'efférocytose insuffisante, les cellules mortes s'accumulent et forment le core nécrotique contribuant à l'instabilité/rupture de la plaque (figure 30).

Ces macrophages « alternatifs » produisent des protéines impliquées dans la synthèse de la MEC, dont la fibronectine, suggérant leur rôle dans le remodelage et la réparation tissulaire (Gratchev *et al*, 2001). Ces macrophages seraient également impliqués dans les processus angiogéniques (Jetten *et al*, 2014). Enfin, quelques études montrent qu'ils seraient associés à un effet athéroprotecteur puisqu'ils sont capables de libérer du TGF- $\beta$ , inhibant le recrutement des

cellules inflammatoires au sein de la lésion athéroscléreuse (Mallat *et al*, 2001) et jouant un rôle important dans le contenu en collagène de la plaque et donc dans sa stabilité (Jiang *et al*, 2004).



**Figure 30 : Rôle potentiel des macrophages M2 dans l'efferocytose au sein des plaques athéroscléreuses** (Chinetti-Gbaguidi *et al*, 2015)

Par ailleurs, Mosser et coll. proposent une autre classification des sous-types de macrophages basée sur les principales activités homéostatiques des macrophages : ils distinguent les macrophages impliqués dans la défense de l'hôte (correspondant aux M1), les macrophages de la réparation tissulaire (se référant aux macrophages M2a) et les macrophages régulateurs de l'immunité (compatibles avec les phénotypes M2b/c) (Mosser and Edwards, 2008).

Notons également que les monocytes/macrophages différenciés, respectivement, en présence de GM-CSF ou de M-CSF, affichent des propriétés fonctionnelles similaires au phénotype M1 et M2 (Waldo *et al*, 2008).

L'expression différentielle de marqueurs spécifiques permet de distinguer ces 2 sous-types de macrophages. MCP-1 est typiquement associé à la polarisation M1 et concernant les marqueurs M2, la forte expression membranaire du récepteur au Mannose (MR/MRC1 ou CD206) et d'autres récepteurs « scavenger », la sécrétion d'IL-1Ra et d'IL-10 et la production de chimiokines dont AMAC-1 ont été décrites (Mantovani *et al*, 2004).

Par ailleurs, en 2005, la plasticité des macrophages a été décrite pour la première fois. En effet, en fonction de signaux spécifiques, les macrophages peuvent passer d'un phénotype M1 vers un phénotype M2 et vice-versa (Porcheray *et al*, 2005). Ce concept de plasticité a été investigué plus récemment dans un modèle d'athérosclérose expérimentale chez la souris (Khallou-Laschet *et al*, 2010) et soulève beaucoup d'intérêt ces dernières années. Dans cette dernière étude, les auteurs observent que les macrophages M2 prédominent dans les lésions précoces alors que les lésions avancées sont riches en macrophages M1, ils démontrent *in vitro* le renversement complet de phénotype en réponse à l'addition séquentielle d'IFN $\gamma$  et d'IL-4, et vice versa.

#### III.2.2.2. *Autres phénotypes de macrophages*

L'environnement cytokinique local peut orienter la polarisation et la plasticité des macrophages (Wolfs *et al*, 2011). Outre les sous-populations de macrophages M1 et M2 conventionnels, d'autres phénotypes de macrophages spécifiques et distincts induits par l'environnement particulier, hétérogène et complexe de la plaque d'athérosclérose, ont été récemment observés.

##### III.2.2.2.1. Les macrophages Mox

Récemment, les phospholipides oxydés ont été décrits comme inducteur d'un nouveau phénotype de macrophages, les Mox, dont la polarisation est médiée par le facteur de transcription Nrf2 (figure 31). Ces macrophages présentent de faibles capacités de chimiotactisme et de phagocytose et un pouvoir anti-oxydant important. Ils contribueraient à la régulation du statut rédox de la plaque (Kadl *et al*, 2010). Ils représentent environ 30% des macrophages infiltrés dans les lésions athéroscléreuses chez la souris mais n'ont pas encore été rapportés dans les lésions humaines (Kadl *et al*, 2010). Par ailleurs, ces macrophages Mox sont

générés *in vitro* à partir des macrophages M1 et M2 complètement différenciées, apportant une preuve supplémentaire de la plasticité des macrophages dans certaines conditions expérimentales.

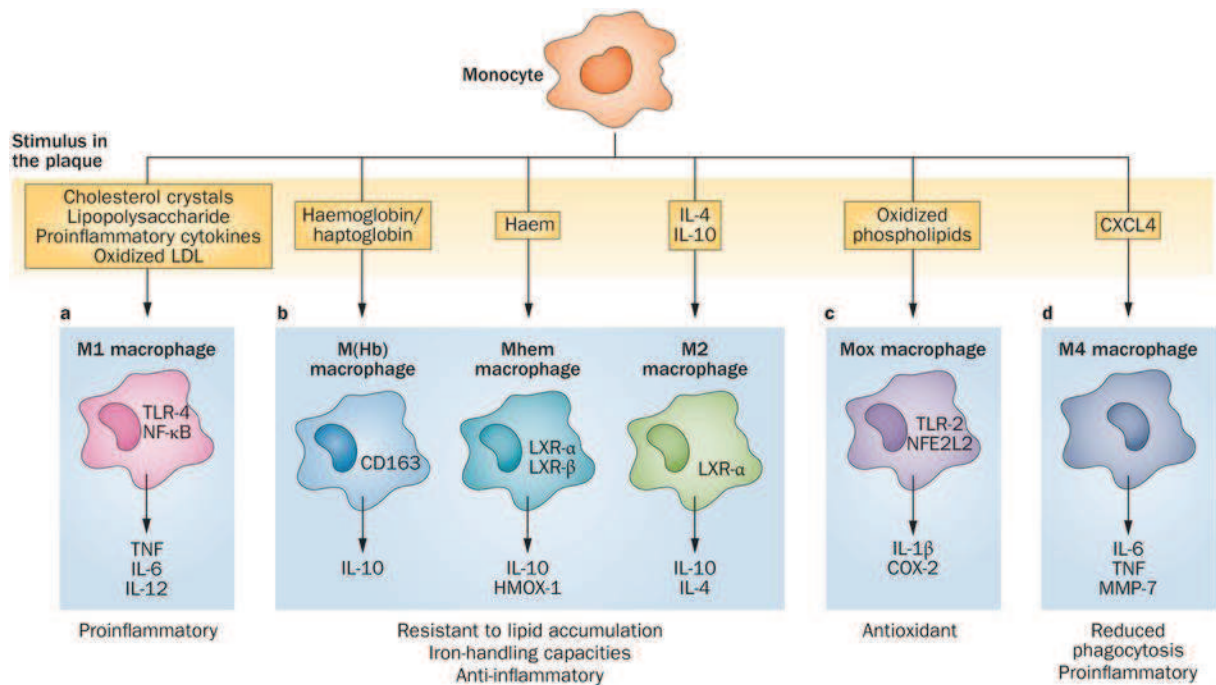
#### III.2.2.2.2. Les macrophages M(Hb) et Mhem

Ces 2 autres sous-types macrophagiques ont été décrits dans les zones hémorragiques des lésions athéroscléreuses humaines instables (Finn *et al*, 2012; Boyle *et al*, 2009; Boyle *et al*, 2012). Les auteurs les définissent comme un sous-type antioxydant et athéroprotecteur « M2c-like ». Ils sont induits par le complexe hémoglobine/haptoglobine (Hb/Hp) et/ou par l'hème directement. Ils participent via le CD163, récepteur scavenger du complexe Hb/Hp, à la clairance de l'hémoglobine libérée lors d'hémorragies intraplaques. Les M(Hb) expriment le MR et ont la capacité à réguler le contenu intracellulaire en lipides via l'induction de transporteurs impliqués dans l'efflux de cholestérol (Finn *et al*, 2012). Bories et coll. ont démontré *in vivo* la présence dans les lésions athéroscléreuses humaines d'une sous-population de M2 (CD68+MR+) colocalisée avec les dépôts de fer et *in vitro* leurs capacités à détecter la teneur intracellulaire en fer et d'adapter leur profil génique en conséquence (Bories *et al*, 2013). De plus, ces macrophages possèdent des propriétés de phagocytose accrue aussi bien pour les érythrocytes sénescents que pour les cellules apoptotiques (Chinetti-Gbaguidi *et al*, 2011). Les Mhem expriment par ailleurs l'hème oxygénase, impliquée dans le catabolisme de l'hème et participent aussi à l'érythrophagocytose. Ces sous-types de macrophages sont ainsi athéroprotecteurs : ils résistent à l'accumulation lipidique et à la transformation en cellules spumeuses et constituent la première ligne de défense contre les dommages induits par les érythrocytes sénescents et le fer. Aujourd'hui, la probable coexistence de ces sous-populations dans les zones de néovascularisation/hémorragies dans les plaques humaines ou l'existence de différents stades d'un même phénotype ne sont pas encore bien élucidées (figure 31).

#### III.2.2.2.3. Les macrophages M4

Très récemment, le phénotype M4 a été décrit chez l'homme par Gleissener et coll. Ces macrophages sont induits par le CXCL4 plaquettaire, chimiokine CXC Ligand 4, appelée également PF4 (Platelet Factor 4) et abondamment exprimée dans les macrophages et l'endothélium néovasculaire des plaques d'athérosclérose (Pitsilos *et al*, 2003; Gleissner and Ley, 2007). Ils se caractérisent par un transcriptome unique, distinct de celui des M1 ou des M2, ils possèdent un profil cytokinique proche des M1 mais ont perdu la capacité de phagocytose,

ils n'expriment pas le CD163 (Gleissner *et al*, 2010; Gleissner *et al*, 2009) (figure 31). Ces macrophages M4 ont été observés dans les plaques athéroscléreuses humaines (cellules MMP7+/S100A8) (Erbel *et al*, 2015a). La présence de macrophages M4 est associée à des indices d'instabilité de plaques et est plus importante chez les patients atteints de coronaropathie sévère (Erbel *et al*, 2015b). Contrairement aux autres phénotypes, la polarisation vers un phénotype M4 semble être irréversible (Gleissner *et al*, 2010). Bien que les fonctions des macrophages M4 restent mal comprises, les données accumulées à ce jour supposent un rôle possible de ce sous-type macrophagique dans l'athérogenèse (Gleissner, 2012).



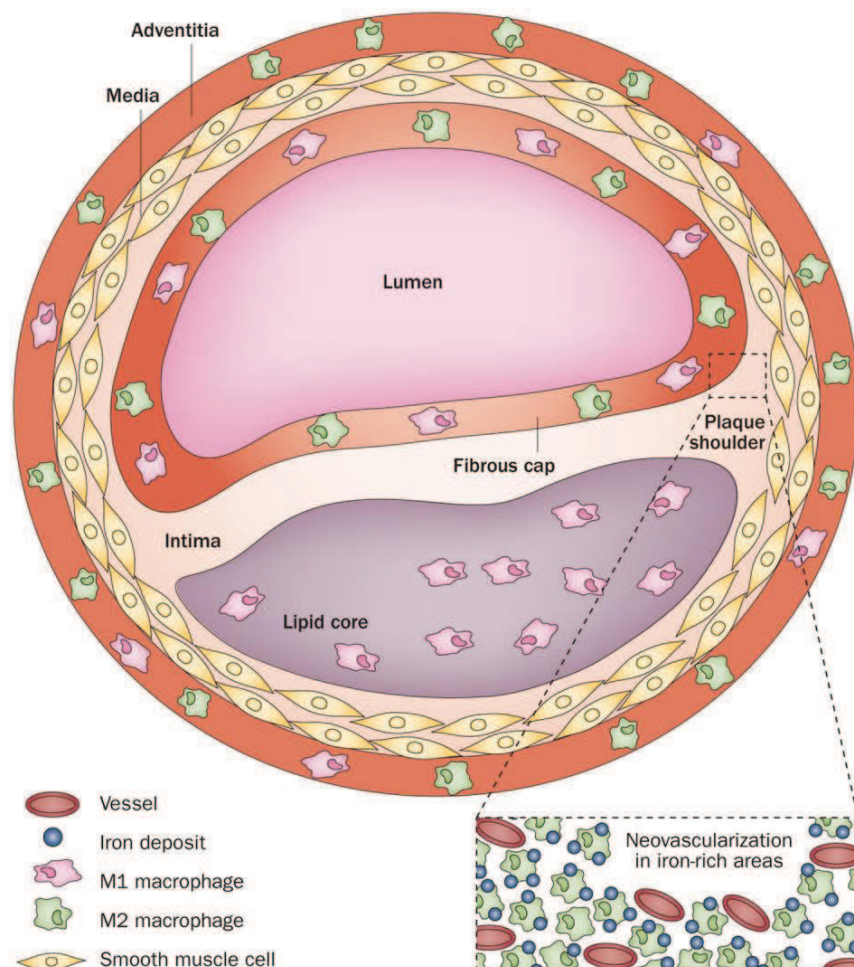
**Figure 31 : Diversité fonctionnelle et phénotypique des macrophages : Principaux sous-types de macrophages présents dans les lésions athéroscléreuses humaines (Chinetti-Gbaguidi *et al*, 2015)**

Il semblerait qu'il s'agisse d'un continuum de phénotypes de macrophages avec des fonctions biologiques distinctes.

### III.2.3. Distribution des macrophages M1/M2 au sein des lésions athéroscléreuses

#### III.2.3.1. *Distribution spatiale*

Bouhleb et coll. ont décrit pour la première fois en 2007, la coexistence des macrophages M1/M2 dans les lésions athéroscléreuses carotidiennes (Bouhleb *et al*, 2007). L'analyse histologique des plaques athéroscléreuses humaines a révélé une distribution spatiale distincte des sous-populations de macrophages dans les plaques humaines (Chinetti-Gbaguidi *et al*, 2011). Les macrophages M1 se trouvent principalement dans les zones d'épaule de la plaque considérée comme l'une des zones les plus fragiles de la plaque et près du noyau lipidique alors que les macrophages M2 sont localisés dans l'adventice, dans les zones stables proches de la chape fibreuse et dans les zones de néovascularisation qui contiennent également les dépôts de fer (Stoger *et al*, 2012; Bories *et al*, 2013). Stoger et coll. ont précisé la répartition similaire des macrophages M1/M2 dans la chape fibreuse (figure 32).



**Figure 32 : Localisation des sous-types de macrophages dans les lésions athéroscléreuses humaines (Chinetti-Gbaguidi *et al*, 2015)**



### III.2.3.2. *Distribution selon la sévérité des lésions*

Ces 2 sous-types de macrophages s'accumulent progressivement avec la sévérité des lésions (Stoger *et al*, 2012).

Récemment, un lien entre la polarité des macrophages dans les plaques athéroscléreuses humaines et l'incidence d'évènements CV a été établi. Le phénotype des macrophages a été analysé et comparé dans les plaques carotidiennes de patients symptomatiques ayant présenté un accident ischémique cérébral aigu par rapport à des patients asymptomatiques (Cho *et al*, 2013). La majorité des macrophages observés dans les plaques instables des sujets symptomatiques présentent un phénotype M1 alors que les plaques asymptomatiques contiennent principalement des macrophages M2 (Cho *et al*, 2013; Shalhoub *et al*, 2010; Shaikh *et al*, 2012) Parallèlement, les lésions athéroscléreuses coronariennes chez des patients ayant présenté un IDM aigu, résultant généralement de l'inflammation et de la rupture de la plaque, sont enrichies en macrophages M1 (Lee *et al*, 2013) Ces données suggèrent que l'instabilité de la plaque peut être la conséquence d'un déséquilibre entre le phénotype M1 et M2.

Par ailleurs, l'infiltration macrophagique dans le tissu adipeux sous épiqueur est plus importante chez les patients présentant une coronaropathie et le ratio M1/M2 dans ce tissu est positivement corrélé à la sévérité de la maladie (Hirata *et al*, 2011).

L'expression de marqueurs spécifiques de sous-populations macrophagiques dans des zones distinctes de la plaque humaine et selon les stades des lésions ne permet pas d'affirmer un recrutement spatio-temporel séquentiel des sous-types de monocytes/macrophages ou un switch phénotypique selon le microenvironnement local de la plaque. Récemment la plasticité des macrophages résidents a été rapportée chez la souris. Les auteurs décrivent d'une part, la prédominance de macrophages M2 dans les lésions précoces alors que les lésions avancées sont riches en macrophages M1 et d'autre part, une coexpression de marqueurs M1 et M2 chez certains macrophages dans les lésions avancées suggérant un switch phénotypique induit par le microenvironnement de la plaque (Khallou-Laschet *et al*, 2010). Chez l'homme, nous manquons de preuves à l'appui d'un tel commutateur phénotypique.

De même, dans le modèle murin Reversa (*Ldlr*<sup>-/-</sup>*ApoB*<sup>100/100</sup>*Mtpr*<sup>fl/fl</sup>*Mx1Cre*<sup>+/+</sup>), l'induction de la régression de la plaque entraîne des modifications de la composition intra-plaque (diminution du contenu lipidique et macrophagique) et de l'équilibre M1/M2. En effet, les macrophages

CD68+ issus des plaques en régression sont caractérisés par une augmentation d'expression de gènes associés au phénotype anti-inflammatoire M2 en lien avec une stabilité de plaque (Feig *et al*, 2011; Feig *et al*, 2012).

### **III.3. Macrophages et lésions valvulaires**

L'infiltration de cellules inflammatoires telles que les macrophages a été décrite comme abondante dans les valves aortiques sténosées et calcifiées par rapport aux valves aortiques humaines normales qui contiennent peu de macrophages (Kaden *et al*, 2005a; Helske *et al*, 2007; Mohler *et al*, 2001; Otto *et al*, 1994; Steiner *et al*, 2012).

La densité macrophagique observée dans les valves aortiques bicuspidées, prédisposées à une calcification précoce, est plus importante que dans les valves tricuspides (Moreno *et al*, 2011). Ces zones d'infiltration de cellules inflammatoires sont associées à l'expression de cytokines pro-inflammatoires impliquées dans la SVA telles que le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  (Yu *et al*, 2011).

Cet infiltrat inflammatoire dans les valves aortiques pathologiques serait associé à la progression de la sténose et au degré de calcification de la valve (Cote *et al*, 2013; Nagy *et al*, 2011; Hjortnaes *et al*, 2010).

Les macrophages libèrent également des MMP impliquées dans la dégradation du collagène et de l'élastine et donc dans le remodelage pathologique de la MEC, compromettant l'intégrité de la valve et favorisant l'expansion des nodules de calcifications.

Concernant les monocytes dont dérivent les macrophages, une augmentation des monocytes activés CD11b+ circulants a été observée chez les patients avec une sténose aortique sévère (Diehl *et al*, 2008). En revanche, une étude récente décrit, quant à elle, une corrélation négative entre le taux de monocytes circulants et la sévérité de la pathologie selon des critères échographiques (Schwartzberg *et al*, 2013). Les auteurs suggèrent donc un chimiotactisme des monocytes auto-entretenu dans la lésion valvulaire contribuant à la progression de celle-ci.

Enfin, l'hétérogénéité phénotypique des macrophages est très peu décrite dans la SVA. La présence de macrophages M2 dans les valves aortiques sténosées calcifiantes a été décrite pour la première fois en 2012 (Kapusta *et al*, 2012). En 2014, Wang *et al*., observent un déséquilibre M1/M2 plus important dans les valves bicuspidées sans préciser leur rôle exact (Wang *et al*, 2014).

## OBJECTIFS DE LA THESE

Les processus physiopathologiques impliqués dans l'athérosclérose vasculaire et la sténose valvulaire aortique partagent de fortes similitudes : l'infiltration de cellules inflammatoires et de dépôts lipidiques, la néoangiogenèse, le processus fibrotique avec un remodelage de la MEC et la calcification.

Le monocyte/macrophage joue un rôle clé dans l'apparition des lésions athéroscléreuses vasculaires et leur devenir. Les sous-populations de macrophages M1 et M2 ont été décrites dans les plaques d'athérosclérose humaines. Hormis des études sur leurs rôles dans le contrôle de l'inflammation, le métabolisme du cholestérol et du fer, leurs fonctions respectives sur la coagulation et le remodelage vasculaire ne sont pas encore bien définies. Notre hypothèse est que les différentes sous-populations de macrophages, observées dans les lésions athéroscléreuses, présentent, selon leur polarisation, des effets pro- et/ou anti-athérogènes, qui modulent le devenir des plaques et la survenue d'événements CV. Par ailleurs, la progression des lésions athéroscléreuses vers des formes compliquées dépend des facteurs de risque CV dont le diabète de type 2. En effet, les sujets diabétiques présentent un risque plus élevé de morbi-mortalité CV, en lien avec des plaques d'athérosclérose plus étendues et plus vulnérables (large infiltrat macrophagique) chez ces patients. L'objectif de cette première partie est de mieux comprendre le rôle respectif de ces macrophages dans la fragilité de la plaque athéroscléreuse et le lien avec le diabète.

Après avoir analysé les niveaux d'expression des divers acteurs de l'athérogenèse dans des plaques carotidiennes et les avoir corrélés à la symptomatologie clinique, nous avons analysé *in vitro* le niveau d'expression et/ou de sécrétion de différents médiateurs impliqués dans la physiopathologie de l'athérosclérose au sein des 2 sous-populations macrophagiques M1 et M2 dérivés des monocytes sanguins (MDM) isolés de patients athéroscléreux ainsi que leur capacité procoagulante afin de mieux les caractériser et d'étudier l'impact du diabète sur la polarisation et le profil d'expression des macrophages M1 et M2. D'un point de vue histologique, nous avons évalué, dans les plaques carotidiennes de ces patients, l'infiltration des macrophages M1/M2 et certains processus de l'athérogenèse notamment l'angiogenèse.

Les polynucléaires neutrophiles (PNN), principal acteur de l'inflammation ont également été décrits au sein des plaques athéroscléreuses humaines. Plusieurs études suggèrent leur rôle dans l'initiation de l'athérosclérose, de par leur dégranulation et leurs sécrétions, ils favoriseraient le rolling et le recrutement des monocytes ainsi que le microenvironnement proathérogénique. Peu

d'études existent sur le rôle potentiel des PNN, producteurs de cytokines, dans la modulation phénotypique des macrophages chez l'homme.

Enfin, les macrophages sont très peu décrits dans la SVA, pathologie « atherosclerotic-like ». A ce jour, 2 études ont décrit la présence de macrophages M2 et/ou M1 dans les lésions valvulaires sans préciser leur rôle exact. Nous émettons l'hypothèse qu'en miroir des lésions athéroscléreuses, il existe, au sein des lésions valvulaires sténosées, différentes sous-populations de macrophages modulant le devenir de la lésion et que les macrophages sont capables d'acquérir des compétences différentes en lien avec leurs interactions avec les VIC, principal type cellulaire de la valve.

L'objectif de cette dernière partie est de caractériser le rôle des macrophages M1/M2 dans le processus physiopathologique de fibrose impliqué dans le développement de la pathologie valvulaire aortique, en étudiant la coopération macrophage/VIC. Après avoir caractérisé les sous-populations M1/M2 dans les valves aortiques humaines par analyse immunohistologique, nous avons comparé l'expression de médiateurs de la fibrose dans les macrophages M1/M2 après différenciation et culture *in vitro* des macrophages en présence ou non de milieu conditionné de VIC.

Intervenir pour diminuer la production de ces médiateurs nuisibles est donc une approche rationnelle à de nouvelles thérapies et motive les efforts pour comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans ces pathologies fréquentes.

## TRAVAUX DE RECHERCHE - PUBLICATIONS

# I. Macrophages M1/M2 et athérosclérose vasculaire

## I.1. Macrophages M1/M2 dans les plaques carotidiennes et lien avec la symptomatologie clinique

### I.1.1. Introduction

La fréquence et l'intensité des événements CV sont dépendantes de la composition de la plaque athéroscléreuse et de sa fragilité. Les macrophages, cellules inflammatoires infiltrées dans les lésions athéroscléreuses, jouent un rôle clé sur la croissance et la vulnérabilité de ces plaques via la libération de nombreux médiateurs impliqués dans l'athérogenèse. Deux sous-populations principales de macrophages, les M1 dits « classiques » pro-inflammatoires et les M2 dits « alternatifs » anti-inflammatoires, ont été identifiées dans les plaques d'athérosclérose humaines (Mosser, 2003; Stein *et al*, 1992; Bouhlef *et al*, 2007). Alors que ces 2 sous-populations macrophagiques ont fait l'objet de nombreuses études, leur rôle dans l'apparition et le devenir des plaques athéroscléreuses reste encore à définir précisément. Par ailleurs, la relation entre la polarisation des macrophages M1/M2 infiltrés dans les plaques et la symptomatologie clinique associée à la présence de ces macrophages reste à élucider.

### I.1.2. Matériel et méthodes

#### I.1.2.1. *Cohorte de patients*

Cette partie du travail a concerné des patients athéroscléreux pris en charge par les services de Chirurgie Vasculaire et de Chirurgie Cardiaque du CHRU de Lille pour bénéficier d'une endartériectomie carotidienne et/ou d'un pontage aorto-coronaire et inclus dans le protocole OPAL (OPTimized management of Atherosclerosis in various Localizations) (CPP11-15 n°2010-A01401-38). Avant la chirurgie, les patients ont reçu les informations nécessaires portant sur l'étude et leur consentement écrit a été recueilli. Les principales données clinicobiologiques d'intérêt ont également été recueillies.

#### I.1.2.2. *Prélèvement et traitement des échantillons biologiques*

##### I.1.2.2.1. *Echantillons sanguins et dosages sériques*

Les échantillons sanguins ont été prélevés après le consentement du patient, le jour du geste opératoire, avant anesthésie et à jeun. Divers dosages biologiques ont été réalisés le jour même (glycémie à jeun) ou différés sur échantillons aliquotés et conservés à -80°C (CRP, hémoglobine glycosylée et insulinémie).

#### I.1.2.2.2. Pièces opératoires d'endartériectomie

Pour 12 patients inclus bénéficiant d'une endartériectomie, la pièce opératoire est divisée en 4 morceaux de taille similaire. Elle est d'abord divisée en « zone pathologique ou lésion athéroscléreuse » (correspondant au segment proche de la sténose et contenant une grande partie du noyau lipidique) et en « zone saine ou zone adjacente » (correspondant aux extrémités du segment). Chacune de ces zones est ensuite divisée en 2 parties : la première conservée en sérum physiologique, dédiée à l'extraction et au dosage protéique et la seconde conservée en RNAlater (Ambion, Royaume-Uni) pour l'extraction et la quantification des ARN. Immédiatement après l'endartériectomie, les échantillons prélevés sont partagés par les chirurgiens (Dr Azzaoui, Dr Juthier, Pr Haulon et Pr Vincentelli), répartis dans les tubes spécifiques, acheminés rapidement au laboratoire et immédiatement congelés à -80°C.

#### I.1.2.3. *Extraction des ARN à partir des broyats de plaques*

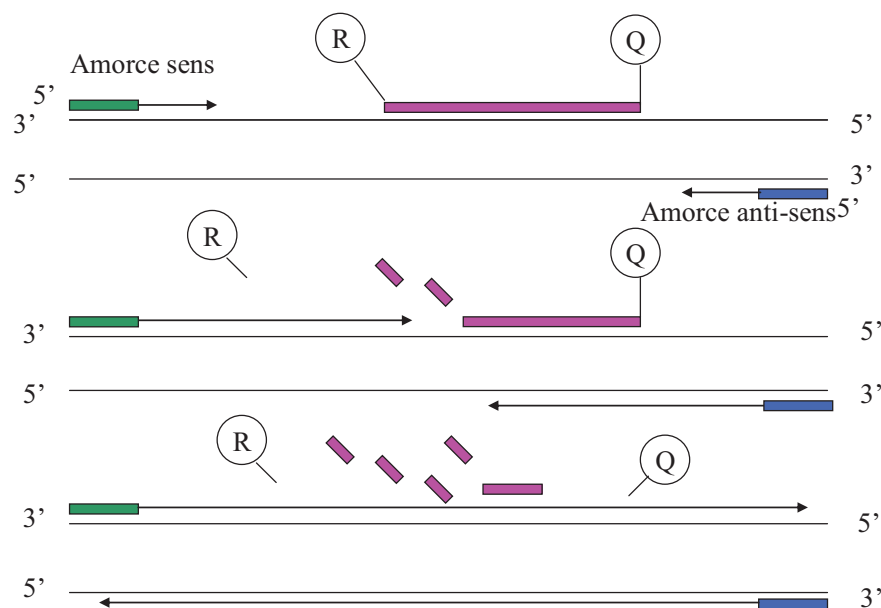
Cent milligrammes de tissu sont homogénéisés (Ultra-Turrax T25, Ika-Labortechnik, Staufen, Germany) dans 1 ml de solution de lyse TRI Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA), à 24000 rpm pendant 30 secondes dans la glace. Après addition de 200 µl de chloroforme et centrifugation (12000 g, 4°C, 15 min), la phase supérieure aqueuse contenant l'ARN est récupérée puis précipitée à l'isopropanol 75% (1 heure, -20°C) puis centrifugée (12000 g, 10 min, 4°C). L'ARN précipité est rincé avec de l'éthanol à 70%, centrifugé de nouveau (8000 g, 4°C, 5 min). Le culot d'ARN est séché puis dissout dans 12 µL d'eau stérile et 0,5 µL de Ribonucléase inhibitor (RNASE out, Life Technologies, USA) et conservé à -80°C.

#### I.1.2.4. *Quantification de transcrits par RT-PCR quantitative*

Les ADN complémentaires (ADNc) sont obtenus à partir des extraits d'ARN totaux par transcription inverse (coffret High Capacity cDNA, Applied Biosystems, Foster City, CA, Etats-Unis) selon les recommandations du fournisseur et sont conservés à -20°C.



La PCR TaqMan® quantitative est basée sur l'activité 5'→3' exonucléasique de l'enzyme Taq polymérase. La sonde TaqMan® est composée d'une séquence oligonucléotidique spécifique, couplée en 5' à un fluorophore (ou « reporter ») et en 3' à un suppresseur (ou « quencher ») qui inhibe l'émission du fluorophore lorsqu'il se trouve à proximité. La sonde, doublement marquée, donc non fluorescente, et les amorces spécifiques s'hybrident à une séquence cible. La sonde sera alors hydrolysée par l'enzyme Taq polymérase lors de l'élongation des amorces, ce qui libèrera le fluorophore et entrainera l'émission d'un signal de fluorescence à chaque cycle d'amplification. L'intensité du signal est alors le reflet direct de la quantité initiale d'ARN présente dans l'échantillon (figure 33).



**Figure 33 : Principe de la PCR quantitative réalisée par la technique TaqMan® (R: reporter, Q: quencher)**

Les sondes oligonucléotidiques des gènes d'intérêt ont été choisies pour qu'elles s'hybrident sur 2 exons successifs afin qu'il n'y ait pas d'amplification de l'ADN génomique (tableau IV).

L'automate TaqMan® (7900HT Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems) a été utilisé pour effectuer cette technique. Quatre microlitres de cDNA ont été ajoutés à 1 µl de mélange prêt à l'emploi contenant les amorces sens et anti-sens et la sonde TaqMan®, spécifiques du gène d'intérêt (Applied Biosystems), 10 µl de TaqMan Universal PCR Master Mix contenant le tampon MgCl<sub>2</sub>, l'enzyme Taq polymérase et les dNTP (Applied Biosystems)

et 5 µl d'eau stérile (volume final de 20 µl). Pour l'amplification, les étapes suivantes ont été réalisées : 2 minutes à 50°C puis 10 minutes à 95°C suivi de 50 cycles avec une étape de dénaturation (15 secondes à 95°C) puis une étape d'hybridation/élongation pendant 1 minute à 60°C. Les réactions de PCR ont été réalisées en duplicate et pour chaque échantillon, une moyenne des Ct a été calculée.

Pour s'affranchir de toute variabilité inter-séries et permettre de comparer les échantillons entre eux, un même échantillon patient (dit « calibrateur ») a été repris à chaque série. L'expression des différents transcrits a ensuite été normalisée par rapport à celle du gène de référence Abelson et un calcul par la méthode comparative des Ct a été effectué pour évaluer la quantification relative de l'expression des gènes. Ce calcul permet de comparer, à la fois pour le gène d'intérêt, et pour le gène de référence, les valeurs de Ct des échantillons des patients aux valeurs des Ct du calibrateur. Les résultats sont exprimés sous la forme :  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , avec  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{(échantillon)}} - \Delta Ct_{\text{(calibrateur)}}$ ,  $\Delta Ct_{\text{(échantillon)}}$  correspondant à la valeur du Ct pour chaque échantillon rapportée au gène de référence et le  $\Delta Ct_{\text{(calibrateur)}}$  correspondant à la valeur du Ct du calibrateur rapportée au gène de référence.

**Tableau IV : Liste des amorces et sondes utilisées**

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

#### I.1.2.5. *Exploitation statistique des données*

Les résultats sont présentés sous la forme de médiane (quartiles) pour les variables continues et de nombre (pourcentage) pour les variables catégorielles. Des tests statistiques non paramétriques : test de Wilcoxon pour les échantillons appariés, de Mann-Whitney pour les variables continues et de Kruskal-Wallis pour la comparaison de plusieurs groupes entre eux (> 2 groupes), ont été utilisés. Le calcul du coefficient de corrélation de Spearman a permis d'évaluer les corrélations entre variables continues. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Statview®, Version 4.5. Lorsque  $p < 0.05$ , les tests sont considérés comme statistiquement significatifs. Les graphiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism, Version 5.02 ou Excel 2007.

### I.1.3. Résultats

#### I.1.3.1. *Caractéristiques de la population*

Les données clinico-biologiques des patients inclus sont présentées dans le tableau V. Ces patients ayant bénéficié d'une endartériectomie carotidienne, ont un âge médian de 68,5 ans et présentent un sex ratio H/F de 1. Ils ont déjà présenté, pour la majorité d'entre eux, un évènement clinique d'ischémie cérébrale et présentent les principaux facteurs de risque CV (tableau V).

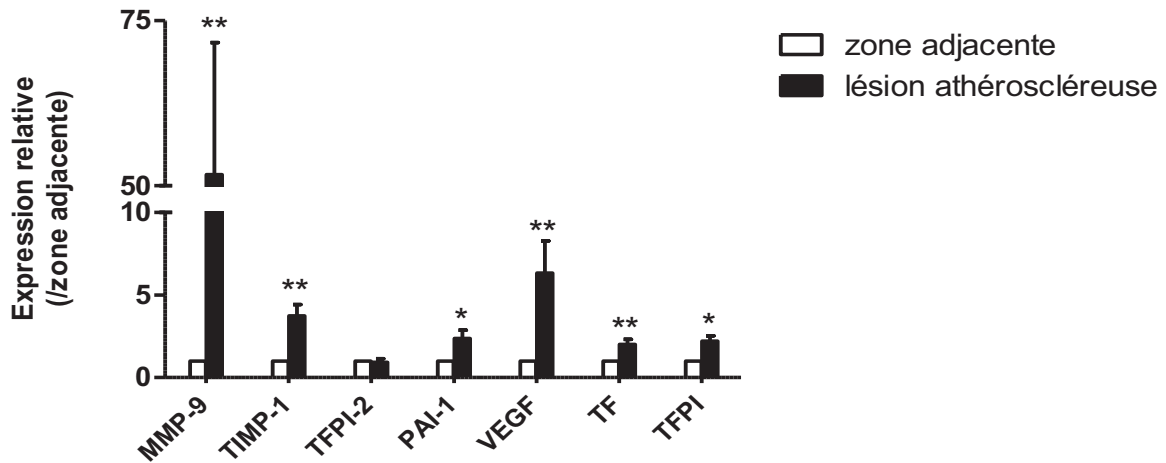
**Tableau V: Données clinico-biologiques des patients inclus dans le protocole OPAL et bénéficiant d'une endartériectomie**

	Patients (n=12)
<i>Données cliniques</i>	
Age (ans)	68,5 (57,5-75,5)
Sexe masculin	6 (50)
Antécédent d'infarctus du myocarde	4 (33)
Antécédent d'accident ischémique cérébral	9 (75)
% sténose carotidienne	70 (70-80)
Carotide opérée	
Carotide droite	5 (42)
Carotide gauche	7 (58)
Hypertension artérielle	10 (83)
Diabète	5 (42)
Tabagisme	6 (50)
Dyslipidémie	10 (83)
Indice de masse corporelle (kg/m <sup>2</sup> )	24,8 (24,1-26,9)
<i>Paramètres sanguins</i>	
Glycémie à jeun (g/L)	1,02 (0,93-2,05)
HbA1c (%)	6,0 (5,6-8,2)
Insulinémie (mUI/L)	9,6 (7,4-13,1)
HOMA-IR (mmol/L × μU/mL)	3,4 (1,4-5,4)
CRP (mg/L)	3,6 (3,2-6,1)

Les variables continues sont représentées en médiane (quartiles) et les variables catégorielles en nombre (%).

#### I.1.3.2. Expression génique des divers acteurs de l'athérogenèse dans les lésions athéroscléreuses

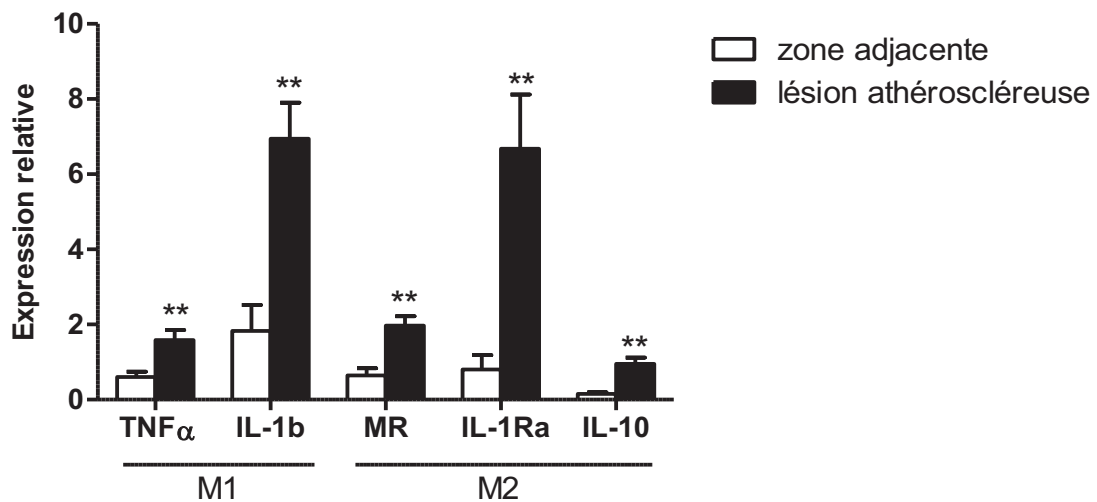
Les expressions géniques de divers médiateurs impliqués dans la physiopathologie de l'athérosclérose [protéines de remodelage tissulaire (MMP-9, TIMP-1, TFPI-2, PAI-1 et VEGF) et de coagulation (FT, TFPI et PAI-1)] et produites en partie par les macrophages sont significativement plus importantes dans les lésions athéroscléreuses par rapport aux zones adjacentes des plaques (figure 34).



**Figure 34 : Expression différentielle des médiateurs de l'athérosclérose entre la lésion athéroscléreuse et la zone adjacente des plaques.** Le taux d'expression des ARNm dans la zone adjacente a été fixée à 1 (n=12, \* : p<0,05 ; \*\* : p<0,01).

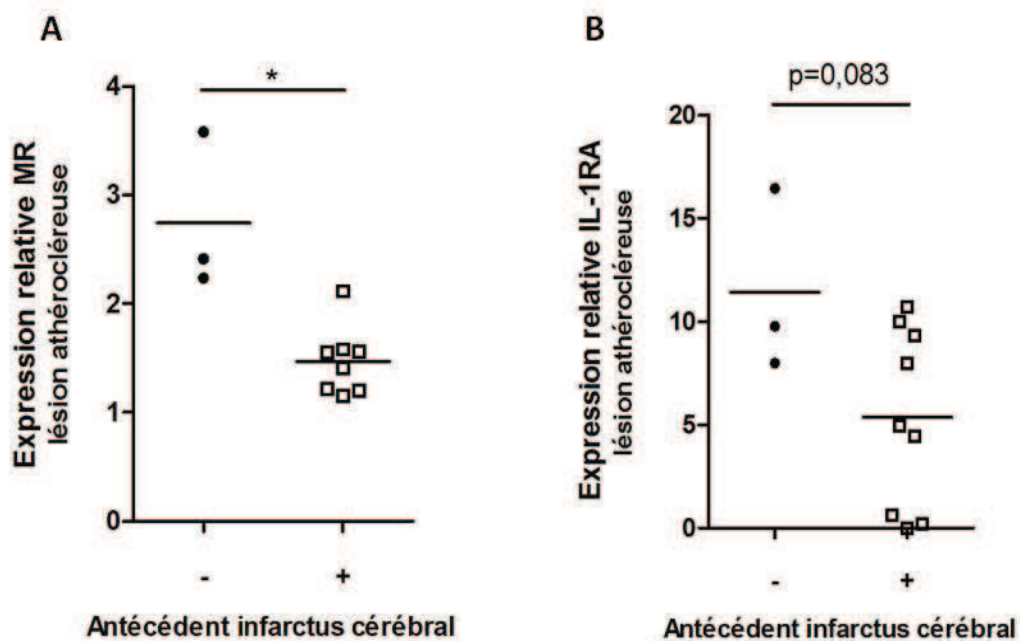
#### I.1.3.3. Relation entre la polarisation des macrophages M1/M2 et l'évolution clinique

Les marqueurs spécifiques des macrophages M1 et M2 sont surexprimés dans les plaques athéroscléreuses humaines de façon significative par rapport à la zone adjacente des lésions (figure 35).



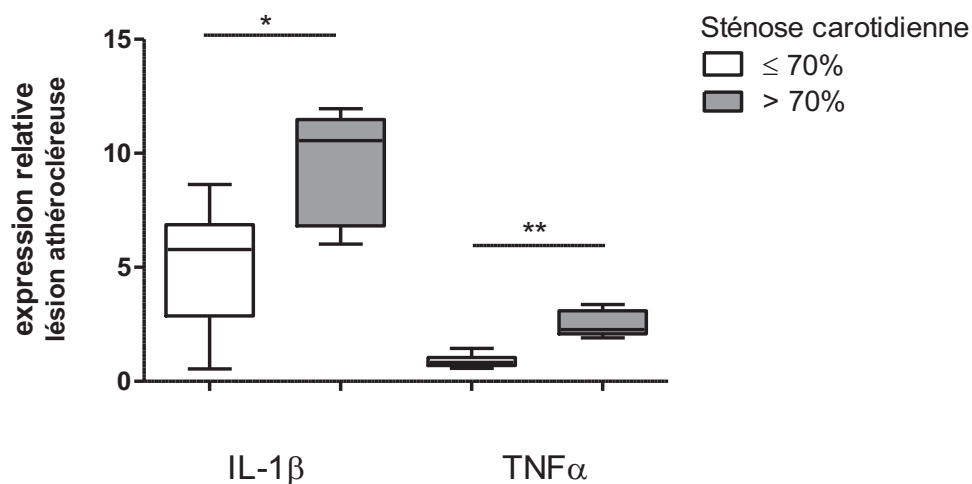
**Figure 35 : Expression génique différentielle des marqueurs M1 et M2 entre la lésion athéroscléreuse et la zone adjacente des plaques** (n=12, \*\* : p<0,01).

Lorsque l'on s'intéresse à la répartition des marqueurs M1/M2 dans la plaque selon la symptomatologie des patients, nous observons au sein de la lésion athéroscléreuse, une expression significativement diminuée du MR chez les patients ayant déjà présenté un AVC ou un accident ischémique transitoire (AIT) par rapport aux patients n'ayant aucun antécédent d'infarctus cérébral (figure 36-A). Concernant l'expression intraplaque de l'IL-1RA, autre marqueur M2, nous observons la même tendance ( $p=0,083$ ) (figure 36-B). Pour les autres marqueurs M1/M2, nous n'avons pas observé de différence d'expression selon les antécédents neurovasculaires des patients.



**Figure 36 : Expression du MR (A) et de l'IL-1RA (B) dans la lésion athéroscléreuse selon les antécédents neurovasculaires des patients (n=12, \* :  $p<0,05$ ). Le trait indique la moyenne.**

Nous avons alors étudié la corrélation entre la polarisation M1/M2 et la sévérité de la sténose carotidienne. Nous remarquons que les marqueurs M1 (IL-1 $\beta$  et TNF $\alpha$ ) au sein de la lésion athéroscléreuse sont significativement plus fortement exprimés chez les patients présentant une sténose carotidienne supérieure à 70% (correspondant à la médiane) avec des corrélations positives entre ces expressions et le degré de sténose, ce qui n'est pas le cas pour les marqueurs M2 (figure 37, tableau VI).

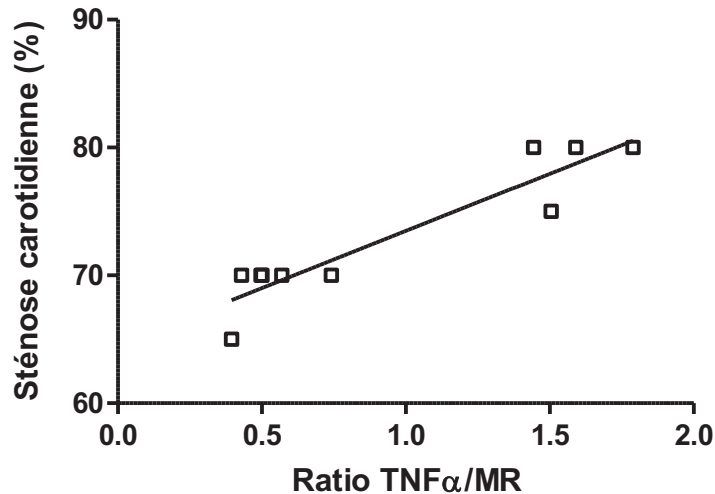


**Figure 37 : Expression de l'IL-1 $\beta$  et du TNF $\alpha$  dans la lésion athéroscléreuse selon la sténose carotidienne (n=12, \* : p<0,05 ; \*\* : p<0,01).**

**Tableau VI : Corrélation entre les marqueurs de caractérisation des macrophages M1 et M2 exprimés dans la lésion athéroscléreuse et le degré de sténose carotidienne (n=12), Corrélation de Spearman.**

Marqueurs M1/M2 dans la lésion athéroscléreuse	Coefficient de corrélation de Pearson	P
IL-1 $\beta$	0,545	<b>0,050</b>
TNF $\alpha$	0,664	<b>0,028</b>
MR	-0,028	0,926
IL-1Ra	0,371	0,220
IL-10	0,294	0,330

De plus, le ratio M1/M2 (TNF $\alpha$ /MR) dans la lésion athéroscléreuse est positivement corrélé à la sténose carotidienne (figure 38). Ces données suggèrent un lien entre la polarisation des macrophages infiltrés dans la lésion et l'évolution clinique des patients.



**Figure 38 : Corrélation entre le degré de la sténose carotidienne et le ratio TNF $\alpha$ /MR dans la lésion athéroscléreuse ( $r=0.818$ ,  $p=0.007$ ).**

Enfin, nous n'avons pas observé de lien entre l'expression des marqueurs de macrophages M1 et M2 dans les broyats de plaque et le statut diabétique des patients.

#### I.1.4. Discussion

Dans ce premier travail, nous constatons que les principaux médiateurs de l'athérosclérose sont plus fortement exprimés dans les lésions athéroscléreuses par rapport aux zones adjacentes des plaques de patients ayant subi une endartériectomie carotidienne. Nous confirmons également la surexpression des marqueurs de polarisation macrophagique M1/M2 dans ces zones (Bouhleb *et al*, 2007).

Nous montrons que l'expression des marqueurs M1/M2 semble être associée à la symptomatologie des patients. En effet, l'expression de marqueurs M2 dans les lésions athéroscléreuses est diminuée chez les patients ayant déjà présenté des complications vasculaires (AVC ou AIT) alors que l'expression des cytokines pro-inflammatoires (marqueurs M1) dans les lésions est plus importante chez les patients présentant une sténose carotidienne sévère. Par ailleurs, le ratio M1/M2 (TNF $\alpha$ /MR) dans la lésion athéroscléreuse est positivement corrélé à la sévérité de la sténose carotidienne. Ces résultats sont renforcés par 2 études récentes qui indiquent une relation positive entre le taux de cytokines pro-inflammatoires M1



dans les plaques et les manifestations CV associées (Shalhoub *et al*, 2010; Hirata *et al*, 2011). Ces résultats suggèrent que la polarisation des macrophages infiltrés dans la lésion pourrait influencer sur l'évolution clinique des patients en modulant l'athérogenèse dans les artères carotidiennes humaines.

Dans notre étude, la polarisation des macrophages dans la lésion carotidienne est orientée vers un état pro-inflammatoire (M1) chez les patients ayant déjà présenté des complications vasculaires et associé à une sténose carotidienne plus sévère. L'état inflammatoire des lésions conduit à l'aggravation de l'athérosclérose vasculaire (Tedgui and Mallat, 2006). Ainsi un renforcement local du profil M1 pourrait diminuer l'intégrité de la lésion et donc accroître la probabilité d'événements cliniques défavorables.

En conclusion, toutes ces données renforcent l'idée que les macrophages M1 sont préférentiellement liés à la progression de la plaque et aux complications thromboemboliques ultérieures. Mais les mécanismes impliqués dans l'évolution des plaques et le rôle respectif exact des macrophages M1/M2 dans l'apparition et le développement des lésions athéroscléreuses ne sont pas encore complètement établis.

## **I.2. L'analyse des profils protéolytique et angiogéniques des macrophages M1 et M2 de patients athéroscléreux révèle un profil distinct chez les sujets diabétiques**

Les macrophages, cellules inflammatoires infiltrées dans les lésions athéroscléreuses, jouent un rôle clé dans la croissance et la fragilité de ces plaques via la libération de nombreux médiateurs impliqués dans l'athérogenèse. Deux sous-populations majeures de macrophages, les M1 dits « classiques » pro-inflammatoires et les M2 dits « alternatifs » anti-inflammatoires, ont été identifiées dans les plaques d'athérosclérose humaines (Mosser, 2003; Stein *et al*, 1992; Bouhlef *et al*, 2007). Alors que ces 2 sous-populations macrophagiques ont été largement étudiées, leur rôle exact dans l'apparition et le devenir des lésions athéroscléreuses reste encore à définir précisément. Un des objectifs de ce travail consiste, dans une première partie, à mieux comprendre le rôle respectif de ces macrophages dans la fragilité de la plaque athéroscléreuse. Ainsi, le niveau d'expression, dans les macrophages M1 et M2, dérivés des monocytes circulants (MDM) isolés de patients athéroscléreux, a été évalué pour des médiateurs impliqués dans la physiopathologie de l'athérosclérose.

De plus, de nombreux facteurs de risque CV sont associés au développement de l'athérosclérose et influencent la progression des lésions athéroscléreuses vers des formes plus ou moins compliquées. Leur connaissance et leur prévention sont actuellement un enjeu de santé publique majeur. De nombreuses études ont identifiées les déterminants histomorphologiques de la vulnérabilité de la plaque (mince chape fibreuse, faible teneur en CML, important contenu en macrophages et core lipidique développé), en lien avec l'incidence des événements CV (Naghavi *et al*, 2003).

Le diabète de type 2 est associé à une progression plus rapide des lésions athéroscléreuses et à un risque plus élevé d'évènements CV récurrents (IDM, AVC et AOMI) (Haffner *et al*, 1998; Dale *et al*, 2008). Quelques études ont montré une corrélation entre la présence d'un diabète et les caractéristiques histologiques des plaques athéroscléreuses (Spagnoli *et al*, 1994; Mauriello *et al*, 2000). Plusieurs auteurs ont notamment décrit chez les patients diabétiques des plaques d'athérosclérose coronariennes plus étendues et plus fragiles caractérisées par un important noyau lipidique et un large infiltrat macrophagique, suggérant une plus grande vulnérabilité des lésions et expliquant un plus haut risque de morbi-mortalité CV chez ces patients (Moreno *et al*, 2000; Burke *et al*, 2004). De même, Hong et coll. ont montré la présence importante de

thrombi et de stigmates de rupture de plaque dans les lésions des patients diabétiques avec syndrome coronarien aigu (Hong *et al*, 2009).

Concernant les plaques carotidiennes, elles possèdent également plus de caractéristiques histologiques de plaques instables chez les sujets diabétiques par rapport aux non diabétiques. En effet, Matsumoto et coll. ont montré une association entre l'augmentation de l'épaisseur intima-media des artères carotidiennes et l'incidence des AVC ischémiques chez les patients diabétiques de type 2 (Matsumoto *et al*, 2002). De plus, les sujets diabétiques présentent des plaques hyperéchogènes, en lien avec un risque plus élevé d'événements CV chez ces patients (Ostling *et al*, 2007). Enfin, Olson et coll. ont décrit une néovascularisation accrue dans les plaques athéroscléreuses carotidiennes de ces patients (Olson *et al*, 2011).

Peu de données sont actuellement disponibles sur l'impact du diabète sur la polarisation des macrophages M1/M2. Nous avons donc étudié l'influence du diabète sur ces profils d'expression et une évaluation de l'infiltration des macrophages M1 et M2, de l'angiogenèse et de la densité des néovaisseaux dans les plaques carotidiennes de ces patients athéroscléreux a été réalisée par analyse histologique.

I.2.1. Article: L'analyse des profils protéolytique et angiogéniques des macrophages M1 et M2 de patients athéroscléreux révèle un profil distinct chez les sujets diabétiques - M1 and M2 macrophage proteolytic and angiogenic profiles analysis in atherosclerotic patients reveals a distinctive profile in type 2 diabetes

**Roma-Lavisse C**, Tagzirt M, Zawadzki C, Lorenzi R, Vincentelli A, Haulon S, Juthier F, Rauch A, Corseaux D, Staels B, Jude B, Van Belle E, Susen S, Chinetti-Gbaguidi G, Dupont A. *Diab Vasc Dis Res.* 2015; 12(4):279-289.

### **Abstract**

The present study aimed to investigate atherosclerotic mediators' expression levels in M1 and M2 macrophages and to focus on the influence of diabetes on M1/M2 profiles. Macrophages from 36 atherosclerotic patients (19 diabetics and 17 non-diabetics) were cultured with IL-1 $\beta$  or IL-4 to induce M1 or M2 phenotype, respectively. The atherosclerotic mediators' expression was evaluated by quantitative RT-PCR. The results showed that M1 and M2 macrophages differentially expressed mediators involved in proteolysis and angiogenesis processes. The proteolytic balance (MMP-9/TIMP-1, MMP-9/PAI-1 and MMP-9/TFPI-2 ratios) was higher in M1 vs. M2, whereas M2 macrophages presented higher angiogenesis properties (increased VEGF/TFPI-2 and TF/TFPI-2 ratios). Moreover M1 macrophages from diabetics displayed more important proangiogenic and proteolytic activities than non-diabetics. This study reveals that M1 and M2 macrophages could differentially modulate major atherosclerosis-related pathological processes. Moreover, M1 macrophages from diabetics display a deleterious phenotype that could explain the higher plaque vulnerability observed in these subjects.

**Keywords:** Macrophage polarization, Atherosclerosis, Diabetes, Angiogenesis, Proteolysis, Plaque vulnerability

## **Introduction**

Diabetic patients have an increased cardiovascular risk, in relation with an earlier onset and more extensive atherosclerosis [1]. Some studies suggest that this risk is related to the increased plaque vulnerability in diabetic patients. Indeed, atherosclerotic plaques from diabetic patients present features of unstable plaques, such as high macrophage infiltration and inflammatory, proteolytic and angiogenic activities, all related to increased neo-angiogenesis [2].

Macrophages, derived from monocyte differentiation, play a key role in all these processes. In particular, they express several mediators involved in proteolytic and/or angiogenic processes such as vascular endothelial growth factor (VEGF), tissue factor (TF), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and the major protease inhibitors, tissue factor pathway inhibitor -1 and -2 (TFPI-1, -2), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) [3-5].

Several studies have suggested phenotypic and functional diversity of macrophages according to microenvironment signals [6,7]. Two predominant macrophage subtypes have been described: M1 (classically activated macrophages) with pro-inflammatory properties and M2 (alternatively activated macrophages) which dampen inflammation and promote tissue repair. Previously, the presence of M1 and M2 macrophages in human atherosclerotic lesions has been reported [8]. These macrophages exert different functions in the control of inflammation, cholesterol metabolism and iron handling [8,9]. However, implication of these macrophage phenotypes in atherosclerotic plaque progression and instability has only recently begun to be investigated and data about the impact of diabetes on macrophage polarization, in relation to cardiovascular complications, are just emerging [10].

In this study, we aimed to compare the expression of angiogenic and proteolytic mediators in M1 and M2 macrophages from atherosclerotic patients and focus on whether the diabetic status influences the M1/M2 polarization as well as the expression of these mediators in macrophage subtypes.

## Methods

### *Subjects*

Thirty six atherosclerotic patients were included in this study. Presence of atherosclerosis was diagnosed by coronary and carotid angiography. All patients presented significant coronary artery disease (CAD) defined by a stenosis of >75% in  $\geq 1$  of the main coronary arteries and/or significant carotid artery stenosis (CAS) (>70%). Data from patients were prospectively collected and included cardiovascular medications and risk factors such as male sex, age, diabetes mellitus (fasting plasma glucose  $\geq 1.26$ g/L and/or use of glucose-lowering medications), dyslipidemia (serum triglyceride levels  $\geq 1.5$ g/L or high-density lipoprotein cholesterol <0.4g/L in men or <0.5g/L in women, and/or current treatment), obesity (body mass index (BMI) value  $>30$ kg/m<sup>2</sup>) and smoking history (current or past smokers vs non-smokers). Additional data included history of myocardial infarction, stroke and peripheral arterial disease (PAD; patients with Fontaine claudication stage  $\geq$  IIa or and/or history of treatment for chronic limb ischemia) and left ventricular ejection fraction. Patients were included in this study during consultation, far from any surgery. At the inclusion, none of the patients had any clinical symptoms of systemic inflammation. The study was approved by the local ethics committee and was carried out in agreement with the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all patients.

### *Determination of blood parameters*

Blood samples were collected from all patients after overnight fasting by venipuncture. After centrifugation, supernatants were immediately stored at -80°C until analysis. IL-6 and insulin were quantified by ELISA (R&D Systems, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. High sensitivity C-reactive protein was measured by immunonephelometric method (BN<sup>TM</sup> II, Siemens, Schwalbach, Germany) and glycemia, creatininemia and lipid parameters were measured using enzymatic assays (Modular®, Roche Diagnostic Systems and Architect®, Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, respectively). Glycated hemoglobin (HbA1c) was determined in whole blood by a chromatography assay (Variant<sup>TM</sup> II Turbo, Bio-rad, Hercules, CA), fibrinogen by the Clauss method (Sysmex CA-7000 Coagulation Analyser, Sysmex, Kobe, Japan) and leucocyte count using an automatic cell counter (Sysmex XE-2100, Sysmex). Insulin resistance was assessed by the homeostasis model assessment (HOMA-IR) according to the formula: HOMA-IR (mmol/L $\times$  $\mu$ U/mL) = fasting glucose (mmol/L)  $\times$  fasting insulin ( $\mu$ U/mL)/22.5.

### *Isolation of human peripheral blood monocytes and monocyte differentiation*

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density centrifugation of heparinized blood on Ficoll-Paque (Pharmacia-Biotech, Uppsala, Sweden) [11]. Cells were suspended in culture medium RPMI 1640 supplemented with 40µg/ml gentamicin and 2mM glutamine (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO). The PBMC viability was >95%, as determined by trypan blue exclusion. Cells were seeded in 24-well plates, and incubated for 2h at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Monocytes were enriched by adherence and by eliminating non-adherent lymphocytes. Monocytes were then cultured with fresh complete medium (RPMI 1640 with antibiotics supplemented with 10% human serum (Eurobio, Courtaboeuf, France) containing recombinant human IL-1β (10ng/ml, Peprotech, Rocky Hill, NJ) or IL-4 (10ng/ml, Peprotech) to obtain M1 and M2 macrophages, respectively. After 7 days of culture, macrophages were maintained in serum free RPMI without stimulation by cytokines for 24h before RNA extraction.

### *RNA extraction and analysis*

Macrophages were homogenized in Trizol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA). Total RNA was extracted using the chloroform/isopropanol/ethanol method. One microgram of total RNA was reverse transcribed with the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Life Technologies) according to manufacturer's protocol. The obtained cDNA were analysed by real-time PCR performed using an Applied Biosystems 7900HT Fast Real-time PCR system (Life Technologies). For TFPI, TFPI-2 and ABL transcripts, the reaction solution, containing 5 µl of cDNA, the forward and reverse primers, the probe and 12.5 µl of TaqMan Universal PCR Master Mix (Life Technologies) was prepared in a total volume of 25 µl. For other transcripts, ready-to-use mix containing both primers and the probe (TaqMan Gene Expression Assay, Life Technologies) were used : TNFα: Hs00174128\_m1, IL-1β: Hs01555410\_m1, Mannose Receptor (MR): Hs00267207\_m1, Factor XIII A-subunit: Hs00173388\_m1, CD200 Receptor (CD200R): Hs00793597\_m1, Stabilin 1 (STAB1): Hs01109068\_m1, IL-10: Hs00961622\_m1, MMP-9 : Hs00234579\_m1, TIMP-1: Hs00171558\_m1, PAI-1: Hs01126604\_m1, TF: Hs00175225\_m1, and VEGF: Hs00900055\_m1. The reaction solution contained 5 µl cDNA, 1 µl of Expression Assay mix and 10 µl of TaqMan Universal PCR Master Mix (Life Technology) in a total volume of 20 µl. Primers and probes for TFPI and TFPI-2 were purchased from Life Technology and those for ABL from Eurogentec (Seraing, Belgium). The nucleotide sequences of the primers and probes, respectively, were as follows (forward,

reverse): TFPI : 5'-GACTCCGCAATCAACCAAGGT-3', 5'-CTGTCTGCTGGAGTGAGACACC-3', 5'-FAM-CAGCCTTTTTGAATTTACGGTCCCTCA-MBG-3'; TFPI-2: 5'-GCA-ACGCCAACAATTTCTACAC-3', 5'-CGGCAAACCTTTGGGAACTTTT-3', 5'-FAM-TTGC GACGATGCTTGCTGGAGG-TAMRA-3', ABL : 5'-TGGAGATAA-CACTCTAAGCATAACTAAAGGT-3', 5'-GATGTAGTTGCTTGGGACCCA-3', 5'-FAM-CCATTTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT-TAMRA-3'. The expression of different genes was normalized to expression of ABL, used as housekeeping gene. The relative quantification of the transcripts was calculated by the cycle threshold (Ct) comparative method using the formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . For each sample, detection of PCR products was performed separately and in triplicate.

#### *Collection of endarterectomy specimens and immunohistochemical analysis*

Immediately after endarterectomy, representative parts of carotid plaques from non-diabetic and diabetic patients were embedded in Neg-50 frozen section medium (Microm International, Waldorf, Germany), frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Serial 10- $\mu\text{m}$  cryosections were mounted on chrome-alum-coated slides and endogenous peroxidase activity was quenched. Macrophages were detected with anti-CD68 (Dako, Carpinteria, CA), smooth muscle cells with anti- $\alpha$ -actin (Dako) and endothelial cells with anti-PECAM1/CD31 (Novus Biologicals, Littleton, CO) antibodies, using N-Histofine Simple Stain (Nichirei Biosciences Inc, Tokyo, Japan). CD68 was revealed by red staining (Nova Red, Vector Laboratories, Burlingame, CA),  $\alpha$ -actin by grey precipitate (Vector SG) and CD31 by blue staining (BCIP/NBT; Vector Laboratories). Adjacent sections were stained with goat polyclonal anti-human MR (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) or rabbit polyclonal anti-human VEGF (Abcam, Cambridge, MA) antibody and revealed by red staining (Vector Nova Red, Vector Laboratories). Finally, sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated through increasing ethanol concentrations, and mounted with Merckoglas® medium (Merck, Darmstadt, Germany) for visualization through an inverted microscope (Eclipse Ti, Nikon, Melville, NY). Images were analysed using NIS Elements software (Nikon): areas corresponding to the CD68+MR- (M1) and CD68+MR+ (M2) macrophages were evaluated. The neovessel density, expressed by counting discrete CD31 positive structures in each plaque, was determined as well as intensity of the positive staining for VEGF antigen.



### *Statistical analysis*

Data are expressed as mean (standard deviation) or median (interquartile ranges) for continuous variables or as absolute number (percentage) for categorical variables. The  $\chi^2$  test was applied to analyze differences in categorical variables. Regarding continuous variables, Wilcoxon's test was performed to compare 2 paired-groups, Mann-Whitney *U* test for unpaired comparisons between 2 groups and Kruskal-Wallis for intergroup comparison (>2 groups). P-values were corrected in case of multiple comparisons with Bonferroni method. Correlations were performed using the Spearman's method. All statistical analyses were performed using SPSS software version 20.0 (IBM SPPS Inc., Chicago, IL). All p-values <0.05 were considered to be statistically significant.

## **Results**

### *Patients' characteristics*

Patients with severe atherosclerotic lesions, 30 males (83%) and 6 females (17%), were stratified into 2 groups: the type 2 diabetic group (n=19) and the non-diabetic group (n=17). The patients' clinical and biochemical characteristics are presented in Table 1. The 2 groups did not significantly differ according to clinical characteristics. As expected, fasting glucose, HbA1c circulating levels and HOMA-IR were significantly higher in diabetic patients. There were no significant differences concerning lipid and inflammatory parameters between the 2 groups.

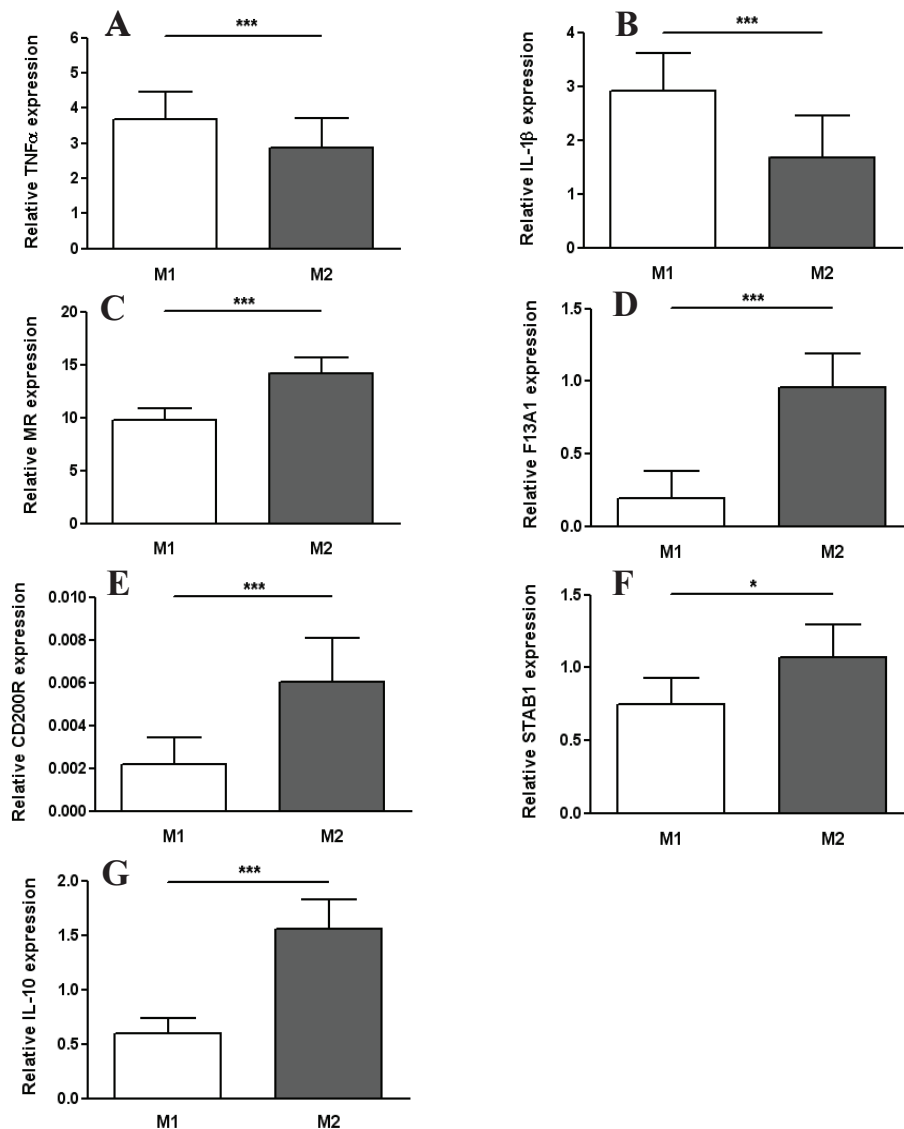
**Table 1: Clinical and blood parameters in all patients and according to diabetic status.**

	All patients (n=36)	Diabetic (n=19)	Non-diabetic (n=17)	P-value
<b>Characteristics</b>				
Age (years)	66(58.5-73.5)	65(58-73.5)	67(58.5-73)	0.72
Male sex	30(83)	16(84)	14(82)	0.88
Carotid artery stenosis	12(33)	7(37)	5(29)	0.64
Coronary artery disease	26(72)	13(68)	13(76)	0.59
Peripheral artery disease	7(19)	2(11)	5(30)	0.15
Previous myocardial infarct	9(25)	4(21)	5(29)	0.84
Left ventricular ejection fraction <50%	20(56)	9(47)	11(64)	0.37
Previous stroke	1(3)	1(5)	0	0.99
Smoking	28(77)	13(68)	15(88)	0.15
Dyslipidemia	26(72)	15(79)	11(65)	0.32
Body mass index >30 kg.m <sup>-2</sup>	12(33)	7(37)	5(29)	0.64
<b>Medication</b>				
β-blockers	26(72)	14(74)	12(71)	0.93
Statins	31(86)	17(89)	14(82)	0.85
Fibrates	4(11)	3(16)	1(6)	0.35
Oral anti-diabetic agents	15(42)	15(79)	0	<0.0001
Insulin	5(14)	5(26)	0	<0.0001
<b>Blood parameters</b>				
Fasting glucose (g/L)	0.90(0.81-1.29)	1.29(0.96-1.49)	0.85(0.79-0.90)	0.0008
HbA1c (%)	6.4(5.9-7.2)	7.05(6.65-8.0)	6.1(5.8-6.3)	0.0005
Insulin (mUI/L)	16.7(11.6-21.1)	17.8(12.9-28.2)	14.9(11.6-21.1)	0.19
HOMA-IR (mmol/L × μU/mL)	4.17(2.64-6.14)	6.04(4.42-9.35)	3.08(2.06-4.17)	0.002
Triglycerides (g/L)	1.17(0.95-1.86)	1.37(0.98-2.28)	1.09(0.91-1.25)	0.26
Total cholesterol (g/L)	1.46(1.21-1.82)	1.43(1.22-1.66)	1.64(1.20-1.92)	0.45
LDL cholesterol (g/L)	0.77(0.58-0.99)	0.72(0.65-0.97)	0.83(0.56-1.05)	0.93
HDL cholesterol (g/L)	0.37(0.30-0.46)	0.35(0.29-0.41)	0.41(0.36-0.52)	0.12
Hs-CRP (mg/L)	1.2(0.6-4.5)	1.3(0.5-6.5)	1.1(0.6-3.2)	0.46
Fibrinogen (g/L)	3.3(2.9-3.8)	3.6(3.1-4.6)	3.1(2.9-3.6)	0.10
Interleukin 6 (pg/mL)	6.3(3.6-17.1)	5.7(3.1-16.9)	7.3(4.5-17.4)	0.63
Leucocytes (G/L)	6.4(5.6-8.0)	6.7(5.8-8.3)	6.3(5.3-7.1)	0.41
Monocytes (G/L)	0.6(0.5-0.7)	0.7(0.5-0.73)	0.6(0.45-0.7)	0.26
Creatinin (mg/L)	9.0(8.0-11.0)	9.0(8.0-11.0)	9.5(8.5-11.0)	0.74

HbA1c: glycated haemoglobin; HOMA-IR: homeostatic model assessment of insulin resistance; HDL: high –density lipoprotein; LDL: low-density lipoprotein; Hs-CRP: high sensitivity C-reactive protein. Continuous data are presented as median (interquartile ranges) and categoric data as number (%). The *p* values are represented for comparison between diabetic and non-diabetic patients.

## M1 and M2 polarization of monocyte-derived macrophages

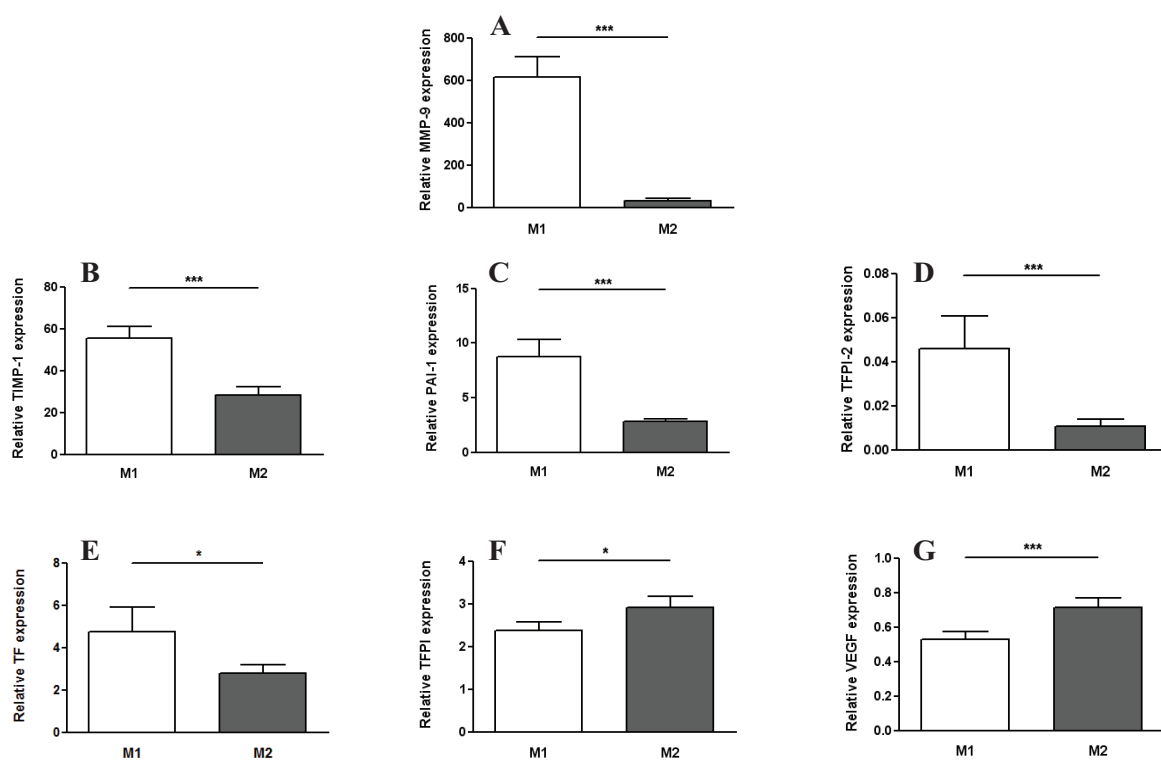
Specific macrophage differentiation was validated by measuring the expression of M1 and M2 markers in cells from diabetics and non-diabetic patients. IL-1 $\beta$  *in vitro* stimulation upregulated M1 markers expression (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , Figure 1A-B) while IL-4 led to an increase in the expression of M2 markers such as MR, Factor XIII A-unit, CD200R, STAB1 and IL-10 (Figure 1C-G).



**Figure 1: Expression levels of M1 and M2 polarization markers in monocyte-derived macrophages from atherosclerotic patients (n=36).** Expression levels were determined by quantitative RT-PCR in macrophages generated *in vitro* by IL-1 $\beta$  (10ng/ml) or IL-4 (10ng/ml), respectively. *M1 markers*: TNF $\alpha$  (A) and Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (B), *M2 markers*: Mannose Receptor (MR) (C), Factor XIII A subunit (F13A1) (D), CD200R (E), Stabilin 1 (STAB1) (F) and Interleukin 10 (IL-10) (G). Data are shown as mean value  $\pm$  SEM. (paired Wilcoxon test, \*\*\* $p$  < 0.001, \* $p$  < 0.05).

*Distinct proteolytic and angiogenic profiles of human M1 and M2 macrophages from atherosclerotic patients*

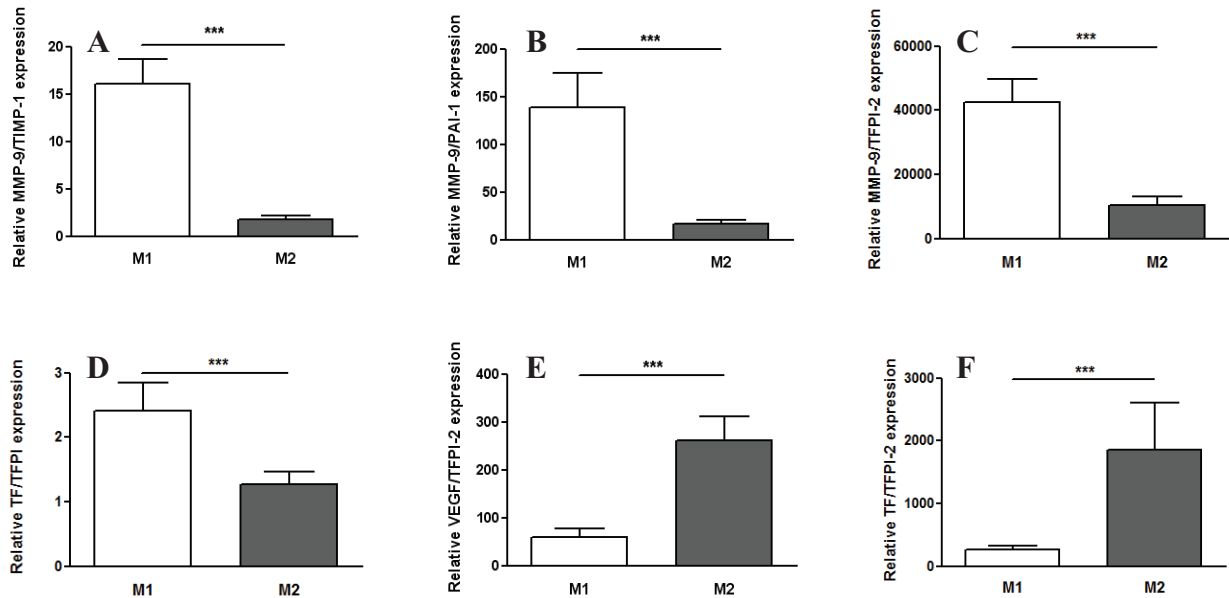
Compared to M2 macrophages, M1 expressed significantly higher levels of MMP-9 as well as proteases inhibitors, TIMP-1, PAI-1 and TFPI-2 (Figure 2A-D). We also observed that M1 macrophages significantly expressed more TF (Figure 2E) whereas M2 macrophages significantly expressed more TFPI compared to M1 (Figure 2F). Finally, M2 macrophages presented significantly higher expression of VEGF, a major contributor of angiogenesis (Figure 2G).



**Figure 2: Expression of atherogenic mediators in human M1 and M2 macrophages from atherosclerotic patients.** Expression levels were determined by quantitative RT-PCR in M1 and M2 macrophages: MMP-9 (A), TIMP-1 (B), PAI-1 (C), TFPI-2 (D), TF (E), TFPI (F) and VEGF (G). Data are shown as mean value  $\pm$  SEM. Statistically significant differences are indicated (paired Wilcoxon test, \*\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ ).

Interestingly, the proteolytic balance expressed as MMP-9/TIMP-1, MMP-9/PAI-1 and MMP-9/TFPI-2 ratios was significantly higher in M1 macrophages compared to M2 macrophages, suggesting an implication of M1 macrophages in plaque vulnerability (Figure 3A-C). Similarly, the TF/TFPI ratio, representing the hemostatic balance, was significantly higher in M1 vs. M2

macrophages (Figure 3D). By contrast, since TFPI-2 is a well known inhibitor of angiogenesis [12], the VEGF/TFPI-2 and TF/TFPI-2 ratios were calculated and found to be higher in M2 vs. M1 macrophages (Figure 3E-F).



**Figure 3: Proteolytic, hemostatic and angiogenic balance in human M1 and M2 macrophages from atherosclerotic patients.** Proteolytic balance was evaluated by calculating the following ratios: MMP-9/TIMP-1 (A), MMP-9/PAI-1 (B) and MMP-9/TFPI-2 (C), hemostatic balance by TF/TFPI ratio (D) and angiogenic balance by VEGF/TFPI-2 (E) and TF/TFPI-2 (F). Data are shown as the mean value  $\pm$  SEM. Statistically significant differences are indicated (paired Wilcoxon test, \*\*\* $p < 0.001$ ).

#### *Impact of diabetes on macrophage polarization and proteolytic and angiogenic profiles*

Gene expression levels of M1 markers, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , and of M2 markers, MR, Factor XIII A-unit, CD200R, STAB1 and IL-10, in monocyte-derived macrophages were not influenced by the diabetic status of patients and among diabetic and non-diabetic patients, the differences between M1 and M2 markers were still significant (Table 2).

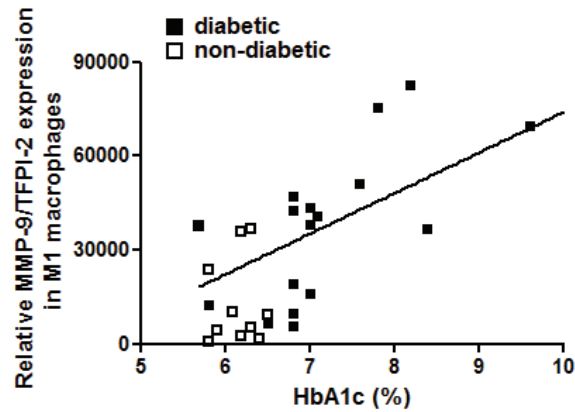
No significant differences were observed in the expression levels of proteolytic and angiogenic factors in M2 macrophages according to diabetic status of patients, whereas M1 macrophage expression profiles were significantly different (Table 2). Indeed, the proteolytic balance (MMP-9/TFPI-2 ratio) was significantly higher in M1 macrophages from diabetic compared to non-diabetic patients ( $p=0.036$ ) and positively correlated with levels of glycated hemoglobin (Figure 4). Moreover, we observed that expression of TFPI-2, an anti-angiogenic molecule,

was markedly downregulated in M1 macrophages in diabetic compared to non-diabetic patients ( $p=0.040$ ) and that VEGF/TFPI-2 and TF/TFPI-2 ratios were significantly higher in this subtype of macrophage in diabetics versus non-diabetic subjects ( $p=0.017$  and  $p=0.043$ , respectively).

**Table 2: Macrophage *in vitro* polarization and remodeling profile of the M1 and M2 phenotypes according to diabetic status**

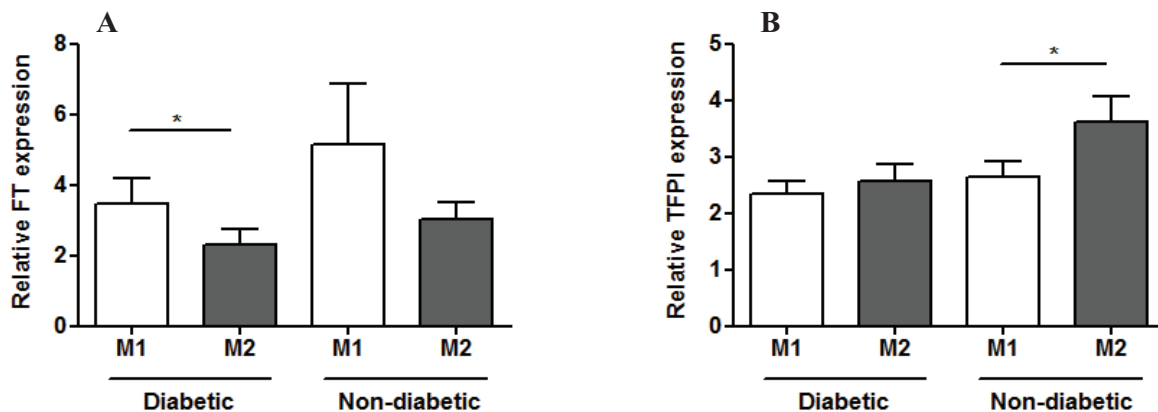
	M1 macrophages		M2 macrophages	
	Diabetic (n=19)	Non-diabetic (n=17)	Diabetic (n=19)	Non-diabetic (n=17)
Polarization markers				
M1 markers				
TNF $\alpha$	3.40 $\pm$ 0.67	4.00 $\pm$ 1.50	2.74 $\pm$ 1.09	3.01 $\pm$ 1.33
IL-1 $\beta$	2.39 $\pm$ 0.74	3.49 $\pm$ 1.27	2.30 $\pm$ 1.46	1.02 $\pm$ 0.44
M2 markers				
MR	8.41 $\pm$ 1.30	11.4 $\pm$ 1.96	13.2 $\pm$ 2.01	15.5 $\pm$ 2.18
F13A1	0.006 $\pm$ 0.003	0.005 $\pm$ 0.001	0.77 $\pm$ 0.27	1.16 $\pm$ 0.38
CD200R	0.001 $\pm$ 0.0002	0.004 $\pm$ 0.002	0.007 $\pm$ 0.004	0.005 $\pm$ 0.001
STAB1	0.77 $\pm$ 0.30	0.73 $\pm$ 0.90	0.99 $\pm$ 0.26	1.16 $\pm$ 0.38
IL-10	0.54 $\pm$ 0.14	0.66 $\pm$ 0.27	1.60 $\pm$ 0.38	1.52 $\pm$ 0.37
Proteolytic and angiogenic markers				
MMP-9	570 $\pm$ 115	670 $\pm$ 155	44.2 $\pm$ 16.7	18.6 $\pm$ 4.13
TIMP-1	57.3 $\pm$ 8.47	53.5 $\pm$ 7.32	30.9 $\pm$ 6.18	25.8 $\pm$ 3.95
PAI-1	7.48 $\pm$ 1.50	10.1 $\pm$ 2.95	2.91 $\pm$ 0.38	2.67 $\pm$ 0.39
TFPI-2	0.014 $\pm$ 0.003	0.074 $\pm$ 0.026*	0.006 $\pm$ 0.001	0.015 $\pm$ 0.006
TF	3.48 $\pm$ 0.71	6.15 $\pm$ 2.35	2.30 $\pm$ 0.44	3.32 $\pm$ 0.68
TFPI	2.34 $\pm$ 0.23	2.41 $\pm$ 0.33	2.57 $\pm$ 0.28	3.28 $\pm$ 0.47
VEGF	0.56 $\pm$ 0.05	0.50 $\pm$ 0.07	0.66 $\pm$ 0.08	0.77 $\pm$ 0.09
MMP-9/TIMP-1	16.9 $\pm$ 3.53	15.2 $\pm$ 3.75	2.41 $\pm$ 0.83	1.03 $\pm$ 0.23
MMP-9/ PAI-1	110 $\pm$ 23.5	170 $\pm$ 70.9	20.3 $\pm$ 8.10	12.1 $\pm$ 4.00
MMP-9/TFPI-2	47700 $\pm$ 7750	37900 $\pm$ 11850*	14750 $\pm$ 5400	6450 $\pm$ 2180
TF/TFPI	2.24 $\pm$ 0.55	2.58 $\pm$ 0.74	1.31 $\pm$ 0.30	1.22 $\pm$ 0.26
VEGF/TFPI-2	100 $\pm$ 35.0	24.4 $\pm$ 5.44*	250 $\pm$ 47.9	270 $\pm$ 85.6
TF/TFPI-2	345 $\pm$ 93.1	200 $\pm$ 57.4*	1140 $\pm$ 290	2470 $\pm$ 1380

TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ : Interleukin-1 $\beta$ ; MR: mannose receptor; F13A1: Factor XIII A subunit; CD200R: CD200 receptor; STAB1: Stabilin 1; MMP: matrix metalloproteinase; TIMP: tissue inhibitor of metalloproteinase; PAI: plasminogen activator inhibitor; TFPI: tissue factor pathway inhibitor; TF: tissue factor; VEGF: vascular endothelial growth factor; SEM: standard error of the mean. Values indicated the relative RNA expression levels and represent mean  $\pm$  SEM. Statistically significant differences between diabetics and non-diabetics in each macrophage subtypes are indicated (\* $p<0.05$ ).



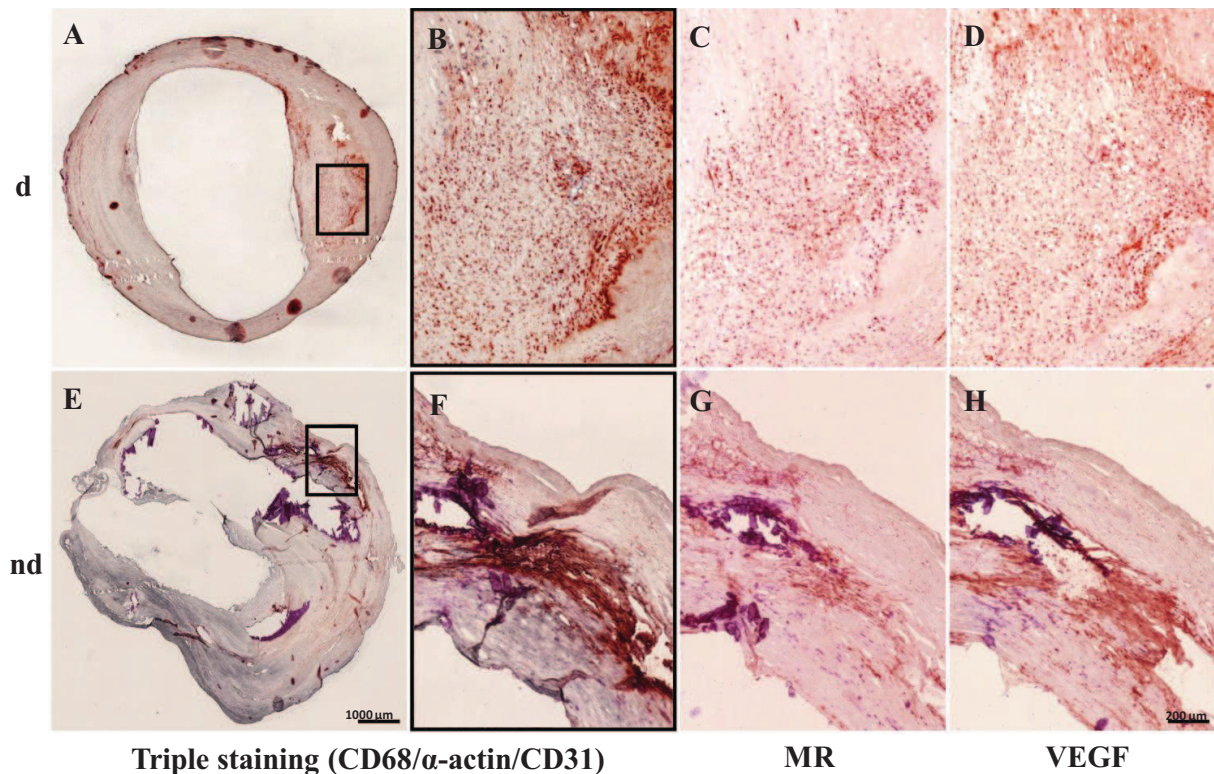
**Figure 4: Correlation between the proteolytic balance (MMP-9/TFPI-2 ratio) in M1 macrophages and levels of glycated hemoglobin (HbA1c) in diabetic (filled squares) and non-diabetic patients (unfilled squares). Line represents the best fit for all patients ( $r=0.505$ ,  $p<0.05$ ).**

Furthermore, we observed a higher expression of TF in M1 compared to M2 macrophages in the diabetic group only. Inversely, we observed a markedly upregulated expression of TFPI in M2 macrophages exclusively in non-diabetic patients (Supplemental figure S1). We did not observe any statistical difference between M1 and M2 expression for the other proteolytic and angiogenic markers. Taken together, these new findings suggest that diabetes orients M1 macrophages toward an angiogenic profile.



**Supplemental Figure S1 : Expression levels of TF (A) and TFPI (B) in human M1 and M2 macrophages according to diabetic status,  $*p<0,05$ .**

Histological analysis confirmed the higher density of neovessels and VEGF expression in carotid plaques from diabetic patients (Figure 5, Table 3). However, no differences were observed in the content of both M1 and M2 macrophages (based on the absence or presence of MR, respectively) according to the diabetic status of the subject.



**Figure 5: Immunohistological analysis of representative carotid endarterectomy specimen from diabetics (d; A to D) and non-diabetics (nd; E to H).** Triple immunostaining for macrophages (CD68, red), smooth muscle cells ( $\alpha$ -actin, grey) and endothelial cells (CD31, blue) (A, B and E, F), immunostaining for M2 macrophages (MR, red) (C and G) and for VEGF (red) (D and H) with higher magnification. Scale bars are shown.

**Table 3: Histological differences between carotid plaques from diabetic or non-diabetic patients**

Histological analysis	Diabetic (n=3)	Non-diabetic (n=3)	<i>p</i> -value
Plaque area (mm <sup>2</sup> )	26.3 ± 2.34	25.7 ± 3.36	0.827
CD68 macrophage area (%)	1.83 ± 0.81	3.03 ± 1.35	0.827
M1 macrophage area (%)	1.19 ± 0.68	1.59 ± 1.48	0.513
M2 macrophage area (%)	0.64 ± 0.17	1.49 ± 0.70	0.275
M1/M2 macrophage area ratio	1.67 ± 0.65	3.00 ± 2.92	0.999
CD31 <sup>+</sup> neovessel density (n/mm <sup>2</sup> )	5.20 ± 0.65	2.68 ± 0.66	0.049
VEGF staining intensity (U/mm <sup>2</sup> )	2.71 ± 0.51	1.36 ± 0.044	0.049

VEGF: vascular endothelial growth factor; SEM: standard error of the mean. Values are indicated as mean ± SEM. Data are presented as percentage of the area plaque, neovessel density represents the density in the entire section and VEGF staining represents the intensity in the entire section.



## Discussion

Diabetes is associated with the development of accelerated atherosclerosis, which results in increased morbidity and cardiovascular complications. Diabetic patients have more vulnerable plaques, due to increased macrophage infiltration and pro-inflammatory processes among other factors, compared to non-diabetic patients [2].

Tissue macrophages can exist in different activation states depending on the cytokine microenvironment [6,7]. M1-inducing stimuli, such as bacterial (lipopolysaccharide) or Th1 cytokines (IFN $\gamma$ , GM-CSF) are widely used in literature but their relevance for atherosclerosis can be discussed. Therefore we used IL-1 $\beta$ , a key pro-inflammatory cytokine in atherosclerosis development, to promote M1 macrophage differentiation [13].

IL-1 $\beta$ -induced M1 macrophages displayed a higher proteolytic potential than M2 macrophages. Indeed, M1 macrophages express higher levels of MMP-9 which is involved in extracellular matrix (ECM) degradation, suggesting a role in plaque rupture [5]. Previous work has shown that MMP-9 is more highly expressed in M1 macrophages in plaques from symptomatic patients [14]. MMP-9 activity is regulated by TIMP-1, its endogenous inhibitor [15], and by other protease inhibitors, TFPI-2 and PAI-1 [16,17]. The balance between MMPs and these inhibitors is critical for the ECM remodeling in atherosclerotic lesions. The expression of these inhibitors was upregulated in M1 compared to M2 macrophages and the MMP-9/TIMP-1, MMP-9/PAI-1 and MMP-9/TFPI-2 ratios were significantly higher in M1 compared to M2 macrophages, suggesting a potential role of M1 macrophages in plaque vulnerability.

We observed a higher expression of TF, the main initiator of coagulation and of PAI-1, a fibrinolysis inhibitor, in M1 compared to M2 macrophages. Previously, increases in both TF and PAI-1 expression were reported in atherosclerotic plaques and monocytes/macrophages represent a source of these coagulation/hemostasis mediators [18,19]. Increased expression of TF and PAI-1 in M1 macrophages may cause a greater extent and persistence of thrombi in the arterial lumen after plaque rupture [20]. In addition, TFPI, an important inhibitor of the TF-dependent coagulation pathway, is present within human atherosclerotic plaque [21], is more expressed in M2 macrophages, suggesting antagonistic roles of M1 and M2 in coagulation, in favor of plaque thrombogenicity for M1 whereas M2 macrophages can be involved in the control of fibrin deposition in atherosclerotic plaques.

Finally, neoangiogenesis has a pivotal role in atherosclerosis. We observed an increased VEGF expression in M2 macrophages, as already described in tumor-associated M2 macrophages, promoting tumor progression [22]. Inversely, TFPI-2, mainly expressed by vascular smooth muscle cells, endothelial cells and macrophages and overexpressed in human atherosclerotic lesions compared to normal arteries, plays an important regulatory role in angiogenic process [12]. Here we found that M1 expressed significantly more TFPI-2 than M2 macrophages. Interestingly, VEGF/TFPI-2 and TF/TFPI-2 ratios, which reflect the angiogenic balance, were significantly higher in M2 vs. M1 macrophages, in favor of the higher angiogenic properties of M2 macrophages [23]. Several studies suggest that neovascularization, associated with unstable vulnerable plaques, promotes the development of immature and rupture-prone microvessels, leading to intraplaque hemorrhages and contributing to plaque destabilization [24]. Yunoki *et al.* found a positive association between intraplaque hemorrhages and M2 macrophages in human unstable coronary plaques [25]. M2 macrophages, via scavenging functions, are involved in the clearance of apoptotic cells, as well as phagocytosis of senescent erythrocytes, so avoiding iron induced damages and thus may play reparatory roles, contributing to plaque stabilization [9].

The functional diversity of macrophages in atherosclerosis is an emerging concept [9]. Brochériou *et al.* already suggested a distinct transcription profile between GM-CSF and M-CSF-induced macrophages with identification of novel candidate genes in atherosclerosis, but no data concerning hemostatic and angiogenic mediators are available in this study [26]. Similarly, Waldo *et al.* highlighted differences in inflammatory proteins, TF and TFPI expression between M1 and M2 in agreement with our results obtained on a large number of subjects [27].

Here, we also observed that diabetes does not alter M1 nor M2 macrophage *in vitro* polarization. This is in agreement with previous results describing an impaired alternative macrophage differentiation in PBMC from obese subjects without significant difference in the expression level of M2 markers in obese patients with diabetes [28]. Second, we observed an influence of diabetes on the gene expression of proteolytic and angiogenic factors in M1 macrophages. The higher proteolytic balance (MMP-9/TFPI-2 ratio) observed in M1 macrophages from diabetic patients, is in line with the accelerating atherogenesis and the higher plaque vulnerability currently observed in diabetic patients [2]. The chronic influence of hyperglycemia on M1 macrophage phenotype is supported by the observation of a positive correlation between proteolytic balance in M1 macrophages and glycated hemoglobin. These

data are in agreement with those from Nicholls *et al.* who observed a close correlation between atheroma burden and glycated hemoglobin [29]. Previous studies reported that the expression of MMP-9 is increased in atherosclerotic plaques from diabetic patients and that insulin treatment reduces MMP-9 tissue expression as well as its secretion by macrophages [30].

Moreover, we observed that M1 macrophages from diabetic patients also displayed a more important proangiogenic activity (increased VEGF/TFPI-2 and TF/TFPI-2 ratios) compared to non-diabetic patients. Our histological and *in vitro* results could explain the link between increased number of microvessels and plaque vulnerability observed in diabetic patients [31]. Hyperglycemia has been reported to induce abnormal angiogenesis and to promote microangiopathic neovessels in the retina via a VEGF-dependent mechanism, and similar mechanisms might take place in the vascular wall and atherosclerotic plaques [32].

Recent studies indicate that M1 macrophages are predominant in the symptomatic plaques, in particular in vulnerable zones (shoulder regions), while M2 cells dominate within the collagen-rich fibrous cap and adventitia surrounding the plaque, suggesting that plaque instability might be caused by an imbalance between M1 and M2 macrophages [8,14,33]. However, no study estimated the M1/M2 ratio according to the diabetic status of the subject. In the current study, diabetes does not seem to be associated to changes in both M1 and M2 macrophage content in atherosclerotic plaques. Our results show that diabetes leads to qualitative changes in M1/M2 macrophages in atherosclerotic context and seem to suggest no impact of diabetes on M1 and M2 macrophages content in atherosclerotic plaques but the latter need to be confirmed by the analysis of a larger sample size. Numerous intracellular signaling cascades but also transcription and epigenetic factors could be involved. The persistent effect of the diabetic condition on monocytes/macrophages after 8 days of culture is probably explained by the recently described concept of “monocytes training”. This phenomenon consists of cellular priming through epigenetic modifications and was observed both *in vitro* [34, 35] and *in vivo* [28]. Further studies should identify the involved pathways in order to provide novel therapeutic targets for ameliorating the adverse cardiovascular effects of diabetes.

This is the first study on the impact of diabetes on macrophage M1/M2 profiles in humans. However the results should be interpreted with caution. A possible limitation of our approach is that our conclusions, drawn from *ex vivo* experiments from a large number of atherosclerotic patients, are based on gene expression data. However, mRNA expression levels are commonly used as a proxy for estimating functional differences that occur at the protein level.

In conclusion, the current study reveals that human M1 and M2 macrophages express different levels of mediators involved in proteolysis and angiogenesis, key processes in atherosclerotic plaque progression and instability. M1 macrophages from diabetic patients exhibit a deleterious phenotype that could contribute to lesion progression with a higher plaque fragility currently observed in these subjects.

### **Acknowledgements**

We are grateful to Bertrand Vaast and Jonathan Vanhoutte for their excellent technical assistance.

### **Funding**

This work was supported by Lille 2 University; INSERM; French Research National Agency (ANR) through Blanc program (AIMHA, n°ANR-2010-110601); CHRU de Lille and OPAL foundation (Sanofi-Synthelabo and Bristol-Myers Squibb).

### **References**

1. Dale AC, Vatten LJ, Nilsen TI, et al. Secular decline in mortality from coronary heart disease in adults with diabetes mellitus: cohort study. *BMJ* 2008;337:a236.
2. Moreno PR, Murcia AM, Palacios IF, et al. Coronary composition and macrophage infiltration in atherectomy specimens from patients with diabetes mellitus. *Circulation* 2000;102(18):2180-4.
3. Ramos MA, Kuzuya M, Esaki T, et al. Induction of macrophage VEGF in response to oxidized LDL and VEGF accumulation in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18(7):1188-96.
4. Meisel SR, Xu XP, Edgington TS, et al. Differentiation of adherent human monocytes into macrophages markedly enhances tissue factor protein expression and procoagulant activity. *Atherosclerosis* 2002;161(1):35-43.

5. Newby AC. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28(12):2108-14.
6. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003;3(1):23-35.
7. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 2003;73(2):209-12.
8. Bouhlef MA, Derudas B, Rigamonti E, et al. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab* 2007;6(2):137-43.
9. Chinetti-Gbaguidi G, Colin S, Staels B. Macrophages subsets in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* 2015;In press
10. Fadini GP, Cappellari R, Mazzucato M, et al. Monocyte-macrophage polarization balance in pre-diabetic individuals. *Acta Diabetol* 2013;50(6):977-82.
11. Chinetti G., Griglio S., Antonucci M., et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages *J Biol Chem*, 1998, 273,25573-25580
12. Zawadzki C, Chatelain N, Delestre M, et al. Tissue factor pathway inhibitor-2 gene methylation is associated with low expression in carotid atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 2009;204(2):e4-14.
13. Apostolakis S, Vogiatzi K, Krambovitis E, et al. IL-1 cytokines in cardiovascular disease: diagnostic, prognostic and therapeutic implications. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2008;6(2):150-8.
14. Cho KY, Miyoshi H, Kuroda S, et al. The phenotype of infiltrating macrophages influences arteriosclerotic plaque vulnerability in the carotid artery. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2013;22(7):910-8.
15. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92(8):827-39.

16. Herman MP, Sukhova GK, Kisiel W, et al. Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001;107(9):1117-26.
17. Oh CK, Ariue B, Alban RF, et al. PAI-1 promotes extracellular matrix deposition in the airways of a murine asthma model. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294(5):1155-60.
18. Zawadzki C, Susen S, Richard F, et al. Dyslipidemia shifts the tissue factor/tissue factor pathway inhibitor balance toward increased thrombogenicity in atherosclerotic plaques: evidence for a corrective effect of statins. *Atherosclerosis* 2007;195(2):e117-25.
19. Lupu F, Bergonzelli GE, Heim DA, et al. Localization and production of plasminogen activator inhibitor-1 in human healthy and atherosclerotic arteries. *Arterioscler Thromb* 1993;13:1090-1100.
20. Sobel BE, Woodcock-Mitchell J, Schneider DJ, et al. Increased plasminogen activator inhibitor type 1 in coronary artery atherectomy specimens from type 2 diabetic compared with nondiabetic patients: a potential factor predisposing to thrombosis and its persistence. *Circulation* 1998;97(22):2213-21.
21. Caplice NM, Mueske CS, Kleppe LS, et al. Presence of tissue factor pathway inhibitor in human atherosclerotic plaques is associated with reduced tissue factor activity. *Circulation* 1998;98(11):1051-7.
22. Hasita H, Komohara Y, Okabe H, et al. Significance of alternatively activated macrophages in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Sci* 2010;101(8):1913-9.
23. Jetten N, Verbruggen S, Gijbels MJ, et al. Antiinflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. *Angiogenesis*. 2014;17(1):109-18.
24. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, et al. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(10):2054-61.
25. Yunoki K, Naruko T, Komatsu R, et al. Enhanced expression of haemoglobin scavenger receptor in accumulated macrophages of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Eur Heart J* 2009;30(15):1844-52.

26. Brochériou I, Maouche S, Durand H, et al. Antagonistic regulation of macrophage phenotype by M-CSF and GM-CSF: implication in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2011;214(2):316-24.
27. Waldo SW, Li Y, Buono C, et al. Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 2008;172(4):1112-26.
28. Bories G, Caiazzo R, Derudas B, et al. Impaired alternative macrophage differentiation of peripheral blood mononuclear cells from obese subjects. *Diab Vasc Dis Res* 2012;9(3):189-95.
29. Nicholls SJ, Tuzcu EM, Kalidindi S, et al. Effect of diabetes on progression of coronary atherosclerosis and arterial remodeling: a pooled analysis of 5 intravascular ultrasound trials. *J Am Coll Cardiol* 2008;52(4):255-62.
30. Schuyler CA, Ta NN, Li Y, et al. Insulin treatment attenuates diabetes-increased atherosclerotic intimal lesions and matrix metalloproteinase 9 expression in apolipoprotein E-deficient mice. *J Endocrinol* 2011;210(1):37-46.
31. Olson FJ, Strömberg S, Hjelmgren O, et al. Increased vascularization of shoulder regions of carotid atherosclerotic plaques from patients with diabetes. *J Vasc Surg* 2011;54(5):1324-1331.
32. Hayden MR, Tyagi SC. Vasa vasorum in plaque angiogenesis, metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atheroscleropathy: a malignant transformation. *Cardiovasc Diabetol* 2004;3:1.
33. Stöger JL, Gijbels MJ, van der Velden S, et al. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2012; 225(2):461-8.
34. Saeed S, Quintin J, Kerstens HH, et al. Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science* 2014;345(6204):1251086
35. Bekkering S, Joosten LA, van der Meer JW, et al. The epigenetic Memory of Monocytes and Macrophages as a Novel Drug Target in Atherosclerosis. *Clin Ther* 2015; In press

## I.2.2. Résultats complémentaires

Pour compléter et confirmer les résultats obtenus en ARN, les dosages protéiques de certains médiateurs, notamment ceux impliqués dans l'hémostase (PAI-1 et TFPI) et le remodelage extracellulaire (MMP-9 et TIMP-1) ont été réalisés sur les surnageants de culture des 2 sous-types de macrophages de patients athéroscléreux. Nous avons également étudié, à partir de lysats cellulaires, la capacité procoagulante des macrophages M1/M2.

### I.2.2.1. *Matériel et méthodes*

#### I.2.2.1.1. Surnageants de macrophages

Les surnageants de culture récupérés après 24 heures supplémentaires en RPMI de base (sans sérum) après les 7 jours de culture sont ultracentrifugés à 12 000 g pendant 12 minutes, aliquotés puis congelés à -80°C pour analyses ultérieures.

#### I.2.2.1.2. Lysats cellulaires de macrophages

Pour certaines expérimentations, après les 24 heures en RPMI post culture, les cellules sont mises en présence de PBS puis congelées à -80°C. Les cellules sont ensuite lysées par 4 cycles de congélation/décongélation à -20°C avant l'analyse.

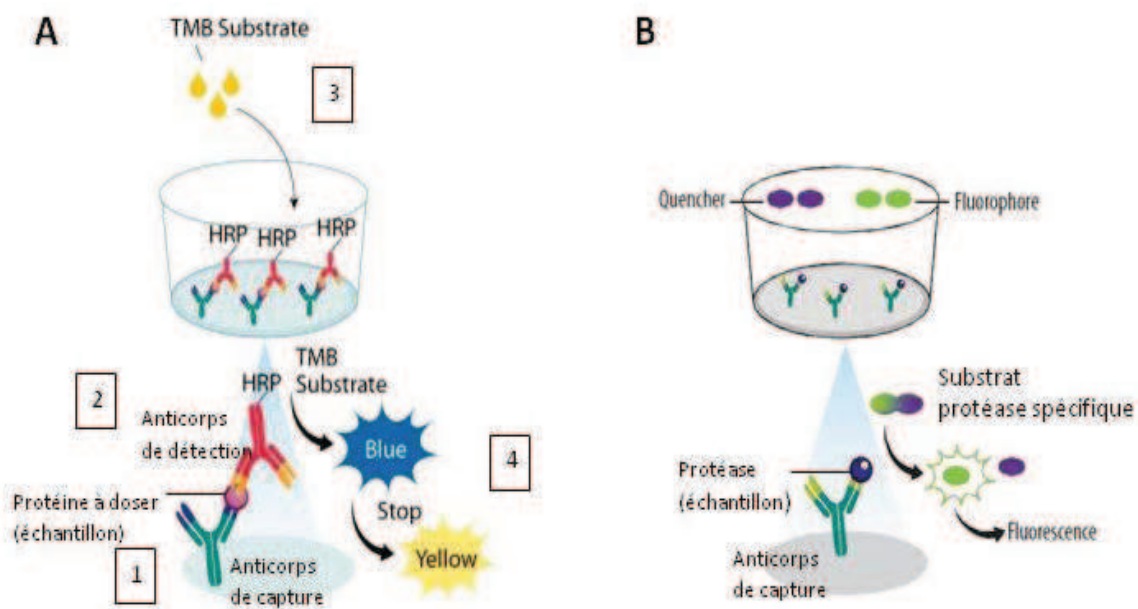
#### I.2.2.1.3. Dosages protéiques et d'activité dans les surnageants de macrophages

Les concentrations de PAI-1, TIMP-1 et TFPI dans les surnageants de cultures des macrophages M1 et M2 ont été mesurées avec les trousse commerciales Quantikine® (R&D Systems Inc.) en suivant les instructions du fournisseur. Les dosages ELISA (pour Enzyme Linked Immunosorbent Assay), basés sur les interactions spécifiques antigène – anticorps, utilisent 2 anticorps dirigés contre des épitopes différents de la protéine à doser. Les surnageants de macrophages sont tout d'abord incubés avec l'anticorps primaire coâté sur les parois d'une microplaque de 96 puits. Puis le surnageant est éliminé et après plusieurs lavages, l'anticorps secondaire polyclonal couplé à une peroxydase est ajouté. L'ajout d'un substrat chromogène (tétraméthylbenzidine, TMB) permet de révéler l'activité de la peroxydase. La réaction est stoppée par l'apport d'une solution d'acide sulfurique 1M et une mesure d'absorbance à 450 nm par un spectrophotomètre lecteur de microplaques (ELx808, BioTek)



permet d'évaluer l'intensité de coloration (figure 39-A). La concentration de la protéine d'intérêt est alors déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage établie avec plusieurs dilutions d'une solution standard de concentration connue en protéine à doser. Les kits utilisés ont, selon le fournisseur, un seuil de détection, respectivement, de 0,06 ng/ml, de 2,2 pg/ml et de 0,08 ng/ml, pour le PAI-1, le TFPI et le TIMP-1.

Pour le dosage de la MMP-9 active, la trousse commerciale Fluorokine® (R&D Systems Inc.) a été utilisée. Elle est basée sur un principe de protéolyse, par l'enzyme active à doser, d'un substrat spécifique. Ce clivage libère le fluorophore du quencher qui émet alors un signal de fluorescence mesuré par un fluorimètre (MFX, Dynex technologies.) (figure 39-B). Le seuil de détection de ce kit est de 0,005 ng/ml.



**Figure 39: Principe des kits de dosages Quantikine® [A] et Fluorokine® [B], selon R&D Systems Inc.**

#### I.2.2.1.4. Test de génération de thrombine

Un pool de plasma pauvre en plaquettes (PPP) est constitué à partir de plasmas citratés témoins, issus de sujets sains avec bilan de coagulation normal (tests globaux TP/TCA et fibrinogène) auxquels est ajouté, au moment du prélèvement, le corn trypsin inhibitor (Kordia, Leiden, Pays Bas), un inhibiteur du FXII impliqué dans la phase contact de la coagulation (Baglin, 2005). Ces plasmas sont préparés par double centrifugation à 20°C pendant 15 min à 4000 tours/min, puis poolés et congelés à -80°C jusqu'à utilisation.

Le test de génération de thrombine par le système CAT® (« Calibrated Automated Thrombogram ») est utilisé pour étudier la capacité procoagulante des macrophages M1 et M2 (Hemker *et al*, 2002; Hemker *et al*, 2003). Pour la mesure de la génération de thrombine, tous les échantillons sont testés en triple (puits GT) et comparés à 3 puits où le calibrateur thrombine a été ajouté (puits CL).

Vingt microlitres de lysats cellulaires de macrophages M1 ou M2 (puits GT) ou 20 µl de Thrombin calibrator® (Thrombinoscope BV, Maastricht, Pays Bas) (puits CL) sont ajoutés aux 80 µl de PPP, dans une microplaque de 96 puits (Immulon, 2HB U-fond clair, Thermo Electron, Villebon-sur-Yvette, France) qui est ensuite incubée à 37°C 5 min dans le fluorimètre de microplaque Fluoroskan Ascent® (Thermolabsystems, Helsinki, Finlande). La génération de thrombine est initiée par l'ajout dans chaque puits, via le dispenseur, de 20 µl de FluCa, réactif déclenchant constitué de substrat fluorogénique spécifique de la thrombine (Z-Gly-Gly-Arg-AMC) et de chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) (Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, France).

La fluorescence émise à 460 nm, proportionnelle à la génération de thrombine, est mesurée toutes les 30 secondes pendant 120 minutes à l'aide du fluorimètre de microplaque Fluoroskan Ascent® et enregistrée par le logiciel Thrombinoscope® (Thrombinoscope, Synapse BV, Maastricht, Pays Bas) qui la compare au calibrateur. A partir des valeurs de fluorescence cumulées, la dérivée première est calculée pour la thrombine, permettant d'étudier la cinétique de génération de thrombine.

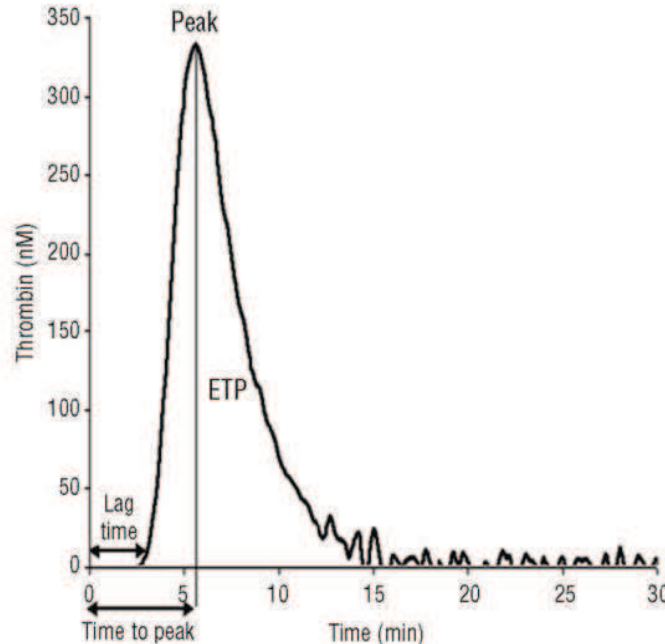
En parallèle, des puits témoins (contrôles positifs) sont réalisés en présence de 20 µl de PPP-Reagent Low® ou 20 µl de PPP-Reagent® [mélange commercial de FT (respectivement, 1 pM ou 5 pM) et de 4 µM de phospholipides (Diagnostica Stago)] et de 80 µL de PPP.

Le profil de génération de thrombine permet de caractériser 5 paramètres importants (figure 40) :

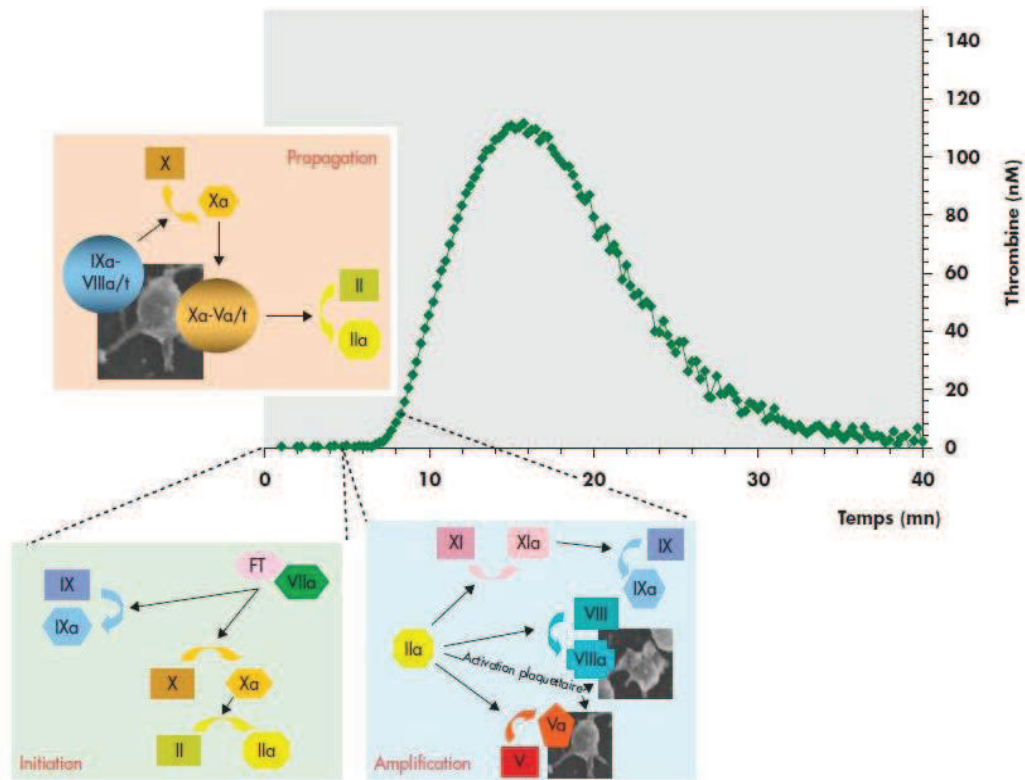
- *lag time* ou temps de latence (min) représentant le délai d'initiation de la génération de thrombine et donc le temps qui précède l'«explosion» de thrombine. Il correspond aux temps de coagulation (tests globaux TP/TCA) mesurés au laboratoire,
- *time to peak* ou temps d'obtention du pic (min), correspondant au temps nécessaire pour atteindre la quantité maximale (pic) de thrombine générée,

- *peak height* ou hauteur de pic (nM) ou *pic de thrombine* représentant le maximum de thrombine active générée,
- *Endogenous Thrombin Potential* (ETP) ou *potentiel thrombinique endogène* (en nM.min) équivalent à l'aire sous le thrombinogramme représente l'ensemble de l'activité de thrombine active générée présente dans le plasma. Il reflète le potentiel coagulant global, son augmentation signe une hypercoagulabilité et sa diminution, une hypocoagulabilité,
- l'*index de vélocité ou pente maximale de génération de thrombine* (en nM/min) est la vitesse avec laquelle se développe la phase de propagation [Vélocité : Hauteur du pic/(Temps au pic - Temps de latence)].

L'initiation de la coagulation correspond au temps de latence initial. Les premières traces de thrombine générée correspondent à la phase d'amplification qui est suivi par l'«explosion» de thrombine (phase de propagation). Enfin, la génération de thrombine est inhibée, principalement par l'antithrombine (figure 41).



**Figure 40 : Profil de génération de thrombine ou thrombinogramme, d'après (Rugeri *et al*, 2007)**



**Figure 41 : Phases de la coagulation et thrombinographie** (Lecompte T *et al*, 2006)

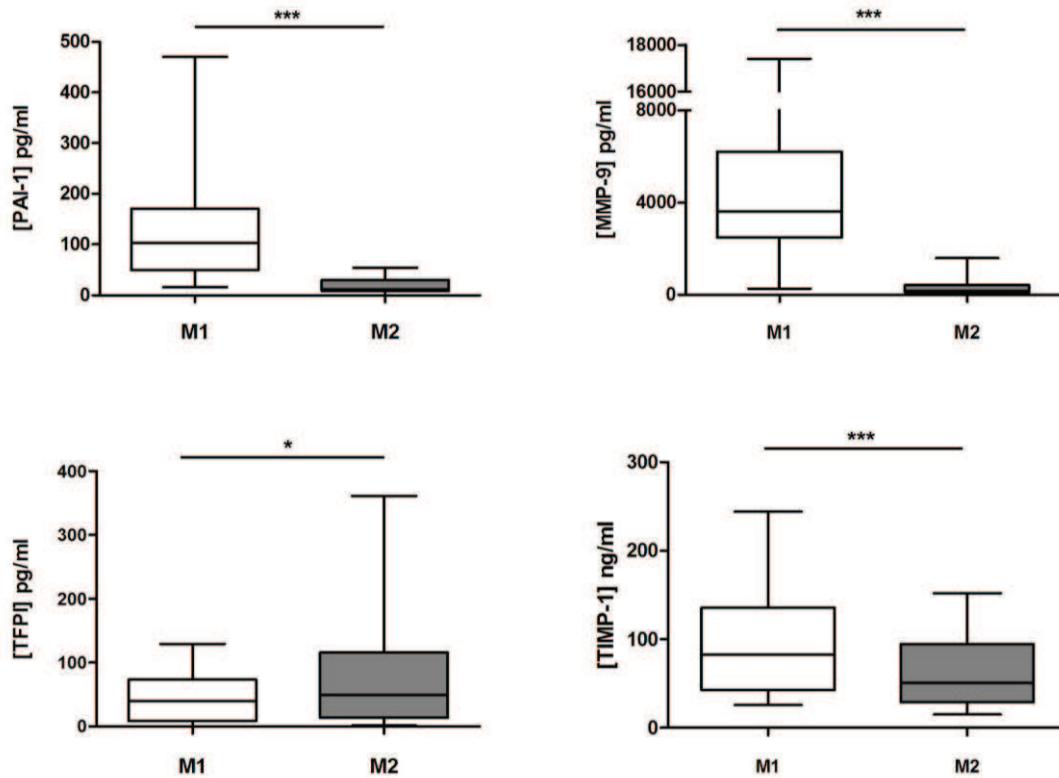
#### I.2.2.1.5. Analyse statistique des résultats

Le test non paramétrique de Wilcoxon est appliqué pour comparer les groupes pour les échantillons appariés et est réalisé à l'aide du logiciel Statview (version 4.5). Les tests sont considérés comme statistiquement significatifs lorsque  $p < 0,05$ . Les graphiques sont réalisés avec le logiciel GraphPad Prism 5.02.

#### I.2.2.2. Résultats

##### I.2.2.2.1. Sécrétion des macrophages

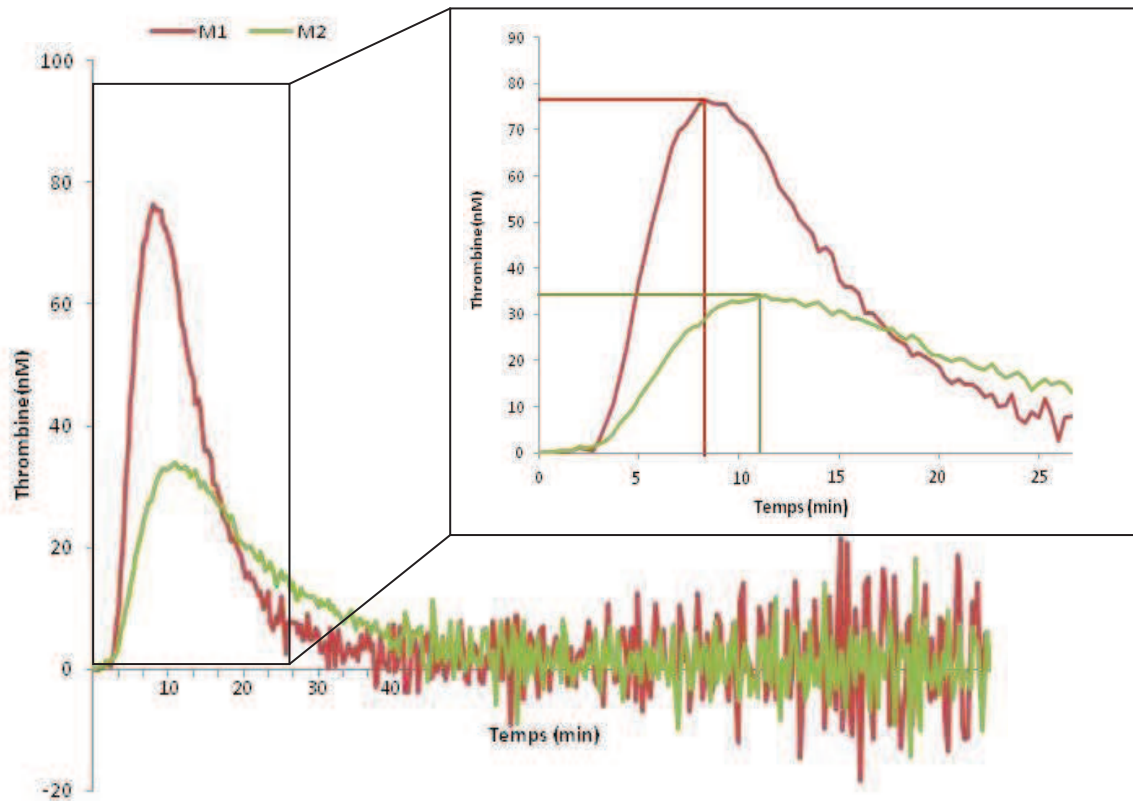
Nous observons que les macrophages M1 sécrètent une quantité significativement plus importante de PAI-1, de MMP-9 et de TIMP-1 que par les macrophages M2, à J8, soit après 24 heures en milieu de culture privé de sérum après 7 jours de culture (pour les 3 protéines,  $p < 0,001$ ) (figure 42). Concernant le TFPI, à J8, sa concentration est significativement plus importante dans les milieux de culture des macrophages M2 comparés aux macrophages M1 ( $p = 0,02$ ).



**Figure 42: Concentrations de PAI-1, MMP-9, TFPI et TIMP-1 dans les surnageants de culture des macrophages M1 et M2 différenciés à partir des monocytes sanguins, n=22, \*: p<0,05 ; \*\*\*: p<0,001.**

#### I.2.2.2.2. Génération de thrombine

Les profils de génération de thrombine des macrophages M1 et M2 ne sont pas superposables (figure 43). Nous avons alors comparé les différents paramètres de génération de thrombine et observé des différences significatives entre les 2 types de macrophages (figure 44).



**Figure 43 : Exemple de profil de génération de thrombine des lysats de macrophages M1 et M2, représentatif des 8 patients testés.**

Le pic de thrombine généré par les macrophages M1 intervient plus précocément par rapport aux macrophages M2 (différence significative sur le temps au pic) même si l'initiation de la génération de thrombine n'est pas retardée dans le M2 (absence de différence significative sur le temps de latence entre les 2 groupes) (figure 44 A-B).

Par ailleurs, la génération de thrombine induite par les macrophages M1 est plus importante par rapport aux macrophages M2. En effet, nous notons un pic de thrombine et un index de vélocité significativement plus élevés dans les M1, associés à un potentiel de thrombine endogène (aire sous la courbe) significativement plus important dans cette sous-population macrophagique (figure 44 C-E).

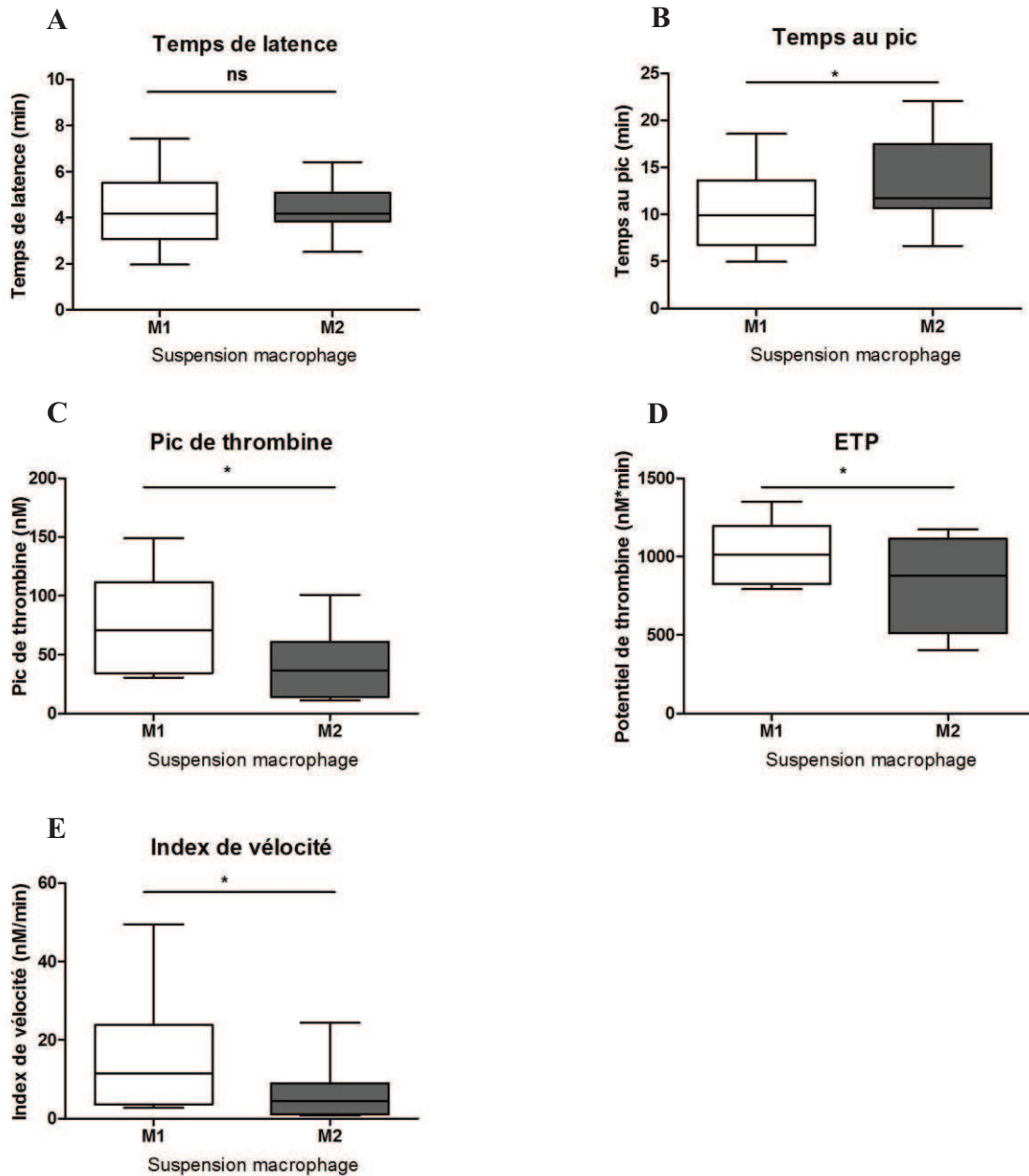


Figure 44 : Paramètres de génération de thrombine des macrophages M1/M2 (lysats cellulaires), n=8, \* : p<0,05.

### I.2.2.3. Discussion

Il est désormais clairement établi que l'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique (Libby, 2012; Ross, 1999). La rupture de la plaque athéroscléreuse et par conséquent la

formation de thrombus artériel conduisent à la progression de la maladie et à la survenue d'événements athérotrombotiques aigus tels que les IDM, AVC et décès vasculaires.

Les plaques vulnérables sont généralement riches en macrophages qui produisent diverses protéases impliquées dans la dégradation de la MEC et responsables de la rupture de la plaque (Newby, 2007). Nous confirmons ici la surexpression de la MMP-9 et de ses inhibiteurs physiologiques (PAI-1 et TIMP-1) dans les macrophages M1 au niveau protéique. Ces données suggèrent un rôle des macrophages M1 dans la vulnérabilité de la plaque.

Par ailleurs, les protéines de la coagulation et de la fibrinolyse sont impliquées dans la physiopathologie de l'athérosclérose et notamment dans l'athérotrombose (Borissoff *et al*, 2011). Le FT joue un rôle central dans l'initiation de la formation du thrombus, il est fortement exprimé dans les lésions athéroscléreuses où il est retrouvé dans les macrophages, les CML, les cellules spumeuses et dans le core lipidique (Wilcox *et al*, 1989; Moreno *et al*, 1994; Marmur *et al*, 1996). Il initie la génération de thrombine conduisant à la formation de thrombus dans les plaques athéroscléreuses érodées et rompues (Zawadzki *et al*, 2007; Jude *et al*, 2005). La thrombogénicité des plaques est directement corrélée à leur contenu en FT (Toschi *et al*, 1997; Badimon *et al*, 1999).

La génération de thrombine reflète l'état fonctionnel des mécanismes de coagulation dans des conditions physiologiques et pathologiques (Hemker *et al*, 2002). En effet, la quantité de thrombine générée dans les plaques dépend non seulement de la quantité de TF mais aussi de la présence et de l'activité d'autres protéines de la coagulation qui amplifient ou atténuent cette génération de thrombine. La génération de trombine *in vivo* est impliquée dans la progression de l'athérosclérose, des niveaux élevés de génération de thrombine ont été associés à un risque accru d'AVC (Carcaillon *et al*, 2011). L'étude de la génération de thrombine induite par les macrophages M1 et M2 dans ce travail permet de mettre en évidence pour la première fois, par cette technique, les capacités procoagulantes des macrophages M1 comparé aux macrophages M2. Nous observons dans ces macrophages M1, un pic de thrombine, un potentiel thrombinique endogène et une vitesse de génération de thrombine bien supérieurs à ceux retrouvés dans les macrophages M2 ainsi qu'un temps d'obtention du pic plus court pour les macrophages M1.

Enfin, concernant les autres acteurs de l'hémostase, les macrophages M1 secrètent davantage de PAI-1 qui a un rôle également d'inhibiteur de la fibrinolyse et est fortement exprimé dans les plaques athéroscléreuses favorisant la persistance du thrombus dans la lumière vasculaire



après la rupture de plaque (Lupu *et al*, 1993; Sobel *et al*, 1998) alors que les macrophages M2 sécrètent significativement plus de TFPI, inhibiteur de la voie du FT. Le TFPI joue un rôle essentiel dans la modulation de la formation du thrombus au sein de la plaque athéroscléreuse. Il réduit la thrombogénicité des plaques humaines en atténuant l'activité procogulante et la surexpression du FT (Caplice *et al*, 1998; Badimon *et al*, 1999).

Toutes ces données confirment bien nos résultats obtenus en ARN et renforcent l'idée de rôles antagonistes des macrophages M1/M2 dans la thrombogénicité des plaques.

### **I.3. Modulation du phénotype des macrophages par les polynucléaires neutrophiles (PNN)**

#### **I.3.1. Introduction**

Rapidement mobilisés et recrutés au sein des sites inflammatoires par chimiotactisme, les PNN jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire innée et dans l'inflammation. Ils possèdent en effet, au cours des différentes étapes d'activation cellulaire, de transmigration et d'infiltration tissulaire, des capacités de phagocytose, de production et de libération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'enzymes protéolytiques stockées dans ses différents granules, aux propriétés microbicides (Nathan, 2006). A l'inverse des monocytes/macrophages dont la contribution dans l'athérogenèse (initiation, progression et déstabilisation de la plaque) a été beaucoup étudiée, les PNN, bien qu'étant les leucocytes sanguins majoritaires chez l'homme, ont peu retenu d'attention dans la physiopathologie de l'athérosclérose jusqu'à récemment, car rarement observés dans les lésions athéroscléreuses en comparaison aux autres cellules inflammatoires. Cette sous-estimation du rôle des PNN dans l'athérosclérose est attribuable aux difficultés rencontrées pour leur détection dans les lésions, notamment expliquées par leur durée de vie relativement courte et par le manque de marqueurs spécifiques et sélectifs des PNN. Néanmoins, le PNN fait l'objet d'un regain d'intérêt dans ce processus physiopathologique depuis ces dernières années. De récentes études suggèrent un lien entre les PNN et le développement de l'athérosclérose et notamment leur rôle contributif dans les stades précoces et tardifs de l'athérosclérose. (Drechsler *et al*, 2011; Soehnlein, 2012; Baetta and Corsini, 2010)

Des études épidémiologiques ont mis en évidence un lien fort entre l'importance de la polynucléose neutrophile et la maladie coronarienne. En effet, la gravité de cette maladie est associée à une augmentation des taux circulants de PNN (Kawaguchi *et al*, 1996) et à leur état d'activation (Haumer *et al*, 2005; Gach *et al*, 2006). Par ailleurs, des taux plasmatiques d'élastase, libérées des granules des PNN sont plus élevés chez des patients souffrant d'angor instable ou d'IDM par rapport à des patients présentant un angor stable (Dinerman *et al*, 1990). De même, la myéloperoxydase (MPO) plasmatique est positivement corrélée au risque de maladie coronarienne (Zhang *et al*, 2001). Ainsi les connaissances actuelles indiquent que le nombre de PNN circulants est un facteur de prédisposition au développement des événements CV.

Par ailleurs, l'analyse immunohistologique des plaques athéroscléreuses humaines, notamment par des marquages spécifiques (élastase, MPO et CD66b) a permis la mise en évidence des PNN au sein des lésions aussi bien précoces qu'avancées. Les PNN sont notamment plus nombreux dans les lésions humaines dans un contexte de SCA (Naruko *et al*, 2002). Leur présence dans les plaques d'athérosclérose humaines est corrélée à un mauvais pronostic en lien avec des signes de fragilité de la plaque (Naruko *et al*, 2002; Ionita *et al*, 2010). Les PNN s'accumulent dans les plaques instables et dans les zones des lésions proches de la chape fibreuse (Naruko *et al*, 2002). Les PNN activés ont été retrouvés au sein de sites de rupture et d'érosion ou dans les thrombi chez des patients avec SCA, leur nombre au sein des lésions étant fortement associé au phénotype de plaques rompues (Ionita *et al*, 2010) mais également dans les zones d'hémorragies intra-plaques (Leclercq *et al*, 2007). Dans cette dernière étude, l'enrichissement en protéases libérées par les PNN (MMP-9, élastase leucocytaire) dans ces zones suggère un lien entre les hémorragies intraplaques, les PNN et la fragilité de la plaque.

Enfin, plusieurs études ont montré le rôle des PNN dans la formation de la plaque et la progression de l'athérosclérose dans des modèles murins d'athérosclérose (Rotzius *et al*, 2010; van Leeuwen *et al*, 2008). Une déplétion en PNN circulants atténue le développement de la plaque et prévient la progression de celle-ci, et notamment diminue l'infiltration des monocytes/macrophages, preuve qu'il existe une corrélation directe entre le nombre de PNN circulants et la taille des lésions (Drechsler *et al*, 2010; Zerneck *et al*, 2008).

Les PNN ont été identifiés comme les premiers leucocytes interagissant massivement avec l'endothélium. Il est aujourd'hui établi que via la libération d'une grande diversité de protéines contenues dans leurs granules (protéases dont la MPO et MMP-9), la production de ROS, impliquées dans la génération des lipoprotéines modifiées (LDLox) et la sécrétion de diverses cytokines pro-inflammatoires, les PNN aggravent la dysfonction endothéliale (Soehnlein, 2012) et favorisent le rolling et le recrutement des monocytes au sein des lésions par leur propriété de chimiotactisme (Soehnlein *et al*, 2009b; Soehnlein *et al*, 2008c).

Par ailleurs, les PNN sont capables d'interagir avec les différents types cellulaires de la plaque via des contacts cellulaires directs et/ou la libération de divers médiateurs mais les mécanismes cellulaires et moléculaires de ces coopérations restent incomplètement caractérisés.

Toutes ces données suggèrent donc un rôle potentiellement important des PNN dans l'athérosclérose vasculaire. Cependant, des travaux supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre leur participation dans la formation de la plaque et les mécanismes précis

mis en jeu. Le but de ce travail est de décrire la coopération PNN/macrophages en étudiant le rôle des PNN dans la modulation phénotypique des macrophages chez l'homme.

### I.3.2. Matériel et méthodes

#### I.3.2.1. *Isolement des monocytes sanguins*

La technique de préparation des monocytes est dérivée de celle décrite par Boyum (Boyum, 1964). Les cellules mononucléées du sang périphérique (Peripheral blood mononuclear cell ou PBMC) sont isolées à partir de 15 ml de sang périphérique dilué au demi dans du PBS 1X (Gibco, BRL)/EDTA 0,1% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) puis centrifugé, selon un gradient de densité, sur Ficoll ( $d=1,077$ , Pharmacia-Biotech), pendant 30 minutes à 380 g à 20°C.

L'anneau de PBMC est ensuite récupéré et lavé, successivement, en PBS 1X/EDTA 0,1% puis en PBS 1X, à 370 g, pendant 10 minutes, à 20°C. Le culot de PBMC est ensuite remis en suspension dans du milieu RPMI 1640 (Gibco) de base [supplémenté avec du tampon Hepes 25 mM (Gibco), de la L-Glutamine 2 mM (Gibco), de la pénicilline 20 U/ml (Gibco), de la streptomycine 20 µg/ml (Gibco) et du pyruvate de sodium 1 mM (Gibco)].

La numération des monocytes est réalisée après coloration des PBMC par le Giemsa et la viabilité des cellules est évaluée sur cellule de Malassez par le test d'exclusion au bleu Trypan. La pureté cellulaire est vérifiée après dépôt de la suspension de PBMC sur lame de verre, cyto-centrifugation à 250 tr/min pendant 3 minutes, coloration au May-Grünwald-Giemsa (MGG) et lecture au microscope à immersion au grossissement x1000. Les différentes populations de leucocytes (polynucléaires neutrophiles, éosinophiles, basophiles, lymphocytes et monocytes) sont identifiées d'après des critères morphologiques.

Les PBMC sont ensuiteensemencées (500 000 monocytes par puits) dans 1 ml de milieu RPMI de base sur un support plastique de type Primaria® (plaques 24 puits, Invitrogen) qui permet l'adhérence des monocytes. Les cellules sont laissées en contact avec le support, sous une atmosphère humide, à 5% de CO<sub>2</sub>, à 37°C, pendant 1 heure 30, délai nécessaire à l'adhésion des monocytes. Les cellules non adhérentes sont ensuite éliminées par 2 lavages successifs en PBS 1X.

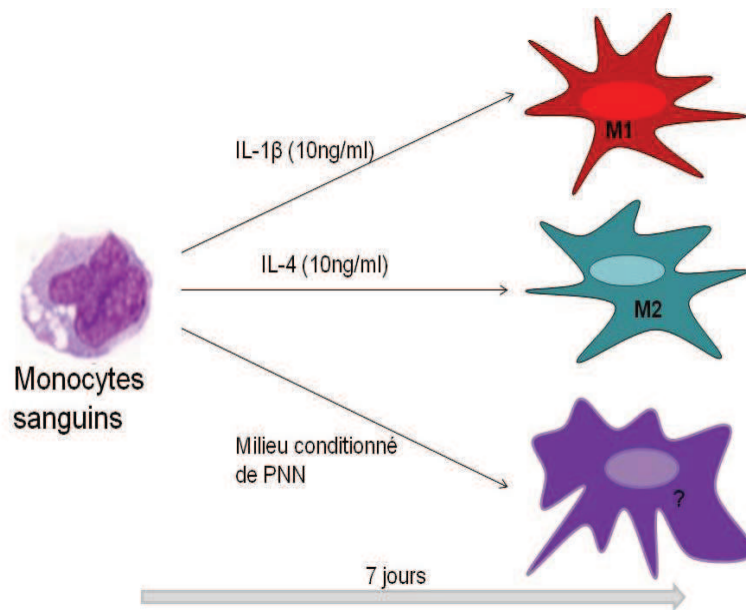
### I.3.2.2. *Isolement des PNN et préparation des milieux conditionnés*

Les cellules polynucléées sont isolées à partir de 4 ml de sang total dilué au demi avec une solution de Tri Sodium Citrate 0,4% (Sigma) sur Percoll d=1,076 (préparé à partir de Percoll d=1,131, GE Healthcare Life Sciences), après centrifugation à 700 g, 30 minutes, à 20°C. Après élimination des couches supérieures, la partie inférieure du gradient cellulaire, c'est-à-dire les globules rouges et les cellules polynucléées, est soumise à 2 étapes d'hémolyse successives à 4°C, pendant 10 minutes, à l'aide d'un tampon de lyse (NH<sub>4</sub>CL [155mM], KHCO<sub>3</sub> [10mM] et EDTA [0,1mM], Sigma) séparées par une étape de centrifugation à 370 g, 10 minutes, à 20°C. Après un lavage au PBS 1X, les cellules polynucléées fraîchement isolées sont remises en suspension dans du RPMI supplémenté en sérum humain AB 10% (Biowest) et sontensemencées à raison de 2.10<sup>6</sup> cellules/puits. La viabilité de la suspension de PNN est évaluée par la méthode d'exclusion au bleu de trypan. La pureté cellulaire est déterminée après coloration au MGG des lames de cytocentrifugation comme décrit précédemment.

Trois cent microlitres de la suspension cellulaire obtenue sont déposés dans des puits (plaque de 24 puits) préalablement coâtés par la poly-L-lysine (Sigma) et lavés successivement par 1 ml de PBS 1X et 300 µl de RPMI + 10% sérum humain AB. Après 2 heures d'incubation, temps nécessaire à l'adhésion et l'activation des cellules, le surnageant de PNN est récupéré. Le milieu conditionné de PNN ainsi obtenu est ultracentrifugé à 12 000 g pendant 12 minutes. Il est ensuite utilisé pour une des conditions de culture des monocytes/macrophages.

### I.3.2.3. *Différenciation in vitro des monocytes sanguins en macrophages.*

Immédiatement après isolement, la différenciation des monocytes sanguins en macrophages est induite par divers milieux de culture (figure 45). Les conditions étudiées ont toutes été réalisées en duplicate. Les différenciations des macrophages M1 et M2 sont induites comme précédemment, respectivement, par l'IL-1β (Peprotech) et l'IL-4 (Peprotech) en milieu RPMI complet (+10% de sérum humain (Eurobio, Courtaboeuf, France)). La condition d'étude concernant la modulation par les PNN est réalisée en présence de milieu conditionné de PNN (V/V) dans du RPMI + 10% sérum humain AB.



**Figure 45 : Conditions de culture et de différenciation des monocytes en macrophages**

Après 7 jours de culture, les cellules sont réincubées avec 1 ml de RPMI de base (sans sérum) pendant 24 heures. La morphologie des cellules a été observée au microscope inversé. Les cellules sont ensuite traitées avec 1 ml de TRIZOL® (Invitrogen) puis congelées à -80°C pour l'extraction d'ARN.

#### I.3.2.4. *Extraction des ARN et mesure de l'expression des gènes par RT-PCR quantitative de type TaqMan®*

Après lyse des macrophages avec 1 ml de Trizol® (Invitrogen), les ARN sont extraits selon la méthode chloroforme/isopropanol. Les ADN complémentaires (ADNc) sont obtenus à partir des extraits d'ARN totaux par transcription inverse (coffret High Capacity cDNA, Applied Biosystems) selon les recommandations du fournisseur et sont conservés à -20°C.

L'expression de divers transcrits est déterminée par PCR TaqMan® quantitative (7900HT Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems) selon la même méthodologie que précédemment. Les amorces et sondes utilisées sont référencées dans le tableau VII. Les résultats sont exprimés sous la forme :  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  où  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(échantillon)} - \Delta Ct_{(calibrateur)}$ .

**Tableau VII : liste des références ou des séquences des amorces et sondes TaqMan® utilisées**

Gène testé	Référence ou séquence amorces + sonde (5' → 3')	Fournisseur
TNF $\alpha$	Hs00174128_m1	Applied Biosystems
MR	Hs00267207_m1	
IL-1Ra	Hs00893625_m1	
F13A1	Hs00173388_m1	
CD200R	Hs00793597_m1	
IL-1 $\beta$	Hs01555410_m1	
IL-10	Hs00961622_m1	
FT	Hs00175225_m1	
PAI-1	Hs01126604_m1	
MMP-9	Hs00234579_m1	
TIMP-1	Hs00171558_m1	
TFPI	Amorce sens: GACTCCGCAATCAACCAAGGT Amorce anti-sens: CTGTCTGCTGGAGTGAGACACC Sonde: FAM-CAGCCTTTTTGAATTTACGGTCCCTCA-MBG	
VEGF	Amorce sens: TTGGGTGCATTGGAGCCT Amorce anti-sens: GCTGCGCTGATAGACATCCAT Sonde: FAM-CCATGCCAAGTGGTCCCACGCT-TAMRA	
Abelson	Amorce sens: TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAAGGT Amorce anti-sens: GATGTAGTTGCTTGGGACCCA Sonde: FAM-CATTTTTGGTTTGGGCTTACACCATT-TAMRA	Eurogentec

### I.3.2.5. *Exploitation statistique des données*

Les résultats sont présentés, pour les variables continues, sous la forme de moyenne  $\pm$  écart-type de la moyenne (SEM). Ils ont été analysés, pour les échantillons appariés, à l'aide du test statistique non paramétrique de Wilcoxon. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Statview, version 4.5. Lorsque  $p < 0,05$ , les tests étaient considérés comme statistiquement significatifs. Les graphiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism Version 5.02 ou Excel 2007.

### I.3.3. Résultats

#### I.3.3.1. *Modulation de la différenciation des macrophages M1/M2 par le milieu conditionné de PNN*

Les PBMC et les PNN sont isolés à partir de sang humain selon 2 protocoles différents décrits ci-dessous. Les puretés cellulaires correspondantes sont supérieures, respectivement, à 91% et 96% après isolement (figure 46-A).

La différenciation *in vitro* des macrophages M1 et M2 par, respectivement, l'IL-1 $\beta$  et l'IL-4 a été validée par la mesure de l'expression des marqueurs spécifiques de ces 2 sous-types de macrophages. Les macrophages M2 expriment significativement plus de MR, d'IL1-RA, de sous-unité A du FXIII et de CD200R, en comparaison aux macrophages M1 qui expriment plus de TNF $\alpha$  (tableau VIII).

Les macrophages induits en présence de milieu conditionné de PNN expriment fortement le TNF $\alpha$  (sans différence d'expression significative avec les macrophages M1) et faiblement les marqueurs M2. L'expression de ces derniers marqueurs dans ces macrophages induits en présence de milieu conditionné de PNN est significativement plus faible que dans les macrophages M2 (tableau VIII).

**Tableau VIII : Expression relative des marqueurs de caractérisation des phénotypes M1 et M2 dans les macrophages M1 et M2 et les macrophages différenciés en présence de milieu conditionné de polynucléaire neutrophile.**

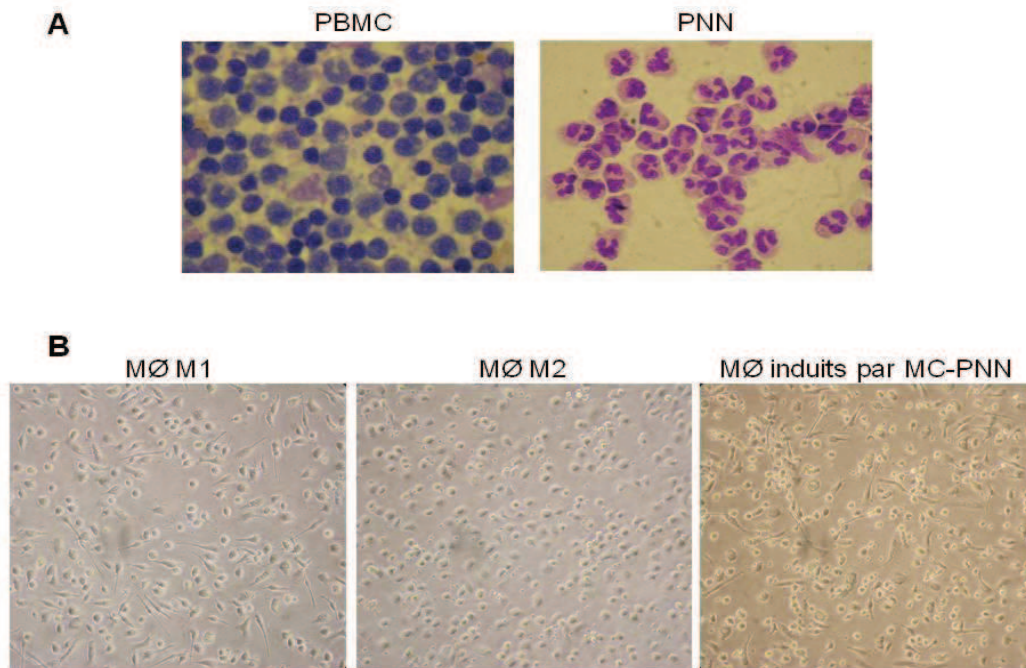
Marqueurs M1/M2	M1(IL-1 $\beta$ )	M2 (IL-4)	Milieu conditionné de PNN
<i>Marqueur M1</i>			
TNF $\alpha$	3,27 $\pm$ 0,78	1,48 $\pm$ 0,33 <sup>**</sup>	3,68 $\pm$ 0,99 <sup>††</sup>
<i>Marqueurs M2</i>			
MR	11,7 $\pm$ 1,48	15,8 $\pm$ 2,76 <sup>*</sup>	3,02 $\pm$ 0,78 <sup>**/††</sup>
IL1-Ra	38,0 $\pm$ 5,55	89,1 $\pm$ 12,8 <sup>**</sup>	31,1 $\pm$ 5,76 <sup>††</sup>
F13A1	0,002 $\pm$ 0,0008	0,83 $\pm$ 0,43 <sup>**</sup>	0,007 $\pm$ 0,001 <sup>*/†</sup>
CD200R	0,0008 $\pm$ 0,0005	0,0036 $\pm$ 0,0017 <sup>*</sup>	0,0001 $\pm$ 0,0006 <sup>†</sup>

Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM (n=10). <sup>\*</sup>p<0,05, <sup>\*\*</sup>p<0,01 comparé aux macrophages M1, <sup>†</sup>p<0,05, <sup>††</sup>p<0,01, comparé aux macrophages M2

D'un point de vue microscopique, la morphologie des MDM diffère selon les conditions de différenciation. En effet, les macrophages M1 induits par IL-1 $\beta$  adoptent une morphologie « fibroblastoïde » avec pour la plupart des prolongements cytoplasmiques alors que les



macrophages M2 présentent une forme plus arrondie (forme amoeboïde) (figure 46-B). Les macrophages induits en présence de milieu conditionné de PNN présentent une morphologie proche de celle des macrophages M1 (figure 46-B).



**Figure 46 : (A) Isolement des populations cellulaires d'intérêt à partir de sang circulant.** Lames de cyto centrifugation des suspensions cellulaires obtenues colorées au May Grunwald Giemsa **(B) Contrôle morphologique des MDM différenciés en M1, M2 et induits en présence de milieu conditionné (MC) de PNN.** Observations microscopiques des MDM après 7 jours de culture (microscope à contraste de phase - Gx200).

Les macrophages différenciés en présence de milieu conditionné de PNN présentent donc une morphologie et un profil de caractérisation de type M1.

### *1.3.3.2. Influence des PNN sur l'expression des médiateurs de l'athérosclérose dans les macrophages*

Les macrophages différenciés en présence de milieu conditionné de PNN expriment différemment la majorité des médiateurs de l'athérosclérose étudiés (IL-1 $\beta$ , IL-10, FT, TFPI, PAI-1, VEGF et MMP-9) en comparaison aux macrophages M1, alors que nous ne retrouvons pas de différence significative entre ces macrophages et les macrophages M2 dans l'expression de ces médiateurs, à l'exception de l'IL-1 $\beta$ , de la MMP-9 et de TIMP-1 (tableau IX). Sur les

critères des marqueurs de caractérisation, le milieu conditionné de PNN semble orienter les macrophages vers une différenciation M1 (tableau VIII). Cependant ces derniers résultats (tableau IX) montrent que le profil M1 obtenu est modifié avec une expression de certains médiateurs (IL-10, acteurs de l'hémostase et de l'angiogenèse) non significativement différente des macrophages M2 suggérant que le milieu conditionné de PNN module le profil d'expression des macrophages vers un profil M1 modifié type « M2-like ».

**Tableau IX: Expression relative des médiateurs de l'athérosclérose dans les macrophages M1 et M2 et dans les macrophages différenciés en présence de milieu conditionné de polynucléaire neutrophile**

Marqueurs	M1(IL-1 $\beta$ )	M2 (IL-4)	Milieu conditionné de PNN
Equilibre inflammatoire			
IL-1 $\beta$	1,29 $\pm$ 0,23	0,25 $\pm$ 0,07**	0,41 $\pm$ 0,06**/†
IL-10	0,32 $\pm$ 0,09	1,11 $\pm$ 0,17**	0,97 $\pm$ 0,08**
Acteurs de l'hémostase			
FT	2,11 $\pm$ 0,36	1,32 $\pm$ 0,27*	1,16 $\pm$ 0,21*
TFPI	2,97 $\pm$ 0,34	4,40 $\pm$ 0,64*	4,37 $\pm$ 0,62*
PAI-1	10,1 $\pm$ 3,7	5,0 $\pm$ 2,3*	3,9 $\pm$ 0,88*
Médiateurs pro- et anti-angiogéniques			
VEGF	0,44 $\pm$ 0,04	0,66 $\pm$ 0,04**	0,74 $\pm$ 0,12**
Médiateurs pro- et anti-protéolytiques			
MMP-9	430 $\pm$ 125	11,9 $\pm$ 5,2**	230 $\pm$ 40*/††
TIMP-1	53,1 $\pm$ 8,6	29,4 $\pm$ 6,1*	53,0 $\pm$ 10,7†

Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM (erreur standard) (n=10). \*p<0,05, \*\*p<0,01 comparé aux macrophages M1, †p<0,05, ††p<0,01 comparé aux macrophages M2.

#### I.3.4. Discussion

Au cours de leur activation, les PNN libèrent le contenu de leurs granules, leur permettant de communiquer avec leur environnement et notamment avec les cellules inflammatoires voisines (Borregaard and Cowland, 1997). Malgré leur courte demi-vie, estimée à quelques heures, leur survie *in vivo* dans les sites inflammatoires peut être prolongée par différents signaux tels que leur activation après transmigration ou par certains facteurs de croissance et cytokines. Cette

durée de vie prolongée, combinée à une capacité à synthétiser et à libérer des cytokines immunorégulatrices, est probablement essentielle aux PNN pour interagir avec d'autres cellules. Très peu d'études ont investigué la relation entre la dégranulation des neutrophiles et la polarisation des macrophages. Nous décrivons ici une modulation du phénotype des macrophages par le milieu conditionné de PNN.

Sur la base des marqueurs de caractérisation des macrophages, le milieu conditionné de PNN semble induire un phénotype M1. Nous observons ainsi dans ces macrophages l'induction de l'expression du TNF $\alpha$  (marqueur M1) comparable à celle des macrophages M1 et une expression significativement plus faible des marqueurs M2 (MR, IL-1Ra, F13A1 et CD200R) en comparaison aux macrophages M2. Ceci est en accord avec les propriétés connues des PNN dans le processus inflammatoire et leur capacité de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , induisant la polarisation M1 des macrophages.

Par ailleurs, il est clairement établi que les PNN activés, via la libération de protéines contenues dans leurs granules, régulent les fonctions des macrophages (Soehnlein *et al*, 2009a). Les données récentes suggèrent un rôle important des PNN dans le développement et la progression de l'athérosclérose et dans le déclenchement de la thrombose. Les PNN et les macrophages, coexistant dans les plaques athéroscléreuses humaines, interagissent entre eux. Nous nous sommes donc intéressés à la modulation *in vitro* par les PNN de l'expression de médiateurs de l'athérosclérose dans les macrophages. Nous montrons ici que les interactions PNN/macrophages modulent l'expression dans les macrophages de différents médiateurs de l'athérosclérose.

Les macrophages sous l'influence du milieu conditionné de PNN expriment significativement moins de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$  et plus de cytokines anti-inflammatoires (IL-10) par rapport aux macrophages M1. Ceci a déjà été montré chez la souris par 2 équipes. Daley *et coll.* ont observé dans les macrophages, une augmentation *in vivo* de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$  et IL-6) lors d'une déplétion neutrophilique et à l'inverse, une inhibition *in vitro* de la sécrétion de ces cytokines et de la libération de ROS en présence de surnageants de culture de PNN (Daley *et al*, 2005). De même, des co-cultures de macrophages M1 avec des neutrophiles apoptotiques induisent chez ces macrophages une diminution de l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-12 sans altérer l'expression du TNF $\alpha$  en accord avec nos résultats (Shibata *et al*, 2010).

De plus, l'élimination des PNN apoptotiques est une étape importante dans la résolution de l'inflammation. L'interaction des PNN apoptotiques avec les monocytes altère la réponse de ces derniers au LPS et induit une libération excessive d'IL-10 et de TGF- $\beta$  et une faible production de TNF $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  (Byrne and Reen, 2002). La phagocytose des PNN apoptotiques stimule les macrophages vers un phénotype IL-10<sup>high</sup>IL-12<sup>low</sup> M2-like, favorisant la réparation tissulaire en régulant l'inflammation (Filardy *et al*, 2010). L'augmentation du TGF- $\beta$  dans la première étude renforce l'idée de l'induction d'un phénotype plutôt immunosuppresseur. En effet, le TGF- $\beta$ , non seulement inhibe la libération de cytokines pro-inflammatoires, mais favorise également la réparation des tissus par le recrutement de fibroblastes et la promotion du dépôt des protéines de la MEC (fibronectine et collagène).

Nos résultats renforcent donc l'idée d'une modulation du phénotype inflammatoire des macrophages par les PNN via la libération de médiateurs solubles. L'importance des protéines granulaires des PNN dans les interactions avec les autres cellules immunitaires et notamment les monocytes/macrophages est mise en évidence dans les déficits humains en PNN et renforcée par différents travaux. Des déficits quantitatifs (neutropénie) ou qualitatifs (désordres immunitaires en lien avec des déficits en granules spécifiques des PNN) sont associés à l'apparition d'infections bactériennes, expliquée par une dysfonction antimicrobienne des macrophages. Le défaut de granules des PNN est associé à une altération des fonctions des macrophages comme leur maturation, leur migration, leur production de cytokines et leur capacité de phagocytose chez l'homme (Shiohara *et al*, 2004) et chez la souris (Tavor *et al*, 2002).

Ces données évoquent les fonctions paradoxales des PNN, à la fois considérés comme cellules inflammatoires mais pouvant aussi se comporter comme des cellules anti-inflammatoires en régulant le phénotype inflammatoire des macrophages.

Secondairement, nous décrivons dans les macrophages soumis au milieu conditionné de PNN des niveaux d'expression des médiateurs d'hémostase (FT, TFPI et PAI-1) et d'angiogenèse (VEGF, MMP-9) significativement différents de ceux retrouvés dans les macrophages M1 et comparables à ceux des macrophages M2, toujours en faveur de l'induction d'un phénotype M2-like.

Diverses protéines des PNN sont décrites comme modulant les fonctions des macrophages, telles que la cathepsine G ou les défensines (Chertov *et al*, 1997). Les produits de sécrétion des PNN (azurocidine et  $\alpha$ -défensines) activent directement les macrophages et induisent une forte augmentation de leur capacité de phagocytose (Soehnlein *et al*, 2008a; Soehnlein *et al*, 2008b). Par ailleurs, il a été montré dans des souris déficitaires en granules spécifiques des PNN, une réduction d'expression des récepteurs « scavengers » par les macrophages associée à une diminution de leur capacité à accumuler les LDLox (Gombart *et al*, 2005).

Notons également que les PNN activés contribuent au processus de coagulation et à la thrombose via la libération, en quantité importante, de FT et de protéases (dont l'élastase neutrophile et la cathepsine G) qui inactivent le TFPI, favorisant ainsi la cascade de coagulation. Par ailleurs, la formation et l'émission dans le milieu extracellulaire de NET (neutrophils extracellular traps) peuvent également expliquer le rôle des PNN dans la formation des thrombi artériels. Ces structures nucléosomiques externalisées, composées d'ADN et d'histones et recouverts de protéases issues des granules (élastase, cathepsine G, MPO, ...) sont pro-coagulantes, via leur surface chargée négativement capable d'activer la voie contact (Maugeri *et al*, 2006). Ces NETs viennent d'être identifiés dans les lésions athéroscléreuses humaines (Megens *et al*, 2012). La formation des NET est associée à un état prothrombotique dans la maladie coronarienne et à la survenue des événements CV (Borissoff *et al*, 2013). Par ailleurs, dans un modèle murin d'athérosclérose (ApoE<sup>-/-</sup> et régime riche en graisses), l'injection de NETs se traduit par une augmentation de la taille des lésions (Doring *et al*, 2012) alors que l'utilisation d'un inhibiteur de formation des NETs (la peptidylarginine déaminase 4) entraîne une diminution de la taille des lésions (Knight *et al*, 2014).

## I.4. Conclusion

La première partie de ce travail réalisée sur les plaques carotidiennes révèle que l'expression des marqueurs de macrophages M1 et M2 semblent être associée à la symptomatologie des patients, avec notamment une polarisation des macrophages orientée vers un phénotype M1 au sein des lésions des patients symptomatiques. Le ratio M1/M2 intra-plaque est fortement corrélé à la sévérité de la sténose carotidienne.

Nous avons ensuite évalué le potentiel athérogène des 2 sous-populations de macrophages M1 et M2. Nos résultats *in vitro* suggèrent les rôles potentiels des macrophages M1 et M2 dans la progression des plaques athéroscléreuse, en lien avec notamment des expressions variables de médiateurs relatifs à l'inflammation, à la coagulation et au remodelage vasculaire. Nous confirmons les propriétés pro- et anti-inflammatoires respectives des macrophages M1 et M2. Nous montrons que les macrophages M1 sont impliqués dans la vulnérabilité des plaques par l'expression de protéases de la MEC et de leurs inhibiteurs physiologiques. Ces macrophages M1 sont également en lien avec la thrombogénécité des plaques par leur activité pro-coagulante et anti-fibrinolytique alors que les macrophages M2, jouent un rôle dans le contrôle des dépôts de fibrine au niveau des plaques d'athérosclérose. Ces macrophages M2 possèdent également des propriétés proangiogéniques.

Concernant l'impact du diabète, ce facteur de risque ne semble pas modifier *in vitro* la polarisation des macrophages M1 ni M2. En revanche, nous mettons en évidence une influence du diabète sur l'expression des gènes de facteurs pro-angiogéniques et protéolytiques dans les macrophages M1. Nos résultats suggèrent que les macrophages M1 des patients diabétiques potentialisent le remodelage vasculaire et l'angiogénèse (ratios MMP-9/TFPI-2 et VEGF/TFPI-2, reflets de la balance protéolytique et angiogénique, plus élevés), en lien avec une athérogenèse accélérée et une plus grande vulnérabilité des plaques observées chez ces patients. Cependant, l'analyse immunohistologique des plaques n'a pas mise en évidence de modification du contenu en macrophages M1 et M2 selon le statut diabétique des patients.

Enfin, nous montrons l'importance des PNN et notamment de leurs produits de sécrétion dans la régulation du phénotype inflammatoire des monocytes/macrophages. Nos résultats indiquent que le milieu conditionné de PNN module le phénotype des macrophages vers un profil M1 modifié type « M2-like », suggérant que les PNN assistent les macrophages dans la résolution de l'inflammation.

## **II. Macrophages M1/M2 et pathologies valvulaires :Rôle des macrophages M1 dans la progression de la fibrose dans la sténose valvulaire aortique**

### **II.1. Introduction**

La sténose valvulaire aortique (SVA), valvulopathie la plus fréquemment rencontrée dans les pays occidentaux touchant essentiellement les sujets âgés, est désormais considérée comme un processus pathologique actif de remodelage tissulaire biologiquement régulé (Helske *et al*, 2007). Elle se caractérise par une désorganisation complète de l'architecture tissulaire de la valve qui s'épaissit. De plus, cette pathologie partage de fortes similitudes physiopathologiques avec l'athérosclérose vasculaire. En effet, les lésions valvulaires observées dans cette pathologie sont le siège de processus d'inflammation, d'angiogenèse, de fibrose et de calcification.

L'infiltration de cellules inflammatoires telles que les macrophages a été décrite comme abondante dans les valves aortiques sténosées et calcifiées (Kaden *et al*, 2005a; Helske *et al*, 2007). La présence de cet infiltrat inflammatoire au sein des valves serait associée à la progression de la SVA (Cote *et al*, 2013). Les macrophages, en libérant des MMP impliquées dans la dégradation du collagène et des fibres d'élastine, participeraient ainsi au remodelage pathologique de la MEC des valves sténosées, compromettant l'intégrité de la valve (Fondard *et al*, 2005). La MMP-9 a été détectée dans les calcifications valvulaires et son expression et son activité sont augmentées dans les valves sténosées par rapport aux valves saines (Soini *et al*, 2001; Satta *et al*, 2003). Les MMP et les TIMP, leurs inhibiteurs physiologiques, semblent ainsi participer à la progression de la fibrose et à la rigidité des feuillets valvulaires observées dans la SVA.

Les macrophages sont caractérisés par une diversité phénotypique et fonctionnelle en réponse à des signaux du microenvironnement. Cette hétérogénéité phénotypique des macrophages, bien documentée dans l'athérosclérose vasculaire, est très peu décrite dans la SVA. A ce jour, seules 2 études ont décrit la présence de macrophages M2 et/ou M1 dans les lésions valvulaires sans préciser leur rôle exact (Kapusta *et al*, 2012; Wang *et al*, 2014). Ainsi, nous émettons l'hypothèse, qu'en miroir des lésions athéroscléreuses, il existe différentes sous-populations de macrophages au sein des lésions valvulaires, capables de moduler le développement de ces

lésions et que les macrophages sont capables d'acquérir des compétences différentes en lien avec leurs interactions avec les VIC, principal type cellulaire de la valve. Après avoir caractérisé les macrophages M1/M2 dans les valves aortiques humaines par analyse immunohistologique, nous avons étudié le lien entre la coopération macrophages/VIC et le remodelage tissulaire décrit dans la SVA.

## **II.2. Matériel et méthodes**

### **II.2.1. Patients et échantillons de valve étudiés**

Cinquante patients avec SVA sévère bénéficiant d'un remplacement valvulaire chirurgical (services de Chirurgie Vasculaire et de Chirurgie Cardiaque du CHRU de Lille) ont été inclus dans le protocole ATHERAO («Étude des spécificités de l'athérosclérose de la valve aortique») approuvé par le comité d'éthique local (CPP2008\_13/0839). Avant la chirurgie, un consentement éclairé écrit a été obtenu auprès de chaque patient inclus. Parallèlement des valves aortiques saines (contrôle) (n=10) ont été obtenues, dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Jashari, à partir de donneurs d'organes multiples de la banque de tissus European Homograft Bank (EHB), ces échantillons n'ayant pas été retenus pour une greffe. Les principales données clinicobiologiques des patients ont été recueillies.

### **II.2.2. Collecte et traitement des valves aortiques humaines**

Immédiatement après l'explantation chirurgicale, les valves sont rincées dans une solution saline (sérum physiologique). Les sigmoïdes sont divisées en 3 parties et utilisées pour l'analyse immunohistochimique, le dosage d'ARN et de protéines sur broyats et l'isolement et la culture des VIC. Le tiers de valve réservé pour le broyage par Ultraturax® est séparé macroscopiquement en 2 parties : une partie calcifiée et une partie tissulaire. Les broyats de valve sont préparés selon la même procédure que les broyats de plaques carotidiennes. Des échantillons sanguins, prélevés à jeun la veille du bloc chirurgical, sont également collectés pour divers dosages biologiques. Tous les échantillons sont stockés à -80 ° C jusqu'à analyse.



### II.2.3. Immunohistochimie

Les sigmoïdes dédiées sont congelées à -80°C dans l'azote liquide après inclusion dans un milieu d'enrobage (méthylméthacrylate, OCT Embedding Matrix, CellPath, Newtown, Royaume-Uni). Les coupes de 10 µm sont réalisées sur un microtome CM3050S (Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne) et déposées sur des lames Superfrost préalablement gélatinées, puis conservées à -20°C jusqu'à utilisation. Différents marquages sur des coupes adjacentes sont réalisés pour la mise en évidence des macrophages (anti-CD68, Dako, Carpinteria, CA) et du sous-type M2 (anti-MR, Santa Cruz Biotechnology) à l'aide des kits Vectastain ABC Elite Peroxydase (Vector Lab, Burlingame, CA). Le marquage au Trichome de Masson (Sigma) est également réalisé. Ce dernier colore les noyaux en bleu-noir, les cytoplasmes en rouge, les hématies en orange, le collagène en bleu-vert intense et les fibres élastiques en bleu-rose. Les noyaux sont contre-colorés à l'hématoxyline. Les coupes valvulaires sont ensuite déshydratées et fixées par incubation dans 3 bains successifs d'éthanol aux concentrations de 75%, 95% et 100% (30 secondes chacun) puis séchées et montées sur lamelle au Clearium® (Leica Microsystems) pour une observation au microscope inversé (Eclipse Ti, Nikon, Melville, NY).

### II.2.4. Préparation des milieux conditionnés de VIC (MC-VIC)

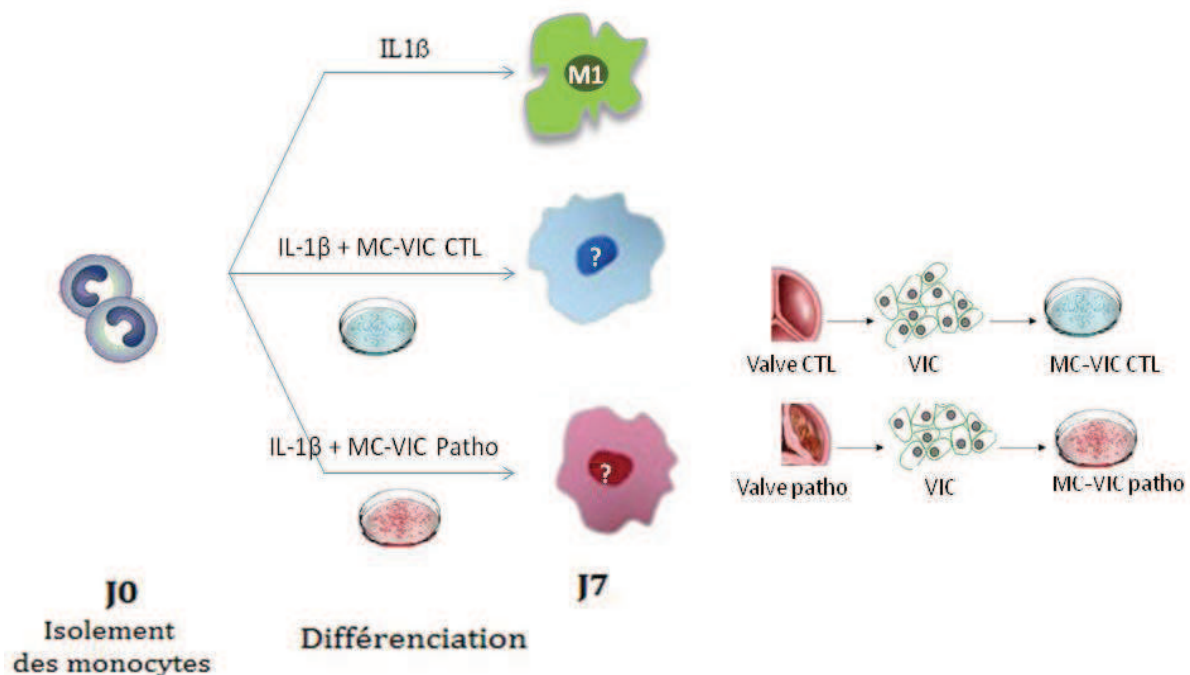
Les VIC sont isolées après digestion de la partie valvulaire dédiée par la collagénase de type I (0,3%, 120 minutes, 37°C sous agitation constante) et sont cultivées dans une boîte de culture de 25 cm<sup>2</sup> (Becton Dickinson, NJ, Etats-Unis), en présence d'un milieu de culture spécifique : le Smooth Muscle Cell Basal Medium 2 (Promocell, Heidelberg, Allemagne) supplémenté en facteurs de croissance [hEGF (human Epidermal Growth Factor), 0,5 ng/ml ; hbFG (human basic Fibroblast Growth Factor), 2ng/ml ; insuline, 5 µg/mL, (Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 Supplement Pack, Promocell)], ainsi qu'en sérum de veau fœtal (SVF) 5% (Lonza, Bâle, Suisse) et en antibiotiques [pénicilline-streptomycine, 2% et fungizone, 1% (Life Technologies, Carlsbad, Etats-Unis)]. Les cellules sont incubées à 37°C dans 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture est remplacé tous les 2-3 jours et le passage des cellules est réalisé lorsque leur confluence atteint 80-90%. Toutes les expériences sont réalisées sur des cellules provenant des passages 3-4. Des cultures confluentes de VIC sont lavées 3 fois avec un tampon HBSS (Gibco) puis les cellules sont sevrées en milieu de culture (Smooth Muscle Cell Basal Medium 2 supplémenté à 0,1% de SVF, 2% de pénicilline-streptomycine et 1% de fungizone). Après

une incubation de 24 heures, les milieux conditionnés de VIC (MC-VIC) sont recueillis, centrifugés (10 min, 400 g, 4°C) pour éliminer les débris cellulaires, poolés (n=6 par condition) et conservés à -80°C.

### II.2.5. Isolement et culture des macrophages M1/M2

L'isolement des monocytes est réalisé à partir de buffy-coat hépariné (250 ml, Etablissement Français du Sang (EFS), Lille) par centrifugation sur Ficoll-Paque (Pharmacia-Biotech) selon la même procédure que celle décrite précédemment.

Les monocytes sont ensuite cultivés avec 500 µl de milieu RPMI supplémenté en sérum albumine humaine (SAH, 10%, Abcyss, Courtaboeuf, France) contenant l'IL-1β humaine recombinante (10 ng/ml, Peprotech) et 500 µl de Smooth Muscle Cell Basal Medium (condition contrôle macrophages M1) ou 500 µL de MC-VIC issues de valves contrôles ou pathologiques (figure 47). Après 7 jours de culture, les surnageants de culture sont recueillis, centrifugés et conservés à -80°C jusqu'à l'analyse. Les cellules sont ensuite traitées avec 1 ml de TRIZOL® (Invitrogen) puis congelées à -80°C pour l'extraction d'ARN.



**Figure 47 : Culture des macrophages dérivés des monocytes en présence de milieu conditionné de VIC (MC-VIC)**

### II.2.6. Quantification de l'expression des ARNm

Les broyats de valves et les macrophages sont traités par Trizol (Invitrogen). Les étapes d'extraction d'ARN, de rétrotranscription et de quantification des transcrits sont réalisées selon les mêmes procédures que citées précédemment. Des mélanges prêts à l'emploi contenant les deux amorces et la sonde (TaqMan Gene Expression Assay, Life Technologies) sont utilisés : TNF $\alpha$ : Hs00174128\_m1, IL-6: Hs00985639\_m1, MR: Hs00267207\_m1, IL-1Ra: Hs00893625\_m1, IL-10: Hs00961622\_m1, MMP-9: Hs00234579\_m1, TIMP-1: Hs00171558\_m1, VEGF: Hs00900055\_m1. PAL: Hs01029144\_m1, BGLAP (ostéocalcine): Hs\_01587814\_g1, COL1A1 (Collagène I): Hs00164004\_m1, COL3A1 (Collagène III): Hs00943809\_m1, COL6A3 (Collagène VI): Hs00915125\_m1 (Applied Biosystems).

### II.2.7. Détection de l'activité gélatinolytique des MMP

Après activation des surnageants de macrophages ou de VIC par une solution 1 mM d'APMA (4 amino-phenylmercuric-acétate) 3 heures sous agitation constante à 37°C, l'activité enzymatique des MMP sécrétées dans ces surnageants est mesurée par fluorescence de la dégradation de la DQ gélatine (10  $\mu$ g/ml, Thermo Fisher Scientific, Fontenay-sous-Bois, France), en présence ou en absence d'inhibiteurs de la MMP-9 (GM6001, MMP-9 inhibitor I, Thermo Fisher Scientific). L'activité réelle de la MMP-9 est calculée en soustrayant les fluorescences obtenues en absence et en présence d'inhibiteur. Les mesures sont effectuées en plaque noire 96 puits à température ambiante. L'activité de la MMP-9 est exprimée en mU collagénase par mg de protéine totale. La concentration en protéines totales dans les surnageants est déterminée au préalable par la technique de BCA, technique de dosage colorimétrique par l'acide bicinchonique, réactif colorigène hautement spécifique du cation Cu<sup>+</sup>, produit par la réduction du Cu<sup>2+</sup> par les protéines en milieu alcalin (Pierce® BCA kit, Thermo Fisher Scientific).

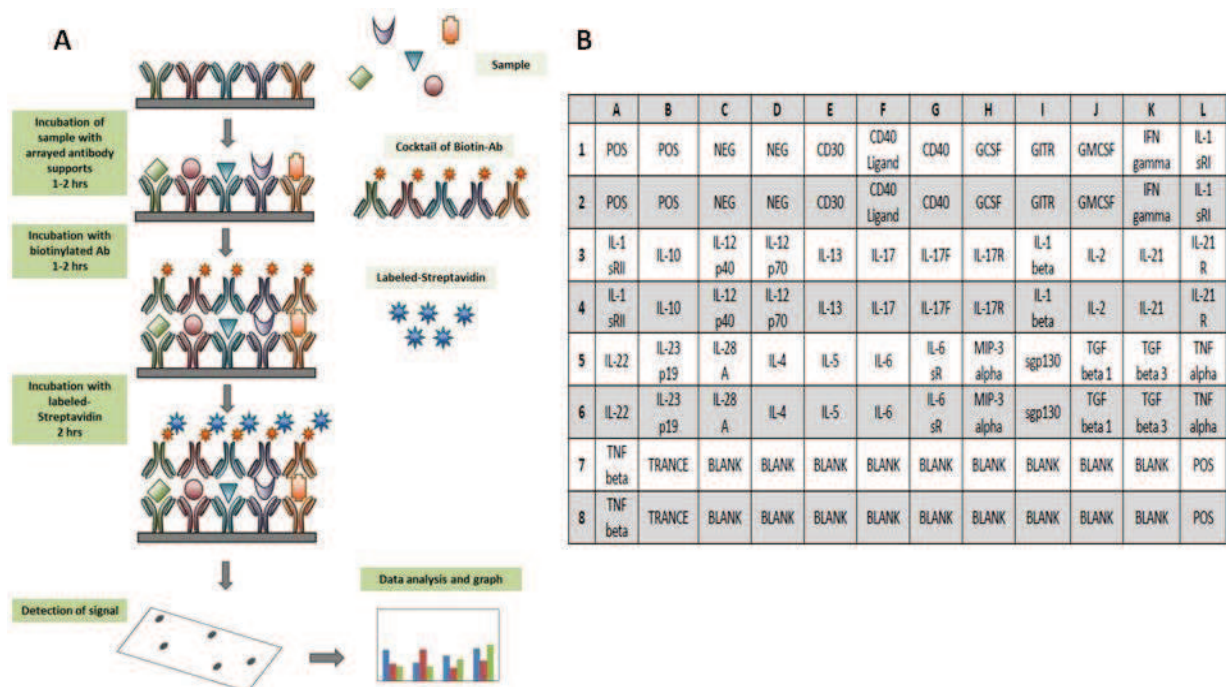
### II.2.8. Dosage du collagène

Le collagène soluble et sécrété dans les surnageants est dosé à l'aide du kit de dosage Sircol® (Biocolor, Newtownsbury, Royaume-Uni) selon les instructions du fabricant. Chaque échantillon est incubé avec le réactif d'isolement et de concentration pendant 24 h à 4°C sous agitation. Après centrifugation, le colorant Sircol qui se lie au collagène est ajouté à chaque échantillon. Le précipité insoluble de colorant-collagène obtenu après 30 minutes d'agitation

douce est récupéré après centrifugation (10 min, 12000 g). Après lavage en milieu acide et centrifugation, le culot est mis en suspension dans le réactif alcalin du kit. La concentration en collagène est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (à 555 nm) grâce à une droite d'étalonnage réalisée à partir d'une gamme étalon de collagène.

### II.2.9. Technique de micro-array protéique

La technologie des puces à anticorps sur membrane (ou micro-array protéique) est basée sur le principe de dosage immunologique en sandwich. Le kit commercial Human Cytokine Antibody Array C-Series® (RayBiotech, Norcross, GA, Etats Unis) est utilisé selon les recommandations du fournisseur, pour étudier le profil protéomique des MIC-VIC (profil cytokines de type Th1/Th2/Th17). Un panel d'anticorps de capture est immobilisé à des emplacements spécifiques sur la surface de la membrane. L'incubation de la membrane avec les surnageants permet la capture des protéines sécrétées par les anticorps correspondants. La liaison des protéines est détectée avec un cocktail d'anticorps biotinylés en présence de streptavidine biotinylée couplée à une peroxydase. La réaction est révélée par l'ajout d'un substrat chimioluminescent. L'intensité des spots, proportionnelle à la quantité de protéines d'intérêt, permet de faire une analyse semi-quantitative des marqueurs (figure 48).



**Figure 48 : Puces à Anticorps sur membrane ou micro-array protéique. (A) Principe de la technique (B) Profil de cytokines testées**

#### II.2.10. Exploitation statistique des données

Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM ou en médiane (interquartiles) pour les variables continues et en nombre absolu (pourcentage) pour les variables catégorielles. Pour les variables continues, le test de Wilcoxon est mis en œuvre pour comparer 2 groupes appariés, le test de Mann-Whitney pour les comparaisons entre les 2 groupes non appariés et le test de Kruskal-Wallis pour la comparaison intergroupe ( $> 2$  groupes). Des corrélations sont effectuées en utilisant la méthode de Spearman. Toutes les analyses statistiques sont effectuées à l'aide du logiciel Statview (version 4.5). Les tests sont considérés comme statistiquement significatifs lorsque  $p < 0,05$ . Les graphiques sont réalisés avec le logiciel GraphPad Prism 6.

### **II.3. Résultats**

#### II.3.1. Description de la population

Les données clinico-biologiques des patients inclus ayant bénéficié d'un remplacement chirurgical de valve aortique sont présentées dans le tableau X. Ces patients présentent un âge médian de 75,5 ans et un sex ratio H/F de 0,85. Seulement 30% d'entre eux ont une maladie coronarienne associée. L'HTA est le facteur de risque CV majoritaire. Selon les critères classiques de sévérité de la SVA, la majorité des patients (82%) présentent une SVA sévère.

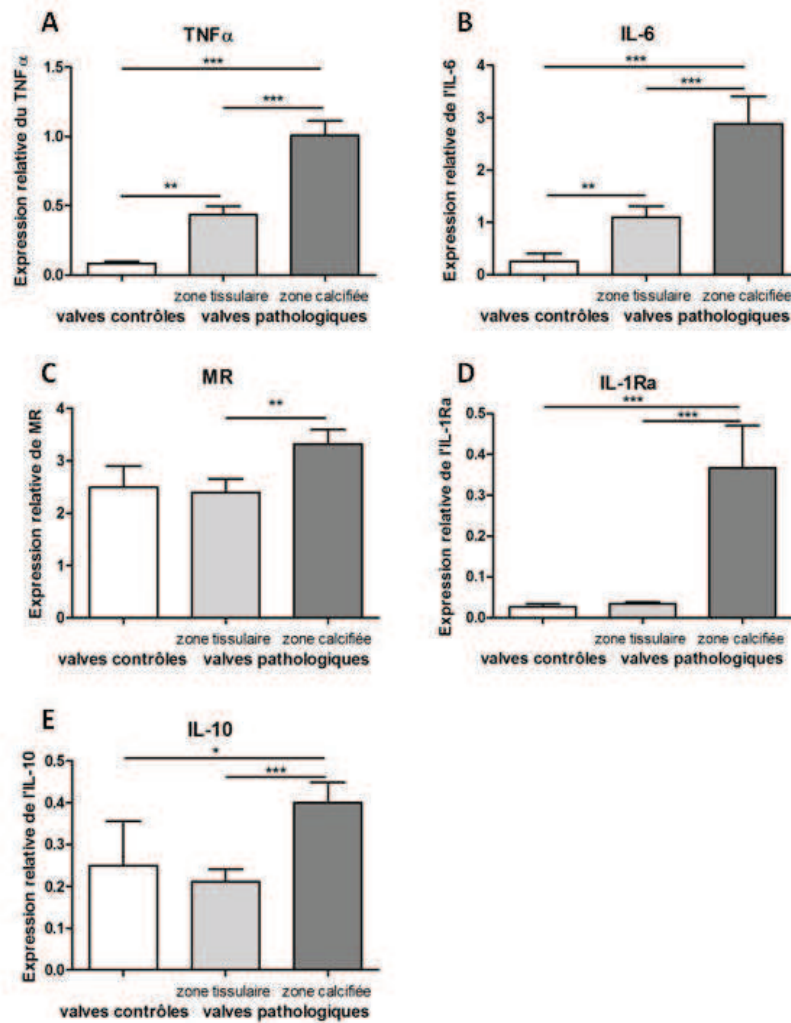
**Tableau X : Données clinico-biologiques des patients inclus dans le protocole ATHERAO bénéficiant d'un remplacement valvulaire aortique**

	Patients (n=50)
<i>Données cliniques</i>	
Age (ans)	75,5 (64-81)
Sexe masculin	23 (46)
Tricuspidie	30 (60)
Antécédent de maladie coronarienne	15 (30)
Hypertension artérielle	37 (74)
Diabète	15 (30)
Tabagisme	4 (1)
Indice de Masse Corporelle (kg/m <sup>2</sup> )	27,2 (23,5-31,6)
<i>Sévérité de la SVA</i>	
Légère / modérée / sévère	0 (0) / 9 (18) / 41 (82)
Vmax aortique (m/sec)	4,6 (4,1-5)
Gradient moyen de pression (mmHg)	53,5 (44,5-66)
Surface valvulaire (cm <sup>2</sup> )	0,72 (0,57-0,85)
Fraction d'éjection du ventricule gauche (%)	60 (52-66)
<i>Leucocytes sanguins</i>	
PNN (G/L)	3,75 (3,1-5,1)
Lymphocytes (G/L)	1,7 (1,3-2,5)
Monocytes (G/L)	0,87 (0,68-1,08)

Les variables continues sont représentées en médiane (quartiles) et les variables nominales en nombre (%).

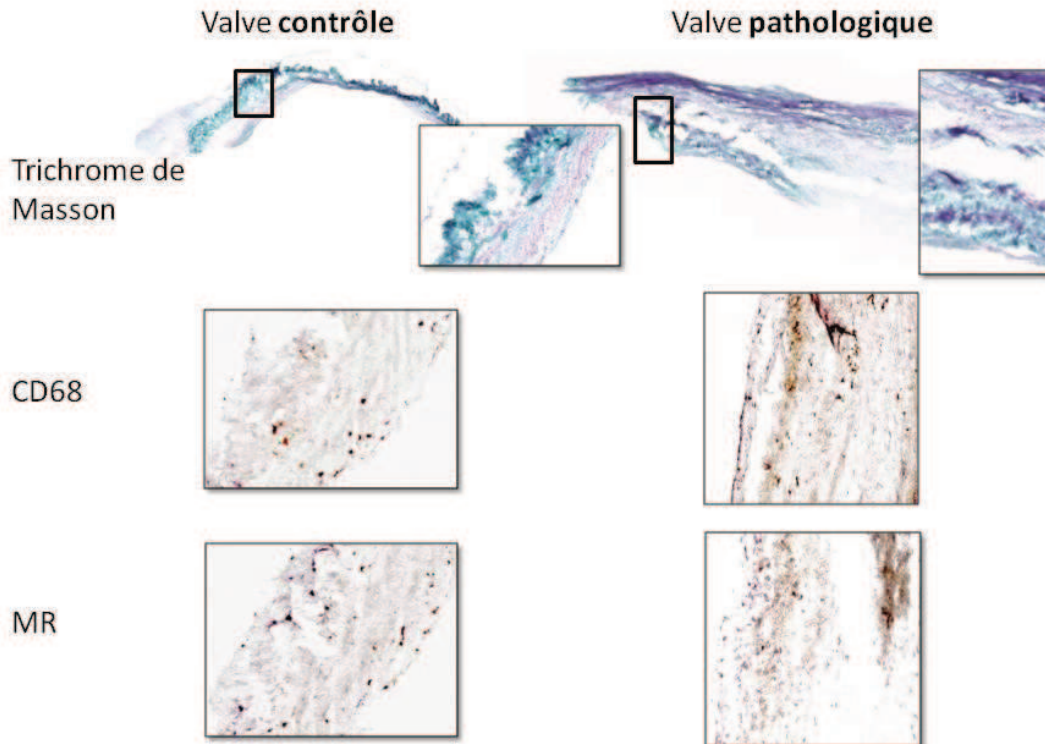
### II.3.2. Expression des marqueurs des macrophages M1 et M2 dans les valves aortiques humaines

L'expression des marqueurs M1 et M2, les plus utilisés dans la littérature pour étudier l'infiltration et la polarisation des macrophages, a été quantifiée par RT-PCR dans les broyats de valves. Nous notons une augmentation significative de l'expression à la fois des marqueurs M1, TNF $\alpha$  et IL-6 et des marqueurs M2, MR, IL-1Ra et IL-10 dans les zones calcifiées des valves pathologiques par rapport aux zones tissulaires (figure 49). Les valves contrôles expriment très peu les marqueurs M1 et expriment fortement certains marqueurs M2 (figure 49).



**Figure 49 : Expression relative des ARNm des marqueurs M1 : TNF $\alpha$  (A) et IL-6 (B), et des marqueurs M2 : MR (C), IL-1Ra (D) et IL-10 (E) dans les broyats de valves aortiques contrôles (n=10) et pathologiques (n=50). Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM, \* : p<0,05 \*\* : p<0,005, \*\*\* : p<0,0005.**

La présence de macrophages M1 et M2 dans les valves aortiques est également confirmée par immunohistochimie. La coloration préalable au Trichrome de Masson, évaluant la quantité et la répartition des fibres de collagène, nous a permis d'orienter les valves et de différencier le versant aortique de la valve (partie riche en collagène, la *fibrosa*) du versant ventriculaire (partie riche en élastine, la *ventricularis*) (figure 50). Les marquages CD68 et MR sont utilisés pour mettre en évidence la présence des macrophages M1 (CD68+MR-) et M2 (CD68+MR+) (figure 50).



**Figure 50 : Analyse immunohistochimique d'échantillons représentatifs de valves contrôles et pathologiques.** Coloration au trichrome de Masson et immunomarquage pour les macrophages (CD68), les macrophages M1 (CD68+MR-) et M2 (CD68+MR+) dans le tissu valvulaire aortique à un plus fort grossissement.

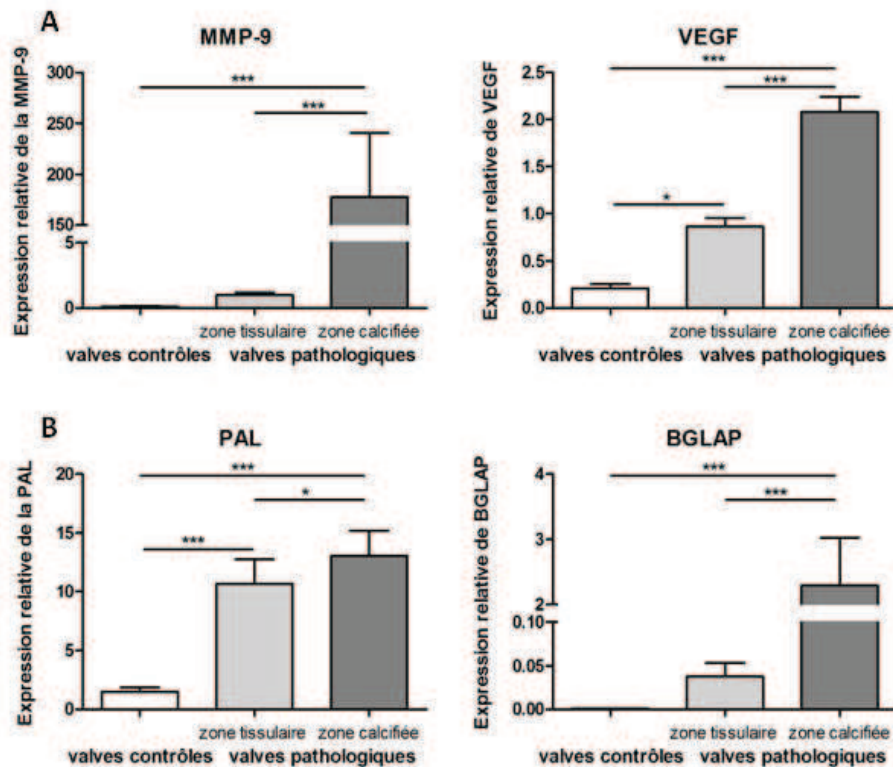
Nous mettons ici en évidence la présence des macrophages M1 et M2 au sein des valves aortiques contrôles et pathologiques. La densité et la distribution des macrophages semblent être plus importante et plus diffuse dans les valves pathologiques que dans les valves contrôles.

### II.3.3. Expression des médiateurs physiopathologiques de la SVA dans les valves contrôles et pathologiques

Nous observons une expression significativement plus importante de la MMP-9 et du VEGF, impliqués dans le remodelage tissulaire, dans les zones calcifiées des valves pathologiques par rapport aux valves contrôles mais aussi aux zones tissulaires de ces mêmes valves (figure 51 A). D'autres marqueurs, décrits comme plus spécifiques des cellules ostéoblastiques matures, ont également pu être détectés tels que l'ostéocalcine (BGLAP) et la phosphatase alcaline (PAL). Au sein des valves pathologiques, l'expression de ces marqueurs de calcification est significativement plus élevée dans les zones calcifiées par rapport aux zones tissulaires (figure



51 B). L'expression de la PAL est significativement moins importante dans les valves contrôles comparée à la partie tissulaire des valves pathologiques, ce n'est pas le cas pour la BGLAP.

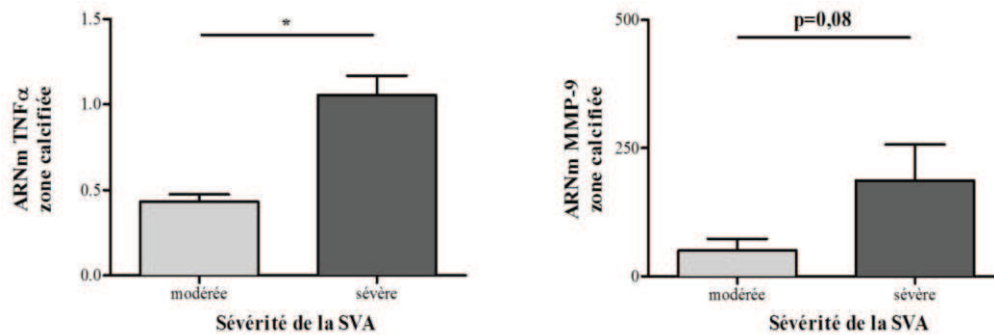


**Figure 51 : Expression différentielle des médiateurs du remodelage tissulaire (A) et de la calcification (B) au sein des valves pathologiques (n=50) et des valves contrôles (n=10). Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM, \* : p<0,05, \*\*\* : p<0,001**

#### II.3.4. Relation entre l'expression des marqueurs des macrophages M1 et M2 ou de médiateurs physiopathologiques de la SVA et la sévérité de la maladie

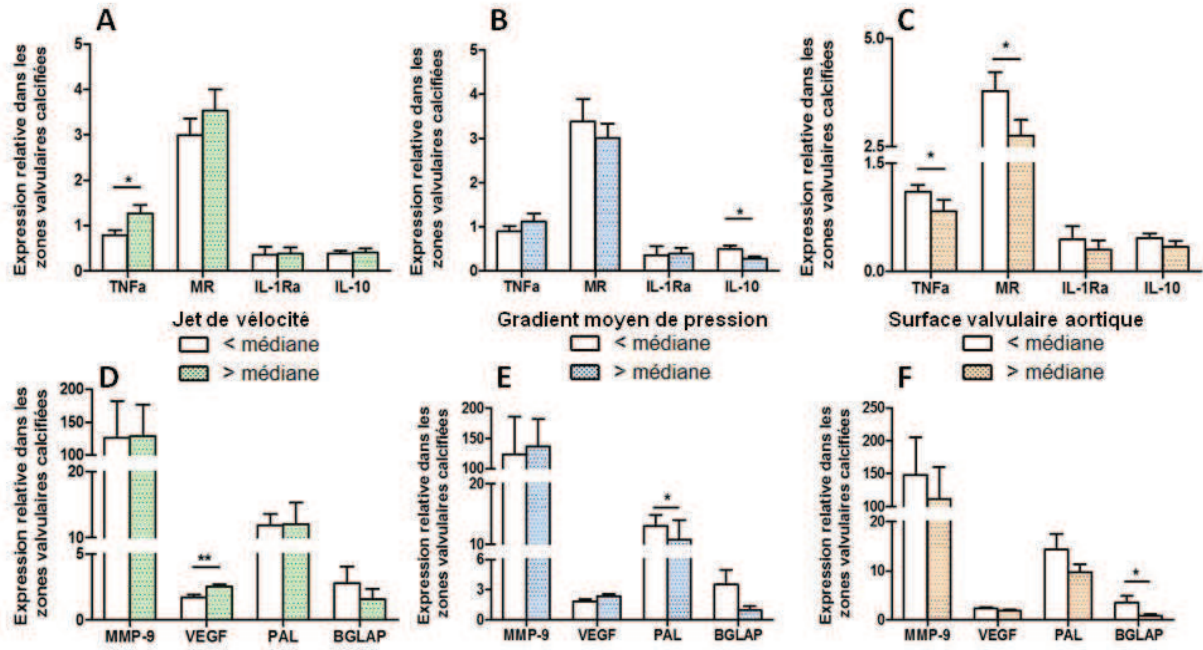
Nous avons étudié le lien entre l'expression génique des marqueurs M1 et M2 et des médiateurs physiopathologiques de la SVA dans le tissu valvulaire aortique au niveau des zones calcifiées et les critères de gravité échographiques (jet de vélocité, gradient moyen de pression et surface valvulaire aortique).

Parmi ces marqueurs, seul le TNF $\alpha$  est significativement augmenté dans les broyats de valves calcifiées issues de patients présentant une SVA sévère par rapport aux patients avec une SVA modérée, selon les critères de gravité échographiques (figure 52). Nous retrouvons cette même tendance pour la MMP-9 (p=0,08).



**Figure 52 : Expression du TNF $\alpha$  et de la MMP-9 dans la zone calcifiée des valves pathologiques selon la sévérité de la sténose valvulaire aortique (SVA).** Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM, \* :  $p < 0,05$ .

Cependant, notre cohorte est largement représentée par des patients avec une SVA sévère (82% d'entre eux) ne permettant pas l'exploitation optimale des données sur ce simple élément. Ainsi, nous nous sommes intéressés aux 3 critères de sévérité pris séparément. Chez les patients présentant un jet de vitesse supérieur à la médiane, nous observons une augmentation significative de l'expression du TNF $\alpha$  et du VEGF dans les broyats des zones valvulaires calcifiées de ces patients (figure 53 A et D). De la même manière, l'expression de l'IL-10 et l'activité de la PAL sont significativement diminuées dans les zones valvulaires calcifiées des patients présentant un gradient moyen de pression supérieur à la médiane (figure 53 B et E). Enfin, le TNF $\alpha$ , le MR et la BGLAP sont significativement plus fortement exprimés dans les zones valvulaires calcifiées des patients présentant une surface valvulaire aortique inférieure à la médiane (figure 53 C et F).



**Figure 53 :** Association entre l’expression des marqueurs M1/M2 (A-B-C) et des médiateurs physiopathologiques de la SVA (D-E-F) dans les zones calcifiées des valves des patients inclus bénéficiant d’un remplacement valvulaire et les critères de gravité de la SVA inférieurs ou supérieurs à leur médiane respective. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM, \* :  $p < 0,05$ .

Nous avons alors étudié la corrélation entre les marqueurs de polarisation M1/M2 ou les médiateurs physiopathologiques de la SVA et les critères échographiques de sévérité de cette pathologie. Nous remarquons que les expressions du TNF $\alpha$  et du VEGF sont positivement corrélées avec le jet de vélocité et le gradient moyen de pression. Une corrélation positive entre l’expression de la MMP-9 et le jet de vélocité est également observée (tableau XI). Nous ne retrouvons pas de corrélation significative entre les marqueurs de calcification (PAL et BGLAP) et les 3 critères paracliniques de sévérité.

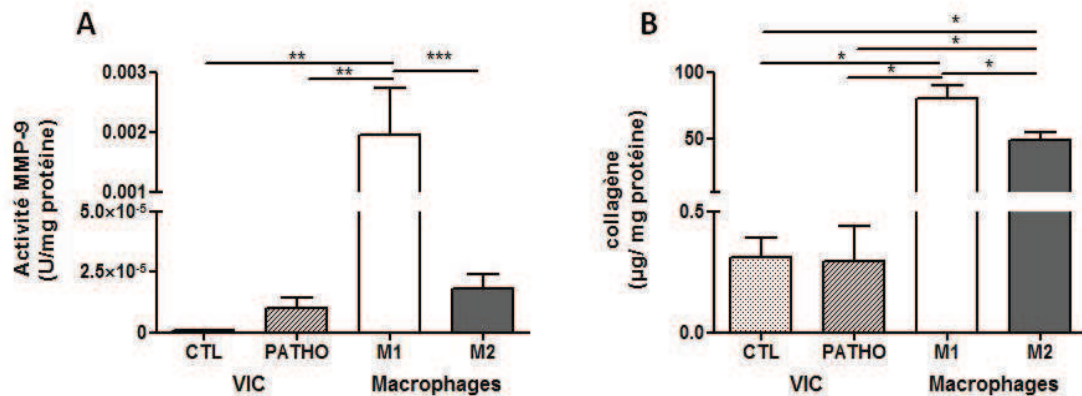
Cette corrélation avec la sévérité de la SVA a permis l’identification de 3 médiateurs d’intérêt : le TNF $\alpha$ , marqueur des macrophages M1, la MMP-9 et le VEGF. En effet, leur expression dans les valves aortiques augmentent avec la sévérité de la SVA.

Parmi les processus physiopathologiques de la SVA cités précédemment, nous avons choisi de nous focaliser sur la fibrose, processus dans lequel la MMP-9 et le collagène sont impliqués. En effet, la MMP-9 a la capacité de dégrader les composants de la MEC dont le collagène et joue ainsi un rôle essentiel dans le remodelage et le développement de la fibrose.

**Tableau XI : Corrélation entre les marqueurs de polarisation des macrophages M1 et M2 ou les médiateurs physiopathologiques de la SVA exprimés dans la zones calcifiée des valves des patients inclus dans le protocole ATHERAO et les paramètres échographiques de gravité de la SVA, n=50, corrélation de Spearman.**

<i>Expression relative (ARNm) dans la zone calcifiée</i>	<i>Paramètres échographiques</i>		
	Jet de vélocité (m/sec)	Gradient moyen de pression (mmHg)	Surface valvulaire aortique (cm <sup>2</sup> )
<i>Marqueurs M1/M2</i>			
TNF $\alpha$	<b>p=0,045, rho=0,310</b>	<b>p=0,020, rho=0,362</b>	p=0,169
MR	p=0,433	p=0,433	p=0,433
IL-1Ra	p=0,133	p=0,068, rho=0,285	p=0,537
IL-10	p=0,818	p=0,973	p=0,169
<i>Médiateurs physiopathologiques de la SVA</i>			
MMP-9	<b>p=0,050, rho=0,343</b>	p=0,070, rho=0,283	p=0,473
VEGF	<b>p=0,008, rho=0,421</b>	<b>p=0,024, rho=0,361</b>	p=0,535
PAL	p=0,320	p=0,167	p=0,465
BGALP	p=0,893	p=0,236	p=0,808

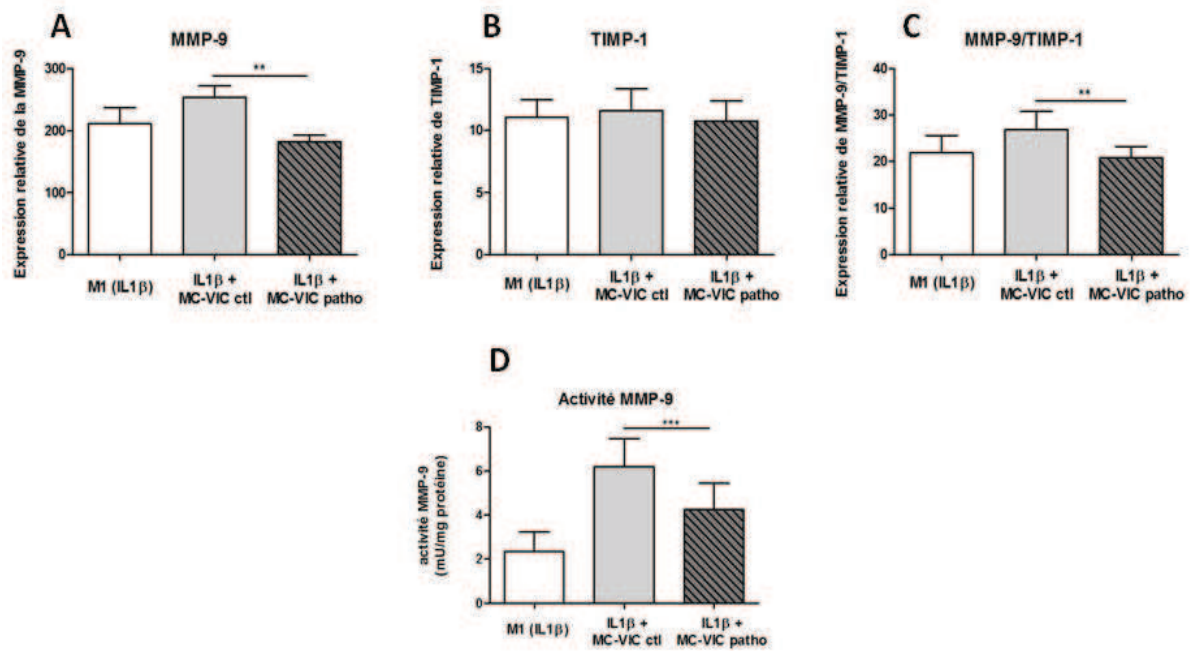
Parmi les cellules qui composent la valve, les VIC produisent des très faibles quantités de MMP-9 et de collagène en comparaison aux macrophages (figure 54). Parmi les macrophages, les macrophages M1 sont la source principale de MMP-9. En effet, l'activité MMP-9 sécrétée par ces derniers est significativement plus importante que celle des macrophages M2 (figure 54 A). D'autre part, les macrophages M1 et M2 sont capables de sécréter du collagène, mais en plus grande quantité pour les M1 ( $p < 0,0005$ , comparé au M2, figure 54 B). Nous n'observons pas de différence de sécrétion de MMP-9 et de collagène entre les VIC isolées de valves contrôles et celles issues de valves pathologiques (figure 54).



**Figure 54 : Dosage de MMP-9 active (A) et de collagène total dans les milieux conditionnés de VIC isolées de valves contrôles (CTL, n=5) ou de valves pathologiques (PATHO, n=5) et de macrophages M1 et M2 différenciés à partir de monocytes sanguins (n=10). Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM, \* : p<0,05, \*\* : p <0,005, \*\*\* : p<0,0005.**

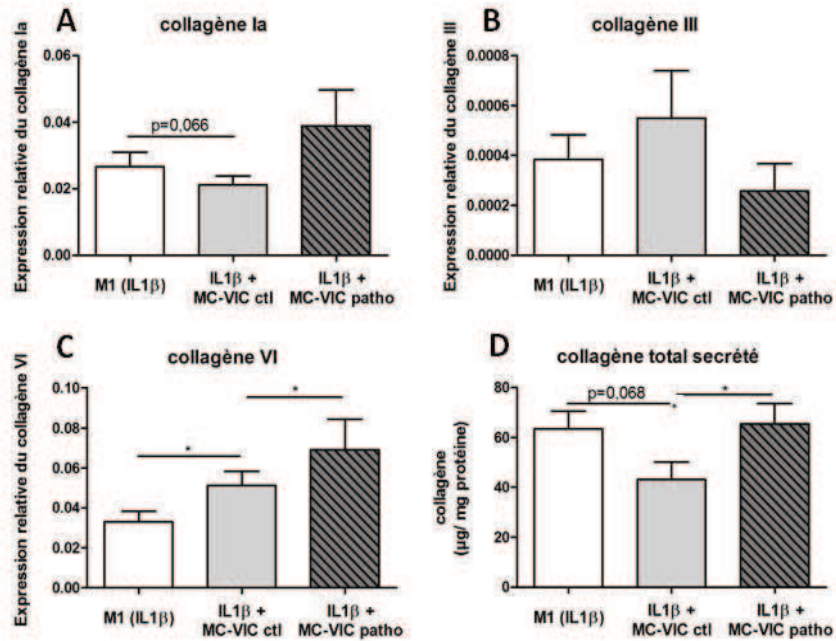
### II.3.5. Influence des milieux conditionnés de VIC sur l'expression de la MMP-9 et du collagène par les macrophages M1

Les MC-VIC isolées de valves pathologiques modifient l'expression et l'activité de la MMP-9 dans les macrophages M1. Ils induisent dans ces macrophages une diminution significative de l'expression de la MMP-9 par rapport au MC-VIC isolées de valves contrôles (figure 55 A). Même si les MC-VIC isolées de valves contrôles et de valves pathologiques n'influencent pas l'expression de TIMP-1, inhibiteur spécifique de la MMP-9, le ratio MMP9/TIMP-1, reflet de la balance protéolytique, est significativement plus bas dans les macrophages M1 en présence de MC-VIC isolées de valves pathologiques comparé à ceux incubés avec le MC-VIC isolées de valves contrôles (figure 55 B et C). En accord avec l'expression génique, l'activité de la MMP-9 est significativement moins importante dans la condition de culture avec le MC-VIC isolées de valves pathologiques que dans la condition avec MC-VIC isolées de valves contrôles (figure 55 D).



**Figure 55 : Effets des milieux conditionnés de cellules interstitielles de valves isolées de valves contrôles (MC-VIC ctl) ou pathologiques (MC-VIC patho) sur l'expression de la MMP-9 (A) et de son inhibiteur TIMP-1 (B), sur le ratio MMP-9/TIMP-1 (C) et sur l'activité de la MMP-9 (D) au cours de la différenciation des macrophages M1 (n=4, en triplicate). Les résultats sont exprimés en moyenne +/-SEM, \*\* : p<0,01, \*\*\* : p<0,005.**

Par ailleurs, le MC-VIC isolées de valves pathologiques induit une augmentation de l'expression et de la sécrétion de collagène par les macrophages M1. Nous n'observons pas de différence d'expression du collagène Ia et III entre les différentes conditions de culture (figure 56 A et B). Cependant, nous notons une augmentation significative de l'expression de collagène VI par les macrophages M1 sous l'influence de MC-VIC issues de valves pathologiques par rapport aux macrophages mis en présence de MC-VIC isolées de valves contrôles (figure 56 C). Parallèlement, le collagène total sécrété par les macrophages M1+MC-VIC patho est significativement plus important que par les macrophages M1+MC-VIC ctl (figure 56 D).



**Figure 56 : Effets des milieux conditionnés de cellules interstitielles de valves isolées de valves contrôles (MC-VIC ctl) ou pathologiques (MC-VIC patho) sur l’expression de collagène Ia, III et VI (A, B et C) et sur la sécrétion de collagène total (D) au cours de la différenciation des macrophages M1 (n=4, en triplicate). Les résultats sont exprimés en moyenne +/-SEM, \* : p<0,05.**

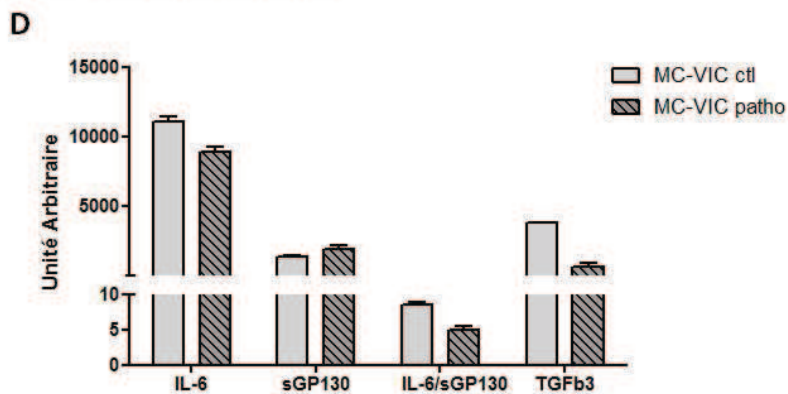
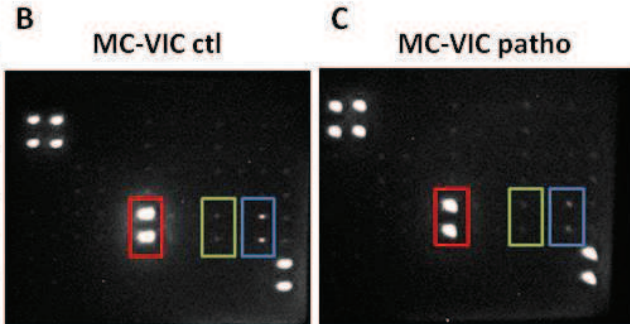
### II.3.6. Identification des facteurs solubles sécrétés par les VIC potentiellement responsables des effets sur les macrophages M1

Le profil du secrétome des VIC a été étudié par une technique de micro-array. Cette méthode permet d’identifier et de mettre en évidence la présence de plusieurs cytokines dans un milieu sur une même membrane (figure 57 A). Sur l’ensemble du profil cytokinique testé, 3 protéines ont été révélées de façon importante à la fois dans les MC de VIC isolées de valves contrôles et de valves pathologiques: l’IL-6 apparait comme la molécule la plus présente quantitativement, son inhibiteur soluble, la sGP130 et la protéine antifibrotique TGF-β3 (figure 57 B, C et D).

Le faible nombre de MC-VIC testés (n=2 pour chaque MC-VIC) ne permet pas l’exploitation statistique des résultats. Cependant, nous observons plusieurs tendances : il semble que les quantités d’IL-6 (respectivement, 8906±10 vs 11058±15) et de TGF-β3 (respectivement, 638±8 vs 3834±0) sécrétées sont moins importantes dans les MC-VIC patho comparée au MC-VIC ctl. Notons également que le ratio IL-6/sGP130 semble être plus faible dans les MC-VIC patho par rapport au MC-VIC ctl (respectivement 4,8±0.1 vs 8.4±0.3) (figure 57 D).

### ATH1/TH2/TH17 cytokine pattern

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	POS	POS	NEG	NEG	CD30	CD40 Ligand	CD40	GCSF	GTR	GMCSF	IFN gamma	IL-1 sR
2	POS	POS	NEG	NEG	CD30	CD40 Ligand	CD40	GCSF	GTR	GMCSF	IFN gamma	IL-1 sR
3	IL-1 sR	IL-10	IL-12 p40	IL-12 p70	IL-13	IL-17	IL-17F	IL-17R	IL-1 beta	IL-2	IL-21	IL-21 R
4	IL-1 sR	IL-10	IL-12 p40	IL-12 p70	IL-13	IL-17	IL-17F	IL-17R	IL-1 beta	IL-2	IL-21	IL-21 R
5	IL-22	IL-23 p19	IL-28 A	IL-4	IL-5	IL-6	IL-6 sR	MP-3 alpha	sGP130	TGF beta 1	TGF beta 3	TNF alpha
6	IL-22	IL-23 p19	IL-28 A	IL-4	IL-5	IL-6	IL-6 sR	MP-3 alpha	sGP130	TGF beta 1	TGF beta 3	TNF alpha
7	TNF beta	TRANCE	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	POS
8	TNF beta	TRANCE	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	POS



**Figure 57 :** Mise en évidence et quantification des cytokines secrétées dans les milieux conditionnés de VIC issues de valves contrôles (MC-VIC ctl, n=2, B et D) ou de valves pathologiques (MC-VIC patho, n=2, C et D). Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM.

## II.4. Discussion

Dans ce travail, nous décrivons la présence des macrophages M1 et M2 infiltrés au sein des lésions valvulaires de patients présentant pour la majorité d'entre eux une SVA sévère et bénéficiant d'un remplacement chirurgical de la valve. L'infiltration accrue de cellules inflammatoires telles que les macrophages est décrite dans les valves aortiques sténosées et calcifiées (Otto *et al*, 1994; Mohler *et al*, 2001). Très récemment, Passmore et coll. ont décrit, dans des valves sténosées, un appauvrissement des VIC et une augmentation des macrophages infiltrés par rapport à des valves contrôles (Passmore *et al*, 2015). Nous confirmons ici les observations de ces 2 seules études disponibles dans la littérature sur la description des macrophages M1 et M2 dans les valves (Wang *et al*, 2014; Kapusta *et al*, 2012). Nous n'avons pas pu mettre en évidence des localisations distinctes de ces 2 sous-types de macrophages dans



ces lésions comme cela a déjà été décrit dans la plaque athéroscléreuse (Bouhlef *et al*, 2007) ou dans la paroi aortique anévrysmale (Boytard *et al*, 2013), du fait d'un trop faible nombre d'échantillons analysés et d'une grande hétérogénéité au niveau de la distribution cellulaire entre les différents échantillons. Nous observons en revanche une plus forte expression des marqueurs des macrophages M1 et M2 dans les zones calcifiées des valves pathologiques.

Nous mettons également en évidence, dans les zones calcifiées des valves pathologiques, l'expression accrue de divers médiateurs impliqués dans la physiopathologie de la SVA, tels des acteurs du remodelage tissulaire (MMP-9 et VEGF) et des acteurs de la différenciation ostéoblastique et donc de la calcification (PAL et BGLAP). La PAL est exprimée de façon croissante tout au long de la maturation ostéoblastique en lien avec la minéralisation osseuse et ne l'est plus dans les phases quiescentes de la vie ostéoblastique. La BGLAP est exprimée dès l'apparition de la minéralisation osseuse et voit sa synthèse augmentée après l'arrêt de la prolifération. Ces données sont confirmées par quelques travaux très récents sur la physiopathologie de la SVA. Perrota et coll. décrivent ainsi une augmentation d'expression de la MMP-9 dans les valves pathologiques, dans le versant aortique et au niveau des zones calcifiées (Perrota *et al*, 2014) et une augmentation significative, dans les valves sténosées, du VEGF qui colocalise avec l'angiogenèse et les zones de calcification (Perrota *et al*, 2015; Saladze *et al*, 2015). Une concentration de plusieurs protéines ostéogéniques telles que l'ostéopontine, l'ostéocalcine et la PAL est décrite dans les zones calcifiées des valves avec des niveaux d'expression 2 à 5 fois plus élevés que dans les valves contrôles (Lehmann *et al*, 2009).

Par ailleurs, nous mettons en évidence un lien entre l'expression de certains de ces marqueurs et la sévérité de la SVA, définie sur 3 critères échographiques que sont le jet de vélocité, le gradient moyen de pression transvalvulaire et la surface valvulaire aortique. Les expressions du TNF $\alpha$  (marqueur des macrophages M1), du VEGF et de la MMP-9 sont positivement corrélées au jet de vélocité. Nous observons également pour les 2 premiers marqueurs, une corrélation positive entre leur expression et le gradient moyen de pression. Les premiers travaux sur la SVA ont montré que l'activité MMP-9 au sein de la valve est corrélée à la sévérité de la maladie (Satta *et al*, 2003). Un lien entre certains polymorphismes génétiques du VEGF et le développement de la calcification valvulaire aortique a récemment été décrit (Yadav *et al*, 2014). Nous ne confirmons pas la corrélation significative entre l'expression des marqueurs de calcification et le gradient moyen de pression mise en évidence par Lehmann et coll. (Lehmann *et al*, 2009).

Les MMP et en particulier la MMP-9 semblent être au centre de ce mécanisme de remodelage tissulaire puisqu'elles participent à la dégradation du collagène et d'autres composants de la MEC. Leur activité tissulaire est régulée par leurs inhibiteurs, les TIMP. Les MMP et les TIMP participent ainsi à la progression de la fibrose et à la rigidité des feuillets observées dans la SVA (Fondard *et al*, 2005). Les macrophages en libérant des MMP participeraient au remodelage pathologique de la MEC des valves sténosées. Nos travaux récemment publiés ont montré que parmi les macrophages, les macrophages M1 représentent la source principale de MMP-9 (Roma-Lavisse *et al*, 2015).

De par leur grande plasticité, les macrophages s'adaptent aux signaux du microenvironnement et voient leur phénotype se modifier. La VIC, principal constituant cellulaire de la valve, peut interagir avec les macrophages environnants. Afin d'étudier cette coopération cellulaire, nous avons utilisé des MC-VIC isolées de valves contrôles ou pathologiques permettant de reproduire *in vitro* l'environnement physiologique ou pathologique de la valve. Nos résultats *in vitro* indiquent que les MC-VIC isolées de valves pathologiques modifient l'expression des médiateurs impliqués dans la fibrose dans les macrophages M1. En effet, ils induisent une diminution de l'expression et de l'activité de la MMP-9 et une augmentation de la sécrétion de collagène dans les macrophages M1, en lien avec la progression de la fibrose.

L'analyse des MC-VIC par technique de micro-array protéique a permis de révéler la prédominance dans ces MC-VIC de 3 facteurs solubles : l'IL-6, son inhibiteur soluble, le sGP130, et le TGF- $\beta$ 3. Nos résultats suggèrent que les VIC isolées de valves pathologiques semblent sécréter moins d'IL-6 et de TGF- $\beta$ 3. Le rôle des cytokines pro-inflammatoires dans l'induction de la MMP-9 dans les macrophages est désormais bien connu (Kothari *et al*, 2014). Par ailleurs, Hosokawa et coll. montrent que la protéine antifibrotique TGF- $\beta$ 3 diminue le collagène de type Ia dans un modèle de cicatrisation (Hosokawa *et al*, 2003). L'ensemble de ces données suggèrent que les VIC via leur action paracrine, sont capables d'influer sur le phénotype des macrophages M1 qui assurent l'homéostasie de la MEC.

## **II.5. Conclusion**

Au total, nos résultats montrent que l'effet paracrine des VIC isolées de valves pathologiques, via des facteurs solubles sécrétés en plus faible quantité (TGF- $\beta$ 3 et IL-6) sur les macrophages

M1 induit une diminution de l'expression et de l'activité de la MMP-9 et de ce fait une accumulation de son substrat, le collagène, pouvant suggérer un lien entre la coopération macrophages/VIC dans la progression de la fibrose observée dans la SVA.

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Comme nous l'avons vu en introduction, les macrophages, issus de la différenciation des monocytes circulants après infiltration dans la paroi artérielle, jouent un rôle central dans le développement de l'athérosclérose. Ils contribuent à un environnement favorable à la progression de la lésion via l'expression et la sécrétion de diverses cytokines et médiateurs. Ils sont caractérisés par une importante plasticité fonctionnelle évoluant avec leur environnement. La polarisation des macrophages correspond à un continuum d'activation et de fonctions associées différentes. Ainsi, la modulation préférentielle d'une sous-population par rapport à une autre permet de modifier l'environnement et les fonctions cellulaires impliquées dans les pathologies. Cette diversité fonctionnelle des macrophages dans l'athérosclérose attire actuellement une attention particulière.

Dans la première partie de cette thèse, concernant l'athérosclérose vasculaire, nous avons étudié, dans une population de patients athéroscléreux, le lien entre la polarisation M1/M2 des macrophages et la sévérité de la maladie athéroscléreuse, la modulation de ces phénotypes par le diabète et par les cellules environnantes présentes dans les lésions telles que les PNN.

Ainsi, dans le premier travail présenté, réalisé sur des broyats de plaques carotidiennes, nous suggérons un lien entre la polarisation des macrophages M1 et M2 et l'évolution clinique de la maladie. En effet, nous observons une polarisation orientée vers un phénotype M1 au sein des lésions des patients symptomatiques, en lien avec une forte corrélation positive entre le ratio M1/M2 intra-plaque et la sévérité de la sténose carotidienne.

Nous avons ensuite étudié l'implication de ces phénotypes de macrophages dans la progression et l'instabilité de la plaque d'athérosclérose en caractérisant les profils d'expression et de sécrétion de médiateurs de l'athérosclérose dans les macrophages M1 et M2 et leur modulation par le diabète.

L'article publié ainsi que les résultats complémentaires précisent que les macrophages M1 et M2 humains expriment et sécrètent différemment les médiateurs de l'inflammation, de la coagulation, de la protéolyse et de l'angiogenèse, processus clés dans la progression et dans l'instabilité de la plaque d'athérosclérose. Nous confirmons les propriétés pro- et anti-inflammatoires respectives des macrophages M1 et M2. Nous précisons l'implication des macrophages M1 dans la vulnérabilité des plaques par l'expression de la MMP-9 impliquée dans le remodelage de la MEC, et de leurs inhibiteurs physiologiques. Ces macrophages M1 sont également en lien avec la thrombogénécité des plaques par leur activité pro-coagulante (via le FT) et anti-fibrinolytique (via le PAI-1) alors que les macrophages M2, jouent un rôle

dans le contrôle des dépôts de fibrine au niveau des plaques d'athérosclérose (via le TFPI). Ces macrophages M2 possèdent également des propriétés proangiogéniques. Nous démontrons ici et ce, pour la première fois par la technique de génération de thrombine, les capacités procoagulantes des macrophages M1 (avec un potentiel thrombogène plus élevé) comparé aux macrophages M2, renforçant nos résultats d'analyse d'expression génique. Ce travail *in vitro* réalisé sur un grand nombre de sujets athéroscléreux (n=35) a permis de mieux comprendre les rôles potentiels respectifs des macrophages M1 et M2 dans les plaques d'athérosclérose et renforce l'idée que les macrophages M1 sont préférentiellement liés à la progression et à la déstabilisation de la plaque et aux complications thromboemboliques, à l'origine des accidents vasculaires. Ainsi la balance M1/M2 dans l'athérosclérose, semble cruciale dans le devenir de la plaque.

Parmi les différents facteurs de risque CV, notre choix s'est porté sur le diabète de type 2 qui est bien décrit comme étant associé à une progression plus rapide des lésions athéroscléreuses. En effet, de nombreuses études anatomopathologiques décrivent chez les patients diabétiques, des plaques d'athérosclérose avec des caractéristiques histologiques de plaques instables (important noyau lipidique et large infiltrat macrophagique avec présence fréquente de thrombi et de stigmates de rupture de plaque), suggérant une plus grande vulnérabilité des lésions et expliquant un plus haut risque de morbi-mortalité CV chez ces patients. Nous confirmons ici que les plaques de patients diabétiques présentent une augmentation du processus angiogénique (VEGF) avec une densité en néovaisseaux (CD31) plus importante. Ce risque de survenue d'évènements cliniques d'origine athéroscléreuse est dépendant de la stabilité de la plaque athéroscléreuse, elle-même sous la dépendance de nombreux médiateurs sécrétés par les macrophages infiltrés dans les lésions athéroscléreuses. Les données sur l'impact du diabète sur la polarisation des monocytes/macrophages, en lien avec des complications cardio-vasculaires, sont juste émergentes (Fadini *et al*, 2013). Nos résultats indiquent que le diabète ne semble pas modifier *in vitro* la polarisation des macrophages M1 ni M2, sur la base des marqueurs de caractérisation. En revanche, nous montrons que le diabète entraîne des changements qualitatifs dans les macrophages M1 dans le contexte d'athérosclérose sans impacter le contenu en macrophages M1 et M2 des plaques d'athérosclérose mais cette dernière donnée doit être confirmée par l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons. Ainsi, nous montrons pour la première fois que les macrophages M1 de patients diabétiques présentent un phénotype délétère potentialisateur du remodelage vasculaire et de l'angiogenèse, qui pourrait contribuer à la progression de la lésion et expliquer cette fragilité accrue des plaques chez ces sujets. Une

corrélation positive entre le taux d'HbA1c, qui reflète l'équilibre du diabète à plus ou moins long terme, et l'activité protéolytique des macrophages M1 a également été observée.

Disposant au laboratoire de la technique de microdissection laser (LMD 6000, Leica), il serait envisageable de vérifier par RT-PCR quantitative, les niveaux d'expression de ces différents médiateurs de l'athérosclérose, et notamment selon le statut diabétique des patients, à partir des ARNm des macrophages M1 et M2 tissulaires isolés de différentes zones clés de la plaque (chape fibreuse, noyau lipidique, zone riche en néovaisseaux) à partir des pièces opératoires d'endartériectomie conservées au laboratoire. Le principe de cette technique est de sélectionner puis d'isoler, sous contrôle microscopique, des cellules ou un groupe de cellules d'intérêt. Contrairement aux techniques globales réalisées sur un broyat tissulaire et donc sur un mélange de cellules, cette technique permet d'obtenir un matériel cellulaire purifié pour les analyses moléculaires. Ce travail permettra de compléter les résultats que nous avons obtenus dans les macrophages différenciés *in vitro* à partir des monocytes sanguins de patients athéroscléreux.

Par ailleurs, de nombreuses cascades de signalisation intracellulaire mais aussi de facteurs de transcription et épigénétiques pourraient être impliquées. Ainsi une nouvelle théorie de pré-programmation ou « priming » des monocytes avant leur différenciation en macrophage tissulaire ou de « mémoire des monocytes » est avancée. Cette mémoire non spécifique des cellules est médiée par des modifications épigénétiques et a récemment été appelée «immunité innée formée" (Bekkering *et al*, 2015; Saeed *et al*, 2014). Ce nouveau concept pourrait expliquer l'effet persistant de l'état diabétique sur les monocytes/macrophages après 8 jours de culture. Des données précliniques suggèrent que l'« immunité innée formée » peut contribuer à l'inflammation vasculaire de la paroi artérielle des patients présentant des facteurs de risque CV. En effet il a été montré que les LDLox peuvent induire un phénotype pro-inflammatoire à long terme dans les monocytes/macrophages par une « reprogrammation » épigénétique basée sur la méthylation des histones (Bekkering *et al*, 2014). De même, les monocytes circulants des patients athéroscléreux ont été retrouvés pré-activés avec un potentiel pro-inflammatoire (Luu *et al*, 2007). Il devient de plus en plus clair que le remodelage de la chromatine régit plusieurs aspects de la différenciation, de l'activation et de la polarisation des macrophages. L'intérêt suscité autour de ces mécanismes épigénétiques est grandissant. Ils sont régulés par des enzymes modifiant les histones et l'ADN (désacétylase ou méthylase) qui pourraient servir de lien entre l'environnement, le métabolisme cellulaire et le phénotype de macrophages mais les données sont encore très limitées et nécessitent d'autres études. Ces enzymes pourraient être de

nouvelles cibles pharmacologiques pour moduler la polarisation des macrophages et ainsi pour améliorer les effets cardiovasculaires néfastes du diabète.

Enfin, ce travail montre le rôle contributif des PNN dans la régulation du phénotype inflammatoire des monocytes/macrophages, par leurs produits de sécrétion via notamment le relargage des protéines de leurs granules. Notre modèle de culture des MDM en présence de milieu conditionné de PNN permet ainsi d'évaluer l'impact de médiateurs sur certains aspects du développement du processus d'athérosclérose. Nos résultats indiquent que le milieu conditionné de PNN module le phénotype des macrophages vers un profil M1 (sur la base des marqueurs de caractérisation) modifié type « M2-like » ( $IL-1\beta^{Low}$   $IL-10^{High}$ ) car capables de produire des médiateurs anti-inflammatoires et d'angiogenèse. Ceci suggère que les PNN assistent les macrophages dans la résolution de l'inflammation. Ils illustrent *in vitro* un exemple de communication entre cellules immunitaires lors de l'inflammation de la paroi vasculaire au cours de l'athérosclérose. La caractérisation des médiateurs solubles des PNN impliqués dans la polarisation des macrophages vers un phénotype plutôt régulateur, ainsi que leur mécanisme d'action pourraient apporter de nouvelles opportunités de développement thérapeutique pour limiter le phénotype inflammatoire des macrophages.

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

Concernant la SVA, pathologie « atherosclerotic-like » dans laquelle la polarisation des macrophages est très peu étudiée, nous décrivons la présence des macrophages M1 et M2 au sein des lésions valvulaires sténosées et calcifiées. Trop peu d'échantillons ont été à ce jour analysés pour affirmer une distribution distincte de ces 2 sous-types de macrophages dans ces lésions, cette étude immunohistologique devra être poursuivie sur un plus grand nombre d'échantillons de patients. Nos résultats d'expression génique des marqueurs M1 et M2 sur des broyats de valves indiquent une plus forte expression de ces marqueurs dans les zones calcifiées des valves pathologiques. De la même manière, nous observons dans ces zones



calcifiées, une expression accrue des acteurs du remodelage tissulaire et de la calcification en accord avec des travaux très récents.

Nous établissons ici et ce, pour la première fois, un lien entre l'expression de certains marqueurs (marqueur de macrophages M1 et de remodelage tissulaire) dans les zones calcifiées des valves pathologiques et la sévérité de la SVA, définie sur des critères échographiques, avec notamment la mise en évidence de corrélations positives entre l'expression de  $TNF\alpha$ , MMP-9 ou VEGF et le jet de vélocité ou le gradient moyen de pression. Ainsi parmi les différents processus physiopathologiques décrits dans la SVA, notre choix s'est porté sur la fibrose. Il est établi que les MMP, impliquées dans le remodelage tissulaire par dégradation du collagène et d'autres composants de la MEC, et les TIMP, leurs inhibiteurs physiologiques, participent à la progression de la fibrose et à la rigidité des feuillets observées dans la SVA.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'état d'activation et les fonctions des macrophages sont profondément influencés par les signaux du microenvironnement. Nos travaux réalisés *in vitro* portent sur l'étude de la coopération entre les macrophages M1, source principale de MMP-9, et les VIC, principal constituant cellulaire de la valve. Ils précisent que les MC-VIC isolées de valves pathologiques humaines modulent l'expression des médiateurs impliqués dans la fibrose dans les macrophages M1. En effet, l'interaction des macrophages M1 avec les VIC atténue significativement les propriétés protéolytiques des macrophages M1 en diminuant l'expression génique et l'activité de la MMP-9 et favorise le dépôt de collagène en augmentant la sécrétion de ce composant matriciel dans les M1, en lien avec la progression de la fibrose. Nous établissons ainsi, pour la première fois, qu'il existe un lien entre la coopération VIC-macrophages et l'acquisition d'un phénotype profibrotique des macrophages. De plus, nous démontrons que la régulation de l'expression génique des médiateurs impliqués dans le remodelage tissulaire s'exerce via les facteurs solubles libérés par les VIC. L'analyse des MC-VIC a révélé que les VIC isolées de valves pathologiques par rapport à celles isolées de valves normales semblent sécréter moins d'IL-6 et de TGF- $\beta$ 3, connus respectivement pour induire la production de MMP-9 dans les macrophages et pour diminuer la synthèse de collagène. L'ensemble de ces données suggèrent que les VIC isolées de valves pathologiques, via leur action paracrine, sont capables de moduler le phénotype des macrophages M1 en faveur de la progression de la fibrose. Il serait intéressant de compléter ce travail en étudiant l'impact de cette coopération cellulaire sur les autres processus physiopathologiques décrits dans la SVA (calcification, angiogenèse...).

Ainsi, dans cette dernière partie, nous décrivons la présence des macrophages M1 et M2 dans les valves aortiques humaines et nous suggérons une implication de la modulation des macrophages M1 par les VIC dans la progression de la fibrose observée dans la SVA. La meilleure connaissance des processus biologiques de la SVA permettra peut être la prévention et le ralentissement de son évolution par des interventions pharmacologiques ciblées afin d'éviter l'approche chirurgicale invasive actuelle.

Pour conclure, cette thèse apporte de nouveaux éléments dans la compréhension des rôles des macrophages dans les processus physiopathologiques impliqués dans les maladies vasculaires et valvulaires humaines. Elle met l'accent sur le rôle délétère des macrophages M1 chez les sujets diabétiques en pathologie vasculaire et identifie également une fonction jusque-là méconnue des macrophages M1 dans la progression de la fibrose, en lien avec une coopération cellulaire avec les VIC. La grande plasticité de ces cellules fait que le rôle des macrophages représente un champ d'investigation vaste pour l'avenir de la compréhension de ces pathologies. Il conviendra par la suite d'identifier les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces interactions, ce qui devrait permettre d'envisager de nouvelles voies thérapeutiques visant à moduler l'effet de ces cellules dans ces pathologies.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## A

- Akat, K., et al. (2009) Aortic valve calcification: basic science to clinical practice. *Heart*, 95, 616-623.
- Alexopoulos, A., et al. (2010) Bone regulatory factors NFATc1 and Osterix in human calcific aortic valves. *Int J Cardiol*, 139, 142-149.
- Andres, V., et al. (2012) Macrophage proliferation and apoptosis in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 23, 429-438.

## B

- Badimon, J.J., et al. (1999) Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions. *Circulation*, 99, 1780-1787.
- Baetta, R. & Corsini, A. (2010) Role of polymorphonuclear neutrophils in atherosclerosis: current state and future perspectives. *Atherosclerosis*, 210, 1-13.
- Baglin, T. (2005) The measurement and application of thrombin generation. *Br J Haematol*, 130, 653-661.
- Basso, C., et al. (2004) An echocardiographic survey of primary school children for bicuspid aortic valve. *Am J Cardiol*, 93, 661-663.
- Baumgartner, H., et al. (2009) Echocardiographic assessment of valve stenosis: EAE/ASE recommendations for clinical practice. *J Am Soc Echocardiogr*, 22, 1-23; quiz 101-102.
- Bekkering, S., et al. (2015) The epigenetic memory of monocytes and macrophages as a novel drug target in atherosclerosis. *Clin Ther*, 37, 914-923.
- Bekkering, S., et al. (2014) Oxidized low-density lipoprotein induces long-term proinflammatory cytokine production and foam cell formation via epigenetic reprogramming of monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34, 1731-1738.
- Belge, K.U., et al. (2002) The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol*, 168, 3536-3542.
- Beppu, S., et al. (1993) Rapidity of progression of aortic stenosis in patients with congenital bicuspid aortic valves. *Am J Cardiol*, 71, 322-327.
- BHC (Brussels heart center), (2015a)  
<http://www.brusselsheartcenter.be/fr/chirurgiecardiaque/interventions/pontage-coronaire>, consulté en Septembre 2015.
- BHC (Brussels heart center), (2015b)  
<http://www.brusselsheartcenter.be/fr/chirurgie-cardiaque/interventions/chirurgie-valvulaire-et-chirurgie-de-l-aorte-thoracique.html>, consulté en Octobre 2015.
- Blankenberg, S., et al. (2003) Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation*, 107, 1579-1585.
- Bonow, R.O., et al. (2006) ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (writing committee to revise the 1998 Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease): developed in collaboration with the Society of Cardiovascular Anesthesiologists: endorsed by the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions and the Society of Thoracic Surgeons. *Circulation*, 114, e84-231.
- Bories, G., et al. (2013) Liver X receptor activation stimulates iron export in human alternative macrophages. *Circ Res*, 113, 1196-1205.

- Borissoff, J.I., et al. (2013) Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33, 2032-2040.
- Borissoff, J.I., et al. (2011) The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *N Engl J Med*, 364, 1746-1760.
- Borregaard, N. & Cowland, J.B. (1997) Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, 89, 3503-3521.
- Bosse, Y., et al. (2008) Genomics: the next step to elucidate the etiology of calcific aortic valve stenosis. *J Am Coll Cardiol*, 51, 1327-1336.
- Bouhlef, M.A., et al. (2007) PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab*, 6, 137-143.
- Boyle, J.J., et al. (2009) Coronary intraplaque hemorrhage evokes a novel atheroprotective macrophage phenotype. *Am J Pathol*, 174, 1097-1108.
- Boyle, J.J., et al. (2012) Activating transcription factor 1 directs Mhem atheroprotective macrophages through coordinated iron handling and foam cell protection. *Circ Res*, 110, 20-33.
- Boytard, L., et al. (2013) Role of proinflammatory CD68(+) mannose receptor(-) macrophages in peroxiredoxin-1 expression and in abdominal aortic aneurysms in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33, 431-438.
- Boyum, A. (1964) Separation of White Blood Cells. *Nature*, 204, 793-794.
- Braverman, A.C., et al. (2005) The bicuspid aortic valve. *Curr Probl Cardiol*, 30, 470-522.
- Breyne, J., et al. (2010) Atherosclerotic-like process in aortic stenosis: activation of the tissue factor-thrombin pathway and potential role through osteopontin alteration. *Atherosclerosis*, 213, 369-376.
- Burke, A.P., et al. (2004) Morphologic findings of coronary atherosclerotic plaques in diabetics: a postmortem study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, 1266-1271.
- Butcher, M.J. & Galkina, E.V. (2012) Phenotypic and functional heterogeneity of macrophages and dendritic cell subsets in the healthy and atherosclerosis-prone aorta. *Front Physiol*, 3, 44.
- Byrne, A. & Reen, D.J. (2002) Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. *J Immunol*, 168, 1968-1977.

## C

- Caplice, N.M., et al. (1998) Presence of tissue factor pathway inhibitor in human atherosclerotic plaques is associated with reduced tissue factor activity. *Circulation*, 98, 1051-1057.
- Cappelli, S., et al. (2010) Aortic valve disease and gamma-glutamyltransferase: accumulation in tissue and relationships with calcific degeneration. *Atherosclerosis*, 213, 385-391.
- Carabello, B.A. & Paulus, W.J. (2009) Aortic stenosis. *Lancet*, 373, 956-966.
- Carcaillon, L., et al. (2011) Increased thrombin generation is associated with acute ischemic stroke but not with coronary heart disease in the elderly: the Three-City cohort study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31, 1445-1451.
- CC (Cleveland clinic) (2015)  
[http://my.clevelandclinic.org/heart/disorders/bicuspid\\_aortic\\_valve\\_disease.aspx](http://my.clevelandclinic.org/heart/disorders/bicuspid_aortic_valve_disease.aspx),  
 consulté en Octobre 2015.
- CCVC (Centre de chirurgie vasculaire de Caen, (2015)  
<http://www.chirurgie-vasculaire-caen.fr/les-interventions-1/endarterectomie-carotidienne-standard/>, consulté en Octobre 2015.

- Chalajour, F., et al. (2004) Angiogenic activation of valvular endothelial cells in aortic valve stenosis. *Exp Cell Res*, 298, 455-464.
- Chatzizisis, Y.S., et al. (2007) Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *J Am Coll Cardiol*, 49, 2379-2393.
- Chen, J.H., et al. (2009) Identification and characterization of aortic valve mesenchymal progenitor cells with robust osteogenic calcification potential. *Am J Pathol*, 174, 1109-1119.
- Chertov, O., et al. (1997) Identification of human neutrophil-derived cathepsin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils. *J Exp Med*, 186, 739-747.
- Chinetti-Gbaguidi, G., et al. (2011) Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling but high phagocytosis because of distinct activities of the PPARgamma and LXRAalpha pathways. *Circ Res*, 108, 985-995.
- Chinetti-Gbaguidi, G., et al. (2015) Macrophage subsets in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*, 12, 10-17.
- Cho, K.Y., et al. (2013) The phenotype of infiltrating macrophages influences arteriosclerotic plaque vulnerability in the carotid artery. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 22, 910-918.
- Clinton, S.K., et al. (1992) Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am J Pathol*, 140, 301-316.
- Cote, N., et al. (2013) Inflammation is associated with the remodeling of calcific aortic valve disease. *Inflammation*, 36, 573-581.
- Cowell, S.J., et al. (2004) Calcific aortic stenosis: same old story? *Age Ageing*, 33, 538-544.

## D

- Dale, A.C., et al. (2008) Secular decline in mortality from coronary heart disease in adults with diabetes mellitus: cohort study. *Bmj*, 337, a236.
- Daley, J.M., et al. (2005) Modulation of macrophage phenotype by soluble product(s) released from neutrophils. *J Immunol*, 174, 2265-2272.
- de Boer, O.J., et al. (1999) Leucocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization? *Cardiovasc Res*, 41, 443-449.
- Deutscher, S., et al. (1984) Diabetes and hypercholesterolemia among patients with calcific aortic stenosis. *J Chronic Dis*, 37, 407-415.
- Diehl, P., et al. (2008) Increased levels of circulating microparticles in patients with severe aortic valve stenosis. *Thromb Haemost*, 99, 711-719.
- Dinerman, J.L., et al. (1990) Increased neutrophil elastase release in unstable angina pectoris and acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 15, 1559-1563.
- Doring, Y., et al. (2012) Auto-antigenic protein-DNA complexes stimulate plasmacytoid dendritic cells to promote atherosclerosis. *Circulation*, 125, 1673-1683.
- Drechsler, M., et al. (2011) Neutrophilic granulocytes - promiscuous accelerators of atherosclerosis. *Thromb Haemost*, 106, 839-848.
- Drechsler, M., et al. (2010) Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis. *Circulation*, 122, 1837-1845.
- Duewell, P., et al. (2010) NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*, 464, 1357-1361.

## E

- Edep, M.E., et al. (2000) Matrix metalloproteinase expression in nonrheumatic aortic stenosis. *Cardiovasc Pathol*, 9, 281-286.
- Edfeldt, K., et al. (2002) Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation*, 105, 1158-1161.
- ENH (European Heart Network) (2008) Health care costs of cardiovascular diseases in 2006. *European Cardiovascular disease statistics*.
- Erbel, C., et al. (2015a) CXCL4-induced plaque macrophages can be specifically identified by co-expression of MMP7+S100A8+ in vitro and in vivo. *Innate Immun*, 21, 255-265.
- Erbel, C., et al. (2015b) Prevalence of M4 macrophages within human coronary atherosclerotic plaques is associated with features of plaque instability. *Int J Cardiol*, 186, 219-225.

## F

- Fadini, G.P., et al. (2013) Monocyte-macrophage polarization balance in pre-diabetic individuals. *Acta Diabetol*, 50, 977-982.
- Faggiano, P., et al. (2003) Progression of aortic valve sclerosis to aortic stenosis. *Am J Cardiol*, 91, 99-101.
- Falk, E., et al. (1995) Coronary plaque disruption. *Circulation*, 92, 657-671.
- Faxon, D.P., et al. (2004) Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group III: pathophysiology. *Circulation*, 109, 2617-2625.
- Feig, J.E., et al. (2011) Reversal of hyperlipidemia with a genetic switch favorably affects the content and inflammatory state of macrophages in atherosclerotic plaques. *Circulation*, 123, 989-998.
- Feig, J.E., et al. (2012) Regression of atherosclerosis is characterized by broad changes in the plaque macrophage transcriptome. *PLoS One*, 7, e39790.
- Filardy, A.A., et al. (2010) Proinflammatory clearance of apoptotic neutrophils induces an IL-12(low)IL-10(high) regulatory phenotype in macrophages. *J Immunol*, 185, 2044-2050.
- Finn, A.V., et al. (2012) Hemoglobin directs macrophage differentiation and prevents foam cell formation in human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol*, 59, 166-177.
- Fondard, O., et al. (2005) Extracellular matrix remodelling in human aortic valve disease: the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Eur Heart J*, 26, 1333-1341.
- Freeman, R.V. & Otto, C.M. (2005) Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation*, 111, 3316-3326.

## G

- Gach, O., et al. (2006) Acute neutrophil activation in direct stenting: comparison of stable and unstable angina patients. *Int J Cardiol*, 112, 59-65.
- Garg, V. (2006) Molecular genetics of aortic valve disease. *Curr Opin Cardiol*, 21, 180-184.
- Geissmann, F., et al. (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, 19, 71-82.
- Gilroy, D.W., et al. (2004) Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 3, 401-416.
- Glagov, S., et al. (1987) Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*, 316, 1371-1375.
- Glass, C.K. & Witztum, J.L. (2001) Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*, 104, 503-516.

- Gleissner, C.A. (2012) Macrophage Phenotype Modulation by CXCL4 in Atherosclerosis. *Front Physiol*, 3, 1.
- Gleissner, C.A., et al. (2007) Effects of native and modified low-density lipoproteins on monocyte recruitment in atherosclerosis. *Hypertension*, 50, 276-283.
- Gleissner, C.A. & Ley, K. (2007) CXCL4 in atherosclerosis: possible roles in monocyte arrest and macrophage foam cell formation. *Thromb Haemost*, 98, 917-918.
- Gleissner, C.A., et al. (2009) CXCL4 downregulates the atheroprotective hemoglobin receptor CD163 in human macrophages. *Circ Res*, 106, 203-211.
- Gleissner, C.A., et al. (2010) CXC chemokine ligand 4 induces a unique transcriptome in monocyte-derived macrophages. *J Immunol*, 184, 4810-4818.
- Goldbarg, S.H., et al. (2007) Insights into degenerative aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol*, 50, 1205-1213.
- Gombart, A.F., et al. (2005) Aberrant expression of neutrophil and macrophage-related genes in a murine model for human neutrophil-specific granule deficiency. *J Leukoc Biol*, 78, 1153-1165.
- Gordon, S. (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*, 3, 23-35.
- Gordon, S. (2007) The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol*, 37 Suppl 1, S9-17.
- Gordon, S. & Taylor, P.R. (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, 5, 953-964.
- Gourdy, P., et al. (2001) Prevalence of type 2 diabetes and impaired fasting glucose in the middle-aged population of three French regions - The MONICA study 1995-97. *Diabetes Metab*, 27, 347-358.
- Grage-Griebenow, E., et al. (2001) Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol*, 69, 11-20.
- Gratchev, A., et al. (2001) Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein betaIG-H3. *Scand J Immunol*, 53, 386-392.

## H

- Haffner, S.M., et al. (1998) Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*, 339, 229-234.
- Haumer, M., et al. (2005) Association of neutrophils and future cardiovascular events in patients with peripheral artery disease. *J Vasc Surg*, 41, 610-617.
- Helske, S., et al. (2007) Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process. *Curr Opin Lipidol*, 18, 483-491.
- Hemker, H.C., et al. (2002) The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 32, 249-253.
- Hemker, H.C., et al. (2003) Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 33, 4-15.
- Herman, M.P., et al. (2001) Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. *J Clin Invest*, 107, 1117-1126.
- Hirata, Y., et al. (2011) Coronary atherosclerosis is associated with macrophage polarization in epicardial adipose tissue. *J Am Coll Cardiol*, 58, 248-255.
- Hjortnaes, J., et al. (2010) Arterial and aortic valve calcification inversely correlates with osteoporotic bone remodelling: a role for inflammation. *Eur Heart J*, 31, 1975-1984.
- Hobeika, M.J., et al. (2007) Matrix metalloproteinases in peripheral vascular disease. *J Vasc Surg*, 45, 849-857.



- Hong, Y.J., et al. (2009) Plaque characteristics in culprit lesions and inflammatory status in diabetic acute coronary syndrome patients. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2, 339-349.
- Hosokawa, R., et al. (2003) TGF-beta 3 decreases type I collagen and scarring after labioplasty. *J Dent Res*, 82, 558-564.

## I

- InVS (Institut de Veille Sanitaire) (2008) Niveau tensionnel moyen et prévalence de l'hypertension artérielle chez les adultes de 18 à 74 ans, ENNS 2006-2007. *Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire (BEH)*, 49-50, 478-482.
- InVS (Institut de Veille Sanitaire) (2011) Données sur la mortalité en France : principales causes de décès en 2008 et évolutions depuis 2000. *Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire (BEH)*, 22, 249-255.
- Ionita, M.G., et al. (2010) High neutrophil numbers in human carotid atherosclerotic plaques are associated with characteristics of rupture-prone lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30, 1842-1848.
- Lung, B., et al. (2003) A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *Eur Heart J*, 24, 1231-1243.

## J

- Jenkins, S.J., et al. (2011) Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science*, 332, 1284-1288.
- Jetten, N., et al. (2014) Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. *Angiogenesis*, 17, 109-118.
- Jiang, X., et al. (2004) The expression of matrix metalloproteinases-9, transforming growth factor-beta1 and transforming growth factor-beta receptor I in human atherosclerotic plaque and their relationship with plaque stability. *Chin Med J (Engl)*, 117, 1825-1829.
- Juan-Babot, J.O., et al. (2003) [Neovascularization in human coronary arteries with lesions of different severity]. *Rev Esp Cardiol*, 56, 978-986.
- Jude, B., et al. (2005) Relevance of tissue factor in cardiovascular disease. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 98, 667-671.
- Jung, S., et al. (2002) In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity*, 17, 211-220.

## K

- Kaden, J.J., et al. (2005a) Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis. *Cardiovasc Pathol*, 14, 80-87.
- Kaden, J.J., et al. (2003) Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis. *Atherosclerosis*, 170, 205-211.
- Kaden, J.J., et al. (2005b) Tumor necrosis factor alpha promotes an osteoblast-like phenotype in human aortic valve myofibroblasts: a potential regulatory mechanism of valvular calcification. *Int J Mol Med*, 16, 869-872.
- Kadl, A., et al. (2010) Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circ Res*, 107, 737-746.
- Kapusta, P., et al. (2012) Factor XIII expression within aortic valves and its plasma activity in patients with aortic stenosis: association with severity of disease. *Thromb Haemost*, 108, 1172-1179.

- Kawaguchi, H., et al. (1996) Band neutrophil count and the presence and severity of coronary atherosclerosis. *Am Heart J*, 132, 9-12.
- Khallou-Laschet, J., et al. (2010) Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PLoS One*, 5, e8852.
- Knight, J.S., et al. (2014) Peptidylarginine deiminase inhibition reduces vascular damage and modulates innate immune responses in murine models of atherosclerosis. *Circ Res*, 114, 947-956.
- Kokkinos, P. & Myers, J. (2010) Exercise and physical activity: clinical outcomes and applications. *Circulation*, 122, 1637-1648.
- Kolodgie, F.D., et al. (2003) Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med*, 349, 2316-2325.
- Kothari, P., et al. (2014) IL-6-mediated induction of matrix metalloproteinase-9 is modulated by JAK-dependent IL-10 expression in macrophages. *J Immunol*, 192, 349-357.
- Koullias, G.J., et al. (2004) Tissue microarray detection of matrix metalloproteinases, in diseased tricuspid and bicuspid aortic valves with or without pathology of the ascending aorta. *Eur J Cardiothorac Surg*, 26, 1098-1103.

## L

- Lawrence, T., et al. (2002) Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*, 2, 787-795.
- Leclercq, A., et al. (2007) Involvement of intraplaque hemorrhage in atherothrombosis evolution via neutrophil protease enrichment. *J Leukoc Biol*, 82, 1420-1429.
- Lecompte T, et al. (2006) Thrombinographie. *Hématologie*, 12 (2), 115-127.
- Lee, C.W., et al. (2013) Macrophage heterogeneity of culprit coronary plaques in patients with acute myocardial infarction or stable angina. *Am J Clin Pathol*, 139, 317-322.
- Lehmann, S., et al. (2009) Mechanical strain and the aortic valve: influence on fibroblasts, extracellular matrix, and potential stenosis. *Ann Thorac Surg*, 88, 1476-1483.
- Lester, S.J., et al. (1998) The natural history and rate of progression of aortic stenosis. *Chest*, 113, 1109-1114.
- Li, H. & Sun, B. (2007) Toll-like receptor 4 in atherosclerosis. *J Cell Mol Med*, 11, 88-95.
- Libby, P. (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420, 868-874.
- Libby, P. (2012) Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32, 2045-2051.
- Libby, P. & Aikawa, M. (2002) Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. *Nat Med*, 8, 1257-1262.
- Lindroos, M., et al. (1993) Prevalence of aortic valve abnormalities in the elderly: an echocardiographic study of a random population sample. *J Am Coll Cardiol*, 21, 1220-1225.
- Liu, A.C., et al. (2007) The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *Am J Pathol*, 171, 1407-1418.
- Losi, M.A., et al. (2010) Aortic valve sclerosis in patients with peripheral and/or coronary arterial disease. *Echocardiography*, 27, 608-612.
- Lupu, F., et al. (1993) Localization and production of plasminogen activator inhibitor-1 in human healthy and atherosclerotic arteries. *Arterioscler Thromb*, 13, 1090-1100.
- Lusis, A.J. (2000) Atherosclerosis. *Nature*, 407, 233-241.
- Luu, N.T., et al. (2007) Comparison of the pro-inflammatory potential of monocytes from healthy adults and those with peripheral arterial disease using an in vitro culture model. *Atherosclerosis*, 193, 259-268.

## M

- Ma, C., et al. (2015) Toll-Like Receptor 9 Inactivation Alleviated Atherosclerotic Progression and Inhibited Macrophage Polarized to M1 Phenotype in ApoE<sup>-/-</sup> Mice. *Dis Markers*, 2015, 909572.
- Mackman, N. (2004) Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, 1015-1022.
- Maganti, K., et al. (2010) Valvular heart disease: diagnosis and management. *Mayo Clin Proc*, 85, 483-500.
- Malek, A.M., et al. (1999) Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *Jama*, 282, 2035-2042.
- Mallat, Z., et al. (2001) Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res*, 89, 930-934.
- Mallat, Z. & Tedgui, A. (2004) [Apoptosis and acute coronary syndromes]. *Med Sci (Paris)*, 20, 298-303.
- Manini, T.M., et al. (2006) Daily activity energy expenditure and mortality among older adults. *Jama*, 296, 171-179.
- Mantovani, A., et al. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, 25, 677-686.
- Marmur, J.D., et al. (1996) Identification of active tissue factor in human coronary atheroma. *Circulation*, 94, 1226-1232.
- Martinez, F.O., et al. (2008) Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*, 13, 453-461.
- Matsumoto, K., et al. (2002) Correlation between common carotid arterial wall thickness and ischemic stroke in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, 51, 244-247.
- Maugeri, N., et al. (2006) Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation. *J Thromb Haemost*, 4, 1323-1330.
- Mauriello, A., et al. (2000) Hyperfibrinogenemia is associated with specific histocytological composition and complications of atherosclerotic carotid plaques in patients affected by transient ischemic attacks. *Circulation*, 101, 744-750.
- Mazzone, A., et al. (2006) Biological features (inflammation and neoangiogenesis) and atherosclerotic risk factors in carotid plaques and calcified aortic valve stenosis: two different sites of the same disease? *Am J Clin Pathol*, 126, 494-502.
- Megens, R.T., et al. (2012) Presence of luminal neutrophil extracellular traps in atherosclerosis. *Thromb Haemost*, 107, 597-598.
- Meisel, S.R., et al. (2002) Differentiation of adherent human monocytes into macrophages markedly enhances tissue factor protein expression and procoagulant activity. *Atherosclerosis*, 161, 35-43.
- Methia, N., et al. (2001) Localized reduction of atherosclerosis in von Willebrand factor-deficient mice. *Blood*, 98, 1424-1428.
- Mills, C.D., et al. (2000) M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*, 164, 6166-6173.
- Mohler, E.R., 3rd, et al. (2001) Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation*, 103, 1522-1528.
- Mönckeberg, J.G. (1904) Der normale histogische Bau und die Sklerose der Aortenklappen. *virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol.*, 176, 472-514
- Moreno, P.R., et al. (2011) Increased macrophage infiltration and neovascularization in congenital bicuspid aortic valve stenosis. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 142, 895-901.

- Moreno, P.R., et al. (1994) Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation*, 90, 775-778.
- Moreno, P.R., et al. (2000) Coronary composition and macrophage infiltration in atherectomy specimens from patients with diabetes mellitus. *Circulation*, 102, 2180-2184.
- Mosser, D.M. (2003) The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol*, 73, 209-212.
- Mosser, D.M. & Edwards, J.P. (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, 8, 958-969.
- Moulton, K.S., et al. (2003) Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 4736-4741.
- Mulholland, D.L. & Gotlieb, A.I. (1996) Cell biology of valvular interstitial cells. *Can J Cardiol*, 12, 231-236.

## N

- Nagase, H., et al. (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*, 69, 562-573.
- Naghavi, M., et al. (2003) From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation*, 108, 1664-1672.
- Nagy, E., et al. (2011) Upregulation of the 5-lipoxygenase pathway in human aortic valves correlates with severity of stenosis and leads to leukotriene-induced effects on valvular myofibroblasts. *Circulation*, 123, 1316-1325.
- Napoli, C., et al. (1997) Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*, 100, 2680-2690.
- Naruko, T., et al. (2002) Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Circulation*, 106, 2894-2900.
- Nassimiha, D., et al. (2001) Rate of progression of valvular aortic stenosis in patients > or = 60 years of age. *Am J Cardiol*, 87, 807-809, A809.
- Nathan, C. (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*, 6, 173-182.
- Newby, A.C. (2007) Metalloproteinases and vulnerable atherosclerotic plaques. *Trends Cardiovasc Med*, 17, 253-258.
- Newby, A.C. (2008) Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28, 2108-2114.

## O

- O'Brien, K.D. (2006) Pathogenesis of calcific aortic valve disease: a disease process comes of age (and a good deal more). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26, 1721-1728.
- O'Brien, K.D. (2007) Epidemiology and genetics of calcific aortic valve disease. *J Investig Med*, 55, 284-291.
- O'Brien, K.D., et al. (1995) Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions. *Circulation*, 92, 2163-2168.
- O'Brien, K.D., et al. (1996) Apolipoproteins B, (a), and E accumulate in the morphologically early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16, 523-532.

- Obeid, E., et al. (2013) The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression (review). *Int J Oncol*, 43, 5-12.
- Oh, C.K., et al. (2002) PAI-1 promotes extracellular matrix deposition in the airways of a murine asthma model. *Biochem Biophys Res Commun*, 294, 1155-1160.
- Olson, F.J., et al. (2011) Increased vascularization of shoulder regions of carotid atherosclerotic plaques from patients with diabetes. *J Vasc Surg*, 54, 1324-1331 e1325.
- Olsson, M., et al. (1999) Presence of oxidized low density lipoprotein in nonrheumatic stenotic aortic valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19, 1218-1222.
- OMS (1988) Rheumatic fever and rheumatic heart disease. Report of a WHO Study Group. Geneva, Technical Report Series No. 764).
- OMS (2001) Rheumatic fever and rheumatic heart disease. Report of a WHO Expert Consultation, Geneva, WHO Technical Report Series No. 923.
- OMS (2014) Principales causes de mortalité dans le monde, Rapport de mai 2014.
- Ostling, G., et al. (2007) Increased echolucency of carotid plaques in patients with type 2 diabetes. *Stroke*, 38, 2074-2078.
- Otto, C.M. (2006) Valvular aortic stenosis: disease severity and timing of intervention. *J Am Coll Cardiol*, 47, 2141-2151.
- Otto, C.M., et al. (1994) Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation*, 90, 844-853.
- Otto, C.M. & O'Brien, K.D. (2001) Why is there discordance between calcific aortic stenosis and coronary artery disease? *Heart*, 85, 601-602.

## P

- Palta, S., et al. (2000) New insights into the progression of aortic stenosis: implications for secondary prevention. *Circulation*, 101, 2497-2502.
- Passlick, B., et al. (1989) Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*, 74, 2527-2534.
- Passmore, M., et al. (2015) Osteopontin alters endothelial and valvular interstitial cell behaviour in calcific aortic valve stenosis through HMGB1 regulation. *Eur J Cardiothorac Surg*, 48, e20-29.
- Perrotta, I., et al. (2015) HIF-1alpha and VEGF: Immunohistochemical Profile and Possible Function in Human Aortic Valve Stenosis. *Ultrastruct Pathol*, 39, 198-206.
- Perrotta, I., et al. (2011) New evidence for a critical role of elastin in calcification of native heart valves: immunohistochemical and ultrastructural study with literature review. *Histopathology*, 59, 504-513.
- Perrotta, I., et al. (2014) Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Calcified Human Aortic Valves: A Histopathologic, Immunohistochemical, and Ultrastructural Study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*.
- Pitsilos, S., et al. (2003) Platelet factor 4 localization in carotid atherosclerotic plaques: correlation with clinical parameters. *Thromb Haemost*, 90, 1112-1120.
- Pittilo, R. (2000) Cigarette smoking, endothelial injury and cardiovascular disease. *Int J Exp Pathol*, 81, 219-230.
- Pohjolainen, V., et al. (2008) Noncollagenous bone matrix proteins as a part of calcific aortic valve disease regulation. *Hum Pathol*, 39, 1695-1701.
- Pohle, K., et al. (2001) Progression of aortic valve calcification: association with coronary atherosclerosis and cardiovascular risk factors. *Circulation*, 104, 1927-1932.
- Porcheray, F., et al. (2005) Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol*, 142, 481-489.

Pyo, R.T., et al. (2004) Mice deficient in tissue factor demonstrate attenuated intimal hyperplasia in response to vascular injury and decreased smooth muscle cell migration. *Thromb Haemost*, 92, 451-458.

## Q

Qian, J., et al. (2010) Relationship between aortic valve calcification and the severity of coronary atherosclerotic disease. *J Heart Valve Dis*, 19, 466-470.

## R

Rabkin-Aikawa, E., et al. (2004) Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves. *J Heart Valve Dis*, 13, 841-847.

Rabkin, E., et al. (2001) Activated interstitial myofibroblasts express catabolic enzymes and mediate matrix remodeling in myxomatous heart valves. *Circulation*, 104, 2525-2532.

Rajamannan, N.M., et al. (2011) Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation*, 124, 1783-1791.

Rajamannan, N.M., et al. (2003) Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation*, 107, 2181-2184.

Ramos, M.A., et al. (1998) Induction of macrophage VEGF in response to oxidized LDL and VEGF accumulation in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18, 1188-1196.

Ridker, P.M. (2003) Cardiology Patient Page. C-reactive protein: a simple test to help predict risk of heart attack and stroke. *Circulation*, 108, e81-85.

Rodes-Cabau, J. (2011) Transcatheter aortic valve implantation: current and future approaches. *Nat Rev Cardiol*, 9, 15-29.

Roma-Lavisse, C., et al. (2015) M1 and M2 macrophage proteolytic and angiogenic profile analysis in atherosclerotic patients reveals a distinctive profile in type 2 diabetes. *Diab Vasc Dis Res*, 12, 279-289.

Roos-Hesselink, J.W., et al. (2003) Aortic valve and aortic arch pathology after coarctation repair. *Heart*, 89, 1074-1077.

Ross, R. (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340, 115-126.

Ross, R. & Glomset, J.A. (1976) The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med*, 295, 369-377.

Rotzius, P., et al. (2010) Distinct infiltration of neutrophils in lesion shoulders in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Am J Pathol*, 177, 493-500.

Rugeri, L., et al. (2007) Thrombin-generating capacity in patients with von Willebrand's disease. *Haematologica*, 92, 1639-1646.

## S

Saeed, S., et al. (2014) Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science*, 345, 1251086.

Saladze, T., et al. (2015) Histological and Immunohistochemical Studies of Atherosclerotic and Senile Calcific Aortic Valve Stenosis. *Georgian Med News*, 94-99.

Satta, J., et al. (2003) Evidence for an altered balance between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitors in calcific aortic stenosis. *Ann Thorac Surg*, 76, 681-688.

- Schmidt, A.M., et al. (1999) Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res*, 84, 489-497.
- Schoenhagen, P., et al. (2000) Extent and direction of arterial remodeling in stable versus unstable coronary syndromes : an intravascular ultrasound study. *Circulation*, 101, 598-603.
- Schwartzberg, S., et al. (2013) Low circulating monocyte count is associated with severe aortic valve stenosis. *Isr Med Assoc J*, 15, 500-504.
- Shaikh, S., et al. (2012) Macrophage subtypes in symptomatic carotid artery and femoral artery plaques. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 44, 491-497.
- Shalhoub, J., et al. (2010) Cytokine profiling in culture reveals a predominance of M1 macrophage polarisation in symptomatic carotid plaques. BSCR Spring Meeting. Poster abstract BSCR38. In: *Heart*. 96(17):e23-3.
- Shetty, R., et al. (2006) Expression of bone-regulatory proteins in human valve allografts. *Heart*, 92, 1303-1308.
- Shibata, T., et al. (2010) Apoptotic neutrophils and nitric oxide regulate cytokine production by IFN-gamma-stimulated macrophages. *Cytokine*, 53, 191-195.
- Shiohara, M., et al. (2004) Phenotypic and functional alterations of peripheral blood monocytes in neutrophil-specific granule deficiency. *J Leukoc Biol*, 75, 190-197.
- Smith, J.D., et al. (1995) Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 8264-8268.
- Sobel, B.E., et al. (1998) Increased plasminogen activator inhibitor type 1 in coronary artery atherectomy specimens from type 2 diabetic compared with nondiabetic patients: a potential factor predisposing to thrombosis and its persistence. *Circulation*, 97, 2213-2221.
- Soehnlein, O. (2012) Multiple roles for neutrophils in atherosclerosis. *Circ Res*, 110, 875-888.
- Soehnlein, O., et al. (2008a) Neutrophil primary granule proteins HBP and HNP1-3 boost bacterial phagocytosis by human and murine macrophages. *J Clin Invest*, 118, 3491-3502.
- Soehnlein, O., et al. (2008b) Neutrophil secretion products regulate anti-bacterial activity in monocytes and macrophages. *Clin Exp Immunol*, 151, 139-145.
- Soehnlein, O., et al. (2009a) Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. *Trends Immunol*, 30, 538-546.
- Soehnlein, O., et al. (2008c) Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood*, 112, 1461-1471.
- Soehnlein, O., et al. (2009b) Neutrophils launch monocyte extravasation by release of granule proteins. *Thromb Haemost*, 102, 198-205.
- Soini, Y., et al. (2001) Expression of MMP2, MMP9, MT1-MMP, TIMP1, and TIMP2 mRNA in valvular lesions of the heart. *J Pathol*, 194, 225-231.
- Spagnoli, L.G., et al. (1994) Relationships between risk factors and morphological patterns of human carotid atherosclerotic plaques. A multivariate discriminant analysis. *Atherosclerosis*, 108, 39-60.
- Sтары, H.C. (2000) Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, 1177-1178.
- Sтары, H.C., et al. (1995) A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 92, 1355-1374.

- Stein, M., et al. (1992) Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med*, 176, 287-292.
- Steinberg, D. (2002) Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat Med*, 8, 1211-1217.
- Steiner, I., et al. (2012) Calcific aortic valve stenosis: Immunohistochemical analysis of inflammatory infiltrate. *Pathol Res Pract*, 208, 231-234.
- Stevens A, L.J. (1997) *Histologie humaine*. DeBoeck Université.
- Stewart, B.F., et al. (1997) Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol*, 29, 630-634.
- Stoger, J.L., et al. (2012) Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 225, 461-468.

## T

- Tarling, J.D., et al. (1987) Self-renewal of pulmonary alveolar macrophages: evidence from radiation chimera studies. *J Leukoc Biol*, 42, 443-446.
- Tavor, S., et al. (2002) Macrophage functional maturation and cytokine production are impaired in C/EBP epsilon-deficient mice. *Blood*, 99, 1794-1801.
- Tedgui, A. & Mallat, Z. (2006) Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev*, 86, 515-581.
- Toschi, V., et al. (1997) Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation*, 95, 594-599.
- Tribouilloy C, et al. (2007) Sténose aortique : de l'histoire naturelle aux indications thérapeutiques. *mt cardio*, 3 (6) 453-458.
- Tunstall-Pedoe, H., et al. (1999) Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet*, 353, 1547-1557.

## V

- Van Gaal, L.F., et al. (2006) Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*, 444, 875-880.
- van Leeuwen, M., et al. (2008) Accumulation of myeloperoxidase-positive neutrophils in atherosclerotic lesions in LDLR<sup>-/-</sup> mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28, 84-89.
- Vandeplass, A., et al. (1988) Frequency of angina pectoris and coronary artery disease in severe isolated valvular aortic stenosis. *Am J Cardiol*, 62, 117-120.
- Vesey, J.M. & Otto, C.M. (2004) Complications of prosthetic heart valves. *Curr Cardiol Rep*, 6, 106-111.
- Virmani, R., et al. (2002) Vulnerable plaque: the pathology of unstable coronary lesions. *J Interv Cardiol*, 15, 439-446.
- Virmani, R., et al. (2000) Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, 1262-1275.
- Virmani, R., et al. (2005) Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25, 2054-2061.



- Visse, R. & Nagase, H. (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, 92, 827-839.
- von Birgelen, C., et al. (2001) Plaque distribution and vascular remodeling of ruptured and nonruptured coronary plaques in the same vessel: an intravascular ultrasound study in vivo. *J Am Coll Cardiol*, 37, 1864-1870.

## W

- Wald, D.S., et al. (2002) Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *Bmj*, 325, 1202.
- Waldo, S.W., et al. (2008) Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol*, 172, 1112-1126.
- Wang, R., et al. (2014) M1/M2 macrophages and associated mechanisms in congenital bicuspid aortic valve stenosis. *Exp Ther Med*, 7, 935-940.
- Ward, C. (2000) Clinical significance of the bicuspid aortic valve. *Heart*, 83, 81-85.
- Wilcox, J.N., et al. (1989) Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 2839-2843.
- Wolfs, I.M., et al. (2011) Differentiation factors and cytokines in the atherosclerotic plaque micro-environment as a trigger for macrophage polarisation. *Thromb Haemost*, 106, 763-771.
- Wong, K.L., et al. (2011) Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*, 118, e16-31.

## X

- Xu, X.H., et al. (2001) Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation*, 104, 3103-3108.

## Y

- Yadav, B.K., et al. (2014) Correlation of VEGF genetic polymorphisms and lipid profile to aortic calcification. *Gene*, 550, 33-39.
- Yener, N., et al. (2002) Bicuspid aortic valve. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 8, 264-267.
- Yetkin, E. & Waltenberger, J. (2009) Molecular and cellular mechanisms of aortic stenosis. *Int J Cardiol*, 135, 4-13.
- Yu, Z., et al. (2011) Tumor necrosis factor-alpha accelerates the calcification of human aortic valve interstitial cells obtained from patients with calcific aortic valve stenosis via the BMP2-Dlx5 pathway. *J Pharmacol Exp Ther*, 337, 16-23.

## Z

- Zawadzki, C., et al. (2007) Dyslipidemia shifts the tissue factor/tissue factor pathway inhibitor balance toward increased thrombogenicity in atherosclerotic plaques: evidence for a corrective effect of statins. *Atherosclerosis*, 195, e117-125.
- Zeihner, A.M., et al. (1995) Long-term cigarette smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial vasodilator function. *Circulation*, 92, 1094-1100.
- Zernecke, A., et al. (2008) Protective role of CXC receptor 4/CXC ligand 12 unveils the importance of neutrophils in atherosclerosis. *Circ Res*, 102, 209-217.

- Zhang, R., et al. (2001) Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *Jama*, 286, 2136-2142.
- Ziegler-Heitbrock, L., et al. (2010) Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 116, e74-80.
- Zizzo, G., et al. (2012) Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction. *J Immunol*, 189, 3508-3520.