



**HAL**  
open science

## Caractérisation et imagerie moléculaire de la plaque d'athérome : études pré-cliniques

Jakub Toczek

► **To cite this version:**

Jakub Toczek. Caractérisation et imagerie moléculaire de la plaque d'athérome : études pré-cliniques. Médecine humaine et pathologie. Université de Grenoble, 2013. Français. <NNT: 2013GRENS037>. <tel-01556490>

**HAL Id: tel-01556490**

**<https://theses.hal.science/tel-01556490v1>**

Submitted on 5 Jul 2017

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.



HAL Authorization

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

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

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Jakub TOCZEK**

Thèse dirigée par **Laurent M. RIOU**

préparée au sein du laboratoire **Radiopharmaceutiques  
Biocliniques, INSERM UMR 1039**

dans l'**École Doctorale : Ingénierie pour la Santé, la Cognition et  
l'Environnement**

## Caractérisation et Imagerie Moléculaire de la Plaque d'Athérome : Études Pré-cliniques

Thèse soutenue publiquement le **12 novembre 2013**,  
devant le jury composé de :

**M. Jacques BONNET**

PU-PH, Bordeaux, Rapporteur

**M. Patrick BOURGUET**

PU-PH, Rennes, Rapporteur

**M. Gérard FINET**

PU-PH, Lyon, Examineur

**M<sup>me</sup> Catherine GHEZZI**

PU, Grenoble, Présidente de jury

**M. Maurizio F. MARIANI**

DR Advanced Accelerator Applications SA, Examineur

**M. Laurent M. RIOU**

CR INSERM, Grenoble, Directeur de thèse

**M. Gérald VANZETTO**

PU-PH, Grenoble, Examineur



Je remercie le laboratoire Radiopharmaceutiques Biocliniques, unité mixte de recherche INSERM 1039, ainsi que tous les collaborateurs qui ont permis la réalisation de cette thèse de doctorat.

Je remercie tout particulièrement la société Advanced Accelerator Applications et l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) qui m'ont permis de bénéficier d'un financement dans le cadre d'une Convention Industrielle de Formation par la Recherche (CIFRE).

Enfin, je remercie également l'ensemble des acteurs qui ont contribué à financer les travaux de thèse et tout particulièrement l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) pour le financement du projet PLAQUIMAG dans le cadre de l'appel à projets Technologies pour la Santé et l'Autonomie (TecSan) édition 2009.

## Table des matières

<b>Table des matières.....</b>	<b>3</b>
<b>Abréviations.....</b>	<b>9</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>11</b>
<b>Revue bibliographique.....</b>	<b>13</b>
1 Introduction.....	13
1.1 La maladie coronaire : le problème clinique.....	13
1.2 Étude de l'athérosclérose.....	15
2 Physiopathologie de l'athérosclérose.....	17
2.1 La paroi artérielle.....	17
2.1.1 Relation fonction-structure.....	17
2.1.2 Structure de la paroi artérielle.....	17
2.2 Les lésions athéromateuses.....	19
2.2.1 Site de développement des lésions.....	19
2.2.2 Classification des lésions.....	20
2.3 Initiation de l'athérosclérose.....	22
2.3.1 Dysfonction endothéliale.....	22
2.3.1.1 Mise en évidence de la dysfonction endothéliale.....	23
2.3.1.2 Contrainte de cisaillement et homéostasie vasculaire.....	23
2.3.1.3 Activation des cellules endothéliales.....	24
2.3.1.4 Conséquences de l'activation de l'endothélium.....	26
2.3.2 Lipoprotéines : rétention et oxydation.....	27
2.3.2.1 Lipoprotéines et métabolisme du cholestérol.....	27
i) Nature des lipoprotéines.....	27
ii) Métabolisme du cholestérol.....	28
2.3.2.2 Perméabilité aux lipoprotéines.....	29
i) Passage trans-endothélial.....	29
ii) Modification du passage trans-endothélial.....	30
2.3.2.3 Rétention.....	31
i) Interaction avec les protéoglycanes.....	31
ii) Sites de rétention augmentée.....	32
2.3.2.4 Oxydation.....	33
i) Les acteurs de l'oxydation.....	33
ii) Étapes de l'oxydation.....	34
iii) Propriétés des LDL modifiées.....	35
2.3.3 Réponse inflammatoires.....	36
2.3.3.1 Recrutement leucocytaire.....	36
i) Capture et roulement.....	37
ii) Activation et arrêt des leucocytes.....	37
iii) Migration transendothéliale.....	39
2.3.3.2 Les macrophages.....	40
i) Monocytes.....	40
ii) Différentiation.....	41
iii) Inflammation.....	41
2.3.3.3 Les lymphocytes T.....	43
2.3.3.4 Autres types cellulaires.....	44

## Table des matières

i) Les cellules dendritiques.....	45
ii) Thrombocytes.....	45
iii) Neutrophiles.....	46
iv) Mastocytes.....	46
v) Les lymphocytes B.....	47
2.3.4 Accumulation de lipides.....	47
2.3.4.1 Origine des cellules spumeuses.....	47
2.3.4.2 Captation de lipides.....	48
2.3.4.3 Devenir intra-cellulaire et réponse au cholestérol.....	48
i) Dans le réticulum endoplasmique.....	48
ii) Efflux de cholestérol.....	49
iii) Inflammation .....	49
2.4 Progression de l'athérosclérose.....	49
2.4.1.1 Cœur lipidique.....	50
i) Apoptose des cellules spumeuses.....	50
ii) Efferocytose.....	51
iii) Nécrose de plaque.....	51
iv) Autophagie.....	52
v) Rôle de la vascularisation.....	52
2.4.1.2 Remodelage vasculaire.....	52
i) Changements phénotypiques des cellules musculaires lisses.....	52
ii) Capsule fibreuse.....	55
iii) Le remodelage vasculaire excentrique et constrictif.....	55
2.4.1.3 Calcification des plaques.....	56
2.5 La vulnérabilité.....	57
2.5.1 Précision sur la notion de vulnérabilité.....	57
2.5.2 Rupture de plaque.....	59
2.5.2.1 Approche biomécanique.....	59
2.5.2.2 Critère de vulnérabilité.....	60
2.5.2.3 Mécanismes biologiques.....	62
i) Capsule fibreuse.....	62
ii) Cœur lipidique.....	64
iii) Calcifications.....	65
2.5.3 Érosion de plaque.....	65
2.5.4 Thrombose.....	66
3 Diagnostic et imagerie de l'athérosclérose.....	68
3.1 Stratégie diagnostique et place de l'imagerie.....	68
3.2 Modalités d'imagerie.....	70
3.2.1 Imagerie échographique.....	70
3.2.2 Imagerie aux rayons X.....	71
3.2.3 Imagerie par résonance magnétique.....	72
3.2.4 Imagerie nucléaire.....	73
3.2.5 Modalités d'imagerie optique.....	74
3.2.6 Comparaison des modalités d'imagerie.....	75
3.3 Imagerie invasive.....	75
3.4 Imagerie non invasive.....	78

## Table des matières

3.4.1 Imagerie anatomique.....	78
3.4.1.1 Imagerie des calcifications coronaires.....	78
3.4.1.2 Imagerie en angiographie par tomodensitométrie.....	80
3.4.1.3 Imagerie échographique.....	80
3.4.1.4 Imagerie par MRI.....	81
3.4.2 Imagerie moléculaire.....	82
3.4.2.1 Macrophages.....	82
3.4.2.2 Molécules d'adhésion.....	86
3.4.2.3 Activité protéolytique.....	87
3.4.2.4 Accumulation de lipides et oxydation.....	88
3.4.2.5 Apoptose.....	89
3.4.2.6 Néovascularisation et hémorragie intra-plaque.....	90
3.4.2.7 Calcification.....	90
3.5 Conclusion sur l'imagerie.....	90
<b>Partie expérimentale : Biomécanique.....</b>	<b>92</b>
1 Introduction.....	92
1.1 Bases de biomécanique.....	92
1.1.1 Quelques notions.....	92
1.1.2 La contrainte pariétale.....	94
1.1.3 La modélisation en éléments finis.....	95
1.1.4 La rupture.....	95
1.2 Contexte du travail expérimental.....	96
1.2.1 Les apports de l'approche biomécanique sur la vulnérabilité.....	96
1.2.2 Vulnérabilité dans les modèle murins d'athérosclérose.....	97
1.3 Objectifs, principe et originalité de l'étude.....	97
2 Matériel & Méthodes.....	99
2.1 Étude des propriétés mécaniques locales du tissu aortiques de souris par microscopie de force atomique.....	99
2.1.1 Animaux & préparation des échantillons.....	99
2.1.2 Colorations histologiques & marquages immunohistochimiques.....	99
2.1.3 Identification et des constituants des lésions et définition des zones de plaque.....	100
2.1.4 Protocole AFM.....	101
2.2 Étude des contraintes dans le tissu aortique de souris .....	104
2.2.1 Animaux & anneaux aortiques.....	104
2.2.2 Colorations histologiques et marquages immunohistochimiques.....	105
2.2.3 Identification des constituants des lésions et définition des zones de plaque sur la conformation ouverte.....	106
2.2.4 Analyse en éléments finis .....	107
2.2.5 Analyse des résultats.....	108
2.3 Analyse des données et traitement statistique.....	110
3 Résultats.....	111
3.1 Propriétés mécaniques des tissus aortiques de souris .....	111
3.2 Caractéristiques morphologiques et histologiques des anneaux aortiques.....	112
3.3 Ouverture de l'anneau artériel.....	114
3.4 Caractérisation biomécanique par modélisation en éléments finis.....	115

## Table des matières

3.4.1	Étude de l'aorte de souris.....	115
3.4.2	Étude de l'influence des propriétés mécaniques.....	118
4	Discussion.....	119
4.1	Principaux résultats de l'étude biomécanique.....	119
4.2	Caractérisation du tissu aortique étudié.....	119
4.2.1	Morphologie des portions artérielles pathologiques.....	119
4.2.2	Identification des zones de plaque.....	120
4.2.3	Composition des plaques.....	121
4.2.4	Évolution des lésions.....	122
4.2.5	Caractérisation de la paroi artérielle.....	123
4.2.6	Angle d'ouverture.....	123
4.3	Étude des propriétés mécaniques des anneaux d'aorte.....	124
4.3.1	Considération sur le protocole expérimental.....	124
4.3.2	Considérations sur la technique et le modèle utilisés et leurs limites.....	125
4.3.3	Comparaison aux données de la littérature.....	127
4.4	Profils de distribution des contraintes et déformations pariétales.....	135
4.4.1	Limites de l'étude par modélisation.....	135
4.4.2	Distribution des contraintes pariétales dans l'aorte de souris apoE <sup>-/-</sup> .....	136
4.4.3	Implications en termes de vulnérabilité.....	138
5	Conclusion & ouverture.....	142
	<b>Partie expérimentale : Imagerie.....</b>	<b>144</b>
1	Introduction.....	144
1.1	Peptides dérivés de la molécule HLA-B2702.....	144
1.1.1	Origine & intérêt du peptide.....	144
1.1.2	Travaux antérieurs & contexte du travail expérimental.....	145
1.1.3	Objectif du travail expérimental.....	146
1.2	Étude du [ <sup>18</sup> F]-fluorodésoxyglucose.....	146
1.2.1	Le [ <sup>18</sup> F]-fluorodésoxyglucose (FDG).....	146
1.2.2	L'utilisation du FDG dans l'athérome.....	147
1.2.3	La captation du FDG par le tissu adipeux brun.....	148
1.2.4	Objectif de l'étude.....	148
2	Matériel & Méthodes.....	149
2.1	Molécules étudiées.....	149
2.2	Étude de la liaison des peptides à VCAM-1.....	150
2.2.1	Analyse en SPR.....	150
2.2.2	Analyse en polarisation de fluorescence.....	151
2.2.3	Analyse par saturation de liaison de molécules radiomarquées.....	153
2.3	Radiomarquage et analyse de stabilité des peptides.....	154
2.3.1	Stratégies de radiomarquage au technétium-99m.....	154
2.3.1.1	Méthode Isolink.....	154
2.3.1.2	Méthode HYNIC.....	155
2.3.2	Stratégies de radiomarquage du fluor-18.....	155
2.3.3	Analyse par radio-HPLC.....	155
2.3.4	Analyse de stabilité dans le milieu de marquage.....	155
2.3.5	Analyse de stabilité in vitro par incubation dans du sang.....	156

## Table des matières

2.3.6 Analyse de stabilité <i>in vivo</i> .....	156
2.3.7 Analyse des radiochromatogrammes.....	156
2.4 Étude sur souris apoE <sup>-/-</sup> .....	156
2.4.1 Animaux et protocole expérimental des études sur les peptides.....	156
2.4.1.1 Ligature carotidienne.....	157
2.4.1.2 Protocole expérimental d'étude de [ <sup>99m</sup> Tc]-L-B2702p1 (marquage Isolink) dans le modèle de souris apoE <sup>-/-</sup> avec ligature carotidienne.....	157
2.4.1.3 Protocole expérimental d'étude des peptides [ <sup>99m</sup> Tc]-L-B2702p1 (marquage Isolink) et [ <sup>99m</sup> Tc]-D-HYNIC-B2702p1 dans le modèle de souris apoE <sup>-/-</sup> sous régime hypercholestérolémiant.....	158
2.4.2 Animaux et protocole expérimental de l'étude FDG.....	159
2.4.3 Imagerie.....	160
2.4.3.1 Imagerie SPECT/CT.....	160
2.4.3.2 Imagerie PET/CT.....	161
2.4.4 Étude de biodistribution <i>ex vivo</i> .....	162
2.4.5 Immunohistochimie.....	164
2.5 Analyse statistique.....	165
3 Résultats.....	166
3.1 Analyse de liaison des peptides à VCAM-1.....	166
3.1.1 Analyse en SPR.....	166
3.1.1.1 Validation de la méthode – liaison de dérivés d'anticorps à VCAM-1.....	166
3.1.1.2 Analyse du peptide L-B2702p.....	166
3.1.2 Analyse en polarisation de fluorescence.....	167
3.1.2.1 Validation de la méthode – liaison du peptide Fluorescéine-L-B2702p à Hsp70.....	167
3.1.2.2 Analyse des peptides Fluorescéine-L-B2702p, Fluorescéine-L-B2702p1 et du térapeptide Fluorescéine-tera-L-B2702p1.....	168
3.1.3 Analyse par saturation de liaison de molécules radiomarquées.....	169
3.1.3.1 Validation de la méthode - liaison de dérivés d'anticorps à VCAM-1.....	169
3.1.3.2 Analyse des peptides B2702p, B2702p1 marqués via Isolink et du peptide B2702p1 marqué via HYNIC.....	169
3.1.4 Bilan sur l'analyse de liaison des peptides à VCAM-1.....	170
3.2 Stabilité des peptides radiomarqués.....	171
3.2.1 Peptide [ <sup>99m</sup> Tc]-L-B2702p1 (marquage Isolink).....	171
3.2.2 Peptide [ <sup>99m</sup> Tc]-D-B2702p1 (marquage Isolink).....	172
3.2.3 Peptide [ <sup>99m</sup> Tc]-HYNIC-L-B2702p1.....	173
3.2.4 Peptide [ <sup>99m</sup> Tc]-HYNIC-D-B2702p1.....	174
3.2.5 Peptide [ <sup>18</sup> F]-FBA-L-B2702p1.....	175
3.2.6 Peptide [ <sup>18</sup> F]-FBA-D-B2702p1.....	176
3.2.7 Bilan sur la stabilité des peptides.....	177
3.3 Étude des peptides sur le modèle de souris apoE <sup>-/-</sup> .....	178
3.3.1 Imagerie <i>in vivo</i> .....	178
3.3.1.1 [ <sup>99m</sup> Tc]-L-B2702p1 (marquage Isolink).....	178
3.3.1.2 [ <sup>99m</sup> Tc]-HYNIC-D-B2702p1.....	180
3.3.2 Analyse <i>ex vivo</i> .....	181
3.3.2.1 Expression de VCAM-1.....	181

## Table des matières

3.3.2.2 [ <sup>99m</sup> Tc]-L-B2702p1 (marquage Isolink).....	182
3.3.2.3 [ <sup>99m</sup> Tc]-HYNIC-D-B2702p1.....	184
3.4 Étude du FDG sur le modèle de souris apoE <sup>-/-</sup> .....	185
3.4.1 Conditions métaboliques des animaux de l'étude FDG.....	185
3.4.2 Imagerie PET/CT.....	186
3.4.3 Autoradiographie.....	188
3.4.4 Présence de tissu adipeux brun autour de la crosse aortique.....	190
3.4.5 Influence de l'infiltration de macrophages au sein des lésions.....	190
3.4.6 Biodistribution <i>ex vivo</i> de FDG.....	191
3.4.7 Corrélation entre données PET et données <i>ex vivo</i> .....	192
4 Discussion.....	194
4.1 Peptides.....	194
4.1.1 Principaux résultats de l'étude des peptides.....	194
4.1.2 Liaison à VCAM-1.....	194
4.1.2.1 Principe des études d'interaction.....	194
4.1.2.2 Résultats obtenus.....	196
4.1.3 Stabilité des peptides.....	200
4.1.3.1 Radiomarquage.....	200
4.1.3.2 Stabilité sanguine.....	201
4.1.3.3 Répartition sanguine.....	204
4.1.4 Étude sur modèle animal.....	206
4.1.4.1 [ <sup>99m</sup> Tc]-L-B2702p1 (marquage Isolink).....	206
4.1.4.2 [ <sup>99m</sup> Tc]-HYNIC-D-B2702p1.....	207
4.2 Étude FDG.....	208
4.2.1 Principaux résultats FDG.....	208
4.2.2 Rationnel des conditions expérimentales.....	209
4.2.3 Mise en perspective des résultats.....	211
4.2.3.1 Captation lésionnelle.....	211
4.2.3.2 Tissu adipeux brun péri-aortique.....	213
4.2.3.3 Imagerie PET/CT.....	214
4.3 Imagerie moléculaire.....	216
4.3.1 Imagerie nucléaire et nature des traceurs.....	216
4.3.2 Cibles de l'imagerie.....	217
5 Conclusion.....	219
<b>Références Bibliographiques.....</b>	<b>220</b>
<b>Résumé / Abstract.....</b>	<b>274</b>

## Abréviations

*Avant-propos :*

Les travaux présentés dans le cadre de cette thèse sont basés sur une littérature scientifique écrite en langue anglaise. Certains des acronymes repris dans ce manuscrit ne sont que rarement utilisés dans leur traduction française ; leur utilisation sera évitée. Par souci de cohérence, l'ensemble des acronymes utilisés seront issus de l'anglais, y compris les acronymes ayant une traduction couramment utilisée en français. La liste d'abréviation qui suit comprend les abréviations les plus couramment utilisées dans ce manuscrit.

%ID/g (*percentage of injected dose per gram*) : pourcentage de la dose injectée par gramme

ACS (*acute coronary syndrome*) : syndrome coronarien aigu

apo : apolipoprotéine

*apoE*<sup>-/-</sup> : déficience pour le gène de l'apolipoprotéine E

BAT (*brown adipose tissue*) : tissu adipeux brun

CACS (*coronary artery calcium score*) : score calcique coronaire

CAD ou CHD (*coronary artery/heart disease*) : maladie coronaire

CCTA (*coronary computed tomography angiography*) : angiographie coronaire par tomodensitométrie

CE (*cholesteryl ester*) : ester de cholestérol

(t)CEUS (*[targeted] contrast-enhanced ultrasound*) : échographie de contraste (ciblée)

CIMT (*carotid intima media thickness*) : épaisseur intima-média carotidienne

CT (*[X-ray] computed tomography*) : tomodensitométrie

CVD (*cardiovascular disease*) : maladies cardiovasculaires

DUR : *differential uptake ratio*

EC (*endothelial cell*) : cellule endothéliale

ER (*endoplasmic reticulum*) : réticulum endoplasmique

ECM (*extracellular matrix*) : matrice extracellulaire

FC (*free cholesterol*) : cholestérol libre ou cholestérol non estérifié

FDG : [<sup>18</sup>F]-fluorodésoxyglucose

HDL (*high density lipoprotein*) : lipoprotéine de haute densité

IVUS (*intravascular ultrasound*) : échographie endovasculaire

LDL (*low density lipoprotein*) : lipoprotéine de faible densité

MRI (*[nuclear] magnetic resonance imaging*) : imagerie par résonance magnétique (nucléaire)

## Abréviations

OCT (*optical coherence tomography*) : tomographie par cohérence optique

PET (*positron emission tomography*) : tomographie par émission de positons

PRR (*pattern recognition receptor*) : récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires

RCP (*radiochemical purity*) : pureté radiochimique

SMC (*smooth muscle cell*) : cellule musculaire lisse (vasculaire)

SPECT (*single photon emission computed tomography*) : tomographie d'émission monophotonique

SPR (*surface plasmon resonance*) : résonance des plasmons de surface

SR (*scavenger receptor*) : récepteur éboueur

SUV : *standardized uptake value*

TLR (*Toll-like receptor*) : récepteur de type Toll

TCFA (*thin-cap fibroatheroma*) : plaque athéromateuse à mince capsule fibreuse

UPR : *unfolded protein response*

VCAM-1 : *Vascular cell adhesion molecule-1*

## Introduction générale

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause mondiale de mortalité ; la maladie coronaire est responsable de près de la moitié de la mortalité cardiovasculaire. La maladie coronaire résulte en un défaut d'irrigation du myocarde, vascularisé par les artères coronaires. La diminution du flux sanguin est causé par la présence de plaques d'athéromes dans la paroi des artères coronaires, i.e. par l'athérosclérose coronaire. Les plaques d'athérome peuvent causer une thrombose intra-vasculaire responsable d'un syndrome coronarien aigu pouvant évoluer jusqu'à l'infarctus du myocarde. La rupture de la plaque d'athérome vulnérable est la cause majeure de la thrombose intra-vasculaire. Les travaux développés au cours de cette thèse de doctorat, intitulée *Caractérisation et Imagerie Moléculaire de la Plaque d'Athérome : Études Pré-cliniques*, portent sur l'étude pré-clinique de la plaque d'athérome et en particulier sa vulnérabilité. Une première partie porte sur l'évaluation des contraintes pariétales, responsables de la rupture de plaques, dans un modèle animal de la pathologie : la souris déficiente en apolipoprotéine E ( $apoE^{-/-}$ ). La seconde partie porte sur l'imagerie moléculaire de l'inflammation au sein du même modèle animal et se décompose en l'évaluation de peptides ciblant la molécule d'adhésion VCAM-1 et du fluorodésoxyglucose radiomarqué au fluor-18 (FDG).

La rupture des plaques d'athérome correspond à la rupture de la capsule fibreuse qui recouvre le cœur lipidique des plaques. Il s'agit d'un phénomène physique lié à la contrainte mécanique présente dans la capsule fibreuse, comme le montrent des études *post-mortem* réalisées chez des patients ayant succombé à un infarctus du myocarde causé par la rupture d'une plaque. Un des modèles d'étude de l'athérosclérose le plus largement utilisé est la souris  $apoE^{-/-}$  ; malgré sa popularité, la répartition et l'amplitude des contraintes mécaniques s'exerçant dans les lésions athéromateuses développées par ce modèle expérimental étaient très mal connues à l'initiation de ce travail. Une première partie de ce travail de thèse porte donc sur l'évaluation de la contrainte mécanique présente dans la paroi des vaisseaux de souris  $apoE^{-/-}$  porteuses de lésions athéromateuses. Cette étude a été menée en étroite collaboration avec l'équipe Dynamiques Cellulaire / Tissulaire et Microscopie Fonctionnelle (DyCTiM) du laboratoire Techniques de l'Ingénierie Médicale et de la Complexité – Informatique, Mathématiques et Applications, Grenoble (TIMC-IMAG). À terme, une meilleure compréhension des phénomènes associés à la rupture de plaques d'athérome pourrait notamment permettre l'identification de nouvelles cibles pertinentes pour l'imagerie de l'athérosclérose vulnérable.

## Introduction générale

Par ailleurs, la prévention de la maladie coronaire et en particulier du syndrome coronarien aigu passe par l'identification des personnes présentant des plaques d'athérome vulnérables et donc exposées au risque de thrombose, avant que ne survienne l'accident coronaire. Les plaques d'athérome vulnérables sont caractérisées par un processus inflammatoire important ; l'identification de l'inflammation dans la paroi des artères coronaires est donc potentiellement un procédé diagnostique efficace. Dans cette optique, l'utilisation de méthodologies visant à imager le processus inflammatoire apparaît comme une approche pertinente. L'imagerie nucléaire est une méthode d'imagerie fonctionnelle et moléculaire d'une grande sensibilité, ce qui rend cette modalité d'imagerie particulièrement adaptée *a priori* à la visualisation d'un processus biologique tel que l'inflammation. Les travaux présentés dans la seconde partie de cette thèse concernent l'imagerie pré-clinique de l'athérosclérose chez la souris apoE<sup>-/-</sup> par imagerie nucléaire. Les traceurs évalués sont une classe de molécules peptidiques destinées à l'imagerie de l'inflammation vasculaire en ciblant la molécule d'adhésion VCAM-1 d'une part, et le FDG d'autre part, qui est un traceur métabolique couramment utilisé en médecine nucléaire et décrit chez l'homme pour s'accumuler dans les cellules inflammatoires présentes dans les plaques d'athérome.

## Revue bibliographique

La revue bibliographique qui suit présente une brève introduction à la physiopathologie de l'athérosclérose coronaire. Suit une description plus détaillée des processus biologiques impliqués dans l'initiation et l'évolution de cette physiopathologie. Une attention toute particulière est portée à la notion de vulnérabilité. La troisième partie de la revue bibliographique traite du diagnostic de la maladie coronaire et de la place de l'imagerie. Les nouveaux outils développés pour l'imagerie moléculaire non invasive de l'athérosclérose, en grande majorité encore au stade de l'évaluation pré-clinique, sont plus largement décrits dans cette partie.

### 1 Introduction

L'athérosclérose est une pathologie inflammatoire chronique de la paroi artérielle. Cette pathologie liée au vieillissement ainsi qu'à d'autres facteurs de risques est endémique dans les pays développés. L'athérosclérose des artères coronaire peut avoir pour conséquence la maladie coronaire. C'est une maladie chronique, cliniquement silencieuse pendant une grande partie de sa progression, et pouvant être responsable d'événements coronaires soudains. Ces événements sont liés à une thrombose occlusive intra-vasculaire secondaire à la mise en contact des éléments thrombogènes de la plaque et du sang. Celle-ci survient en cas de perte d'endothélium par érosion ou, plus fréquemment, suite à la rupture de plaque. L'obstruction de la lumière du vaisseau et l'interruption de l'écoulement du sang qui en découle sont responsables des conséquences observées au niveau du myocarde.

#### 1.1 La maladie coronaire : le problème clinique

L'athérosclérose est caractérisée par le développement de lésions caractéristiques au niveau de l'intima, appelées plaques d'athérome. Dans la classification statistique internationale des maladies et des problèmes de santé connexes, 10e révision (ICD-10, *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*), les pathologies cardiaques résultantes de l'athérosclérose des artères coronaires sont indexées dans la section des cardiopathies ischémiques (I20-25). L'autre composante importante des maladies cardiovasculaires est représentée par les maladies cérébrovasculaires (I60-I69), elles aussi en grande partie causées par les plaques d'athérome, en particulier localisées dans les artères carotides (World Health Organization 2010).

Les maladies cardiovasculaires (CVD, *cardiovascular disease*) représentent la première cause de mortalité à l'échelle mondiale (World Health Organization 2011). En 2008, parmi les 17.3 millions

## Revue bibliographique

de décès d'origine cardiovasculaire, 7.3 millions ont été causés par la maladie coronaire (CAD ou CHD, *coronary artery/heart disease*) principalement à la suite d'événements responsables d'un syndrome coronarien aigu (ACS, *acute coronary syndrome*), lié à la présence de plaques d'athérome coronaires vulnérables (Falk *et al.* 2013). L'ACS comprend l'angor instable (présentant une atteinte modérée du myocarde et une faible élévation du taux de troponine cardiaque) et l'infarctus du myocarde, qui peut être classé, suivant l'apparence de l'électrocardiogramme, en infarctus avec ou sans sus-décalage du segment ST et avec ou sans onde Q (Thygesen *et al.* 2012). L'angor (stable) est causé par une diminution du débit sanguin coronaire, liée à la présence de plaques sténosantes ; ces plaques n'étant pas responsables d'un ACS sont dites stables, cependant elle peuvent présenter des caractéristiques de plaques vulnérables et potentiellement évoluer et être responsable d'un ACS. La mortalité associée à l'angor stable est plus faible et la prise en charge mieux maîtrisée que celles de l'angor instable dans les pays développés (Fox *et al.* 2006).

Les facteurs de risque cardiovasculaires peuvent être classés en facteurs de risques irréversibles et en facteurs de risque modifiables (World Heart Federation 2013). Les principaux facteurs de risques irréversibles sont l'âge, le sexe et les antécédents familiaux de CVD. La prévalence de CAD augmente avec l'âge ; c'est le premier facteur de risque cardiovasculaire, faisant de l'athérosclérose une maladie liée au vieillissement. Elle est plus importante chez l'homme que chez la femme, et augmente chez la femme après la ménopause. Enfin, telle que l'atteste une plus forte prévalence d'événements coronaires chez les personnes ayant des antécédents familiaux de pathologie coronaire mais aussi une différence inter-ethnique, l'hérédité joue un rôle dans le risque cardiovasculaire. Par ailleurs, un certain nombre de facteurs de risque importants peuvent être évités ou améliorés par des mesures hygiéno-diététiques ou par un traitement pharmacologique. Les dyslipidémies et particulièrement l'hypercholestérolémie, l'hypertension artérielle, l'obésité, le diabète et le tabagisme font partie de ces facteurs de risque modifiables. A ces facteurs de risques, sont associés des facteurs de risque plus difficilement appréhendables ou non-indépendants tels que la sédentarité, une mauvaise alimentation et le stress ou d'autres facteurs physiologiques. Les principaux facteurs de risques seront plus largement développés dans la partie traitant de la physiopathologie de l'athérosclérose.

L'évaluation des facteurs de risque d'un individu permet de définir un risque cardiovasculaire. Les facteurs de risques sont évalués, pondérés et sommés pour obtenir un score de risque, qui en rapport avec les données épidémiologiques donne la probabilité d'incidence de CVD, typiquement à 10 ans (e.g. score de risque de Framingham ou SCORE (Perk *et al.* 2012)).

## Revue bibliographique

Les personnes à haut risque cardiovasculaire sont traitées de façon à réduire les facteurs de risque par l'adoption de mesures hygiéno-diététiques et l'utilisation de médicaments, notamment visant à traiter l'hypercholestérolémie (statines), l'hypertension (bêta-bloquants, inhibiteurs de l'enzyme de conversion), et réduisant le risque de complications thrombotiques (anti-aggrégants plaquettaires : aspirine et inhibiteurs de P2Y12) (Perk *et al.* 2012). Les personnes présentant un ACS sont traitées suivant des stratégies de revascularisation médicale (thrombolyse et fibrinolyse), instrumentale (angioplastie) ou chirurgicale (pontage aorto-coronarien) (Steg *et al.* 2012; Hillis *et al.* 2011).

### 1.2 Étude de l'athérosclérose

L'observation directe, histologique de lésions d'athérosclérose présentant un thrombus mural dans les artères coronaires a été associée à la mortalité cardiovasculaire. De nombreuses études anatomopathologiques post-mortem ont été menées sur des victimes de CVD et ont notamment permis la définition des critères de vulnérabilité (Naghavi *et al.* 2003a; Falk *et al.* 2013).

En 1948, l'étude *Framingham Heart Study* a débuté sous la direction du NHLBI (*National Heart, Lung, and Blood Institute*) avec pour objectif d'identifier les causes des maladies cardiovasculaires dont la prévalence augmentait continuellement depuis le début du XX<sup>ème</sup> siècle aux États-Unis d'Amérique (Framingham Heart Study 2013; Dawber, Meadors, et Moore 1951). Cette étude a rapidement démontré que l'hypercholestérolémie et l'hypertension artérielle sont des facteurs de risque majeurs d'événements cardiovasculaires (Kannel *et al.* 1961). La poursuite de cette étude ainsi que d'autres études épidémiologiques menées sur diverses populations ont permis de déterminer l'influence de divers paramètres et facteurs de risques cardiovasculaires sur le risque de CVD. Au cours des 50 dernières années, un grand nombre d'études cliniques ont été menées sur les sujets à risque cardiovasculaire afin d'évaluer l'impact de diverses thérapeutiques et interventions ou tests diagnostiques. Pour ne citer que les statines, médicaments décrits initialement comme inhibiteur de la biosynthèse de cholestérol, 26 essais cliniques de grande envergure (> 1000 participants suivis sur plus de 2 ans), incluant 169 138 participants, ont été rapportés sur la période 1994 – 2009 (de Lemos *et al.* 2010; Taylor *et al.* 2013). Différents critères peuvent être utilisés pour évaluer les thérapeutiques ou interventions, dont e.g. la mesure de l'incidence d'événements cardiovasculaires majeurs (MACE, *major adverse cardiovascular events*) souvent définis comme regroupant la maladie coronaires (ACS et angor), l'accident vasculaire cérébral et la mort d'origine cardiovasculaire.

L'hypercholestérolémie étant un facteur de risque modifiable, ce facteur a été utilisé pour l'établissement de modèles animaux d'athérosclérose *via* l'administration de régimes spéciaux (Getz

## Revue bibliographique

et Reardon 2012). D'abord chez le lapin, en combinaison avec la désendothélialisation et potentiellement l'administration de substances pharmacologiques pour induire une thrombose (Constantindes et Chakravarti 1961), puis en sélectionnant des lapins hypercholéstérolémiques présentant spontanément des lésions de taille importante (Watanabe 1980). Ce modèle de lapin WHHL (Watanabe heritable hyperlipidemic) a évolué, avec la sélection des individus les plus gravement atteints, pour donner un modèle présentant une incidence élevée d'infarctus du myocarde et des caractéristiques de plaques coronaires vulnérables. Il s'agit alors du modèle de lapin WHHLMi (*myocardial infarction-prone WHHL rabbit*) (Shiomi *et al.* 2003).

Il a été montré que certaines lignées de souris sont susceptibles à la formation de lésions sous régimes sévères (Paigen *et al.* 1985), et l'avènement de techniques de manipulation génétiques a permis de créer des modèles murins mimant les hypercholéstérolémies familiales sous fond génétique favorable au développement de plaques (C57BL/6). Les deux modèles majeurs développés sont les souris déficientes pour le gène de l'apolipoprotéine E (*apoE*<sup>-/-</sup>) (Piedrahita *et al.* 1992; Plump *et al.* 1992) et pour le gène du récepteur aux lipoprotéines de faible densité (*LDLR*<sup>-/-</sup>) (Ishibashi *et al.* 1993). L'étude de ces animaux, en tant que tels ou en combinaison avec d'autres modifications génétiques, a permis la réalisation de progrès sensibles dans la compréhension de la physiopathologie de l'athérosclérose au cours des 20 dernières années, en particulier des processus physiopathologiques liés à l'initiation et à la progression de l'athérosclérose, en de nombreux points analogues à ce qui a été observé chez l'homme.

Un certain nombre de différences sont cependant observées entre les modèles animaux les plus couramment utilisés et la pathologie humaine (e.g. absence d'épaississement de l'intima, différents profils lipidiques). L'étude des artères coronaires du petit animal est particulièrement difficile du fait de leur faible diamètre ; l'étude du processus pathologique porte donc souvent sur d'autres lits vasculaires (e.g. aorte de souris). Bien que ce point soit encore controversé, il est généralement considéré que les lésions murines (tout comme les autres modèles animaux couramment utilisés) ne présentent pas d'événements athérotrombotiques majeurs spontanés, avec en particulier l'absence de rupture de plaques, ce qui représenterait une limitation importante aux études s'intéressant à la vulnérabilité (développée en Partie expérimentale : Biomécanique).

## **2 Physiopathologie de l'athérosclérose**

L'athérosclérose est une pathologie de la paroi artérielle qui consiste en un développement de lésions caractéristiques. Les atteintes initiales sont liées à la dysfonction de l'endothélium, au passage de lipoprotéines à travers la paroi endothéliale, à leur rétention et à leur oxydation. Ces phénomènes aboutissent au recrutement de divers types cellulaires et en particulier à celui des cellules inflammatoires. L'inflammation et l'accumulation de lipides dans la paroi artérielle mènent à la formation d'un cœur lipidique et à la formation de tissu fibreux recouvrant le cœur lipidique : la capsule fibreuse. À ce stade, ces lésions sont des plaques d'athérome qui peuvent être responsables d'une thrombose dans la lumière vasculaire.

### **2.1 La paroi artérielle**

#### **2.1.1 Relation fonction-structure.**

Les artères sont des vaisseaux impliqués dans le transport du sang depuis le cœur jusqu'aux tissus où elles se ramifient pour former un réseau capillaire. Ce transport s'effectue à haute pression. Dans le cas de la circulation systémique, la pression à la sortie du ventricule gauche (pression systolique) est de l'ordre de 120 mm Hg (ou 16 kPa) chez les personnes normotendues. La fermeture de la valvule sigmoïde aortique, liée à une dépression dans le ventricule gauche secondaire à la relaxation du myocarde, résulte en une pression nulle. Le débit pulsé à la sortie du cœur est transformé en un débit continu grâce à l'importante compliance des artères les plus proximales qui jouent un rôle de réservoir de pression ; ce phénomène est appelé effet Windkessel (O. Frank 1899; Westerhof, Lankhaar, et Westerhof 2009).

La paroi des artères est adaptée à cette double fonction physiologique, avec une structure évoluant depuis les troncs artériels principaux, fortement élastiques, réservoir de pression, vers des artères plus distales, essentiellement musculaires, assurant la conduction à forte pression. Plus distale encore, les artérioles représentent l'essentiel de la résistance vasculaire et abaissent la pression sanguine jusqu'à une valeur très faible, compatible avec l'irrigation capillaire (Burton 1954). Les artères coronaires naissent au niveau des sinus aortiques droit et gauche à partir de l'aorte thoracique ascendante et irriguent le myocarde. Ce sont des artères musculaires qui présentent une forte capacité à réguler le débit sanguin en fonction des besoins métaboliques (Feigl 1983).

#### **2.1.2 Structure de la paroi artérielle.**

La paroi des artères se compose de trois feuillets concentriques : l'intima, la média et l'adventice (Figure 1).

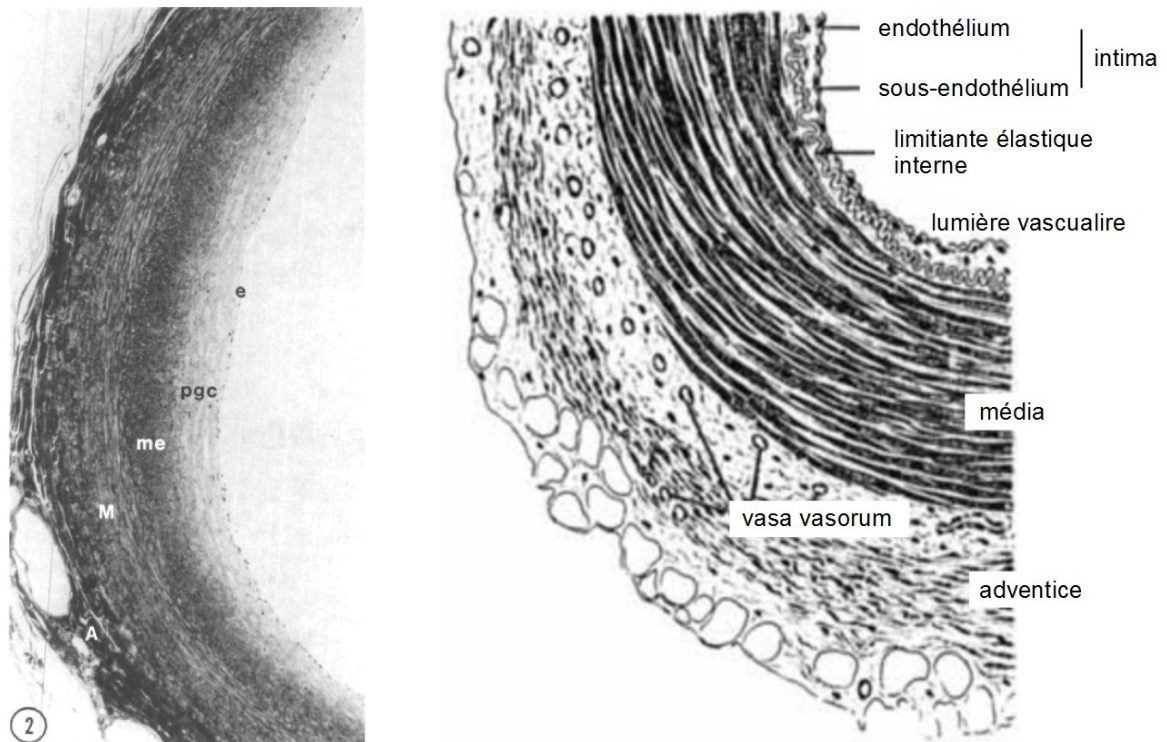


Figure 1. À gauche, coupe d'artère coronaire issue d'un enfant de 16 mois, fixée à pression physiologique et vue par microscopie optique (Stary *et al.* 1992). L'intima épaissie est constituée d'un endothélium (e) et d'un espace sous-endothélial présentant une couche riche en protéoglycanes (pgc) et une couche musculo-élastique (me). À l'arrière, la média (M) et l'adventice (A) sont identifiées. À droite, schéma de coupe d'artère musculaire sans épaississement intimal.

**Intima.** L'intima, le feuillet le plus interne, se compose de l'endothélium vasculaire et de l'espace sous-endothélial. L'épithélium pavimenteux unistratifié est fait de cellules jointives. Les cellules endothéliales (ECs, *endothelial cells*) assurent l'étanchéité entre le sang présent dans la lumière vasculaire et le reste de la paroi artérielle grâce aux jonctions serrées. La cohésion entre ces cellules est assurée par les jonctions adhérentes, présentes sur la face latérale des ECs. Au pôle apical, un glycocalyx est présent. L'espace sous-endothélial est composé de la lame basale de l'épithélium, constitué de matrice extracellulaire (ECM, *extracellular matrix*) (essentiellement de laminine, fibronectine, de collagène de type IV et de protéoglycanes), mais aussi, même en condition physiologique, d'une certaine épaisseur essentiellement composée de ECM ainsi que d'un faible pool de cellules musculaires lisses résidentes (SMCs, *smooth muscle cells*), dans les artères coronaires humaines. L'épaississement de l'intima, appelé DIT (*diffuse intimal thickening*) regroupe en continuité l'épaississement diffus proprement dit et l'épaississement excentrique (*intimal cushion*) présent au niveau des embranchements ; ce phénomène est considéré comme physiologique (Stary *et al.* 1992). On distingue deux couches concentriques dans le DIT : la couche

riche en protéoglycanes, externe, et la couche musculo-élastique, plus interne, plus riche en SMCs et en fibres d'élastine. À noter que le DIT est un phénomène lié à l'âge, bien que l'épaississement excentrique débute dès un très jeune âge (Figure 1), particulièrement accentué dans les artères coronaires (Nakashima *et al.* 2002), et qui n'est pas présent dans les modèles animaux d'athérosclérose les plus fréquemment utilisés (souris, lapins) (Nakashima, Wight, et Sueishi 2008).

**Média.** La média est le feuillet intermédiaire des artères. Il est constitué d'une alternance concentrique de feuillets élastiques et de SMCs entourés de ECM, le tout formant des unités lamellaires ou feuillets musculo-élastiques (Clark et Glagov 1985). Les feuillets élastiques sont constitués de fibres d'élastine et de fibrilline ; ils sont fortement impliqués dans l'élasticité de la paroi artérielle. Le feuillet le plus interne et le plus externe, seuls présents dans le cas d'artères de petit calibre, sont dénommés limitante élastique interne et externe, et constituent les limites de la média. À noter qu'en présence de DIT, la limitante élastique interne est parfois difficilement discernable de la couche musculo-élastique ; elle est parfois considérée comme faisant partie de l'intima. Les SMCs présentes entre les lames élastiques sont entourées d'éléments d'ECM, constitués d'une lame basale et d'éléments fibrillaires (collagène de type I et III principalement). Les SMCs sont impliquées dans la synthèse des éléments de ECM. Ces cellules présentent également des propriétés contractiles, et permettent le maintien et la modulation du tonus vasculaire. Les artères élastiques (aorte et principales collatérales proximales) et les artères musculaires se distinguent notamment par leur richesse relative en fibres élastiques et SMCs.

**Adventice.** L'adventice est le feuillet le plus externe. C'est un tissu conjonctif lâche présentant un réseau de fibres de collagène ainsi que des éléments cellulaires (fibroblastes) et dans lequel on trouve des éléments vasculaires (*vasa vasorum*) et nerveux impliqués dans l'irrigation et l'innervation de la paroi artérielle.

Un tissu adipeux périvasculaire, quelquefois assimilé pour partie à l'adventice, forme une couche plus externe encore, entourant les artères.

## 2.2 Les lésions athéromateuses

### 2.2.1 Site de développement des lésions

Les lésions athéromateuses se développent initialement à des sites spécifiques des artères susceptibles à l'athérosclérose et présentant un épaississement intimal (Nakashima *et al.* 2002). Ces sites privilégiés sont retrouvés principalement aux bifurcations des artères et sur la face interne des courbures vasculaires. A ces sites, l'écoulement sanguin est perturbé et sort du régime laminaire

avec pour conséquence une diminution et une irrégularité de la contrainte de cisaillement appliquée sur les cellules endothéliales, participant à la dysfonction endothéliale reconnue comme un événement précoce de l'athérogenèse (Gimbrone 1995; Malek, Alper, et Izumo 1999). Dans les modèles animaux ne présentant pas d'épaississement intimal, une distribution similaire des lésions est observée (Nakashima *et al.* 1994).

### 2.2.2 Classification des lésions

Sur la base d'observations anatomopathologiques de lésions coronaires, une classification des plaques d'athérome a été proposée par l'AHA (*American Heart Association*) (Stary *et al.* 1992; Stary *et al.* 1994; Stary *et al.* 1995; Stary 2000b). Les lésions sont classées suivant un ordre physiopathologique (de I à VI ou VIII). Cette classification présente 3 stades depuis les stades précoces I à III, correspondant à un épaississement intimal (*intimal thickening*) considéré comme non pathologique, à des stries lipidiques (*fatty streak*) et à des lésions intermédiaires (*intermediate lesions*), respectivement. Les stades IV à VI (ou à VIII) correspondent à des lésions avancées, pouvant être responsable de signes cliniques. Le stade IV décrit des plaques d'athérome (*atheroma*), présentant un cœur lipidique extra-cellulaire confluent ainsi qu'une capsule fibreuse. Le stade suivant comprend 3 types de lésions, en fonction de l'importance de la fibrose et des dépôts de calcium au sein de ces plaques : les lésions fibroathéromateuses (*fibroatheroma*, Va ou V), les

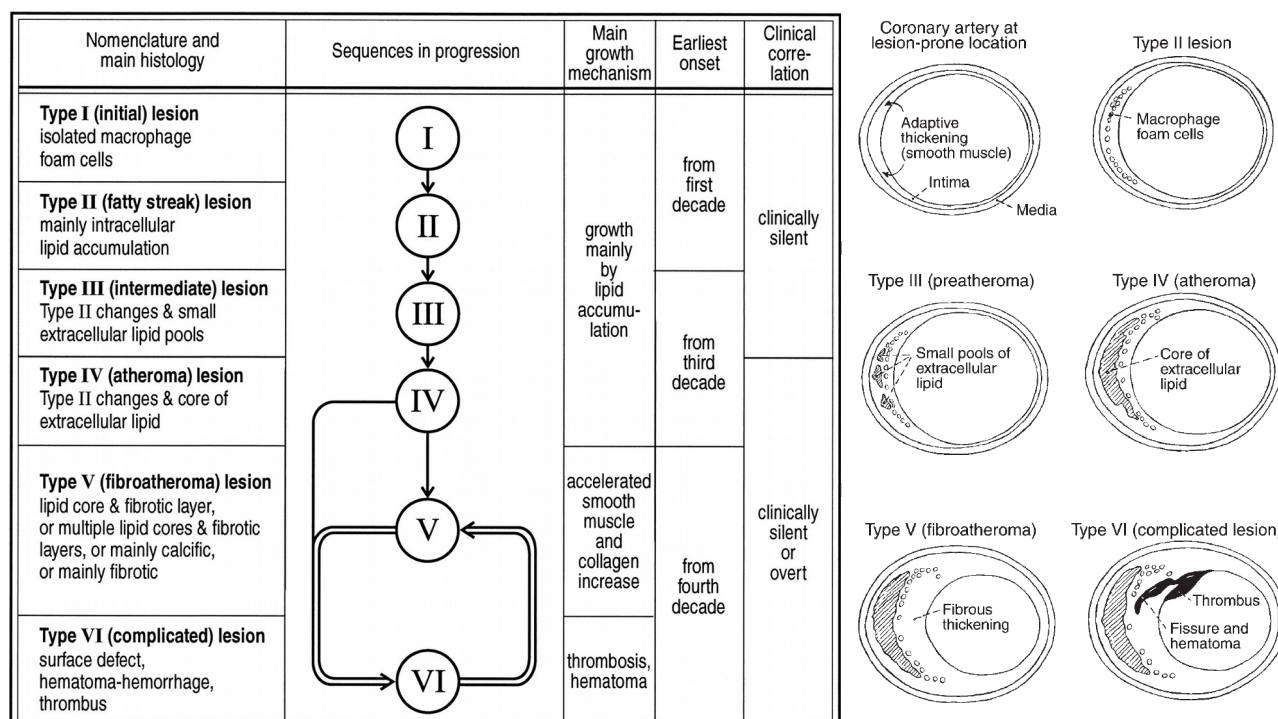


Figure 2. Différentes étapes de la progression de l'athérosclérose suivant la classification de l'AHA (Stary *et al.* 1995).

## Revue bibliographique

lésions calcifiées (*calcified plaque*, Vb ou VII) et les lésions fibreuses (*fibrous plaque*, Vc ou VIII). Enfin, les lésions de type VI correspondent à des lésions compliquées (*complicated plaque*) pouvant présenter une rupture de la capsule fibreuse, des hémorragies intra-plaque et une thrombose (Figure 2) ; ces lésions sont donc impliquées dans les ACS. A noter que si les lésions calcifiées ou fibreuses sont peu sujettes à la rupture (évolution vers le stade VI), ces lésions peuvent présenter un caractère sténosant, d'où leur implication dans l'angor.

La présence de thrombose murale sans discontinuité (rupture) dans la capsule fibreuse a également été observée (van der Wal *et al.* 1994; Farb *et al.* 1996), correspondant à un autre type de plaques vulnérables mais non sujettes à la rupture. Pour rendre compte de cet état de fait, une nouvelle classification a été proposée (Virmani *et al.* 2000). L'érosion peut être observée au niveau de plaques fibroathéromateuses ou de lésions présentant un épaissement intimal pathologique (Figure 3). Cette classification introduit également la notion de nodule calcifié, pouvant être

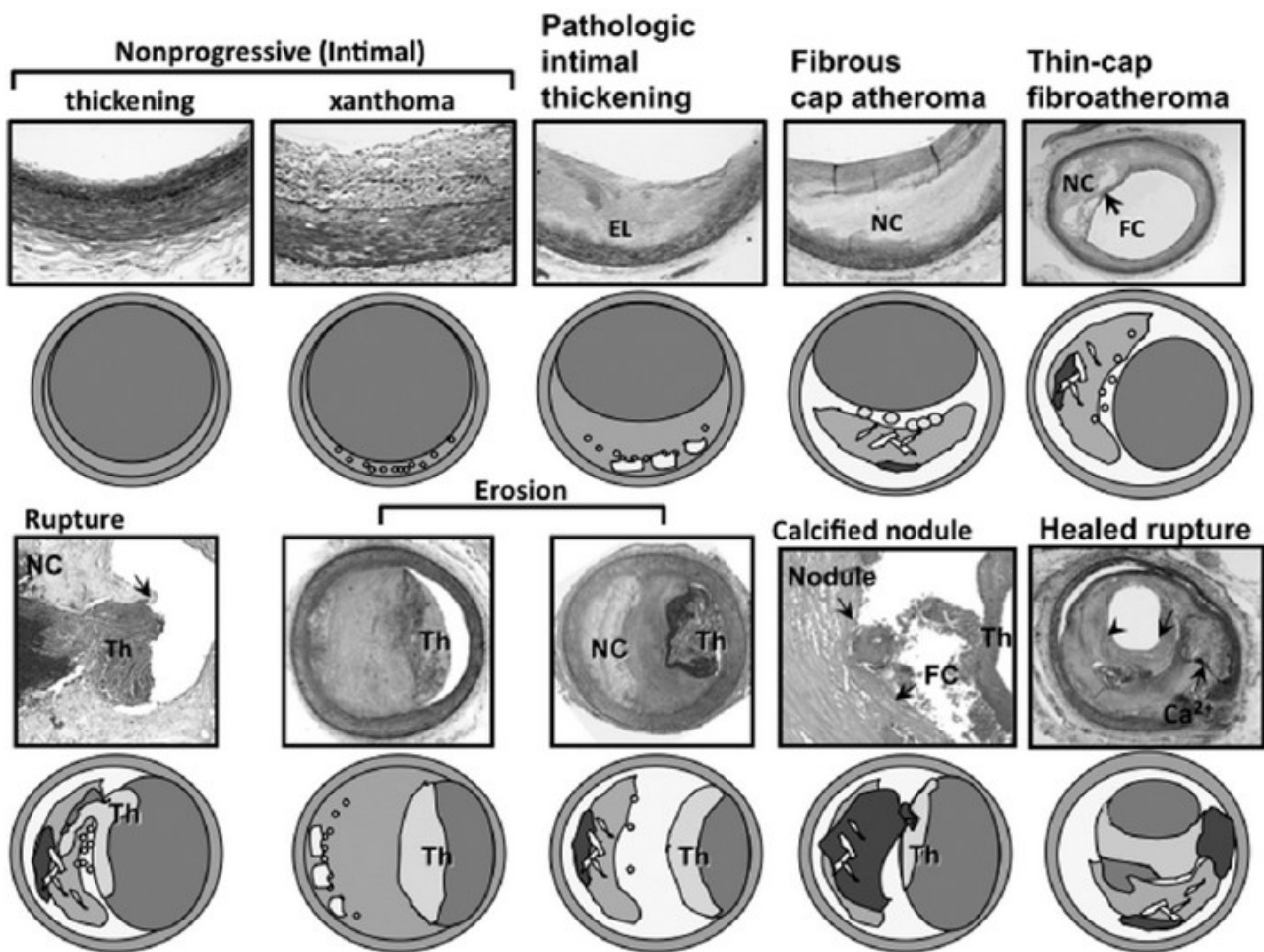


Figure 3. Spectre de lésions d'athérosclérose coronaire chez l'homme suivant la classification proposée par Virmani et al. (Virmani et al., 2000) . EL : Lamme élastique ; NC : cœur lipidique ; FC : capsule fibreuse ; Th : thrombus ; Ca<sup>2+</sup> : calcifications. (Kolodgie *et al.* 2012)

responsable de la vulnérabilité des plaques, bien que des études récentes suggèrent que ce phénomène soit marginal (Xu *et al.* 2012). Une méta-analyse récente analysant rétrospectivement les données de 22 études s'intéressant à des plaques coronaires présentant une thrombose murale responsable d'un infarctus du myocarde fatal a montré que 73 % des décès sont associés à une rupture de plaque, soulignant l'importance clinique de ce phénomène (Falk *et al.* 2013).

Enfin, cette classification introduit la notion de lésions fibroathéromateuses à mince capsule fibreuse (TCFA, *thin-cap fibroatheroma*), équivalentes à des lésions de type IV-Va particulièrement sujettes à la rupture en raison de la faible épaisseur de la capsule fibreuse.

### **2.3 Initiation de l'athérosclérose**

L'athérogénèse implique une dysfonction endothéliale ainsi que la rétention et l'oxydation de lipoprotéines. Comme présenté dans la revue par Stocker et Keaney (Stocker et Keaney 2004), ces événements initiateurs réfèrent, suivant leur importance relative et leur séquence temporelle dans le développement de la pathologie, aux hypothèses athérogéniques de réponse à la lésion (endothéliale, *response-to-injury hypothesis*) i.e. désendothélialisation (Ross et Glomset 1973) ou – plus pertinent d'un point de vue physiopathologique – de dysfonction ou activation endothéliale (Ross 1993; Ross 1999), de réponse à la rétention (de lipoprotéines dans l'espace sous-endothélial, *response-to-retention hypothesis*) (K. J. Williams et Tabas 1995; Tabas, Williams, et Borén 2007) et de la modification oxydative (des lipoprotéines, *oxydative modification hypothesis*) (Steinberg 1989; Witztum 1994; Chisolm et Steinberg 2000; Steinberg 2009). Dans tous les cas, l'initiation de l'athérosclérose est caractérisée par une réponse inflammatoire associée au recrutement de leucocytes en présence de lipoprotéines modifiés et par l'accumulation de lipides par les cellules de l'intima, donnant des cellules spumeuses.

#### **2.3.1 Dysfonction endothéliale**

L'endothélium joue un rôle majeur de barrière de l'espace vasculaire et il est fortement impliqué dans la régulation de l'homéostasie vasculaire en participant à la régulation du tonus vasculaire, de l'hémostase, de l'inflammation et de la prolifération des cellules de la paroi vasculaire. La dysfonction endothéliale est une altération fonctionnelle de l'endothélium, caractérisée notamment par une altération de la réponse aux facteurs induisant une vasodilatation endothélium-dépendante. Elle correspond à une activation de l'endothélium d'un état quiescent à un état pro-inflammatoire, caractérisé notamment par une diminution de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (ou oxyde nitrique, NO) et un stress oxydant. La dysfonction endothéliale est observée dans les zones

présentant une perturbation du flux, en présence de lipoprotéines oxydées et de médiateurs de l'inflammation. En dehors de la perturbation de la vasodilatation, la dysfonction endothéliale est impliquée dans d'autres processus liés à l'initiation de l'athérosclérose notamment la réponse fibroproliférative (à l'origine du remodelage vasculaire), l'oxydation des lipoprotéines, l'activation plaquettaire, le recrutement de cellules inflammatoires et l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Gimbrone *et al.* 2000).

### **2.3.1.1 Mise en évidence de la dysfonction endothéliale**

L'acétylcholine induit la production de NO par les ECs, tandis qu'elle est responsable de la vasoconstriction des SMCs; la réponse vasodilatatrice liée au NO est plus importante que la vasoconstriction induite directement sur les SMCs (Furchgott et Zawadzki 1980). En cas de dysfonction endothéliale, le déficit de production de NO en réponse à l'acétylcholine mène à une vasoconstriction dite paradoxale en réponse à l'acétylcholine ; c'est ce qui est observé dans les artères coronaires présentant des plaques d'athérome identifiées par angiographie (Ludmer *et al.* 1986). Cependant, il a également été montré que la dysfonction endothéliale précède l'apparition des plaques, ce qui en fait un phénomène précoce dans l'athérosclérose (Celermajer *et al.* 1992; Ross 1999).

### **2.3.1.2 Contrainte de cisaillement et homéostasie vasculaire**

La contrainte de cisaillement est une grandeur représentant une force (liée à l'écoulement et à la viscosité du sang) par unité de surface, appliquée tangentiellement à la surface de l'endothélium dans le sens du flux ; de façon équivalente, cette grandeur peut aussi être définie comme le produit du gradient de vitesse et de la viscosité du sang à la surface de l'endothélium. Cette grandeur est homogène à une pression et s'exprime dans le système international d'unité en N/m<sup>2</sup> ou Pa ; elle est fréquemment exprimée en dynes/cm<sup>2</sup> (1 Pa = 10 dynes/cm<sup>2</sup>). Dans les zones rectilignes du système artériel, l'ordre de grandeur de la contrainte de cisaillement est de 15 – 20 dynes/cm<sup>2</sup> (Malek, Alper, et Izumo 1999). Les mécano-senseurs, récepteurs sensibles à la contrainte de cisaillement et à l'origine de la mécano-transduction, sont des structures impliquées dans l'adhérence cellule-cellule et cellule-ECM (intégrine, protéines des jonctions serrées et adhérentes) ainsi que d'autres structures membranaires (canaux ioniques, récepteurs) (Nitzan Resnick *et al.* 2003; Chatzizisis *et al.* 2007; Chiu et Chien 2011) et sont liés à des voies de signalisation responsables de régulations transcriptionnelles *via* des facteurs trans régulateurs (e.g. SREBP1, *shear stress response element binding protein 1*, Sp1, *specificity protein 1*, AP1, *activator protein-1*, NF-κB, *nuclear factor- κB*,

des éléments *cis* régulateurs positifs et négatifs appelés SSRE (*shear stress response element*) (N. Resnick *et al.* 1993; Nitzan Resnick *et al.* 2003).

En conditions physiologiques, la présence de l'endothélium vasculaire assure l'homéostasie de la paroi vasculaire, notamment avec la production de monoxyde d'azote (NO) (Furchgott et Zawadzki 1980; Palmer, Ferrige, et Moncada 1987; Ignarro *et al.* 1987). La production de NO par les cellules endothéliales est sous le contrôle de la NO synthase endothéliale (eNOS, *endothelial nitric oxide synthase*) (Palmer et Moncada 1989) et s'effectue à partir de la L-arginine en présence de cofacteurs dont la tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>) et implique la liaison au complexe calcium-calmoduline (Ca<sup>2+</sup>-CaM) (Förstermann et Münzel 2006).

Dans les conditions de flux laminaire, la production basale de NO (P. F. Davies 1995) met en jeu la phosphorylation de la eNOS par l'Akt (Fulton *et al.* 1999; Dimmeler *et al.* 1999) et l'interaction entre la eNOS et le complexe Ca<sup>2+</sup>-CaM. Le complexe Ca<sup>2+</sup>-CaM se forme avec l'entrée de Ca<sup>2+</sup> liée à l'ouverture des canaux calciques dans les conditions de flux laminaire (Fleming 2010).

Le NO joue un rôle majeur dans le maintien d'un état non inflammatoire et quiescent des ECs (De Caterina *et al.* 1995). Cet effet est pour partie attribuable à la régulation post-traductionnelle d'un grand nombre de protéines, par S-nitrosylation (Stamler, Lamas, et Fang 2001), et notamment la régulation des facteurs de transcription nucléaire NF-κB – en favorisant l'expression de son inhibiteur endogène IκB (De Caterina *et al.* 1995) – et AP-1 (Deanfield, Halcox, et Rabelink 2007).

D'autres médiateurs sont également sécrétés par l'endothélium en conditions physiologiques. La prostacycline (ou prostaglandine I<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>) est produite à partir de la prostaglandine H<sub>2</sub>, issue de l'acide arachidonique sous l'action de cyclo-oxygénases (COX) (Dubois *et al.* 1998). L'endothélium fonctionnel produit également l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA, *tissue plasminogen activator*) qui clive la fibrine et donc prévient l'activation plaquettaire. Plus récemment, il a été montré que des microRNA, notamment miR-143 et miR-145 sont sécrétés et impliqués dans une signalisation paracrine (Cordes *et al.* 2009; Neth *et al.* 2013).

### **2.3.1.3 Activation des cellules endothéliales**

Les cellules endothéliales sont activées en réponse à plusieurs stimuli, y compris la perturbation du flux, la présence de lipides oxydés et des stimuli inflammatoires.

**Perturbation du flux.** La présence de géométries variables, tel qu'observé dans les courbures ou les bifurcations, est responsable de variations dans la contrainte de cisaillement. La présence de contraintes de cisaillement faibles (< 5 dynes/cm<sup>2</sup>) et oscillantes est responsable d'une perturbation

## Revue bibliographique

de la fonction endothéliale (Zarins *et al.* 1983; Ku *et al.* 1985). Ce phénomène est, pour partie, attribué à la diminution de la production de NO par perturbation de la signalisation Akt (Dimmeler *et al.* 1999), à la diminution de la concentration intra-cellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$  et donc du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM ou encore à la perturbation du transport entre domaines subcellulaires (Fleming 2010) et notamment la phosphorylation de la eNOS par la protéine kinase C (PKC) (Fleming *et al.* 2001) et son association à la cavéoline-1, qui antagonise la liaison au complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM (García-Cardena *et al.* 1997).

En dehors de la diminution du NO et de l'augmentation du stress oxydant, un grand nombre d'autres modifications sont observées en conditions de perturbation du flux ; elles affectent la signalisation de divers facteurs (Chatzizisis *et al.* 2007; Chiu et Chien 2011; Neth *et al.* 2013).

**Lipides modifiés.** Il a été montré que les LDL modifiés sont responsables de l'activation de l'endothélium ; il a notamment été montré que l'expression par les ECs de molécules d'adhésion (e.g. VCAM-1 (J. A. Kim *et al.* 1994)), de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires est augmentée en présence de LDL modifiés (Berliner *et al.* 1995). Ces effets sont liés à la reconnaissance des LDL modifiés qui implique le récepteur LOX-1 (*Lectin-like oxidized LDL receptor-1*) et à la signalisation en aval (Sawamura *et al.* 1997; J. L. Mehta *et al.* 2006).

**Inflammation.** D'autres stimuli, notamment les cytokines pro-inflammatoires, ont également été associés à la dysfonction endothéliale. Il a été montré que divers médiateurs de l'inflammation e.g. les cytokines pro-inflammatoire TNF,  $\text{IL-1}\beta$ , mais aussi la chimiokine MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*) et le facteur tissulaire (TF, tissue factor) peuvent favoriser divers aspects de la dysfonction endothéliale (Raines et Ferri 2005), notamment et pour partie via la signalisation pro-inflammatoire NF- $\kappa$ B (Sima, Stancu, et Simionescu 2009).

La présence de stress oxydant, fortement potentialisée avec la signalisation pro-inflammatoire, a aussi été associée à une activation de la voie NF- $\kappa$ B, notamment par activation du complexe IKK (I $\kappa$ B kinase) impliqué dans la dérégulation de NF- $\kappa$ B par l'inhibiteur de  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) (Gareus *et al.* 2008), ainsi que par modification post-transcriptionnelle des sous-unités de NF- $\kappa$ B et d'autres co-facteurs (Ghosh et Hayden 2008).

**Rôle du stress oxydant.** L'activation de l'endothélium conduit à une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*) par plusieurs voies, notamment par activation de la xanthine oxydase (XO) et de la NADPH oxydase (NOX), en aval de la signalisation NF- $\kappa$ B (Hwang *et al.* 2003; Lassègue et Griendling 2010).

La présence de ROS, et en particulier de l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) participe à la diminution de la biodisponibilité du NO. Cet effet est lié à l'interaction entre le NO et l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Gryglewski, Palmer, et Moncada 1986) qui induit la formation de peroxyde nitrique ( $ONOO^-$ ); l'effet direct est une diminution de la biodisponibilité du NO (Harrison 1997; Hsiai *et al.* 2007). En effet, le  $ONOO^-$  est responsable de l'oxydation de diverses cibles, y comprise le BH<sub>4</sub>, co-facteur de la eNOS (Szabó, Ischiropoulos, et Radi 2007). La réduction de la biodisponibilité du BH<sub>4</sub> entraîne le découplage de la eNOS, responsable d'une diminution de la synthèse de NO et d'une augmentation de la synthèse de  $O_2^{\cdot-}$  (Laursen *et al.* 2001; Landmesser *et al.* 2003). Le  $ONOO^-$  est responsable de l'inactivation de la diméthylargininase (DDAH) ce qui conduit à l'augmentation de la concentration en diméthylarginine asymétrique (ADAM), inhibiteur de la eNOS (Wadham et Mangoni 2009).

En dehors de l'effet médié par la diminution de la biodisponibilité du NO, les ROS présentent une action directe sur la dysfonction endothéliale et l'inflammation ainsi que sur le remodelage vasculaire *via* l'activation de la signalisation NF- $\kappa$ B (Anrather, Racchumi, et Iadecola 2006). De plus, il a été montré que le  $ONOO^-$  est aussi responsable de l'inactivation d'enzymes antioxydantes (GSR, GRX, SOD) (Szabó, Ischiropoulos, et Radi 2007), augmentant ainsi la quantité de ROS.

### **2.3.1.4 Conséquences de l'activation de l'endothélium.**

L'endothélium activé est caractérisé en premier lieu par une diminution de la biodisponibilité du NO et une production de ROS. La production de ROS résulte de l'activation de plusieurs enzymes (NOX, XO), du découplage de la eNOS, et de l'inactivation d'enzymes antioxydantes. D'autres enzymes, notamment les lipoxigénase (LO), impliquées dans l'oxydation des lipides, sont également activées. Une production de cytokines pro-inflammatoire (IL-1 $\beta$ ), de facteurs de croissance, de chimiokines (MCP-1), et l'expression de molécules d'adhésions (P- et E-sélectine et VCAM-1 et ICAM-1) survient également. D'autres facteurs que le NO, impliqués dans la vasodilatation et le maintien des SMCs à l'état quiescent, sont également diminués, notamment la prostacycline (PGI<sub>2</sub>), tandis qu'il y a augmentation des facteurs vasoconstricteurs stimulant les SMCs, notamment l'endothéline-1 (ET-1), la prostaglandine H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) et le thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>); la synthèse de ces prostanoides implique les cyclo-oxygénases (COX) qui génèrent également des ROS. Une augmentation de la prolifération et une augmentation de la susceptibilité à l'apoptose sont également observées. Ces effets sont largement imputables aux signalisations pro-inflammatoires NF- $\kappa$ B et AP-1 (Gareus *et al.* 2008).

L'activation des cellules endothéliales est responsable de plusieurs processus majeurs développés ci-

après et liés à l'athérogénèse et plus largement à l'athérosclérose, dont : 1) une augmentation de l'inflammation, liée au recrutement leucocytaire et à l'activation plaquettaire, qui implique l'augmentation de la signalisation des chimiokines et l'expression de molécules d'adhésion, ainsi que l'expression directe de facteurs pro-inflammatoires par les ECs ; 2), une augmentation de l'oxydation des lipoprotéines, notamment liée à la production de ROS, mais aussi à l'activation d'enzymes oxydantes ; 3) une augmentation de la perméabilité vasculaire aux lipoprotéines, liée à l'augmentation de la prolifération des ECs ; 4) une altération de la vasoréactivité et une stimulation des plaquettes et des SMCs, responsables d'une réponse fibro-proliférative, associée à la perturbation de la signalisation du NO et des autres facteurs dérivés de l'endothélium.

### **2.3.2 Lipoprotéines : rétention et oxydation**

L'hypercholestérolémie est un facteur de risque majeur de l'athérosclérose qui reflète l'importance du rôle des lipoprotéines et du métabolisme lipidique dans la pathologie athérosclérotique. Les lipoprotéines pro-athérogéniques se trouvent en concentration importante dans les zones susceptibles à l'athérosclérose. Ceci est dû à un transport de ces particules, lié à leur concentration plasmatique importante et à la perméabilité de l'endothélium, ainsi qu'à leur rétention à ces sites. La conséquence majeure de cette rétention est la modification oxydative des lipoprotéines, leur conférant des propriétés immunogéniques et pro-inflammatoires.

#### **2.3.2.1 Lipoprotéines et métabolisme du cholestérol**

Les lipoprotéines sont des particules lipophiles présentes dans le sang et impliquées dans le transport de substances lipophiles, notamment du cholestérol et des triglycérides.

##### **i) Nature des lipoprotéines**

Les lipoprotéines sont des particules composées d'un cœur hydrophobe contenant des triglycérides (TG) et esters de cholestérol (CE, *cholesteryl esters*) et d'une membrane amphiphile constituée de phospholipides, de cholestérol libre (FC, *free cholesterol*) et des protéines appelées apolipoprotéines (apo). Elles sont classées suivant leur densité, qui reflète leur composition, et suivant les apolipoprotéines qui entrent dans leur constitution. Globalement, deux classes de particules présentant des effets pro- et anti-athérogéniques sont décrites.

Les lipoprotéines de haute densité (HDL, *high density lipoprotein*) sont anti-athérogènes en raison de leur implication dans le transport inverse du cholestérol (Fielding et Fielding 1995; Khera *et al.* 2011). Ces particules consistent en une association, de faible stabilité *in vivo*, d'apolipoprotéine, principalement l'apoA-1, synthétisée par le foie et l'intestin, et de lipides, principalement du

cholestérol.

Les lipoprotéines à apoB, aussi définies comme le cholestérol non-HDL, sont pro-athérogéniques (Pischon *et al.* 2005). Les lipoprotéines de faible densité (LDL, *low density lipoprotein*) sont les particules majoritaires de cette classe, mais l'on trouve aussi les VLDL (*very low density lipoprotein*), les IDL (*intermediate density lipoprotein*), les chylomicrons, les rémanents de chylomicrons, et les lipoprotéines(a) se distinguant des LDL par la présence d'apolipoprotéine(a), un homologue du plasminogène, liée à l'apoB. Les chylomicrons et les VLDL sont des lipoprotéines riches en triglycérides tandis que les autres particules sont enrichies en cholestérol. Les lipoprotéines à apoB sont souvent assimilées aux LDL, qui est le principal constituant de cette classe et le plus étudié.

## **ii) Métabolisme du cholestérol.**

Le métabolisme des lipoprotéines est présenté en Figure 4. Succinctement, les lipides exogènes (alimentaires) s'assemblent avec l'apoB-48 pour former des chylomicrons. Sous l'action des lipases, les chylomicrons sont dégradés et les acides gras sont utilisés comme substrat énergétique par les tissus ; les rémanents des chylomicrons sont captés par le foie via l'interaction entre apoB-48 ou apoE et le récepteur aux LDL (LDLR) ou LRP1 (*Low density lipoprotein receptor-related protein 1*). Les lipides endogènes s'assemblent avec l'apoB-100 pour former des VLDL qui sont dégradés par les lipases en IDL et captés, pour partie par le foie via le récepteur aux LDL (LDLR) ; les particules non captées deviennent, sous l'action de la lipase hépatique, des LDL. L'apolipoprotéine A-1 est sécrétée par l'intestin et le foie et s'assemble avec du cholestérol sous l'action du transporteur ABCA1 (ATB-Binding Casser A1) pour former des HDL naissantes. Dans les tissus périphériques, les HDL naissantes et matures participent à l'efflux de cholestérol en interagissant avec les transporteurs ABCA1 et ABCG1 respectivement, notamment exprimés dans les macrophages sous le contrôle du facteur de transcription LXR (*Liver X Receptor*). Le cholestérol libre des HDL naissantes est estérifié par la lécithine-cholestérol acyltransférase (LCAT) formant des HDL matures qui permettent le retour du cholestérol au foie directement via l'interaction avec le récepteur éboueur SR-B1 (*scavenger receptor B1, alias SCARB1*) ou par transfert de cholestérol depuis les lipoprotéines à apoB100 via la protéine de transfert de cholestérol (CETP, *cholesterylester transfer protein*) (Rader et Daugherty 2008; Lusis et Pajukanta 2008).

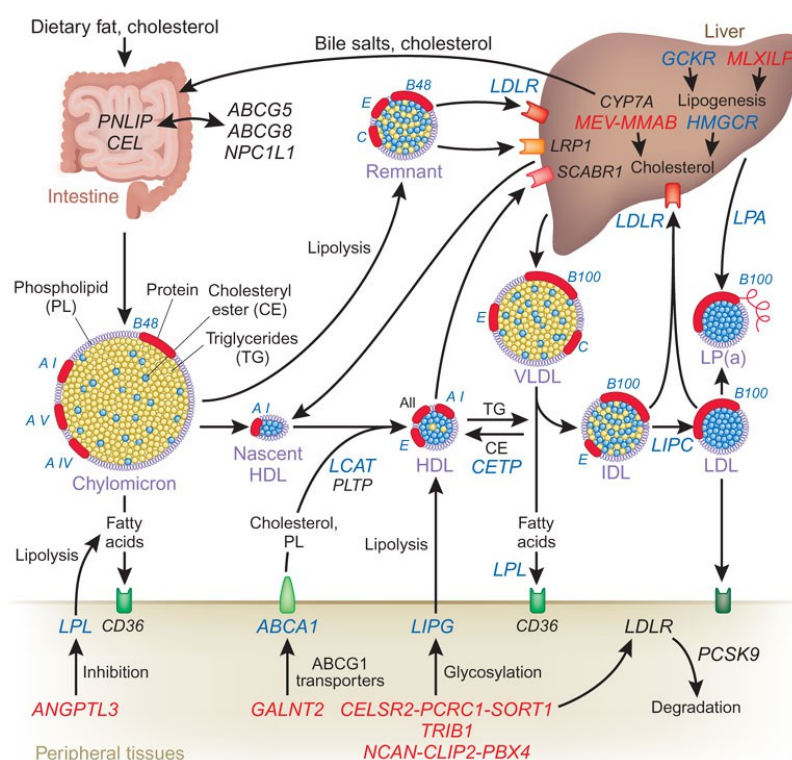


Figure 4. Métabolisme des lipoprotéines humaines. Les LPs riches en TG issues de l'intestin (chylomicrons) et du foie (VLDL) délivrent des acides gras aux tissus périphériques et deviennent plus riches en cholestérol. Les rémanents de chylomicrons (via LDLR et LRP1) et une partie des rémanents des VLDL ou IDL (via LDLR) sont captés par le foie ; l'autre partie, sous l'action de la lipase hépatique, constitue les LDL. Les HDL sont formés à partir de apoA-1 circulant (HDL naissants). (Lusis et Pajukanta 2008)

Chez l'homme, les valeurs normales – utilisées pour déterminer l'âge vasculaire (D'Agostino *et al.* 2008) – sont de 180 mg/dL de cholestérol total et 45 mg/dL de HDL, soit 135 mg/dL de cholestérol non-HDL ou 115 mg/dL de cholestérol LDL, les deux valeurs étant équivalent en termes de prédiction du risque cardiovasculaire (Robinson *et al.* 2009). Les recommandations récentes plaident en faveur d'une réduction du cholestérol LDL à des valeurs < 100 mg/dL (ou 2.5 mmol/L) (Perk *et al.* 2012). Il est intéressant de noter que ce profil lipidique varie avec les espèces. Notamment chez la souris, le niveau de cholestérol sanguin est bien plus faible et essentiellement constitué de HDL, ce qui est notamment lié à l'absence d'activité de transfert de CE chez la souris (Dietschy et Turley 2002), mais aussi à la présence de apoE au niveau des LDLs de souris facilitant leur élimination hépatique (Skålén *et al.* 2002).

### 2.3.2.2 Perméabilité aux lipoprotéines

L'endothélium vasculaire est perméable aux lipoprotéines, en particulier de faible diamètre ; cette perméabilité met en jeu des mécanismes actifs de passage trans-endothélial sujets à régulation.

#### i) Passage trans-endothélial

Le transport des lipoprotéines à travers la membrane endothéliale est un processus régulé qui s'effectue par les voies paracellulaire et transcellulaire. Ces voies mettent en jeu des mécanismes de régulation de l'adhérence cellulaire entre ECs et de transport vésiculaire, avec un certain degré

d'interdépendance entre les deux voies (Komarova et Malik 2010).

Le transport des lipoprotéines par la voie transcellulaire (ou transcytose) consiste en une endocytose, suivie d'un transport vésiculaire et enfin d'une exocytose des lipoprotéines au pôle cellulaire opposé. Ce transport met un jeu des cavéoles – vésicules obtenues après invagination de la membrane plasmique – constituées par l'assemblage de cavéoline-1 (P. G. Frank, Pavlides, et Lisanti 2009). Il a été montré que ~ 85 % des lipoprotéines retrouvées dans l'espace sous-endothélial sont issues d'un processus de transcytose, restreint aux particules de moins de 70 nm (Simionescu et Simionescu 1993) .

Le transport par la voie paracellulaire implique une réorganisation du cytosquelette cortical d'actine et des molécules d'adhésion associées entraînant une régulation de l'intégrité des jonctions serrées et des jonctions adhérentes au pôle apical et sur la face latérale des ECs, respectivement. Les principales molécules impliquées dans la cohésion entre ECs au niveau des jonctions d'adhésion sont les VE-cadhérines, engagées dans des interactions homophiles, et liées au cytosquelette d'actine via des complexes protéiques constitués notamment de caténines (von Eckardstein et Rohrer 2009). La régulation de l'adhésion met en jeu principalement les signalisations liées aux protéines G monomériques (RhoGTPase), à c-Src et au calcium, induites par différents stimuli athérogéniques, notamment le stress oxydant (Komarova et Malik 2010; Stancu, Toma, et Sima 2012) ou la présence de thrombine et la signalisation liée à son récepteur PAR1 (*protease-activated receptor*) (Komarova, Mehta, et Malik 2007) .

### **ii) Modification du passage trans-endothélial**

La perméabilité endothéliale est classiquement considérée comme augmentée dans un contexte inflammatoire, notamment en réponse aux signaux tels que le TNF (*tumor necrosis factor*) et en conditions de stress oxydant (D. Mehta et Malik 2006). Il n'est donc pas étonnant d'observer une augmentation de la perméabilité vasculaire au cours de l'athérosclérose. L'augmentation de la prolifération et de l'apoptose des ECs dans la dysfonction endothéliale implique une restructuration du cytosquelette au cours de la division cellulaire et aboutit à l'augmentation du transport par voie paracellulaire (Chatzizisis *et al.* 2007). Les zones vasculaires présentant une perturbation du flux sont des zones susceptibles à la formation de lésions athérosclérotiques ; la présence de particules dans l'endothélium a été corrélée à ces perturbations de flux (Himburg *et al.* 2004). Cependant, la présence de macromolécules dans l'espace sous-endothélial ne signifie pas nécessairement que la perméabilité à ces molécules est augmentée, mais peut aussi refléter une augmentation de leur rétention (K. J. Williams et Tabas 1995). L'observation d'un transport équivalent entre des zones de

dysfonction endothéliale et des zones présentant un endothélium fonctionnel (Schwenke et Carew 1989) va dans le sens de cette explication. Toutefois, lorsque des lésions avancées sont présentes, le passage transendothélial des lipoprotéines est bien augmenté (Stancu, Toma, et Sima 2012).

Le passage de lipoprotéines dépend de la concentration plasmatique en lipoprotéines. Cette observation majeure fait le lien entre l'hypercholestérolémie en temps que facteur de risque cardiovasculaire et le processus atherogénique d'entrée de lipoprotéines dans l'espace sous-endothélial (Nielsen 1996).

### 2.3.2.3 Rétention

L'interaction entre les lipoprotéines et les protéoglycanes a été décrite dans les années 1960 (Camejo *et al.* 1980). Cette interaction, directe ou non, qui est responsable de l'augmentation de la rétention des lipoprotéines, plus particulièrement aux sites prédisposés à la formation de lésions et présentant un épaissement de l'intima riche en protéoglycanes (Nakashima, Wight, et Sueishi 2008). La rétention des lipoprotéines (et leur modification en conséquence) constitue l'élément clé de l'athérogénèse, nécessaire et suffisant à la formation de lésions (K. J. Williams et Tabas 1995; Tabas, Williams, et Borén 2007).

#### i) Interaction avec les protéoglycanes

L'espace sous endothélial est composé de différentes molécules de matrice extra-cellulaire, y compris des protéines fibrillaires (collagène, élastine), globulaires (fibronectine, vitronectine) et des protéoglycanes. Les protéoglycanes sont composés d'une protéine cœur et de glycoaminoglycanes : chaînes polysaccharidiques sulfatées, chargées négativement (e.g. dermatane sulfate, héparane sulfate) ; on retrouve ces molécules principalement dans l'espace extra-cellulaire et associées à la membrane cellulaire. Les principaux protéoglycanes vasculaires sont le versicane, le biglycane – tous deux retrouvés dans les sites susceptibles à l'athérosclérose – et la décorine – aux sites peu susceptibles à l'athérosclérose (Nakashima, Wight, et Sueishi 2008).

Les protéoglycanes jouent un rôle dans la rétention des lipoprotéines, *via* l'interaction avec les apolipoprotéines (Chait et Wight 2000) ; en effet, la rétention des lipoprotéines augmente avec la taille et la degré de sulfatation des protéoglycanes (Camejo *et al.* 1993; M. Y. Chang *et al.* 2000).

**Interaction directe.** Différents sites de l'apoB comprenant des acides aminés chargés positivement ont été identifiés comme ligands de protéoglycanes ; en particulier, l'implication du site B de l'apoB100 et du site B-1b de l'apoB48 a été démontrée dans l'interaction avec le chondroïtine sulfate et le dermatane sulfate (Borén *et al.* 1998; Flood *et al.* 2002). La taille et les modifications des

lipoprotéines, en particulier leur oxydation, influent sur leur capacité à lier les protéoglycanes (Khalil, Wagner, et Goldberg 2004). En mutant l'apoB, et en modifiant ainsi son affinité pour les protéoglycanes, un lien direct entre la capacité de l'apoB à lier les protéoglycanes et l'atherogénicité des LDL a été montré (Skålen *et al.* 2002).

**Protéines accessoires.** La rétention des lipoprotéines par les protéoglycanes peut également être facilitée par la présence de protéines accessoires (LPL, *lipoprotein lipase* ; S-SMase, *secretory sphingomyelinase* ; sPLA2, *secretory phospholipase A2*). La présence de LPL a été mise en évidence au niveau de l'intima, associé aux SMCs en conditions physiologiques, tandis que dans les lésions précoces, la LPL a également été retrouvée associée à la ECM (Araki, Fan, et Watanabe 1998). La liaison initiale entre LDL et protéoglycane tend à évoluer avec la mise en place d'un pontage moléculaire impliquant la LPL (Gustafsson *et al.* 2007). Les LDL modifiés par la sPLA2 présentent une affinité augmentée pour l'apoB100 *via* le site A (Flood *et al.* 2004). Par ailleurs, il a été montré que les lipoprotéines peuvent s'agrèger et fusionner, ce qui augmente leur rétention *via* une augmentation de la liaison aux protéoglycanes (Öörni *et al.* 2000). La S-SMase est impliquée dans l'agrégation des lipoprotéines ; la taille des particules est liée à leur rétention dans l'intima (Tabas 1999).

### ii) Sites de rétention augmentée

Les zones susceptibles au développement de lésions d'athérome sont caractérisés, chez l'homme, par un épaississement intimal excentrique, présentant une couche superficielle riche en protéoglycanes (Stary *et al.* 1992). Cet épaississement est considéré comme non pathologique. Cependant, il résulte d'une réponse fibroproliférative liée à l'endothélium dysfonctionnel, favorisant la migration des SMCs au sein de l'intima et l'adoption d'un phénotype sécrétoire. Ainsi, bien que la rétention des lipoprotéines soit nécessaire et suffisante pour expliquer l'athérosclérose (les modifications des lipoprotéines étant une conséquence nécessaire de leur rétention) (K. J. Williams et Tabas 1995), la perturbation du flux apparaît comme un phénomène en amont de la pathologie. Ainsi, les zones artérielles susceptibles à l'athérosclérose du fait de l'augmentation de la rétention des lipoprotéines colocalisent parfaitement avec les zones de perturbation du flux. Cette interprétation est renforcée par l'observation du développement des lésions aux sites de perturbation du flux dans les modèles animaux ne présentant pas d'épaississement de l'intima (Nakashima *et al.* 1994).

Par ailleurs, d'autres stimuli participant à l'induction de la synthèse de protéoglycanes et de protéines accessoires sont impliqués dans l'augmentation de la rétention des lipoprotéines. C'est notamment le cas des oxLDL ; il a été montré que l'activation des SMCs par les oxLDL résulte en la

synthèse de protéoglycanes plus longs et présentant un degré de sulfatation plus élevé, avec une affinité augmentée pour les LDL (M. Y. Chang *et al.* 2000).

#### **2.3.2.4 Oxydation**

La présence de lipides oxydés dans l'athérosclérose a été établie par Galvind *et al.* (Glavind *et al.* 1952). Il a été montré que les LDL natifs incubés en présence de cellules endothéliales présentent une affinité augmentée pour les macrophages (Henriksen, Mahoney, et Steinberg 1981). Des études postérieures ont démontré que ces LDL natifs ont subi un phénomène d'oxydation et que ce phénomène est également observé *in vivo* (Steinberg 1989; Palinski *et al.* 1989). En effet, dans l'espace sous-endothélial, la rétention des lipoprotéines par les protéoglycanes les rend susceptibles à l'oxydation (Hurt-Camejo *et al.* 1992). Les modifications oxydatives des lipoprotéines permettent leur reconnaissance par les récepteurs de l'immunité innée, exprimés par différents types cellulaires et favorisant la progression de l'athérosclérose.

##### **i) Les acteurs de l'oxydation**

L'oxydation des lipides peut se faire en présence de ROS, catalysée en présence d'ions métalliques, et par voie enzymatique.

Beaucoup d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*) possèdent un électron non apparié et sont donc par définition des espèces radicalaires ; c'est le cas de l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), du radical hydroxyle ( $HO^{\cdot}$ ), de l'oxyde nitrique ( $NO^{\cdot}$  ou NO) et des lipides radicalaires. D'autres ROS comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'acide hydrochlorique (HOCl) ou le peroxydrite ( $ONOO^{\cdot}$ ) ne sont pas des espèces radicalaires mais contribuent au stress oxydant. À noter que le  $NO^{\cdot}$  et ses dérivés, dont le principale, le  $ONOO^{\cdot}$ , peuvent être considérés non comme des ROS, mais des espèces réactives de l'azote (RNS, *reactive nitrogen species*) (Hausladen *et al.* 1996; Stocker et Keaney 2004).

Les ROS proviennent de différents types cellulaires, incluant les ECs de l'endothélium activé, les leucocytes recrutés, en particulier les macrophages et les neutrophiles, mais aussi les SMCs de l'intima. Les sources de ROS sont la chaîne respiratoire de la mitochondrie, les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acide arachidonique : les lipoxygénase (LO) et cyclo-oxygénases (COX), le cytochrome p450, la xanthine oxydase (XO), les NOS, les NADH/NADPH oxydases (NOX), les peroxydases et d'autres protéine à hème (H. Cai et Harrison 2000). La NOS inductible (iNOS) plus particulièrement exprimée par les cellules inflammatoires est responsable de la synthèse de NO à haute concentration, constituant une source majeure de RNS (Nauseef 2008).

## Revue bibliographique

La réduction univalente de l'oxygène moléculaire résulte en la production de ( $O_2^{\cdot-}$ ) ; cette réaction peut être effectuée par réaction enzymatique, notamment via les NOX ou la XO, ou non enzymatique, notamment par de la chaîne de transport d'électrons. Le  $O_2^{\cdot-}$  peut être dismuté en  $H_2O_2$  par voie enzymatique impliquant la superoxyde dismutase (SOD). Le  $H_2O_2$  peut interagir avec du fer, résultant en la production de  $OH^{\cdot}$  par réaction de Fenton. Le ONOO<sup>-</sup> en condition acide donne du ONOOH, qui peut se décomposer pour donner notamment du  $HO^{\cdot}$  (Radi *et al.* 1991). La myéloperoxydase (MPO) est une hémoprotéine et enzyme qui augmente le potentiel oxydant du  $H_2O_2$  : aux concentrations physiologiques d'ion chlorure, le système myéloperoxydase- $H_2O_2$  résulte en la production de HOCl, qui peut réagir avec du  $O_2^{\cdot-}$  pour donner du  $OH^{\cdot}$ . (Madamanchi, Vendrov, et Runge 2005). Par ailleurs, la MPO est également impliquée dans d'autres voies de modification des protéines : la nitration, liée au NO (Podrez *et al.* 1999) et la carbamylation (Z. Wang *et al.* 2007). Il a été montré que les 12/15-LO sont capables d'oxyder directement les LDL (Parthasarathy, Wieland, et Steinberg 1989) et que l'oxydation liée aux 12/15-LO est une voie d'oxydation majeure, en tout cas dans les modèles murins d'athérosclérose (Cyrus *et al.* 1999).

### ii) Étapes de l'oxydation

Les observations *in vitro* montrent que l'oxydation des LDL peut être décrite en trois phases (Stocker et Keaney 2004).

La première phase correspond à une phase de latence au cours de laquelle il y a déplétion des molécules anti-oxydantes lipophiles incluses dans les particules (e.g.  $\alpha$ -tocophérol,  $\beta$ -carotène, ubiquinol) ; au cours de cette phase, les lipoprotéines ne sont virtuellement pas modifiées.

La deuxième phase est la phase de propagation au cours de laquelle l'oxydation des acides gras et du cholestérol donne respectivement des peroxydes lipidiques (en particulier la lysophosphatidylcholine) et de l'oxycholestérol (en particulier le 7-cétocholestérol). L'apoB n'est pas ou peu modifiée au cours de cette étape. Cette phase génère les LDL minimalement modifiés (mmLDL).

La phase de décomposition survient enfin, au cours de laquelle les lipides oxydés se fragmentent pour former des aldéhydes réactifs capables de modifier des groupements aminés des protéines et des phospholipides. La modification des résidus lysines de l'apoB en conséquence de la peroxydation des lipides est responsable de la formation de résidus malondialdéhyde et 4-hydroxynonéal. D'autres modifications liées à l'oxydation des protéines telles que la nitration et la carbomylation sont également observées. Les oxLDL présentent divers degrés d'oxydation et

constituent (*in vivo* aussi) une population très hétérogène (Stocker et Keaney 2004; Yoshida et Kisugi 2010; Levitan, Volkov, et Subbaiah 2010).

Bien que le taux de LDL modifiées dans le sang soit augmenté chez les personnes à haut risque cardiovasculaire (Toshima *et al.* 2000), il semblerait que ces particules soient oxydées dans l'intima avant de migrer vers le compartiment plasmatique. La forte concentration en molécules anti-oxydantes de nature lipidique dans les lipoprotéines circulantes (e.g.  $\alpha$ -tocophérol) empêche l'oxydation dans le sang, tandis que dans l'intima, la rétention et l'exposition au stress oxydant permet dans un premier temps la déplétion en anti-oxydants suivie des modifications oxydatives (Yoshida et Kisugi 2010).

### iii) Propriétés des LDL modifiées

Les modifications des lipides et dans un second temps des protéines génèrent des épitopes d'oxydation, modifiant les propriétés de reconnaissance par différents récepteurs cellulaires et responsables de réaction inflammatoire, de captation non-régulée des LDL et capable d'induire une réaction immunitaire.

**Les récepteurs.** Il a été montré que les cellules de l'immunité innée sont capables de reconnaître des motifs moléculaires associés à des pathogènes (PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*) via des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR, *pattern recognition receptor*) (Janeway 1989). Les PRR se composent de plusieurs types de récepteurs, notamment les récepteurs éboueurs (SR, *scavenger receptor*) et les récepteurs de type Toll (TLR, *Toll-like receptor*), tous deux membranaires. Par la suite, il a été montré que ces récepteurs ne sont pas restreints aux cellules de l'immunité innée, et que les motifs moléculaires reconnus ne sont pas uniquement associés à des pathogènes, mais plus généralement à des signaux de danger (DAMP, *danger-associated molecular pattern*). Les épitopes d'oxydation font partie de ces motifs moléculaires et sont reconnus par les SR et TLR (Levitan, Volkov, et Subbaiah 2010; Y. I. Miller *et al.* 2011).

En fonction de leur degré d'oxydation, les LDL sont reconnus par différents récepteurs. Schématiquement, les LDL natifs sont reconnus par le LDLR mais pas par les PRR. Les mmLDL gardent leur capacité à être reconnus par les LDLR, mais sont également reconnus par les TLR, en particulier TLR-4. Les oxLDL ne sont plus reconnus par les LDLR, mais présentent une haute affinité pour les SR, notamment LOX-1 et, si l'oxydation est plus importante, par les CD36 et SRA (Levitan, Volkov, et Subbaiah 2010) (Figure 5) ; il a également été montré que les oxLDL sont reconnus par TLR-2 (West *et al.* 2010). Cependant, il existe une certaine spécificité des récepteurs pour diverses formes d'oxydation ; e.g. CD36 présente une haute affinité pour les LDL nitrés

(Podrez *et al.* 2000), tandis que SRA présente une haute affinité pour les LDL carbamylés (Z. Wang *et al.* 2007) ou porteurs de groupements malondialdéhyde-lysine. L'implication de ces changements de reconnaissance sur la captation de LDL et sur la réponse inflammatoire sont discutés plus loin.

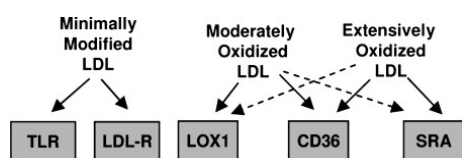


Figure 5. Relation entre le degré d'oxydation des LDL et l'interaction avec différents récepteurs. (Levitan *et al.* 2010)

En dehors de la reconnaissance par les PRR, les épitopes d'oxydation peuvent être reconnus par les cellules de l'immunité adaptative ; cela est notamment attesté par la présence d'anticorps spécifiques des épitopes d'oxydation, e.g. des résidus malondialdéhyde-lysine (Ylä-Herttuala *et al.* 1994; Libby, Lichtman, et Hansson 2013).

**Autres modifications.** Les LDL peuvent également subir des modifications non oxydatives. L'acétylation est un modèle d'étude des modifications des LDL, non pertinent *in vivo* ; c'est l'étude des LDL acétylés qui a permis de mettre en évidence la captation des LDL indépendante du LDLR par les macrophages (J. L. Goldstein *et al.* 1979) ; cette reconnaissance passe par les récepteurs SRA (Kodama *et al.* 1988). La glycation et la glycosylation des LDL ont également été mises en évidence, et il a été montré que ces modifications favorisent l'oxydation des LDL ; il est postulé que ce phénomène est un élément d'explication du lien observé entre le diabète et les pathologies cardiovasculaires (Hunt, Smith, et Wolff 1990; Lyons 1992). L'agrégation des lipoprotéines, qui met en jeu la sphingomyélinase soluble (S-SMase, *secretory sphingomyelinase*) est un phénomène qui augmente la rétention des lipoprotéines, qui sous forme agrégée ne peuvent pas quitter l'intima (Tabas 1999).

### 2.3.3 Réponse inflammatoires

La dysfonction endothéliale est impliquée dans le recrutement de leucocytes et, avec la rétention et la modification des lipoprotéines, participe à l'entretien d'une réponse inflammatoire chronique principalement liée aux macrophages et lymphocytes T.

#### 2.3.3.1 Recrutement leucocytaire

Le recrutement de leucocytes est réalisé par l'endothélium dysfonctionnel des lésions. Classiquement, le recrutement leucocytaire est décrit par trois phases, précédant la migration trans-endothéliale : le roulement, l'activation et l'arrêt, qui mettent en jeu respectivement les sélectines, les chimiokines et les intégrines (Springer 1994). Ce paradigme a été complété pour décrire plus

finement les acteurs moléculaire impliqués ; ainsi, le processus débute par une étape de capture et inclut notamment les étapes d'adhésion ferme et de migration latérale, précédant la transmigration par voie para- ou trans-cellulaire (Figure 6) (Ley *et al.* 2007).

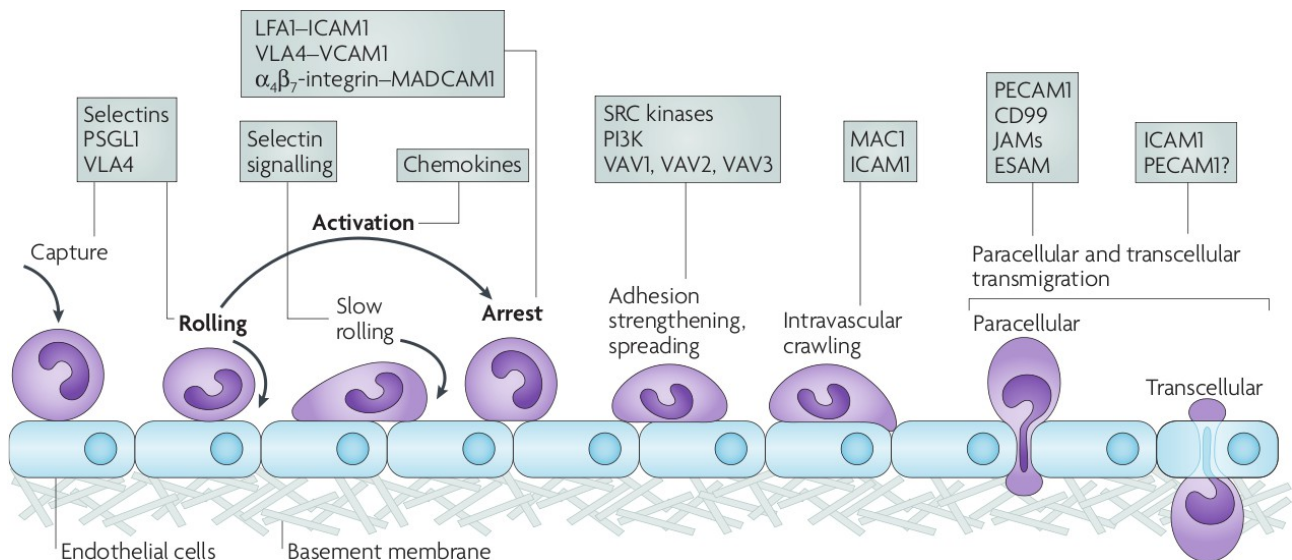


Figure 6. Phases de recrutement des leucocytes et molécules impliquées. (Ley 2007)

### i) Capture et roulement

Le roulement met en jeu des interactions entre sélectines ; les L-sélectines sont exprimées par les leucocytes et les P- et E-sélectines par les cellules endothéliales activées dans un contexte inflammatoire. Ces interactions rapides (constantes cinétiques d'association et de dissociation faibles et élevées respectivement) permettent de ralentir les leucocytes à la surface endothéliale en présence de contraintes de cisaillement (Alón, Hammer, et Springer 1995).

Les sélectines interagissent également avec d'autres ligands, e.g. PSGL1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*). L'interaction entre L-sélectine et PSGL1 exprimé par des leucocytes permet une capture secondaire de leucocytes (Eriksson *et al.* 2001). Ce phénomène est également facilité par la présence de plaquettes activées, qui expriment notamment la P-sélectine (Lievens et von Hundelshausen 2011).

### ii) Activation et arrêt des leucocytes

L'arrêt des leucocytes est déclenché par l'activation leucocytaire *via* la signalisation liée aux molécules chémoattractantes, et notamment les chimiokines, pendant la phase de roulement ; l'arrêt est effectué par l'interaction entre les intégrines de leucocytes et les récepteurs de type immunoglobulines exprimés par les ECs.

**Les chimiokines.** Les chimiokines ou cytokines chémoattractantes (*chemotactic cytokines*) sont classées suivant la position de leurs deux premières cystéines en 3 groupes distincts identifiés dans l'athérosclérose (CC, CXC, CX<sub>3</sub>C). Ces molécules sont produites soit directement sous forme soluble, soit comme protéines trans-membranaires (c'est le cas de CX<sub>3</sub>CL1 et CXCL16) qui subissent un clivage enzymatique. Les récepteurs aux chimiokines appartiennent à la classe des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR, *G protein-coupled receptor*) et sont classés suivant la nature de leurs ligands (Zernecke et Weber 2010). MIF (*macrophage migration inhibitory factor*) est une cytokine capable de lier des récepteurs aux chimiokines CXC (CXCR2 et CXCR4) considérée comme une chimiokine atypique (Zernecke, Bernhagen, et Weber 2008).

Les chimiokines majeures impliquées dans le recrutement leucocytaire impliqué dans l'initiation de l'athérosclérose sont MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1, alias CCL2*), RANTES (*Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted, alias CCL5*), l'interleukine-8 (IL-8 *alias CXCL8*), et la Fractaline (*alias CX<sub>3</sub>CL1*). Les principaux récepteurs de ces chimiokines que sont CCR2, CCR5 et CX<sub>3</sub>CR1 présentent des signalisations indépendantes et des effets additifs (Saederup *et al.* 2008; Combadière *et al.* 2008). À noter que différents couples chimiokine-récepteur peuvent être impliqués pour le recrutement de différents types cellulaires et que le profil de chimiokines varie en fonction de l'avancement de la pathologie (Zernecke et Weber 2010). Il a été montré qu'en présence de CXCL4, la réponse liée à CCL5 et menant à l'arrêt des monocytes est potentialisée (von Hundelshausen *et al.* 2005).

L'endothélium activé exprime des molécules chémoattractantes au pôle apical, en particulier des chimiokines, *via* une augmentation de la synthèse et du transport depuis le pôle basolatéral (Ley *et al.* 2007). Le clivage enzymatique de précurseurs de chimiokines par les thrombocytes suivi du transport vésiculaire et de l'exocytose est impliqué dans le dépôt de chimiokines, et notamment RANTES, mais aussi CXCL4 et CXCL5 sur l'endothélium en présence de plaquettes activées (von Hundelshausen *et al.* 2001; Huo *et al.* 2003). Les chimiokines se lient aux glycosaminoglycanes présents dans le glycocalyx à la face luminale des ECs ; il a été montré que cette liaison, en plus d'une implication dans la protection à la protéolyse, est nécessaire à l'activation des leucocytes (Z. Johnson, Proudfoot, et Handel 2005).

**Les intégrines & l'activation des leucocytes.** Les intégrines sont une famille de protéines d'adhésion cellulaire composées de deux sous-unités trans-membranaires  $\alpha$  et  $\beta$  pouvant présenter des configurations de basse et de haute affinité pour leur ligand. Les intégrines impliquées dans l'arrêt des leucocytes font partie des sous-famille  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2, en particulier les intégrines  $\alpha$ <sub>4</sub> $\beta$ <sub>1</sub> *alias*

VLA-4 (*Very Late Antigen-4*) et  $\alpha_1\beta_2$  alias LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen 1*).

La signalisation liée aux molécules chémoattractantes, en particulier MCP-1 et IL-8 (Gerszten *et al.* 1999), permet d'augmenter l'affinité des intégrines pour leur cible par changement conformationnel (Takagi *et al.* 2002) mais aussi d'augmenter la valence de la liaison par regroupement (Kucik 2002). Ce phénomène correspondant à l'activation leucocytaire implique une signalisation *inside-out* rapide entre les récepteurs aux chimiokines et les intégrines (Laudanna *et al.* 2002). Il en résulte une stabilisation de l'adhésion après l'arrêt : adhésion ferme (Ley *et al.* 2007).

**Les molécules de la superfamille des immunoglobulines & l'arrêt des leucocytes.** Les ligands des intégrines appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Il a été montré que dans le contexte du recrutement leucocytaire au cours de l'athérosclérose, les molécules d'adhésion VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) et ICAM-1 (*intracellular cell adhesion molecule-1*) sont les ligands principaux de VLA-4 et de LFA-2, respectivement (Springer 1990).

L'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion VCAM-1 et ICAM-1 (tout comme celle des sélectines) est une caractéristique de la dysfonction endothéliale ; cette augmentation est observée dans les conditions pro-athérogéniques, notamment en réponse aux stimuli pro-inflammatoires tels que le TNF ou l'IL-1 (Osborn *et al.* 1989; Ramana, Bhatnagar, et Srivastava 2004), avec l'accumulation de lipides (Cybulsky et Gimbrone 1991; Khan *et al.* 1995) ou en conditions de perturbation du flux sanguin (Ohtsuka *et al.* 1993; Brooks, Lelkes, et Rubanyi 2002).

### iii) Migration transendothéliale

La migration transendothéliale des leucocytes intervient en réponse aux stimuli chémoattractants des chimiokines et à la contrainte de cisaillement (Cinamon *et al.* 2004) ; elle peut se faire par voie para- ou transcellulaire.

Il a été montré que les leucocytes présentent un phénomène de migration latérale qui met en jeu l'interaction entre les intégrines LFA-1 et Mac-1 (*alias*  $\alpha_M\beta_2$ , CD11b/CD18) et ICAM-1 (C. W. Smith *et al.* 1989). Ce phénomène participe à l'initiation de la transmigration, notamment en induisant une signalisation impliquant les RhoGTPases, elles-mêmes impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine (Ley *et al.* 2007).

La voie paracellulaire est la voie majoritaire ; la migration s'effectue à la jonction des ECs. Dans le cas général, ce phénomène met en jeu des interactions homophiles et hétérophiles avec les protéines des jonctions serrées et des jonctions d'adhérence, notamment PECAM-1 (*platelet/endothelial-cell adhesion molecule 1, alias* CD31), CD99, VE-cadhérine, ICAM-2 (*intracellular cell adhesion*

*molecule-2*) et les JAMs (*Junctional Adhesion Molecules*). La signalisation intracellulaire résultante est responsable de la rétraction des ECs par le biais d'une réorganisation du cytosquelette d'actine (Wittchen 2009). La diapédèse dans l'athérosclérose présente quelques spécificités mais reste peu étudiée, par rapport à d'autres modèles d'étude (Moore et Tabas 2011).

L'existence d'une voie transcellulaire a été démontrée avec l'observation de la migration de neutrophiles au travers de l'endothélium de veinules cutanées de *Cavia porcellus* dans un modèle d'inflammation aiguë (D. Feng *et al.* 1998) avant d'être généralisée à d'autres types cellulaires et contextes physiopathologiques. Cette voie met en jeu des structures appelées organelles vésiculo-vacuolaires (VVO, *vesiculo-vacuolar organelles*). La liaison de ICAM-1 aux protrusions cytoplasmiques des leucocytes entraîne une signalisation dans les ECs qui aboutit à la translocation de ICAM-1 du pôle apical (engagé avec les leucocytes) vers des zones riches en caveoline-1, puis au transport au sein de VVOs, dépendant de la caveolin-1, au pôle basale de la cellule (Millán *et al.* 2006)

Enfin, après la migration au travers de ECs, les leucocytes doivent également traverser la membrane basale de l'endothélium, principalement composé de laminine, de fibres de collagène de type IV et de protéoglycanes. Ce phénomène met en jeu l'interaction entre PECAM-1 et diverses intégrines avec les éléments de la membrane basale (Dangerfield *et al.* 2002; Werr *et al.* 2000), aux zones présentant une faible densité de fibres de matrice extracellulaire (S. Wang *et al.* 2006) et un gradient de chimiokines constitué par interaction entre chimiokines et protéoglycanes (Wei *et al.* 2003).

### **2.3.3.2 Les macrophages**

Les cellules dérivées des monocytes circulants sont le principal type cellulaire retrouvé au sein des lésions athéromateuses. Ces cellules phagocytaires internalisent les lipoprotéines de l'espace sous-endothélial et jouent un rôle prépondérant dans la signalisation pro-inflammatoire.

#### **i) Monocytes**

Les monocytes sont des cellules circulantes de lignée myéloïde. Trois populations de monocytes peuvent être distinguées : les classiques, non classiques, et intermédiaires. Ces populations sont caractérisées par l'expression de marqueurs de surface. Ainsi chez l'homme, les monocytes classiques sont CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>, les monocytes non-classiques CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> et les intermédiaires CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> ; chez la souris, des populations analogues (classique, non-classique, et intermédiaire) sont caractérisées par Ly6C<sup>++</sup> (ou Lyc<sup>high</sup>) CD43<sup>+</sup>, Ly6C<sup>+</sup> (ou Lyc<sup>low</sup>) CD43<sup>++</sup> et Ly6C<sup>+</sup> CD43<sup>++</sup>, respectivement, ainsi que par un profil d'expression de chimiokines différent (Ziegler-

Heitbrock *et al.* 2010). Il est considéré que les monocytes classiques sont pro-inflammatoires tandis que les monocytes non classiques sont anti-inflammatoires (Arnold *et al.* 2007). Il a été montré que l'inhibition de l'entrée de l'ensemble des sous-populations de monocytes présente un effet anti-athérogène (Tacke *et al.* 2007) et que l'augmentation du nombre de monocytes circulants en conditions d'hypercholestérolémie est un phénomène impliqué dans l'aggravation de l'athérosclérose (Soehnlein *et al.* 2009) ; l'implication des cellules dérivant de ces populations dans l'athérosclérose n'est pas entièrement décrite (Moore et Tabas 2011).

### ii) Différentiation

Après transmigration et sous l'effet de facteurs de croissance présent dans la néo-intima, notamment le M-CSF (macrophage-colony stimulating factor) (J. D. Smith *et al.* 1995), ces cellules se différencient en macrophages tissulaires (J. L. Johnson et Newby 2009).

Classiquement, la polarisation pro-inflammatoire M1, ou activation classique, est réalisée en présence de cytokines de type I (IFN- $\gamma$ , TNF) et se traduit par la production élevée de cytokines pro-inflammatoires TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, et IL-12. La polarisation M2, ou activation alternative, est réalisée en présence de cytokines T<sub>H</sub>2 (IL-10, IL-4, et IL-13) et de cellules apoptotiques et résulte en une importante expression de cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- $\beta$  (S. Gordon et Taylor 2005). IL-10 et TGF- $\beta$  favorisent la polarisation M2 (McLaren *et al.* 2011). Cette polarisation implique notamment les facteurs de transcription KLF-4 (*Krüppler-like factor-4*) et PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptor*) intégrant les signaux de l'environnement cytokinique. (Xudong Liao *et al.* 2011; Rigamonti, Chinetti-Gbaguidi, et Staels 2008). Le paradigme classique de polarisation M1/M2 s'est toutefois complexifié, avec la distinction de différentes sous-populations de macrophages, notamment parmi les macrophages à polarisation alternative et l'émergence d'une nouvelle polarisation plus particulièrement impliquée dans la résolution de lésions (Mosser et Edwards 2008), potentiellement pertinente dans le contexte de l'athérosclérose (J. L. Johnson et Newby 2009).

### iii) Inflammation

Les macrophages dérivant de monocytes circulants sont le principal type inflammatoire des lésions d'athérosclérose, caractérisé notamment par la sécrétion de TNF et IL-1. Les macrophages présentent un certain nombre de PRR, y compris les TLR et SR, mais aussi d'autres récepteurs membranaires, notamment aux lectines, dont le récepteur au mannose (MR, *mannose receptor*) et le récepteur aux produits finaux de glycation (RAGE, *receptor for advanced glycation endproduct*), ainsi que des PRR cytosoliques, impliqués notamment dans la voie de l'inflammasome.

## Revue bibliographique

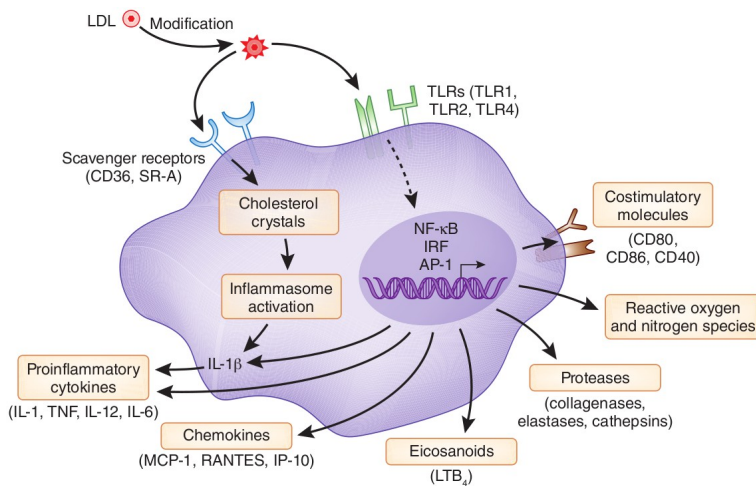


Figure 7. La réponse immunitaire innée, liée à la reconnaissance de oxLDL par les macrophages des plaques. L'accumulation intracellulaire de lipides internalisés après liaison aux SRs peut activer l'inflammasome et mener à la sécrétion de IL-1 $\beta$  et d'autres cytokines pro-inflammatoires. La signalisation liée aux TLRs mène à l'activation de facteurs de transcription et à différents phénomènes liés à l'inflammation, notamment la sécrétion de chimiokines, de protéases, l'expression de molécules co-stimulatrices et la production d'espèces réactives de l'oxygène. (Hansson et Hermansson 2012)

Les TLRs peuvent être activés par certaines des lipoprotéines oxydées ; ainsi, TLR4 est activé par des mmLDL (Y. I. Miller *et al.* 2003), tandis que TLR2 l'est par des oxLDL (West *et al.* 2010). La signalisation en aval de ces TLR implique la protéine MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) et aboutit à l'activation du facteur de transcription pro-inflammatoire NF- $\kappa$ B (Curtiss et Tobias 2009). Il a été montré que l'hétérodimère TLR4/TLR6 participe avec CD36 dans l'initiation de la signalisation qui aboutit également à l'activation de NF- $\kappa$ B (Stewart *et al.* 2010). Il existe également une signalisation liée à la liaison des molécules de co-stimulation (e.g. CD40).

Des TLRs intracellulaires peuvent s'assembler en un complexe appelée inflammasome, induisant la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-18 et IL-1 $\beta$ , ligands de TLRs membranaires (Schroder et Tschopp 2010). L'inflammasome à sous-unités NLR (*Nod-like receptors*), NRLP3, a notamment été mis en évidence comme pouvant s'assembler en présence de cristaux de cholestérol, faisant un lien entre concentration critique en cholestérol et inflammation (Duewell *et al.* 2010).

Comme le montrent les résultats contradictoires des études de délétions des SRs, ces récepteurs, bien que fortement impliqués dans la captation de lipides, ne semblent présenter qu'une implication accessoire dans la réponse inflammatoire des macrophages (Greaves et Gordon 2009).

Certaines observations démontrent une plus grande complexité de la signalisation inflammatoire dans la pathologie athérosclérotique, pour partie expliquée par la perturbation de l'apoptose. Ainsi, contrairement à ce qui est observé au niveau des ECs (Gareus *et al.* 2008), la délétion de NF- $\kappa$ B dans les macrophages induit une aggravation de la pathologie (Kanters *et al.* 2003). Il a aussi été montré que ces cellules présentent une diminution de la sécrétion d'IL-10, cytokine à effet athéroprotecteur (X. Han *et al.* 2010).

La réponse inflammatoire à ces stimuli se caractérise notamment par la sécrétion de messagers de

l'inflammation dont les cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-6, IL-12), de chimiokines (MCP-1), de protéases (MMP, *matrix metalloproteinases*), la production de ROS et l'augmentation du niveau d'expression de différents récepteurs et en particulier des molécules de co-stimulation (CD40) (Figure 7). Ces mécanismes de réactions inflammatoires sont au moins pour partie retrouvés dans d'autres types cellulaires composant les plaques d'athérome et exprimant des TLRs et des SRs, tels que les ECs et les SMCs. Cette signalisation participe à la progression de la pathologie par divers phénomènes d'amplification de la réaction inflammatoire (e.g. stimulation de l'endothélium et augmentation du recrutement leucocytaire, de la production de ROS) impliqués dans des processus pro-athérogènes (Hansson et Hermansson 2011).

### 2.3.3.3 Les lymphocytes T

Les lymphocytes T sont caractérisés par l'expression de CD3 et d'un TCR (*T cell receptor*) obtenu après recombinaison somatique caractéristique d'une population clonale et spécifique d'un épitope donné. Les lymphocytes T sont composés de deux populations majeures : les lymphocyte T CD4<sup>+</sup> aussi appelés auxiliaires (*helper*) et les lymphocyte T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques, ainsi que d'autres populations (NKT, *natural killer T cell*, et les lymphocytes T à TCR $\gamma\delta$ ). Les lymphocytes T<sub>H</sub> sont considérées comme la population lymphocytaire la plus importante fonctionnellement et numériquement dans l'athérosclérose, notamment *via* la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et en particulier de l'IFN- $\gamma$ . L'activation directe de lymphocytes T par les LDL ne se fait que pour les mmLDL ; les oxLDL ne sont pas reconnus et n'induisent donc pas d'activation des lymphocytes T (Hansson et Hermansson 2011).

#### Les lymphocytes T auxiliaires

Les lymphocyte T<sub>H</sub> se caractérisent par l'expression du complexe TCR $\alpha\beta$ -CD3 et du récepteur de surface CD4, impliqués dans la reconnaissance du peptide antigénique présenté par les cellules présentatrices d'antigène *via* les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC, *major histocompatibility complex*) de classe II et responsable d'une signalisation intracellulaire (ceci correspond au signal 1 de l'activation). L'interaction des molécules de co-stimulation (en particulier CD28, CD40L sur le lymphocyte T<sub>H</sub> et CD80/CD86 *alias* B7-1/2, CD40 sur les cellules présentatrices d'antigène) est responsable du signal 2 de l'activation. Les cellules ainsi activées prolifèrent (extension clonale), notamment *via* une signalisation autocrine liée à l'IL-2 et à son récepteur CD25, et se différencient en fonction de l'environnement cytokinique.

Différentes catégories de lymphocytes T auxiliaires peuvent être distinguées au sein des plaques : les lymphocytes à polarisation T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub>, les T<sub>reg</sub> et les T<sub>H17</sub> (Hansson et Hermansson 2011).

## Revue bibliographique

**T<sub>H1</sub>** Les cellules à polarisation T<sub>H1</sub> pro-inflammatoires sont le type de lymphocytes prédominant dans les plaques (Ait-Oufella *et al.* 2006). Cette activation se fait par la liaison du TCR à l'antigène présenté par les APC, avec un signal de co-stimulation (tel que CD40-CD40L, notamment exprimé par les macrophages) en présence d'IL-12 et aboutit à l'activation des facteurs de transcription STAT-4. L'activation des lymphocytes T<sub>H1</sub> a pour conséquence majeure une production importante de la cytokine pro-inflammatoire IFN- $\gamma$ , mais aussi IL-1 $\beta$ .

**T<sub>H2</sub>** La polarisation T<sub>H2</sub> est classiquement associée à la réponse humorale. Elle est réalisée en présence d'IL-4, et se caractérise par la sécrétion d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13. La signalisation T<sub>H2</sub> étant antagoniste de la signalisation T<sub>H1</sub>, la polarisation T<sub>H2</sub> présente des effets anti-inflammatoires, et tend à démontrer des effets anti-athérogéniques (Hansson et Hermansson 2011).

**T<sub>reg</sub>** Les lymphocytes T régulateurs – T<sub>reg</sub> – sont impliqués dans le maintien de la tolérance immune ; leur rôle dans la modulation de l'athérosclérose a été démontré (Ait-Oufella *et al.* 2006). Les lymphocytes T<sub>reg</sub>, caractérisés comme CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>, sont associés à une régulation de la réponse inflammatoire, notamment avec la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF $\beta$ .

**T<sub>H17</sub>** Les lymphocytes T<sub>H17</sub>, producteurs de IL-17, présentent des effets pro-athérogéniques dans un modèle animal de la pathologie (Q. Gao *et al.* 2010).

### 2.3.3.4 Autres types cellulaires

Les cellules de lignées monocytaires (macrophages) constituent le principal type cellulaire des plaques et jouent avec les lymphocytes T auxiliaires un rôle majeur dans la réponse inflammatoire. D'autres cellules de l'immunité innée participent également à l'inflammation des plaques. Plus récemment, la présence de cellules immunitaires a également été mise en évidence dans l'adventice, dans des structures organisées appelées tissu lymphoïde tertiaire (Figure 8).

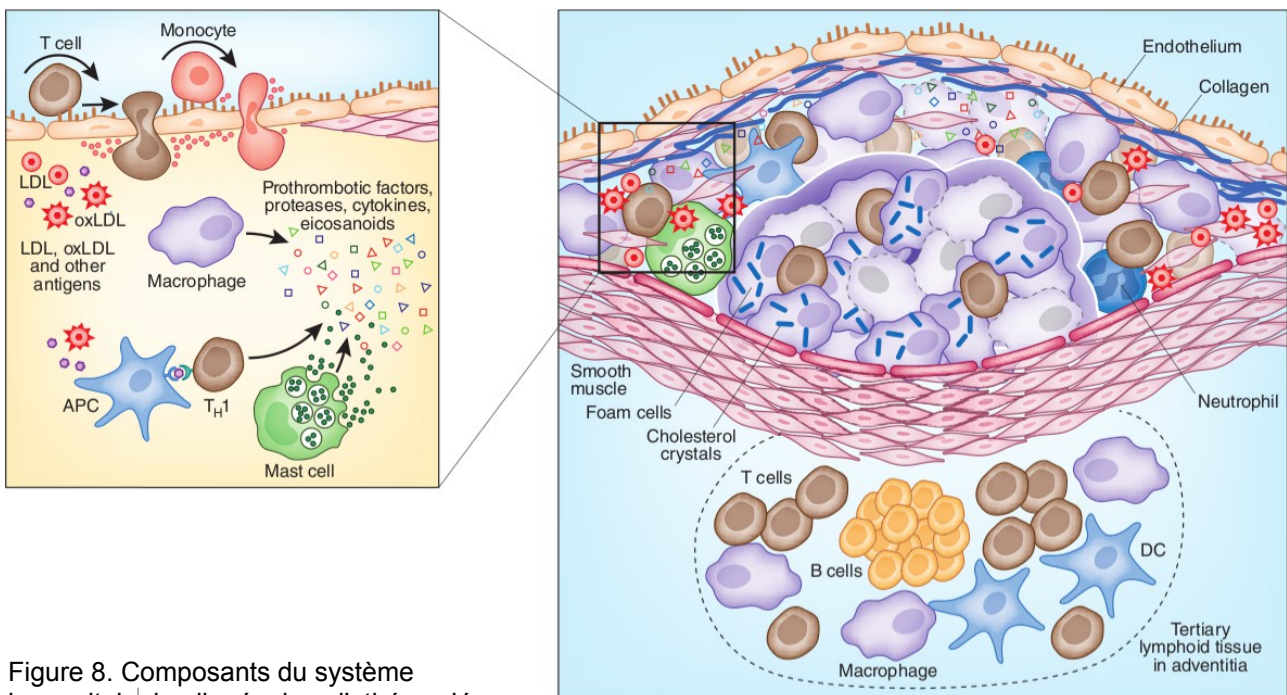


Figure 8. Composants du système immunitaire impliqués dans l'athérosclérose.

Dans l'intima, les macrophages, les lymphocytes T, les cellules dendritiques, les neutrophiles et les mastocytes participent à la formation des lésions athéromateuses. Dans l'adventice, l'organisation en tissu lymphoïde tertiaire contribue à la réponse immunitaire. (Hansson et Hermansson 2012)

### i) Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DCs) sont le principal type de cellules présentatrices d'antigènes faisant le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Une double origine est décrite pour ces cellules : d'une part, une origine myéloïde, issue de la différenciation de monocytes, et d'autre part, une origine lymphoïde (DCs plasmacytoïdes). Un niveau d'expression élevé du marqueur de surface CD11 (CD11c<sup>hi</sup>) caractérise ces cellules. La distinction entre macrophages et DCs dans les lésions athéromateuses est délicate du fait de leur grande plasticité, au point qu'il ne soit pas clair que ces deux types cellulaires issus de la différenciation de monocytes représentent des populations cellulaires distinctes (S. Gordon et Taylor 2005; Doring et Zerneck 2012). Les DCs peuvent être distinguées fonctionnellement sur la base de la réponse à CCL7 et d'un rôle dans la présentation d'antigènes aux organes lymphoïdes secondaires (Thorp, Subramanian, et Tabas 2011).

### ii) Thrombocytes

Les thrombocytes ou plaquettes sont des cellules impliquées dans l'hémostase. En cas de lésion endothéliale, les plaquettes sont activées par l'exposition à la ECM et à d'autres éléments pro-thrombotiques et participent à l'induction de la cascade de coagulation en s'agréant pour former

un thrombus. En plus de leur rôle dans l'hémostase, la signalisation liée aux plaquettes activées peu agrégées qui interagissent avec l'endothélium dysfonctionnel joue également un rôle majeur dans les signalisations participant au maintien de l'endothélium à l'état activé et à la réponse fibro-proliférative (Ross 1999; Lievens et von Hundelshausen 2011).

L'activation plaquettaire peut survenir en cas de dysfonction endothéliale, par stimulation des ECs (diminution de NO, PGI<sub>2</sub>, tPA, et sécrétion TXA<sub>2</sub>), par interaction avec les ECs ou autres leucocytes (*cross-talk*) e.g. *via* PGSL-P-sélectine, CD40-CD40L, mais aussi en présence de oxLDL *via* CD36 ou SR-B1 ou d'autres messagers tels que la thrombine *via* PAR1 (*Protease activated receptor 1*).

Les plaquettes activées participent au recrutement leucocytaire, notamment par capture secondaire (P-sélectine) mais aussi par la sécrétion de divers messagers, notamment par dégranulation. Les granules cytoplasmiques contiennent divers messagers inflammatoires participant à l'activation des thrombocytes, des ECs et des leucocytes ; e.g. des chimiokines (RANTES, IL-8) qui peuvent interagir avec les protéoglycanes du glycocalyx des ECs. (Huo et Ley 2004; Lievens et von Hundelshausen 2011; Kaplan et Jackson 2011).

### **iii) Neutrophiles**

Les neutrophiles sont des granulocytes (lignée myéloïde) classiquement impliqués dans les phases précoces de la réaction inflammatoire aiguë. La présence des neutrophiles dans les plaques d'athéromes est avérée, malgré leur relativement courte durée de vie et leur difficulté d'identification liée à des variations phénotypiques ; leur rôle fonctionnel de cellules pro-inflammatoires participe à la physiopathologie de l'athérosclérose (Soehnlein 2012). Ainsi, les neutrophiles participent à la réaction inflammatoire principalement par sécrétion d'enzymes protéolytiques (e.g. MMP-2/9, cathepsine G) et d'autres médiateurs de l'oxydation (e.g. MPO) et de l'inflammation (e.g. MCP-1) depuis des granules cytoplasmiques. Il a été montré que le taux de neutrophiles circulants est augmenté avec l'hyperlipidémie (Araujo *et al.* 1995) ; les neutrophiles ont été associés à une aggravation de la dysfonction endothéliale liée à l'oxydation (Araujo *et al.* 1995; Griffin *et al.* 2012), et plus globalement à une augmentation de l'inflammation.

### **iv) Mastocytes**

Les mastocytes sont des cellules de l'immunité innée, notamment décrites dans l'hypersensibilité immunologique. Leur mode d'action principal est la sécrétion de substances pro-inflammatoires par dégranulation. En dehors de cette action pro-inflammatoire, l'implication des mastocytes dans la réponse T<sub>reg</sub> a également été montrée (Lu *et al.* 2006). La présence de mastocytes en faible

proportion a été démontrée au sein de lésions d'athérome. Du côté abluminal de la paroi artérielle, ces cellules ont également été identifiées, tout comme d'autres types cellulaires, dans le tissu lymphoïde tertiaire (Kovanen 2007; Gräbner *et al.* 2009).

#### **v) Les lymphocytes B**

Les lymphocytes B sont associés à la réponse humorale : c'est le type cellulaire responsable de la production et de la sécrétion d'anticorps. Tout comme pour les TCR, les anticorps sont associés à un clone de lymphocytes B ayant subi un phénomène de recombinaison somatique et sont spécifiques d'un épitope. Les lipoprotéines, en particulier les résidus lysines de la protéine apoB, sont immunogènes lorsque modifiées par oxydation. La présence d'anticorps ciblant les oxLDL atteste de l'implication des lymphocytes B dans la pathologie ; les propriétés athéroprotectives de ces anticorps ont été démontrées (Schiopu *et al.* 2004). Cependant, les observations de lymphocytes B dans les plaques sont rares et controversées ; il semblerait que l'activation de ces cellules ait lieu dans des organes lymphoïdes secondaires ou tertiaires, récemment mis en évidence comme structures associées à l'athérosclérose (Hansson et Hermansson 2011). En plus de la reconnaissance des oxLDL et des fragments apoptotiques, ces anticorps reconnaissent également la paroi de bactéries pneumocoques. Ceci suggère un mécanisme de mimétisme moléculaire entre l'athérosclérose et l'infection de pneumocoques potentiellement impliqués dans l'aggravation de la pathologie en rapport avec la présence de pathogènes (Hansson et Hermansson 2011).

#### **2.3.4 Accumulation de lipides**

La rétention des lipoprotéines et leur modification dans l'espace sous-endothélial précède leur internalisation par les cellules des plaques qui vont accumuler les lipides et devenir des cellules spumeuses. Cette internalisation est principalement permise par les SRs des macrophages et SMCs.

##### **2.3.4.1 Origine des cellules spumeuses**

Les cellules spumeuses peuvent provenir de macrophages ou de SMCs. Dans les lésions précoces, les cellules spumeuses issues de macrophages sont retrouvées dans les couches superficielles de l'intima tandis que les cellules spumeuses dérivant des SMCs sont retrouvées dans la couche musculo-élastique (Katsuda *et al.* 1992). Dans les lésions plus avancées présentant un cœur lipidique, la couche musculo-élastique est hypo-cellulaire. Ceci a été lié à l'apoptose des SMCs contenant des oxLDLs (Kockx *et al.* 1998; Okura *et al.* 2000).

### 2.3.4.2 Captation de lipides

Les lipoprotéines à apoB, en particulier les LDL, peuvent être internalisées par le récepteur LDLR. Cependant, cette voie est soumise à un rétrocontrôle mettant en jeu la signalisation SERBP (*sterol-regulatory element binding pathway*) en présence de cholestérol libre (FC, *free cholesterol*) dans le réticulum endoplasmique (ER, *endoplasmic reticulum*), et n'entraîne pas d'accumulation excessive de lipides intra-cellulaires (Brown et Goldstein 1997). En revanche, la captation de lipoprotéines modifiées par l'intermédiaire de SRs n'est pas régulée et entraîne une accumulation importante de lipides intra-cellulaires (Greaves et Gordon 2009).

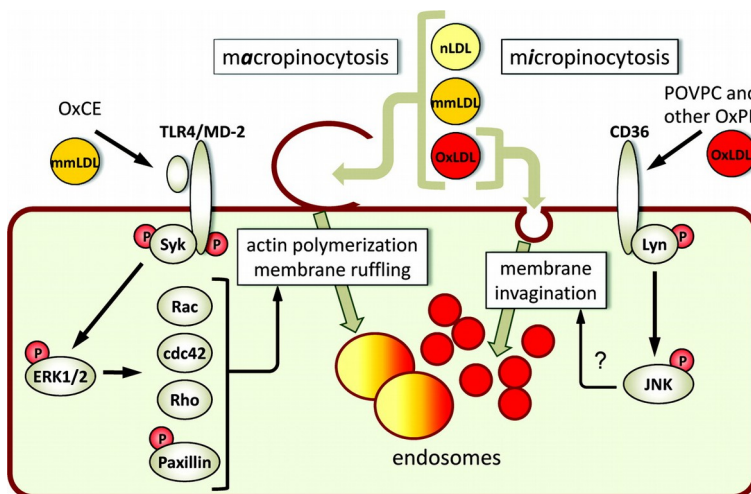


Figure 9. Les LDL dans différents états d'oxydation peuvent être captés par macropinocytose suite à la signalisation liée aux mmLDL, quelque soit leur état d'oxydation ou par micropinocytose à la suite de la liaison entre oxLDL et SR. (Miller *et al.* 2011)

L'internalisation des oxLDL est principalement médiée par des SRs ; en particulier, il a été montré que 90 % des oxLDL sont internalisés par les récepteurs SRA et CD36 (Kunjathoor *et al.* 2002). Cette internalisation par micropinocytose est liée à la signalisation induite par la fixation des oxLDL sur CD36 en particulier (Silverstein *et al.* 2010). Le récepteur éboueur LOX-1 ne participe que modestement à la formation des cellules spumeuses (J. L. Mehta *et al.* 2006). Un mécanisme de phagocytose de LDL agrégés avec des éléments de matrice extracellulaire a été proposé pour rendre compte de cette internalisation (Tabas *et al.* 1993). Le phénomène de macropinocytose permet l'internalisation de lipoprotéines natives ou présentant divers degrés d'oxydation par une voie indépendante des SRs (Figure 9) (Kruth *et al.* 2002). Cependant ces deux phénomènes ne participent que marginalement à la formation des cellules spumeuses (Steinberg 2009).

### 2.3.4.3 Devenir intra-cellulaire et réponse au cholestérol

#### i) Dans le réticulum endoplasmique

Les esters de cholestérol (CE, *cholesteryl esters*) des lipoprotéines sont hydrolysés en FC et acides

## Revue bibliographique

gras dans les endosomes tardifs. Le FC peut être transloqué vers des sites cellulaires périphériques (notamment sous l'action de NPC1 et NPC2) tels que la membrane cellulaire et le ER. Dans le ER, le FC inhibe la signalisation de SERBP (*sterol-regulatory element binding pathway*) avec pour conséquence une diminution de l'expression de LDL-R et de la synthèse du cholestérol endogène (Brown et Goldstein 1997). Toujours dans le ER, le FC peut être re-estérifié en CE sous l'action de l'ACAT (*acyl-CoA:cholesterol ester transferase*) (Brown, Ho, et Goldstein 1980) responsable d'une accumulation de cholestérol au sein d'inclusion lipidiques conférant le phénotype spumeux aux cellules considérées.

### ii) Efflux de cholestérol

À la membrane cellulaire, le FC est disponible pour l'efflux de cholestérol. Ce phénomène consiste en un transfert du FC vers le feuillet externe de la membrane plasmique à partir duquel le FC diffuse passivement vers les HDL qui sont liées aux transporteurs ABCA1 et ABCG1, pour les HDL naissantes et matures respectivement, tous deux présentant un faible taux de FC (Tall *et al.* 2008). L'expression des transporteurs ABCA1 et ABCG1 est sous le contrôle des facteurs de transcription LXR (Calkin et Tontonoz 2010) ; cette expression est régulée par miR-33 (Najafi-Shoushtari *et al.* 2010; Rayner *et al.* 2010).

### iii) Inflammation

L'accumulation intra-cellulaire de cholestérol peut résulter en la formation de cristaux de cholestérol (Small 1988). Comme mentionné précédemment, la présence de cristaux de cholestérol est responsable de la formation de l'inflammasomes NRLP3 et de la signalisation associée responsable de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Düwell *et al.* 2010). Comme développé plus loin, l'accumulation intra-cellulaire de cholestérol contribue à l'entrée en apoptose des cellules spumeuses.

## 2.4 Progression de l'athérosclérose

Les lésions athéromateuses précoces présentent une accumulation de lipoprotéines oxydées dans l'intima ainsi que divers éléments cellulaires, notamment des SMCs et macrophages différenciés ou non en cellules spumeuses ainsi que d'autres cellules immunitaires. Le maintien voire l'accentuation des processus impliqués dans la formation de ces lésions, i.e. l'entrée, la rétention, la modification oxydative des lipoprotéines dans l'intima et la réponse inflammatoire associée fait évoluer ces lésions vers un stade athéromateux, avec une accumulation de lipides extracellulaires au sein d'une zone acellulaire confluyente (cœur lipidique) et l'induction d'une réponse fibro-proliférative, associée au remodelage vasculaire et aboutissant à la formation d'une capsule fibreuse (Stary *et al.* 1995).

### 2.4.1.1 Cœur lipidique

Les cellules spumeuses chargées de lipides entrent en apoptose, notamment sous l'action du stress liée au réticulum endoplasmique (ER stress) et du stress oxydant. L'efferocytose est défini comme la capacité à résoudre l'inflammation suite au processus d'apoptose (Serhan *et al.* 2007). L'athérosclérose est caractérisée par une efferocytose défectueuse et une nécrose secondaire des cellules apoptotiques non phagocytées (Tabas 2010a). Il en résulte alors une accumulation de lipides extra-cellulaires, au sein d'un cœur lipidique convergents, inflammatoire et nécrotique dans les lésions avancées (Figure 10).

#### i) Apoptose des cellules spumeuses

L'apoptose des cellules spumeuses implique le stress lié au ER associé à d'autres stimuli pro-apoptotiques (*second hit*).

L'accumulation de FC dans le ER déclenche un stress liée au ER, qui met en jeu la réponse UPR (*Unfolded Protein Response*) (Moore et Tabas 2011). La voie UPR est médiée par une augmentation de CHOP (*CEBP-homologous protein*) qui entraîne une libération de calcium du ER et une signalisation *via* CaMKII (*Ca<sup>++</sup>/calmodulin-dependent protein kinases II*) (Thorp *et al.* 2009).

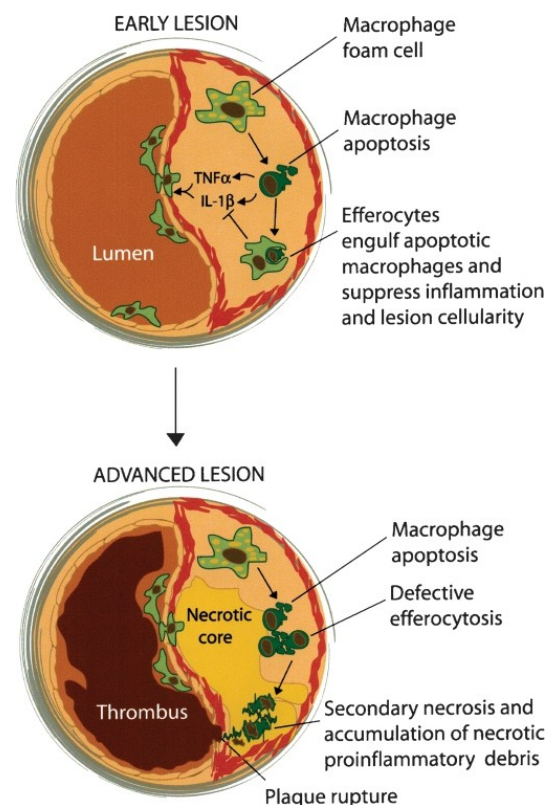


Figure 10. Modèle de formation du cœur lipidique causé par l'apoptose de cellules spumeuses associée à une efferocytose déficiente des éléments apoptotiques et une nécrose secondaire. (Seimon et Tabas 2009)

En association à cette voie, il a été montré que d'autres voies de signalisations sont importantes pour l'induction de l'apoptose, et agissent en complément du ER stress (*second hit*). La présence de oxLDL reconnus par les PRR est notamment responsable de l'activation du complexe NOX lysosomal responsable d'un stress oxydant (Seimon *et al.* 2010). Les oxLDL sont responsables de l'activation de NOX via une signalisation impliquant CD36, TLR2 et TLR6 ; la signalisation impliquant une interaction CD36-TLR2, plus particulièrement en réponse à Lp(a), a été montrée dans l'activation de la NOX. (Seimon *et al.* 2010). La signalisation de SR-A en association avec TLR4 est responsable d'une diminution des signaux de survie (Seimon *et al.* 2006). Ces signalisations induisent la voie mitochondriale de l'apoptose (Tabas et Ron 2011) qui implique notamment l'activation des caspases (en particulier caspases-9/3) (Hengartner 2000).

Les cellules apoptotiques ainsi engendrées expriment des signaux attractant les cellules phagocytaires ainsi que des signaux pro-phagocytaires (e.g. exposition de la phosphatidylsérine) et répriment les signaux anti-phagocytaires favorisant le phénomène d'efférocytose (Henson, Bratton, et Fadok 2001).

### ii) Efferocytose

La résolution de l'inflammation passe par la phagocytose des cellules apoptotiques, reconnues grâce à la présence de marqueurs spécifiques comme l'exposition de la phosphatidylsérine. Ce processus entraîne une dégradation des éléments apoptotiques au sein de phagolysosomes des cellules phagocytaires ainsi qu'une signalisation anti-inflammatoire, avec notamment la sécrétion de TGF $\beta$  et d'IL-10, permettant d'éviter une nécrose secondaire des cellules phagocytaires (Henson, Bratton, et Fadok 2001). Cependant, diverses maladies chroniques dont l'athérosclérose avancée présentent une efférocytose déficiente (Schrijvers *et al.* 2005). La grande capacité d'efférocytose suggère que ce défaut n'est pas lié à une saturation de la capacité d'efférocytose et il a été montré que le caractère spumeux des macrophages des plaques avancées ne compromet pas leur capacité d'efférocytose (Y. Li *et al.* 2006). Le défaut d'efférocytose pourrait être lié à l'excès d'éléments extracellulaires perturbant la reconnaissance des éléments apoptotiques (M.-K. Chang *et al.* 1999), au déficit d'expression de signaux pro-apoptotiques ou des récepteurs d'efférocytose ou de leurs molécules adaptatrices (*bridging molécules*) dans le contexte des lésions avancées (Tabas 2010a). En particulier, il a été montré que le clivage du récepteur d'efférocytose Mertk par l' $\alpha$ -secrétase ADAM-17 entraîne l'inhibition de l'efférocytose (Sather *et al.* 2007). Le défaut de signalisation anti-inflammatoire, dû à l'environnement fortement pro-inflammatoire, peut expliquer le défaut d'efférocytose (Tabas 2010a).

### **iii) Nécrose de plaque**

Le défaut d'efférocytose mène à la mort cellulaire par nécrose des macrophages impliqués dans l'efférocytose, qui constituent alors les macrophages nécrotiques post-apoptiques à l'origine du cœur lipidique (Tabas 2010a). Ces cellules nécrotiques présentent les marqueurs habituels de mort cellulaire par nécrose (e.g. gonflement cytoplasmique) (Kroemer *et al.* 2008). Ainsi, le cœur lipidique des lésions avancées est constitué d'éléments apoptotiques et d'éléments nécrotiques, qui amplifient la réaction inflammatoire.

### **iv) Autophagie**

L'autophagie est une modalité de mort cellulaire distincte de l'apoptose et de la nécrose, initialement décrite dans des conditions de déprivation en nutriments, qui ne génère que peu d'inflammation (Kroemer *et al.* 2008). Il a été montré que les facteurs responsables de l'apoptose, i.e. le stress du ER et le stress oxydant, peuvent également déclencher la mort cellulaire par autophagie. L'autophagie, notamment des macrophages présents au niveau des épaulements de plaques, est induite par la signalisation TLR7 et présente un effet protecteur (De Meyer *et al.* 2012), tandis que la diminution de l'autophagie est responsable d'une aggravation de la pathologie (Xianghai Liao *et al.* 2012).

### **v) Rôle de la vascularisation**

L'hypothèse de l'implication de la vascularisation des plaques d'athérome dans le phénomène physiopathologique de l'athérosclérose a été émise il y a près de 30 ans (Barger *et al.* 1984). De nombreux signaux pro-athérogéniques, présents en condition inflammatoire, sont également identifiés comme facteurs pro-angiogéniques (Carmeliet et Jain 2000; Moreno *et al.* 2006). L'observation de tissus *post-mortem* a montré une accumulation de fer et de membrane d'érythrocytes (caractérisées par la présence de glycophorine A) associé au cholestérol extracellulaire dans les plaques d'athéromes avancées ; ces éléments sont associés avec de larges cœurs lipidiques et une forte infiltration de macrophages. L'induction d'une hémorragie intra-plaque dans un modèle de lapin athérosclérotique a été associée à un enrichissement en ces éléments (Kolodgie, Gold, *et al.* 2003) et donc à l'augmentation de la taille du cœur lipidique.

#### **2.4.1.2 Remodelage vasculaire**

La progression de l'athérosclérose met en jeu la dégradation partielle de l'ECM à l'interface entre l'intima et la média ainsi qu'une stimulation des SMCs de la média qui migrent vers l'intima,

prolifèrent, et adoptent un phénotype sécrétoire. Cette réponse fibro-proliférative est responsable de la constitution d'un tissu fibreux entre le cœur lipidique et la lumière vasculaire – la capsule fibreuse – ainsi que d'un remodelage excentrique de la paroi artérielle (Gibbons et Dzau 1994).

### **i) Changements phénotypiques des cellules musculaires lisses**

**Origine des SMCs.** Les SMCs des lésions athéromateuses sont, dans la limite de zones restreintes, de nature monoclonale (Benditt et Benditt 1973). Classiquement, il est considéré que les SMCs de la média présentant un phénotype contractile se différencient pour migrer dans l'intima et adoptent un phénotype sécrétoire (Chamley-Campbell et Campbell 1981; Owens, Kumar, et Wamhoff 2004). Ceci suggère que les SMCs de l'intima sont issues d'un faible nombre de cellules ayant migré depuis la média et ayant proliféré sur un mode clonal (Schwartz et Murry 1998). Plus récemment, il a été proposé que les SMCs de l'intima seraient issues de progéniteurs circulants provenant de la moëlle osseuse (Saiura *et al.* 2001; Sata *et al.* 2002). Cependant, il a été montré chez la souris apoE<sup>-/-</sup> ayant subi une greffe de moëlle osseuse que les SMCs des plaques sont exclusivement originaires de la média (Bentzon *et al.* 2006). La différenciation des SMCs à phénotype contractile de la média a récemment été remise en question, avec la mise en évidence d'une population de cellules souches vasculaires multipotentes : les MVSC (*Multipotent Vascular Stem Cells*), présents dans la média, dont l'expansion serait la source des SMCs à phénotype sécrétoire de l'intima (Z. Tang *et al.* 2012). Ce nouveau paradigme reste pour le moment controversé (Nguyen *et al.* 2013; Z. Tang *et al.* 2013).

**Stimulation des SMCs.** Les cellules inflammatoires de l'intima sont responsables de la synthèse d'enzymes protéolytiques, en particulier les MMPs, qui dégradent divers éléments de la ECM. Par ailleurs, les SMCs activées participent elles-mêmes à la synthèse de MMPs (Galis et Khatri 2002). L'implication de ces enzymes dans la dégradation de la limitante élastique interne et de la ECM de la média a été montrée, avec en particulier un rôle majeur des MMP-2/9 (Galis *et al.* 2002; C. Johnson et Galis 2004; Tronc *et al.* 2000; Katsuda et Kaji 2003) impliquées dans la dégradation de la membrane basale. MMP-2 est exprimée constitutivement par les SMCs sous forme de pro-enzyme et son activation peut se faire par divers stimuli pro-athérogéniques (Newby et Zaltsman 1999).

La dégradation de la ECM permet la migration des SMCs, physiquement et par dérégulation, et fournit également un substrat à cette migration. En effet, il a été montré que la liaison à la ECM non dégradée, en particulier au collagène de type I, est responsable d'une inhibition de la prolifération (Koyama *et al.* 1996), tandis que des éléments de membrane basale dégradée, en particulier la

## Revue bibliographique

fibronectine dégradée (EDA, *extra domain A*) est reconnue par le récepteur TLR-4. Cette interaction a été décrite comme favorisant le changement phénotypique des SMCs (Okamura *et al.* 2001). Il a été montré que d'autres signalisations liées à l'interaction à la ECM sont impliquées notamment dans la régulation de la prolifération et de la migration des SMCs.

Les SMCs sont également soumises à d'autres stimuli, dont les facteurs dérivés de l'endothélium : les EDCF (ET-1, TXA<sub>2</sub>), ainsi qu'à la diminution de la signalisation liée à l'endothélium fonctionnel (notamment le NO, mais aussi le PGI<sub>2</sub> et la signalisation EDHF) (Vanhoutte 2009). Il a été montré que les microRNA miR-143 et miR-145 participent à la régulation du phénotype des SMCs : la diminution de cette signalisation est impliquée dans l'adoption d'un phénotype prolifératif des SMCs dans l'athérosclérose (Cordes *et al.* 2009) ; cet effet est lié à une signalisation paracrine depuis les ECs (Hergenreider *et al.* 2012). Divers facteurs de croissance, issus des ECs et des autres types cellulaires, participent à l'activation des SMCs. Initialement décrite dans le cas de la dénudation de l'endothélium, la réponse fibro-proliférative est également décrite en réponse aux facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGF, *platelets-derived growth factor*). D'autres facteurs de croissance ou cytokines tels que le FGF-2 (*fibroblast growth factor-2*) et le TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) ont été décrits comme participant à la stimulation des SMCs (Ross 1999), tout comme l'angiotensine II (Berk *et al.* 1989) et d'autres signaux pro-athérogéniques (Hautmann, Madsen, et Owens 1997; X. Li *et al.* 1997), le stress oxydant (B. Su *et al.* 2001) et la présence de lipoprotéines modifiées: mmLDL (Vink *et al.* 2002; Hollestelle *et al.* 2004) et oxLDL (Pidkovka *et al.* 2007). Enfin, l'étirement des SMCs a été identifié comme un facteur responsable de la modulation phénotypique (Reusch *et al.* 1996; Y. Feng *et al.* 1999; Haga, Li, et Chien 2007). L'intégration des différents signaux est un phénomène complexe, qui implique notamment une diminution de la signalisation liée aux facteurs de transcription nucléaires PPAR- $\alpha/\delta$  (*proliferator-activated receptor- $\alpha/\delta$* ) activés par la PGI<sub>2</sub> en présence d'un endothélium fonctionnel, et impliqués dans le maintien d'un phénotype contractile (Staels *et al.* 1998; Tsai *et al.* 2009), ainsi que Klf-4/5 (Krüppel-like factor-4/5) (Owens, Kumar, et Wamhoff 2004) et d'autres mécanismes de régulation, en particulier au niveau post-transcriptionnel (X. Liu *et al.* 2009).

**Phénotype prolifératif & sécrétoire.** Les SMCs des plaques d'athérome présentent un phénotype sécrétoire et prolifératif, distinct du phénotype contractile des SMCs de la média. Ce phénotype est caractérisé par une diminution des protéines contractiles, une altération du métabolisme du calcium et des capacités contractiles, un index de prolifération plus élevé (D. Gordon *et al.* 1990), et un phénotype caractéristique des cellules sécrétoires, notamment avec un ER (*endoplasmic reticulum*) et

un appareil de Golgi développés (Owens, Kumar, et Wamhoff 2004). Ces cellules sont responsables de la synthèse d'éléments de ECM qui vont constituer la capsule fibreuse (Newby et Zaltsman 1999).

Les SMCs présentant un phénotype sécrétoire expriment des SRs et présentent la capacité à internaliser les lipoprotéines modifiées ; ces cellules peuvent évoluer et adopter un phénotype de cellules spumeuses (J. H. Campbell et Campbell 1994; Klouche *et al.* 2000; Rong *et al.* 2003). Par ailleurs, ce type cellulaire est également responsable de la calcification des plaques (voir plus loin).

Les SMCs de l'intima soumises aux stimuli pro-inflammatoires sont impliquées dans la synthèse de divers messagers inflammatoires, la production de ROS et d'autres facteurs, notamment des facteurs de croissance (Raines et Ferri 2005). Il a été montré qu'en réponse à l'IL-1, les SMCs secrètent des facteurs de croissance tels que PDGF (Raines, Dower, et Ross 1989) et FGF-2 (Gay et Winkles 1991), qui sont des facteurs-clés impliqués dans le remodelage vasculaire. L'expression de MCP-1 par les SMCs (Yu *et al.* 1992) et sa rétention par les protéoglycanes de l'ECM (Kuschert *et al.* 1999) sont impliquées dans le chimiotactisme des macrophages *via* CCR2 (K. H. Han *et al.* 1998) ainsi que dans l'hypertrophie intimale et la réponse inflammatoire qui en découle (Schober *et al.* 2004). Ce phénomène est lié à la présence d'un gradient de chimiokines constitué par l'interaction entre chimiokines et protéoglycanes (Wei *et al.* 2003).

### **ii) Capsule fibreuse**

La constitution de la capsule fibreuse est la continuité du phénomène fibro-prolifératif des lésions initiales présentant un cœur lipidique confluent formé. Les SMCs stimulées prolifèrent et synthétisent des éléments de ECM, en particulier des fibres de collagène et forment une capsule fibreuse qui recouvre le cœur lipidique (Newby et Zaltsman 1999). Le collagène fibrillaire sécrété par les SMCs est un constituant majeur des plaques avancées, comptant pour 30 – 60 % de la masse sèche des plaques. Tout comme dans la média, le collagène de type I est majoritaire (~70 %) par rapport au collagène de type III dans la capsule fibreuse (Stary *et al.* 1995). La présence de collagène de type V et de type IV, associé à la membrane basale des SMCs, a également été montrée dans l'intima, mais davantage au niveau de lésions initiales (Shekhonin *et al.* 1987). La synthèse de collagène est directement augmentée en réponse au TGF- $\beta$ , (Frutkin *et al.* 2009). Dans la capsule fibreuse constituée, les SMCs présentent un phénotype sécrétoire moins prononcé. Ces cellules sont entourées de membrane basale pouvant atteindre 10 fois l'épaisseur du corps cellulaire (Stary *et al.* 1995). En cas de rupture de la capsule fibreuse à proximité, ces SMCs à membrane basale présentent une réactivation du phénotype sécrétoire (Timpl et Dziadek 1986). Ceci est attribué à la

régulation de la prolifération et de la sécrétion en présence de collagène fibrillaire, tandis que les zones riches en fibronectine et protéoglycanes et en éléments dégradés de ECM favorisent la prolifération des SMCs (Doran, Meller, et McNamara 2008).

### iii) Le remodelage vasculaire excentrique et constrictif

La dégradation de la ECM de la média, la destruction de ce tissu avec l'entrée en cycle de SMCs et la perte de leur phénotype contractile, et la synthèse de ECM dans l'intima sont responsables d'un phénomène de remodelage excentrique qui induit une augmentation du diamètre externe du vaisseau (Figure 11) (Glagov *et al.* 1987). Ce phénomène est associé avec une augmentation de la taille des plaques sans diminution du diamètre de la lumière vasculaire ; il est observé pour ~ 60 % des lésions coronaires (Chatzizisis *et al.* 2007).

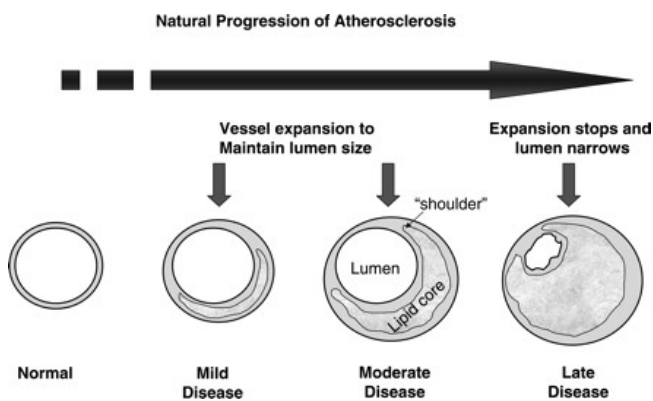


Figure 11. Le remodelage excentrique permet de préserver la lumière vasculaire dans les temps initiaux de l'athérosclérose coronaire chez l'homme. (Stocker et Keaney 2004 ; adapté de Glagov *et al.* 1987)

En dehors du remodelage vasculaire excentrique, une réponse fibro-proliférative importante peut être responsable d'une diminution de la lumière vasculaire secondaire à un phénomène de remodelage constrictif (Mintz *et al.* 1997).

#### 2.4.1.3 Calcification des plaques

La calcification débute par la formation de granules microscopiques retrouvées dans les SMCs (intracellulaire) et dans le cœur lipidique (extra-cellulaire). Les granules extra-cellulaires sont issues, en partie, des granules intracellulaires libérées lors de la mort des SMCs. Ces granules s'assemblent pour former de plus larges structures, pouvant évoluer jusqu'à une large calcification des plaques, voire une métaplasie osseuse (Boström *et al.* 1993; Stary 2000a).

**Calcification.** Les SMCs représentent le type cellulaire impliqué dans la calcification. Le phénomène de calcification débute dans les vésicules intracellulaires présentant une accumulation de calcium et de phosphate, en formant des cristaux d'hydroxyapatite (Demer et Tintut 2008).

## Revue bibliographique

L'expression de diverses molécules impliquées dans le processus de calcification, notamment la phosphatase alcaline, a été démontrée au sein de SMCs adoptant un phénotype particulier, approchant fonctionnellement des chondrocytes (Bobryshev 2005; Speer *et al.* 2009; Sage, Tintut, et Demer 2010). La modulation phénotypique des SMCs et leur implication dans le processus de calcification sont sous le contrôle de différents facteurs, notamment les facteurs de croissance BMP-2/4 (*bone morphogenetic protein 2/4*), l'inflammation chronique de bas grade avec un rôle important du TNF, ou encore le stress oxydant et le métabolisme des vitamines D et K (Sage, Tintut, et Demer 2010). Le métabolisme des vitamines D et K est impliqué dans la régulation de MGP (*matrix gla - gamma carboxyglutamate - protein*), inhibiteur des BMP fortement impliqué dans la calcification artérielle comme montré par le phénotype d'inactivation de MGP présentant une calcification rapide et intense sur l'arbre artériel (Luo *et al.* 1997). En extra-cellulaire, la nucléation des produits minéralisés contenus dans les vésicules sécrétées met en jeu les éléments fibrillaires de la ECM (Demer et Tintut 2008).

**Résorption.** Les cellules de lignée monocytaire et en particulier les macrophages des plaques participent à la résorption des calcifications de manière analogue aux ostéoclastes. Ce mécanisme met en jeu notamment la signalisation liée au récepteur RANK et l'activation de NF- $\kappa$ B (Steitz *et al.* 2002).

### 2.5 La vulnérabilité

Les plaques d'athérome responsables de thrombose coronaire, et donc potentiellement de syndrome coronarien aigu (ACS, *acute coronary syndrome*), sont des plaques vulnérables. Deux types majeurs de plaques vulnérables sont identifiés : les plaques susceptibles à l'érosion (*erosion-prone plaques*) et les plaques susceptibles à la rupture (*rupture-prone plaques*), majoritairement responsable des ACS (Falk *et al.* 2013). La vulnérabilité associée à ces deux types de plaque fait appel à des notions bien distinctes bien que dans les deux cas les ACS soit liés à la thrombose intravasculaire (Figure 12).



Figure 12. À gauche, thrombose associée à la rupture de plaque. À droite, thrombose associée à l'érosion de plaque (Davies 2000).

### 2.5.1 Précision sur la notion de vulnérabilité

**Le patient vulnérable.** Comme développé par Naghavi et al (Naghavi *et al.* 2003a; Naghavi *et al.* 2003b), les plaques ne sont pas seules responsables de la vulnérabilité. En effet, le patient défini comme vulnérable d'un point de vue cardiovasculaire est un patient présentant un risque élevé de survenue d'un ACS.

La survenue d'un ACS est liée à la survenue d'une thrombose intra-coronaire. Or, l'observation de la rupture asymptomatique de plaques coronaires humaines est fréquente (Burke *et al.* 2001), ce qui signifie que la rupture n'induit pas systématiquement une thrombose importante. Ceci peut être expliqué par une faible thrombogénicité du sang (notion de sang vulnérable). À l'inverse, les patient présentant une thrombose associée à l'érosion de plaque, qui n'expose que modestement les éléments pro-thrombogènes des plaques aux facteurs de coagulation sanguins, présentent un sang fortement thrombogène ou vulnérable.

La notion de patient vulnérable est étendue encore davantage avec la notion de myocarde vulnérable. Cette notion déroge à la conception de la vulnérabilité associée à la thrombogénicité, mais ajoute une distinction sur l'issue de l'ischémie induite par la thrombose coronaire en fonction de l'état du myocarde. Plus particulièrement, la vulnérabilité du myocarde réfère à sa propension à développer une arythmie fatale, en rapport à l'activité du système nerveux autonome ortho-sympathique.

**Les plaques à risque.** Il a été observé que les plaques responsables d'une sténose importante sont davantage susceptibles de causer un ACS ; l'importance de la sténose est donc en rapport avec la vulnérabilité (Falk 1983). Cependant, comme le montre les données épidémiologiques (Falk, Shah, et Fuster 1995; M. J. Davies 1990), du fait de la plus faible prévalence des plaques fortement sténotiques par rapport aux plaques moins sténotiques, le risque statistique pour que des plaques modérément sténotiques soient responsable d'un ACS est plus élevé (Naghavi *et al.* 2003a). De plus, l'athérosclérose étant une maladie diffuse, la présence de ces plaques fortement sténotiques implique une charge athérosclérotique globale importante, d'où une forte probabilité de présence d'autres plaques potentiellement vulnérables (J. A. Goldstein *et al.* 2000).

**Plaques à nodule calcique.** La classification proposée par Virmani *et al.* (Virmani *et al.* 2000) présente un troisième type de plaque vulnérable : les plaques à nodule calcique, auxquelles 2 – 7 % des ACS sont imputés (vs. 55 – 60 % pour la rupture de plaque, et 30 – 35 % pour l'érosion (Virmani *et al.* 2006)). L'étude clinique PROSPECT (*Providing Regional Observations to Study Predictors of Events in the Coronary Tree*) au cours de laquelle un suivi de 3 ans a été réalisé par

échographie endocoronaire sur une cohorte de 697 patients a montré une faible prévalence d'événements coronaires (MACEs, *major adverse cardiovascular events*) dus aux lésions présentant des nodules calciques présents chez 12 % des patients, par rapport aux autres lésions étudiées (Xu *et al.* 2012). Les plaques vulnérables étant des plaques présentant un risque élevé de complication thrombotique, cette étude montre que les plaques à nodules calciques ne doivent pas être considérées comme des plaques vulnérables (Falk *et al.* 2013).

**Autres distinctions entre plaques vulnérables.** Naghavi *et al.* (Naghavi *et al.* 2003a) distinguent d'autres types de plaques vulnérables qui peuvent toutefois être assimilées à des plaques susceptibles soit à l'érosion, soit à la rupture. Ainsi, les plaques rompues/guéries et les plaques présentant une hémorragie intra-plaque sont des plaques susceptibles à la rupture, alors que les plaques présentant une érosion superficielle sont susceptibles à l'érosion. Les plaques fortement sténotiques quant à elles peuvent présenter un risque de thrombose et d'occlusion lié à la contrainte de cisaillement (Naghavi *et al.* 2003a) ;

**Angor.** Le développement de plaques d'athérome peut également aboutir à des plaques non vulnérables. Dans ce cas de figure, ces plaques peuvent être soit non sténosantes, auquel cas la pathologie athérosclérotique demeure asymptomatique, soit ces plaques peuvent présenter un caractère sténosant. Dans ce deuxième cas, la limitation du flux sanguin peut être responsable d'ischémie, plus particulièrement en cas d'augmentation des besoins du myocarde en oxygène (à l'effort) ; c'est la maladie coronaire stable ou angor. Les études épidémiologiques présentant l'incidence de CAD prennent en compte ces plaques coronaires responsables d'angor, appelées abusivement plaques stables ; les études portant sur la vulnérabilité s'intéressent à l'incidence des ACS.

**Les déclencheurs.** Le risque de survenue des ACS est notamment augmenté lors de l'exercice physique et en cas de stress émotionnel. Ceci témoigne d'une implication potentielle d'éléments déclencheurs dans la survenue des ACS, tels que l'augmentation de la fréquence cardiaque ou de la pression artérielle, en réponse à l'activation du système nerveux orthosympathique par exemple (Mittleman et Mostofsky 2011).

### 2.5.2 Rupture de plaque

Les ACS sont majoritairement causés par la rupture des plaques. Les plaques susceptibles à la rupture sont les plaques athéromateuses à mince capsule fibreuse (TCFA, *thin-cap fibroatheroma*). Ces lésions sont caractérisées principalement par un large cœur lipidique, une fine capsule fibreuse

et une inflammation importante.

### 2.5.2.1 Approche biomécanique

La rupture de plaque fait référence à la perte d'intégrité physique de la capsule fibreuse. Cette perte survient suite à la déchirure physique du tissu constituant la capsule fibreuse, à la suite de l'application d'une force. Une force se répartissant sur une surface importante sollicite moins un matériau que la même force appliquée sur une faible surface ; pour s'affranchir de la surface à considérer, on peut introduire la notion de contrainte, définie comme le rapport de la force sur la surface à laquelle elle est appliquée. Similairement à ce qui a été introduit pour la contrainte de cisaillement, cette grandeur est homogène à une pression, exprimée en Pascals (Pa) ; ces contraintes présentes au sein de la paroi vasculaire (comprenant les lésions athéromateuses) sont dénommées contraintes pariétales (cf. Partie expérimentale : Biomécanique). Il a été montré que la rupture de la capsule fibreuse survient aux zones présentant une élévation de la contrainte pariétale (Richardson, Davies, et Born 1989; G. C. Cheng *et al.* 1993) (Figure 13).

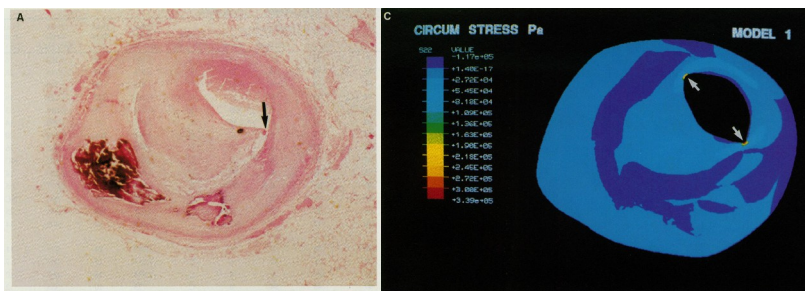


Figure 13. Association d'une zone de rupture de plaques (flèche noire) à une élévation de la contrainte pariétale (flèches blanches). (Cheng *et al.* 1993)

Ces considérations biomécaniques expliquent pour partie le caractère vulnérable associé à l'épaisseur de la capsule fibreuse et l'importance du cœur lipidique ; elles sont davantage développées en Partie expérimentale : Biomécanique, où elles sont alors discutées en rapport avec les données obtenues lors de l'étude biomécanique menée sur le modèle murin d'athérosclérose qu'est la souris apoE<sup>-/-</sup>.

La contribution de la contrainte de cisaillement au phénomène de rupture physique apparaît faible en raison de la valeur modeste de cette force au regard de la contrainte pariétale (Teng *et al.* 2010). Cependant, son influence sur la fonction des ECs apparaît comme importante dans la vulnérabilité des plaques (Seneviratne *et al.* 2013). En effet, les plaques se développant dans les zones de contraintes oscillantes présentent un contenu en SMCs et en collagène plus important que les plaques situées dans des zones à faible contrainte de cisaillement, plus inflammatoires (C. Cheng *et al.* 2006). La mécanotransduction liée à l'étirement cyclique des SMCs de la paroi artérielle est liée

au remodelage vasculaire (Haga, Li, et Chien 2007) avec notamment une augmentation de la synthèse de fibres de collagène liée au TGF- $\beta$  mais aussi une augmentation de l'activité MMP-2 (O'Callaghan et Williams 2000) ; ces effets sont ambivalents sur la stabilité de la capsule fibreuse.

### **2.5.2.2 Critère de vulnérabilité**

Naghavi *et al.* (Naghavi *et al.* 2003a) présentent trois critères majeurs pour la définition des plaques vulnérables, susceptibles à la rupture : l'inflammation, la présence d'une fine capsule fibreuse associée à un large cœur lipidique, et la présence de fissuration dans la capsule fibreuse, ainsi que trois critères mineurs : l'hémorragie intra-plaque, le remodelage positif, et la couleur jaune des plaques lors de l'analyse par angioscopie, témoin d'un large cœur nécrotique. Une discussion sur les techniques proposées pour l'évaluation de ces critères de vulnérabilité est développée plus loin (cf. 3).

**Épaisseur de la capsule fibreuse.** Par définition, pour une même force appliquée, la contrainte augmente d'autant plus que la surface à laquelle elle est appliquée est réduite. Ainsi, intuitivement, il est aisé de concevoir que l'amincissement de la capsule fibreuse résulte en une augmentation des contraintes dans la capsule fibreuse. Les études biomécaniques démontrent que les contraintes sont augmentées d'autant plus que la capsule fibreuse est mince (Finet, Ohayon, et Rioufol 2004). Sur la base d'observations post-mortem, le seuil d'épaisseur de la capsule fibreuse a été défini à 65  $\mu\text{m}$  (Naghavi *et al.* 2003a). En effet, les observations de Burke *et al.* (Burke *et al.* 1997) ont montré une épaisseur moyenne de capsule fibreuse de  $23 \pm 19 \mu\text{m}$ ,  $< 65 \mu\text{m}$  dans 95 % des cas de plaque présentant une rupture. Des observations *in vivo* sur des patients présentant un ACS ou un angor ont montré que l'épaisseur critique pour laquelle la rupture est observée est de 80  $\mu\text{m}$ , l'épaisseur minimale médiane des plaques rompues étant de 54  $\mu\text{m}$ , avec 80 % des ruptures survenant aux zones d'épaisseur minimale (Figure 14) (Yonetsu *et al.* 2011).

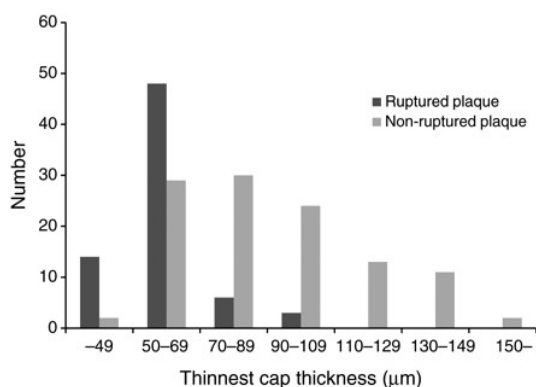


Figure 14. Évaluation de l'épaisseur critique de la capsule fibreuse de plaques rompues et non rompues par tomographie de cohérence optique. (Yonetsu *et al.* 2011)

**Taille du cœur nécrotique.** En raison de sa nature même, le cœur lipidique ne présente que de faibles propriétés mécaniques ; ainsi, les forces externes ne peuvent que faiblement solliciter ce milieu (Loree, Tobias, *et al.* 1994). Il en résulte que plus la taille du cœur lipidique est importante, plus la capsule fibreuse est sollicitée mécaniquement (Finet, Ohayon, et Rioufol 2004). Sur la base d'observations histologiques, les plaques comprenant un cœur lipidique comptant pour > 40 % de l'aire de la plaque sont considérées comme vulnérables (Kolodgie *et al.* 2001). Par analyse biomécanique sur modèle de plaques idéalisées, il a été montré que l'épaisseur du cœur lipidique influe sur la concentration de contrainte au niveau de la capsule fibreuse sus-jacente, tandis que son étendue circonférentielle ne présente que peu d'influence sur ce paramètre liée à la rupture de plaque (Ohayon *et al.* 2008).

**Vascularisation et hémorragie intra-plaque.** L'hémorragie intra-plaque participe à la formation d'un cœur lipidique ; ce phénomène est donc lié aux critères morphologiques de vulnérabilité. L'hémorragie intra-plaque requiert la vascularisation préalable de la plaque ; c'est donc également un critère de vulnérabilité (Kolodgie, Gold, *et al.* 2003). De plus, le caractère soudain de l'expansion du cœur lipidique secondaire à l'hémorragie intra-plaque peut en faire un facteur déclencheur d'ACS (Michel *et al.* 2011).

**L'aspect jaune à l'angioscopie.** L'aspect jaune des plaques observées en angioscopie est à rapprocher des critères morphologiques de taille du cœur nécrotique et d'épaisseur de capsule fibreuse. En effet, cet aspect a pour origine l'importance du contenu en lipides des plaques et leur visualisation au travers d'une capsule fibreuse mince (Takano *et al.* 2001).

**Le remodelage positif.** Le phénomène de remodelage excentrique de la plaque, décrit par Glagov *et al.* (Glagov *et al.* 1987) est associé à une vulnérabilité plus élevée des plaques (Varnava, Mills, et Davies 2002). Comme présenté par Chatzizisis *et al.* (Chatzizisis *et al.* 2007), le remodelage

excentrique est impliqué dans le maintien de la perturbation du flux et de la signalisation pro-athérogénique correspondante observée dans les ECs. De plus, le remodelage excentrique est responsable d'une augmentation de la contrainte dans la capsule fibreuse (Ohayon *et al.* 2008).

**Fissuration.** La présence de fissurations dans la capsule fibreuse témoigne d'épisodes antérieurs de rupture de plaque, ce qui indique que la plaque considérée (et probablement d'autres plaques développées dans le même contexte systémique) a développé un phénotype vulnérable qui est susceptible d'occasionner un autre épisode de rupture de plaque (Naghavi *et al.* 2003a).

**Inflammation** Comme discuté ci-dessous, l'inflammation est liée à des nombreux processus biologiques favorisant l'amincissement de la capsule fibreuse, l'expansion du cœur nécrotique et le remodelage excentrique des plaques ; c'est un marqueur majeur de vulnérabilité (Naghavi *et al.* 2003a).

### 2.5.2.3 Mécanismes biologiques

#### i) Capsule fibreuse

Tout processus impliqué dans la diminution de la synthèse de collagène par les SMCs, dans la dégradation des fibres de collagène, et dans la diminution de la quantité de SMCs dans la capsule fibreuse est un processus favorisant la vulnérabilité. Ces phénomènes sont étroitement liés à l'état inflammatoire des plaques.

**Apoptose des SMCs.** Un grand nombre de voies pro-apoptotiques ont été identifiées comme potentiels activateurs de l'apoptose des SMCs et peuvent être activées dans le contexte de l'athérosclérose. Il a été montré que les SMCs expriment des récepteurs de mort TRAIL (Kavurma et Bennett 2008) et Fas (Geng *et al.* 1997). De plus, de nombreux signaux de l'environnement des plaques induisent l'apoptose des SMCs, notamment la présence de oxLDL (Björkerud et Björkerud 1996), d'espèces radicalaires (Boyle, Weissberg, et Bennett 2003) et de cytokines pro-inflammatoires IL-1, TNF et IFN- $\gamma$  (Geng *et al.* 1996). La combinaison de ces signalisations permet l'induction de l'apoptose des SMCs, notamment mise en place à proximité des macrophages et des lymphocytes T (Bennett, Yu, et Clarke 2012). Les SMCs sont aussi sensibles à la déprivation en facteurs de croissance qui peut causer l'apoptose par diminution des signaux de survie liée à la signalisation Akt (Okura *et al.* 2001). Un modèle transgénique d'apoptose inductible des SMCs a montré que l'apoptose des SMCs seules suffit à l'induction d'un phénotype de plaque vulnérable (Clarke *et al.* 2006).

**Diminution de la synthèse de collagène.** La synthèse de collagène est sous le contrôle de TGF $\beta$

(Ignatz et Massague 1986; Roberts *et al.* 1986). Tout mécanisme responsable d'une diminution de la synthèse de TGF $\beta$  est donc potentiellement impliqué dans la diminution de la synthèse de collagène. Les macrophages des zones présentant un défaut de clairance des cellules apoptotiques présentent une diminution de la sécrétion TGF $\beta$  (Fadok *et al.* 1998) ; le défaut d'efférocytose est donc associé à une diminution de la synthèse du collagène. Les SMCs sont une source importante de TGF $\beta$ , qui participe à une stimulation autocrine/paracrine en faveur de la synthèse de collagène. L'apoptose des SMCs participe à une diminution de la synthèse de collagène par la diminution de cette signalisation.

**Dégradation des fibres de collagène.** La dégradation enzymatique des fibres de la capsule fibreuse implique différentes enzymes protéolytiques et notamment les MMPs. L'observation d'une corrélation entre la présence de macrophages, l'amincissement de la capsule fibreuse, et la présence de MMPs activées – en particulier MMP-2 et MMP-9 – dans les épaulements de plaques vulnérables a initié un grand intérêt pour ces enzymes dans le contexte de l'athérosclérose (Galis *et al.* 1994). Il a été montré que les cellules présentes dans les plaques, et en particulier les cellules inflammatoires au premier chef desquelles les macrophages, secrètent un grand nombre de MMPs, y compris les gélatinases (MMP2/9) et collagénases interstitielles (MMP-1/8/13), les stromélysines (en particulier MMP-3) et des MMPs membranaires (en particulier MMP-14) (Galis *et al.* 1994; P K Shah *et al.* 1995; Sukhova *et al.* 1999; Herman *et al.* 2001; Page-McCaw, Ewald, et Werb 2007). Il a été montré que la délétion de MMP-13 et MMP-14 permet d'augmenter le contenu des plaques en collagène (J.-O. Deguchi *et al.* 2005; Schneider *et al.* 2008) et que la surexpression de MMP-9 conduit au développement de plaques de plus grande vulnérabilité (Gough *et al.* 2006). La synthèse des MMPs par les macrophages est stimulée en conditions pro-inflammatoires, notamment par stimulation du récepteur CD40L (Mach *et al.* 1997), mais aussi en réponse aux cytokines pro-inflammatoires (Levitan, Volkov, et Subbaiah 2010). D'autres protéases secrétées par les macrophages, telles que les cathepsines, sont associées à une augmentation de la dégradation des fibres d'élastine et de collagène (J. Liu *et al.* 2004). Une augmentation de l'activité collagénase et élastase est observée dans les zones présentant un flux perturbé (Chatzizisis *et al.* 2011).

## ii) Cœur lipidique

Tout processus participant à l'augmentation de la taille du cœur nécrotique est associé à une vulnérabilité ; comme décrit précédemment, ces éléments sont en rapport avec l'état inflammatoire. L'augmentation de la taille du cœur nécrotique résulte de la poursuite des phénomènes impliqués dans sa formation, i.e. l'apoptose des cellules spumeuses et le déficit d'efférocytose (Tabas 2010a).

## Revue bibliographique

L'apoptose des cellules spumeuses se fait principalement en réponse au stress liée au ER. Ce stress est associé à l'accumulation de FC dans le ER, *via* la réponse UPR, souvent en association avec d'autres facteurs, e.g. la signalisation liée aux SRs (Tabas 2010b). L'efférocytose de ces éléments apoptotiques des lésions avancées est déficiente, probablement à cause de l'accumulation d'éléments extracellulaires qui perturbent, par compétition, la reconnaissance d'éléments apoptotiques (M.-K. Chang *et al.* 1999) ainsi qu'en raison du clivage des récepteurs impliqués dans l'efférocytose (Sather *et al.* 2007).

La taille du cœur lipidique des plaques de sujets diabétiques est en moyenne plus importante que celle de sujets non diabétiques (Burke *et al.* 2004). Ceci est causé principalement par l'augmentation de l'apoptose des macrophages des plaques présentant une perturbation de la signalisation liée à l'insuline (Tabas, Tall, et Accili 2010).

L'augmentation de la taille du cœur lipidique résulte également de l'apport d'éléments issus de l'hémorragie intra-plaque (Kolodgie, Petrov, *et al.* 2003). La présence d'éléments provenant du sang est associée à une augmentation de l'oxydation, de la protéolyse et de la formation de cristaux de cholestérol (Michel *et al.* 2011). De plus, l'expansion rapide du cœur lipidique associée à l'hémorragie intra-plaque peut constituer un facteur déclencheur de la rupture (Michel *et al.* 2011).

### iii) Calcifications

Il a été montré que la présence de calcifications importantes est associée à la stabilité des plaques (H. Huang *et al.* 2001). Cependant, la présence de calcifications de faible taille (*spotty calcifications*), identifiées par échographie intra-vasculaire, a été associée à une vulnérabilité augmentée (Ehara *et al.* 2004). Il a été suggéré par approche biomécanique que la présence d'inclusions présentant une rigidité importante peut générer dans certaines conditions une concentration des contraintes ; la présence de ces inclusion au niveau de la capsule fibreuse pourrait être responsable d'une concentration importante de contraintes responsables de la rupture de plaque (Vengrenyuk *et al.* 2006; Kelly-Arnold *et al.* 2013). Cette analyse montre que ce phénomène reste vrai pour des inclusion de taille microscopiques, non détectables en imagerie *in vivo* du fait de leur faible dimension par rapport à la résolution des systèmes d'imagerie ; ces microcalcifications pourraient être associées à une vulnérabilité accrue.

Enfin, similairement à ce qui a été décrit avec les cristaux de cholestérol, il a été montré que la présence de calcifications peut être responsable de l'activation de la voie de l'inflammasome NLRP3, participant ainsi à l'inflammation de plaque (Jin *et al.* 2011).

### 2.5.3 Érosion de plaque

La présence de thrombose murale en l'absence de rupture de la capsule fibreuse a été décrite et associée au ACS (van der Wal *et al.* 1994; Farb *et al.* 1996). L'érosion de plaque correspond, suivant les observations *post-mortem*, à la perte partielle de l'endothélium vasculaire et à l'exposition à la lumière vasculaire du sous-endothélium riche en SMCs et en ECM.

La revue de Naghavi *et al.* (Naghavi *et al.* 2003a) présente la dénudation endothéliale avec agrégation plaquettaire superficielle comme un critère majeur pouvant être utilisé pour définir les plaques vulnérables susceptibles à l'érosion à partir de techniques d'investigation cliniques. Ce critère majeur s'accompagne d'un critère mineur : la dysfonction endothéliale.

Comme discuté par Falk *et al.* (Falk *et al.* 2013), les plaques présentant une érosion endothéliale ont été décrites comme faiblement inflammatoires (Virmani *et al.* 2000) ou comme présentant une inflammation plus importante (M. J. Davies 1990; van der Wal *et al.* 1994). Similairement, différentes études rapportent également différentes associations entre le degré de sténose des plaques et leur susceptibilité à l'érosion endothéliale (Falk *et al.* 2013).

Globalement, les processus biologiques impliqués dans l'érosion endothéliale sont mal connus, ce qui rend la distinction entre plaques vulnérables sujettes à l'érosion endothéliale et plaques stables particulièrement délicate (Falk *et al.* 2013).

### 2.5.4 Thrombose

La thrombose est définie comme la formation d'un thrombus, constitué de fibrine, produit de coagulation, et de thrombocytes agrégés (Furie et Furie 2008). Classiquement, la thrombose est décrite comme la résultante de facteurs liés à l'hypercoaguabilité, à des perturbations hémodynamiques et à la lésion ou la dysfonction endothéliale (triade de Virchow). Dans l'athérosclérose, la thrombose survient à la suite de la mise en contact des éléments pro-thrombotiques des plaques avec les facteurs de coagulation sanguins, suite à l'érosion endothéliale ou à la rupture de la capsule fibreuse des plaques vulnérables. Les ACS sont majoritairement causés par la thrombose murale, initiée et demeurant au niveau de la plaque vulnérable rompue ou érodée (*culprit*) (M. J. Davies 2000).

**Coagulation.** La voie de la coagulation est une cascade de clivages enzymatiques. Dans le cas de la voie extrinsèque, cette cascade est initiée par le clivage du facteur VII de la coagulation en facteur VIIa par le facteur tissulaire (TF, *tissue factor*) et l'association TF-VIIa, qui active les facteurs IX et X.

## Revue bibliographique

La cascade de coagulation aboutit au clivage de la prothrombine en thrombine qui clive le fibrinogène en fibrine et le facteur XIII en facteur XIIIa ; XIIIa forme des liaisons covalentes avec la fibrine pour former un réseau réticulé (Davie, Fujikawa, et Kisiel 1991).

**L'activation plaquettaire dans l'athérosclérose.** L'activation plaquettaire peut être initiée par l'interaction entre le collagène de la matrice extracellulaire et son récepteur exprimé par les plaquettes : la glycoprotéine VI ou la glycoprotéine Ia/IIa (*alias* intégrine  $\alpha 2\beta 1$ ). Cette liaison entre thrombocytes et collagène est renforcée par le facteur von Willebrand (vWF) qui lie le complexe de glycoprotéines Ib-IX-V. En dehors de la voie d'activation plaquettaire dépendante du collagène, il existe également une voie dépendant du TF, associée au facteur VIIa et menant au clivage par la thrombine de Par1 (*proteas-activated receptor-1*, ou Par4 chez la souris) à la surface des thrombocytes résultant en une activation plaquettaire (Furie et Furie 2008).

L'activation plaquettaire consiste en un relargage par les thrombocytes de granules contenant des facteurs activateurs des plaquettes. Ces granules contiennent notamment de l'ADP, de la sérotonine, le facteur d'activation plaquettaire (PAF, platelet-activating factor), le facteur vWF, le facteur plaquettaire 4 et le thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). Les thrombocytes activés expriment également un certain nombre de marqueurs de surface, dont la P-sélectine.

La signalisation de l'activation plaquettaire aboutit à une augmentation de l'affinité de l'intégrine  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  (*alias* glycoprotéines IIb/IIIa) pour le fibrinogène, permettant ainsi l'interaction avec les facteurs de coagulation pour compléter la formation du thrombus (D. J. Fitzgerald *et al.* 1986).

Il a été montré qu'en présence de oxLDL, l'activation plaquettaire médiée par des agonistes classiques comme l'ADP est augmentée. Cette réponse a été observée par une augmentation de l'agrégation plaquettaire et par une augmentation d'expression des marqueurs de l'activation, comme la P-sélectine et l'intégrine  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  (récepteur au fibrinogène) dans sa conformation activée. Cette réponse est liée à l'expression par les plaquettes de CD36 (Podrez *et al.* 2007; Silverstein *et al.* 2010).

### **3 Diagnostic et imagerie de l'athérosclérose**

La prévention des atteintes cardiovasculaires représente un enjeu majeur de santé publique. Ceci passe par un diagnostic efficace des atteintes coronaires permettant d'orienter la prise en charge thérapeutique. Tandis que l'identification des plaques sténosantes responsables de l'angor est parfaitement validée, la détection des plaques vulnérables responsable des ACS reste encore problématique. L'importance de la mortalité due à des accidents coronaire inauguraux démontre la nécessité d'un outil diagnostique efficace applicable à large échelle.

Chez le sujet asymptomatique présentant un risque cardiovasculaire intermédiaire, l'imagerie non-invasive permettant d'évaluer la charge d'athérosclérose et de reclassifier les individus dans des groupes à risque faible ou élevé présente un intérêt immédiat reconnu.

Une évaluation fine des lésions des individus à haut risque cardiovasculaire peut être effectuée par imagerie endo-coronaire afin de guider la prise en charge thérapeutique ; cette approche d'imagerie invasive ne sera que succinctement mentionnée.

#### **3.1 Stratégie diagnostique et place de l'imagerie**

L'évaluation du risque cardiovasculaire est typiquement effectuée par une évaluation des facteurs de risques majeurs, intégrés dans un modèle basé sur les données épidémiologiques fournissant une évaluation du risque cardiovasculaires à 10 ans. Cette approche permet de classer les personnes au sein de groupes à faible, faible à intermédiaire, intermédiaire et haut risque cardiovasculaire, correspondant à des risques de survenue d'évènements cardiovasculaires < 6 %, de 6% – 10 %, de 10 – 20 % et > 20 % à 10 ans, respectivement. Le diagramme du risque cardiovasculaire sur la base des facteurs de risques traditionnels du projet SCORE (*Systematic Coronary Risk Evaluation Project*) est présenté en Figure 15 (Perk *et al.* 2012). À noter que les personnes ayant subi un évènement coronaire sont classées dans les population à haut risque cardiovasculaire.

## Revue bibliographique

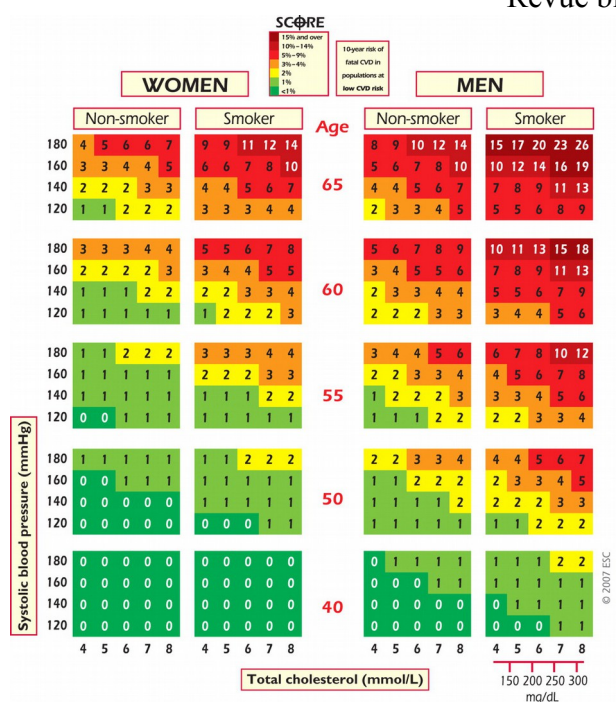


Figure 15. Diagramme SCORE. Risque de mortalité cardiovasculaire à 10 ans, dans les pays à faible risque cardiovasculaire, basé sur l'évaluation des facteurs de risque : âge, tabagisme, pression artérielle systolique et cholestérol total. Le risque de survenue d'événement cardiovasculaire (fatal et non léthal) est approximativement 3 fois supérieur au risque de mortalité cardiovasculaire. (Perk *et al.* 2012)

Low CVD countries are Andorra, Austria, Belgium, Cyprus, Denmark, Finland, France, Germany, Greece, Iceland, Ireland, Israel, Italy, Luxembourg, Malta, Monaco, The Netherlands, Norway, Portugal, San Marino, Slovenia, Spain, Sweden, Switzerland, United Kingdom.

L'évaluation du risque cardio-vasculaire chez des patients non symptomatiques fait l'objet de recommandations émises par un groupe de travail constitué de l'ACCF (*American College of Cardiology Foundation*) et de l'AHA (*American Heart Association*) (Greenland *et al.* 2010). Ce groupe de travail a mis en avant, en accord avec les recommandations d'autres sociétés savantes (e.g. SHARP, *Society for Heart Attack Prevention and Eradication* ; ESC, *European Society of Cardiology* ; EACPR, *European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*), la nécessité de reclassifier les personnes à risque intermédiaire afin d'améliorer la prise en charge, notamment suivant des recommandations de prévention primaire des personnes à haut risque cardiovasculaire (Figure 16) (Perk *et al.* 2012).

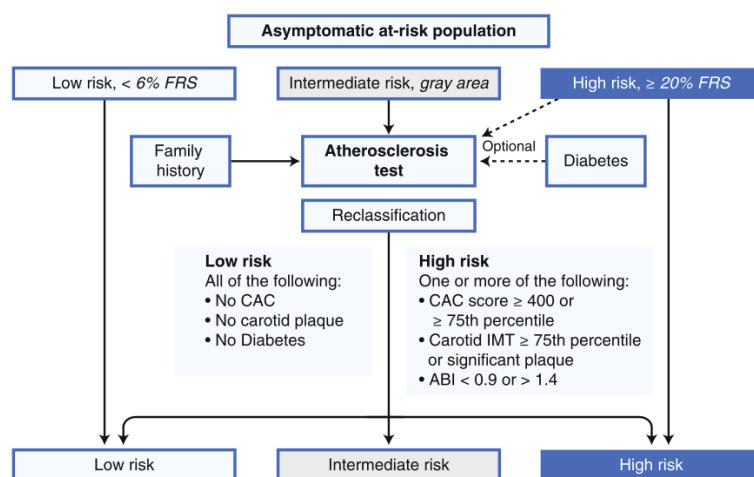


Figure 16. Approche suggérée pour l'évaluation de l'athérosclérose chez les sujets asymptomatiques, suivant les recommandations de SHAPE (*Screening for Heart Attack Prevention and Education*). (Falk *et al.* 2011)

## Revue bibliographique

Dans cette optique, ce groupe de travail a émis des recommandations concernant l'évaluation globale du risque cardiovasculaire sur la base de facteurs de risques traditionnels (e.g. SCORE ou FRS, *Framingham Risk Score*), de l'histoire familiale, de tests génétiques, de profil lipidique, de la mesure du peptide natriurétique, de la protéine C-réactive, de l'hémoglobine A1C, du test de la microalbuminurie, du dosage de la phospholipase A2, de l'analyse électrocardiographique au repos et à l'exercice, de tests fonctionnels de dilatation périphérique liée au flux, de l'index de pression cheville bras (ABI, *ankle-brachial pressure index*), de la rigidité artérielle ainsi que de techniques d'imagerie : l'échographie trans-thoracique, l'échocardiographie au stress, la mesure de l'épaisseur intima-média (IMT), l'imagerie de la perfusion myocardique, la mesure du score calcique (CACs), la tomographie cardiaque aux rayons X (CCTA) et l'imagerie par résonance magnétique (MRI). Dans le cadre de ces recommandations, l'évaluation globale du risque sur la base de facteurs de risques traditionnels et de l'histoire familiale sont les seules méthodes dont l'usage est conseillé (recommandation de classe I et niveau de preuve B) (Greenland *et al.* 2010). Ceci démontre la nécessité de développer et de valider de nouveaux outils diagnostiques avec conceptuellement un intérêt majeur pour l'imagerie moléculaire des processus impliqués dans la vulnérabilité des plaques.

### **3.2 Modalités d'imagerie**

L'imagerie médicale a pour objectif la visualisation, anatomique ou fonctionnelle de structures d'intérêt, souvent avec une finalité d'aide au diagnostic. Les diverses modalités d'imagerie médicale peuvent être classées suivant le principe physique sous-jacent ; une même modalité peut être adaptée à diverses échelles permettant e.g. une imagerie externe et une imagerie endoscopique.

#### **3.2.1 Imagerie échographique**

L'imagerie échographique repose sur la réflexion d'ondes ultrasonores à l'interface de structures présentant un changement d'échogénicité (Dauzat *et al.* 2013). Cette méthodologie consiste en l'émission d'ondes ultrasonores dans le tissu biologique et le traitement des ondes réfléchies. La résolution temporelle de cette méthode d'imagerie est excellente. La résolution spatiale de l'imagerie échographiques dépend de la fréquence (et donc de la longueur d'onde) des ondes émises et doit être mise en regard de la pénétration tissulaire de ces ondes qui dépend de cette même caractéristique ; ainsi, plus la résolution spatiale augmente, plus la pénétration tissulaire diminue. L'échographie externe (trans-thoracique ou des artères carotides) nécessite chez l'homme une pénétration tissulaire importante, les fréquences utilisés sont 2 – 18 MHz. L'utilisation de sondes endovasculaires

## Revue bibliographique

(invasif) permet de se placer au contact direct des plaques d'athérome à imager. Une résolution spatiale de  $\sim 150 \mu\text{m}$  peut être obtenue avec l'utilisation de sondes à 20 – 45 MHz. Cette technique est appelée échographie endovasculaire (IVUS, *intravascular ultrasound*).

L'échographie trans-thoracique permet de visualiser les parois, cavités et valves cardiaques, cependant la résolution spatiale est insuffisante pour l'imagerie des artères coronaires. La charge de l'athérosclérose peut être évaluée par la mesure de l'épaisseur intima-média carotidienne (CIMT, *carotid intima media thickness*) ; cette mesure est fréquemment effectuée sur la paroi profonde de l'artère carotide commune. L'imagerie échographique des carotides permet également l'identification de plaques d'athérome (épaississement focal de la paroi vasculaire). L'échogénicité des structures traversées est corrélée à leurs caractéristiques histologiques. Ainsi, les plaques fortement lipidiques sont peu échogènes, tandis que les plaques fibreuses le sont plus fortement et les calcifications réfléchissent l'ensemble des ondes incidentes aboutissant à la visualisation d'un cône d'ombre en arrière des structures calcifiées.

L'analyse de la fréquence des ondes réfléchies permet d'apprécier le flux par effet Doppler.

L'imagerie par échographie peut être couplée à l'utilisation d'agents de contraste vasculaires hyperéchogènes (CEUS, *contrast-enhanced ultrasound*) voire d'agents de contraste hyperéchogènes ciblés (tCEUS, *targeted contrast-enhanced ultrasound*).

### 3.2.2 Imagerie aux rayons X

L'imagerie par rayons X est une technique d'imagerie irradiante reposant sur la mesure de l'atténuation du faisceau de rayons X, produit par un tube à rayon X et enregistré par des capteurs plans, qui est fonction de la densité du tissu traversé. On distingue deux modalités principales : la radiographie (planaire) et l'imagerie tomographique ou tomodensitométrie (CT, *computed tomography*) qui permet la reconstruction d'images tridimensionnelles à partir des projections sous différentes incidences angulaires. Ces modalités d'imagerie peuvent être associées à l'injection de produit de contraste vasculaire dense aux rayons X.

La coronarographie est effectuée par radiographie du thorax suite à l'injection de produit de contraste à partir d'un cathéter introduit dans les artères coronaires (il s'agit donc d'une modalité d'imagerie invasive). Cette méthode permet de visualiser la lumière vasculaire suivant le plan étudié, mais ne permet pas la visualisation de la paroi artérielle (Stiel *et al.* 1989).

Plus récemment, les avancées du matériel de tomodensitométrie – notamment l'utilisation de scanner à source de rayons X fixe (EBCT, *electron beam computed tomography*) ou de scanners

## Revue bibliographique

réalisant des acquisitions hélicoïdales avec plusieurs rangées de détecteurs (MSCT, *multislice computed tomography*), voire deux sources de rayons X (Achenbach *et al.* 2006) – ont permis de perfectionner cette technique pour donner l'angiographie par tomodensitométrie cardiaque (CCTA, *coronary computed tomography angiography*) (Achenbach *et al.* 2000). L'augmentation de la vitesse d'acquisition permet d'effectuer l'acquisition sous apnée (permettant ainsi de s'affranchir des artefacts liés aux mouvements respiratoires) et de réaliser un recalage sur l'enregistrement électrocardiographique (ECG) permettant, à la reconstruction, de s'affranchir des mouvements cardiaques (*cardiac gating*). L'injection de produit de contraste par voie i.v. en périphérie permet de s'affranchir de la caractérisation artérielle et en fait une méthode d'imagerie non invasive.

En l'absence de produit de contraste, la densité des calcifications et leur étendue sur les artères coronaires peuvent être évaluées par tomodensitométrie. Au début des années 1990, une méthode de quantification des calcifications (CACS, *coronary artery calcium scoring*) a été proposée par les docteurs Agatston et Janowitz (Agatston *et al.* 1990) et raffinée (avec les avancées matérielles) depuis (Callister *et al.* 1998; C. Hong *et al.* 2002; Qian *et al.* 2010).

### 3.2.3 Imagerie par résonance magnétique

L'imagerie par résonance magnétique nucléaire (MRI, *nuclear magnetic resonance imaging*) est une technique d'imagerie non ionisante qui repose sur le principe de la résonance magnétique nucléaire (M. A. Brown et Semelka 2011). Les noyaux de certains atomes possèdent un moment magnétique de spin (e.g.  $^1\text{H}$ ) qu'il est possible d'aligner suivant un champ magnétique (aimant). Ce moment magnétique de spin peut être perturbé (en un mouvement de précession) par l'application d'un champ plus faible et oscillant, orienté perpendiculairement et appelé champ radio-fréquence (antenne émettrice), qui entre en résonance avec les noyaux atomiques pour une fréquence précise (e.g. 42 Mhz/T pour  $^1\text{H}$ ). Le réalignement des moments magnétique de spin suivant le champ magnétique principal (signal de précession ou relaxation) donne lieu à un signal électromagnétique mesurable (antenne réceptrice). Cette relaxation est caractérisée par un temps de relaxation longitudinal (T1) et transversal (T2) fonction de l'agitation moléculaire du milieu observé.

L'utilisation de gradient dans le champ magnétique de base, responsable de fréquences de précession différentes en fonction de la position dans le champ magnétique et donc de phénomènes de résonance localisés, permet la localisation spatiale de ces phénomènes et donc l'obtention d'images tridimensionnelles.

L'utilisation de différentes séquences MRI (temps entre excitation et réception, temps de répétition

d'excitation successives) permet d'obtenir différentes pondérations d'images. Ces séquences peuvent être adaptées à l'utilisation de différentes classes de produits de contraste, qui peuvent permettre un ciblage moléculaire.

### **3.2.4 Imagerie nucléaire**

L'imagerie médicale nucléaire est une méthode d'imagerie reposant sur l'injection de traceurs radioactifs – responsables de l'émission de rayonnements ionisants – et la détection externe – donc non invasive – de la radioactivité *via* des gamma-caméras. Les modalités d'imagerie nucléaire se distinguent en fonction du type de radioélément utilisé. Il s'agit d'une modalité d'imagerie fonctionnelle ou moléculaire (Sharp, Gemmell, et Murray 2005).

Les radioéléments émetteurs de rayonnements  $\gamma$  (e.g. technétium-99m) peuvent être employés pour réaliser de l'imagerie planaire : l'individu ayant reçu une injection de radiotraceur est placé sous une caméra équipée de radio-détecteurs avec un système de collimation permettant d'obtenir une image de la radioactivité suivant la projection considérée.

Par extension, l'acquisition de séries de projections sous différentes incidences angulaires permet d'obtenir une image tomographique : c'est la tomographie d'émission monophotonique (SPECT, *single-photon emission computed tomography*).

L'imagerie médicale nucléaire de tomographie par émission de positon (PET, *positron emission tomography*) est utilisée pour visualiser la biodistribution des radioéléments émettant des particules  $\beta^+$  (e.g. fluor-18). Les particules  $\beta^+$ , après un parcours tissulaire dépendant de leur énergie, s'annihilent avec un électron et produisent deux particules  $\gamma$  émises suivant l'axe perpendiculaire à la désintégration. La détection en co-incidence de ces particules permet, en l'absence de collimation physique, de déterminer la ligne où s'est produite la désintégration et par extension, d'obtenir une image tomographique reflétant la distribution des particules  $\beta^+$ .

Ces deux modalités d'imagerie sont extrêmement sensibles – la sensibilité de la TEP étant 2 à 3 ordres de grandeur supérieure à celle de la SPECT du fait de l'absence de collimation physique (Rahmim et Zaidi 2008) – ce qui en fait les modalités d'imagerie les plus adaptées à l'imagerie moléculaire. Cependant, la résolution spatiale est relativement faible et les images ne présentent pas de repères anatomiques ; ces limitations ont mené au développement de l'imagerie multi-modalités, associant le CT ou (plus récemment) l'MRI à l'imagerie nucléaire.

### **3.2.5 Modalités d'imagerie optique**

D'autres modalités d'imagerie de l'athérosclérose sont également décrites, en particulier des

## Revue bibliographique

méthodes d'imagerie invasives. Les modalités reposant sur l'utilisation de sondes endo-vasculaires utilisant la lumière visible ou proche infra-rouge nécessitent, du fait de l'absorbance du sang, soit de bloquer la circulation durant un court laps de temps (typiquement < 1 min au niveau des artères coronaire), soit de créer une fenêtre de visibilité par infusion de produit transparent.

L'angioscopie repose sur la visualisation directe, par lumière visible, de la paroi artérielle, au moyen d'une sonde endovasculaire à fibre optique, analogue aux sondes endoscopiques.

La tomographie par cohérence optique (OCT, *optical coherence tomography*) est basée sur le phénomène d'interférence d'ondes lumineuses cohérentes en phase, entre le faisceau réfléchi (par les interfaces entre différents milieux dans la paroi vasculaire, de manière analogue aux ondes ultrasonores en IVUS) et le faisceau de référence (D. Huang *et al.* 1991; Prati *et al.* 2010). Les ondes lumineuses proches infra-rouge ( $\lambda \sim 1.3 \mu\text{m}$  pour l'OCT) présentent une pénétration tissulaire de 1 – 3 mm. Un développement récent de cette technique est l'imagerie OFDI (*optical frequency domain imaging*), présentant une meilleure résolution temporelle et permettant donc l'acquisition de séquences d'images en rétraction (*pull-back*) et ainsi l'obtention d'images tridimensionnelles (Tearney *et al.* 2008).

Les modalités d'imagerie optique moléculaire basées sur l'injection de sondes fluorescentes dans le proche infra-rouge (NIRF, *near-infrared fluorescence*) ont été développées principalement dans le cadre de recherches pré-cliniques ou en peropératoire. Ces méthodes consistent en une injection de sonde fluorescente dans le proche infra-rouge, et en l'enregistrement des images par un système optique capable de visualiser les ondes proches infra-rouge, suite à l'excitation de la sonde fluorescente. Le proche infra-rouge est utilisé en raison de la pénétration tissulaire. Cette modalité peut également être adaptée à une utilisation intravasculaire (Jaffer *et al.* 2008) ou, pour la recherche pré-clinique sur petit animal, en un système tomographique (FMT, *fluorescence molecular tomography*) (Ntziachristos *et al.* 2002).

Enfin, l'imagerie de bioluminescence (BLI) est une modalité d'imagerie uniquement utilisée dans le cadre de la recherche pré-clinique sur petit animal et récemment adaptée en tomographie (BLT, *bioluminescence tomography*). Cette modalité d'imagerie repose sur la détection de la luminescence émise par les organismes ou cellules vivantes exprimant des molécules émettant de la lumière visible à une longueur d'onde précise (e.g. luciférase) (Rice, Cable, et Nelson 2001).

### 3.2.6 Comparaison des modalités d'imagerie

Les différentes techniques citées ci-dessus peuvent dans la plupart des cas être adaptées à un

## Revue bibliographique

système endoscopique pour l'imagerie invasive intra-vasculaire ; en règle générale, approcher le système de détection du tissu à imager permet d'améliorer la résolution spatiale des images obtenues. L'imagerie non-invasive suppose un système de détection externe. Les systèmes dédiés à l'imagerie du petit animal sont conçus de façon à présenter une meilleure résolution par rapport au système dédiés à l'imagerie clinique. L'imagerie échographique utilise des ondes à plus haute fréquence. Les système de tomodensitométrie sont conçus de façon à approcher la source des rayons X près de l'animal. Les systèmes MRI présentent un champ magnétique plus réduit, ce qui permet d'augmenter son intensité. Les systèmes SPECT ont des collimateurs proches de l'animal, et l'anneau des systèmes PET est de taille réduite, améliorant la précision de détection. Une comparaison des modalités d'imagerie non-invasives est présentée en Tableau 1 (I. Y. Chen et Wu 2011; Camici *et al.* 2012).

Modalité d'imagerie	Forme d'énergie utilisée	Résolution spatiale (mm)	Temps d'acquisition (s)	Masse de traceur requis (ng)	Pénétration tissulaire (mm)	Utilisation prinipale	Coût (équipement et utilisation)
PET	Photons d'annihilation	1 – 4 (animal), 4 – 5 (clinique)	1 – 300	1 – 100	> 300	Clinique et petit animale	Élevé
SPECT	Rayons gamma	0.5 – 5 (animal), 7 – 15 (clinique)	60 – 2000	1 – 100	> 300	Clinique et petit animale	Moyen-Élevé
Bio-luminescence	Lumière visible et proche infra-rouge	3 – 10	10 – 300	$10^3 - 10^6$	1 – 10	Petit animale	Faible
Fluorescence	Lumière visible et proche infra-rouge	2 – 10	10 – 2000	$10^3 - 10^6$	1 – 20	Petit animale	Faible
MRI	Ondes radiofréquence	0.025 – 0.1 (animal), 0.2 – (clinique)	60 – 3000	$10^3 - 10^6$	> 300	Clinique et petit animale	Élevé
Échographie	Ondes ultrasonore	0.05 – 0.5 (animal), 0.1 – 1 (clinique)	0.1 – 100	$10^3 - 10^6$	1 – 200	Clinique et petit animale	Faible
CT	Rayons X	0.03 – 0.4 (animal), 0.3 – 1 (clinique)	1 – 300	N/A	> 300	Clinique et petit animale	Moyen-Élevé

Tableau 1. Comparaison des techniques d'imagerie non invasive (d'après Camici *et al.* 2012).

### 3.3 Imagerie invasive

Les principales modalités d'imagerie invasive sont l'angiographie, l'angioscopie, l'IVUS et l'OCT. L'utilisation de sondes NIRF ciblant des éléments des plaques vulnérables et visualisés en intra-vasculaire est une approche d'imagerie moléculaire. A noter que le développement de cathéters supportant des systèmes d'acquisition multi-modalités permettent de combiner les avantages de plusieurs techniques d'imagerie invasive.

**Angiographie.** L'angiographie coronaire (ou coronarographie) permet la visualisation des sténoses

## Revue bibliographique

coronaires suite à l'injection d'agent de contraste en intra-coronaire (Figure 18) (Sones et Shirey 1962; Proudfit, Shirey, et Sones Jr 1966). Cependant, cette technique ne permet pas la visualisation de la paroi artérielle. La mise en évidence de phénomènes de remodelage excentrique en présence de plaques qui n'altèrent pas la lumière vasculaire (Glagov *et al.* 1987) constitue une limitation majeure de cette technique (Stiel *et al.* 1989). Cette technique est employée en routine clinique, notamment lors de la revascularisation par angioplastie.

**Angioscopie.** L'angioscopie permet de parfaitement visualiser la thrombose intra-vasculaire lors des ACS mais permet aussi de visualiser la couleur des plaques (Figure 18). Une couleur jaune, associé à un contenu en lipides important a été associée à des plaques présentant un remodelage excentrique plus élevé par rapport aux plaques blanches (fibreuse). Ces plaques, présentant donc deux critères de vulnérabilité, ont été associées à une incidence de ACS plus élevés dans plusieurs essais cliniques (Takano *et al.* 2001; Uchida *et al.* 1995).

**IVUS et OCT.** L'IVUS et l'OCT sont deux méthodologies visant à caractériser la paroi vasculaire directement en contact avec la sonde endocoronaire (Figure 18). La différence entre ces deux techniques repose sur la nature des ondes utilisées, leurs caractéristiques et les conséquences en termes de pénétration tissulaire et de résolution qui en découlent (Prati *et al.* 2010). En effet, l'IVUS présente une pénétration tissulaire de 10 mm tandis que celle de l'OCT est de 1 – 2.5 mm, ce qui est toutefois suffisant pour visualiser toute la circonférence des artères coronaires (Yamaguchi *et al.* 2008). Cependant, l'OCT présente une bien meilleure résolution spatiale que l'IVUS (résolution axiale :  $\sim 15 \mu\text{m}$  vs.  $\sim 150 \mu\text{m}$ ), ce qui permet de déterminer finement l'épaisseur de la capsule fibreuse qui, lorsqu'elle est fine ( $< 65 \mu\text{m}$ ), n'est pas appréhendable par IVUS. La précision de la mesure de l'épaisseur de la capsule fibreuse par OCT a été validée en comparaison à l'examen histologie (Kume *et al.* 2006). Les deux techniques présentent des images d'un contraste satisfaisant permettant d'identifier les composants des plaques ; l'OCT permet également d'identifier des thrombi et, du fait de sa meilleure résolution, fournit des images interprétables en présence de stents. L'excellente résolution temporelle (15 – 20 Hz et 30 Hz, pour l'OCT/OFDI et l'IVUS, respectivement) permet l'acquisition d'images séquentielles pendant le déplacement de la sonde (*pull-back*) et ainsi l'obtention de données volumiques (von Birgelen *et al.* 1997). Le comportement cinétique de la paroi vasculaire peut également être étudié afin de caractériser les propriétés cinétiques du tissu imagé par l'élastographie (Schaar *et al.* 2003). Enfin, l'analyse spectrale des ondes réfléchies est possible, donnant lieu à l'histologie virtuelle : IVUS-RF ou VH IVUS (Nair *et al.* 2002). Ces trois approches sont plus matures dans le cadre de l'IVUS par rapport à l'OCT.

## Revue bibliographique

La comparaison des techniques d'angioscopie, IVUS et OCT, chez des patients présentant un infarctus du myocarde aigu a montré que l'OCT présente de meilleures performances pour identifier les plaques responsables de l'événement aigu par rapport au deux autres techniques (Kubo *et al.* 2007) et pourrait donc jouer un rôle dans les décisions de prise en charge thérapeutique (choix de la méthode de revascularisation) lors d'un ACS (Holmes *et al.* 2013). Un document de consensus quant à l'utilisation de l'OCT met toutefois en avant la nécessité de davantage de validations, notamment quant à la détection de la vulnérabilité des plaques et la nécessité de développer davantage de méthodologies de post-traitement des images et des séquences d'images (Prati *et al.* 2010).

L'IVUS, incluant l'analyse en radiofréquence ou histologie virtuelle (Nair *et al.* 2002), a été utilisée dans une étude prospective multi-centrique récente (PROSPECT) sur une cohorte de 697 patients (Stone *et al.* 2011). Cette étude a montré que la classification morphologique des plaques à partir de ces acquisitions est prédictive de l'incidence d'événements coronariens associés (Figure 17) ; en particulier il a été montré que les plaques présentant une sténose > 70 %, une surface de section luminale < 4 mm<sup>2</sup> et identifiés comme TCFA par VH-IVUS sont associés à une incidence de MACE de 18.2 % à 3.4 ans.

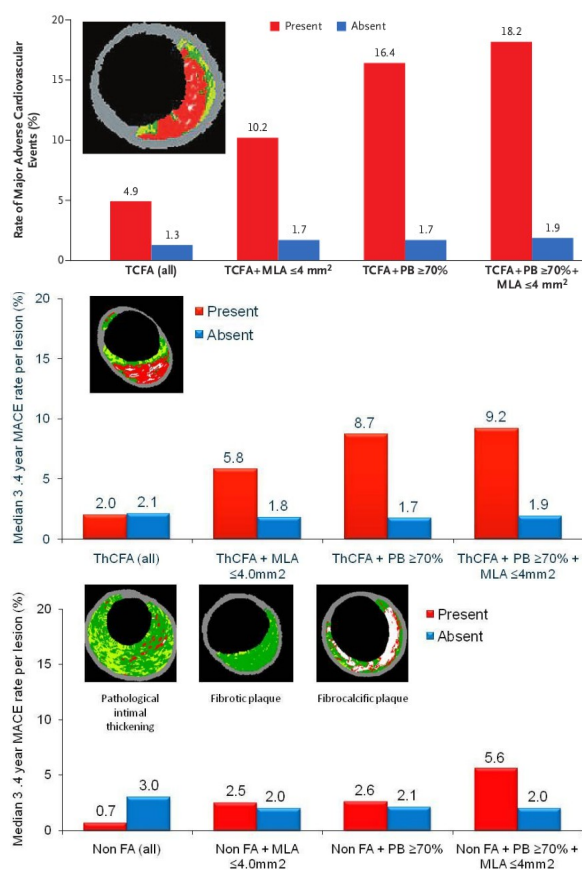


Figure 17. Taux d'événements cardiovasculaires majeurs (MACE) lors d'un suivi médian de 3.4 ans à la suite d'un ACS associé aux plaques non responsables de l'ACS initial. Ces plaques sont classées, par analyse spectrale de signal IVUS, en plaques d'athérome à mince capsule fibreuse (TCFA, n = 595, haut), plaques d'athérome à capsule fibreuse épaisse (ThCFA, n = 1005, milieu) et plaques non athéromateuses (présentant un épaissement intimal pathologique, n = 1005, fibreuses, n = 71, ou fibrocalciques, n = 33, bas).

Dans la population étudiée, la prévalence des TCFA, ThCFA et des plaques non athéromateuses est de 47 %, 68 % et 68 %, respectivement.

L'imagerie IVUS a également permis de discriminer au sein de ces plaques celles présentant une aire luminale minimale (MLA, *minimal luminal area*) ≤ 4 mm<sup>2</sup> et une sténose luminale (PB, *plaque burden*) ≥ 70 % ; le taux d'incidence des MACE est montré pour les plaques en fonction de la présence ou de l'absence de ces caractéristiques pour les différentes catégories de plaques. (Stone *et al.* 2011)

**Imagerie moléculaire invasive.** L'utilisation de sondes NIRF activables en présence de protéases (cathepsines) a montré la possibilité d'imager l'activité protéolytique des plaques par cette méthodologie dans un modèle de lapin (Jaffer *et al.* 2008; Thukkani et Jaffer 2013).

### **3.4 Imagerie non invasive**

Une méthodologie d'imagerie non-invasive pourrait être appliquée à plus grande échelle par rapport à l'imagerie invasive ; cette approche peut être particulièrement adaptée afin de re-classifier les individus à risque cardiovasculaire intermédiaire au sein de groupes à faible ou haut risque cardiovasculaire.

L'imagerie non-invasive peut être anatomique. Dans ce cas, on s'intéresse à la charge athéromateuse globale ou à la morphologie des plaques d'athérome afin d'estimer leur vulnérabilité sur la base de critères accessibles par cette imagerie. L'imagerie moléculaire permet quant à elle de cibler des processus biologiques particuliers qui reflètent la vulnérabilité des plaques. Le domaine de recherche portant sur l'imagerie de l'athérosclérose est un domaine de recherche particulièrement actif ; plusieurs revues récentes de qualité ayant trait à ce domaine de recherche sont parues récemment (Quillard et Libby 2012; Joshi *et al.* 2012; Camici *et al.* 2012; Gallino *et al.* 2012; Tawakol, Narula, et Jaffer 2013).

#### **3.4.1 Imagerie anatomique**

Tandis que l'imagerie invasive (notamment en IVUS et OCT) permet la visualisation des plaques et des artères coronaires pathologiques assez finement pour déterminer la taille et la composition des lésions ainsi que le remodelage vasculaire, l'imagerie non-invasive est plus limitée. Les modalités majeures déjà largement utilisées dans le cadre d'essais cliniques de grande ampleur sont la tomodensitométrie, notamment pour l'appréhension de l'amplitude des calcifications coronaires par CACS (*coronary artery calcium score*) ainsi que l'évaluation de la lumière et de la paroi artérielle par CCTA (*coronary computed tomography angiography*) ; l'échographie, pour l'évaluation des atteintes des artères carotides, et notamment l'épaisseur intima-média (CIMT, *carotid intima-media thickness*) comme marqueur de la charge d'athérosclérose globale ; et enfin l'MRI, qui permet l'obtention d'images présentant un bon contraste au sein de tissus mous (avec ou sans injection d'agent de contraste MRI) et l'évaluation de la lumière et la paroi des vaisseaux par MRA (*magnetic resonance angiography*)

##### **3.4.1.1 Imagerie des calcifications coronaires**

La calcification des artères coronaires peut être mise en évidence par tomodensitométrie (CACS,

## Revue bibliographique

*coronary artery calcium scoring*). Au début des années 1990 une méthode de quantification des calcifications de la paroi des artères coronaires identifiées en tomodynamométrie a été proposée par Agatston et Janowitz (Agatston *et al.* 1990). Plusieurs raffinements à cette méthode ont été proposés (Callister *et al.* 1998; C. Hong *et al.* 2002; Qian *et al.* 2010). Cette méthode repose sur la mesure de la densité et de l'étendue des calcifications au niveau de l'arbre coronaire, évalués par EBCT ou MSCT (Nasir *et al.* 2003).

Le CACS est un indicateur de la charge athérosclérotique globale. Une méta-analyse des études cliniques présentant une évaluation par CACS a conduit à plusieurs conclusions (Greenland *et al.* 2007). La prévalence des calcifications chez les sujets jeunes (< 40 ou 50 ans pour les hommes et les femmes respectivement) est faible. L'absence de calcification (CACS = 0) est liée à une très faible incidence de CAD, démontant une bonne valeur pronostique négative. Le risque relatif de CAD augmente, avec des valeurs de CACS de 0-400, de 400-1000 et > 1000, après ajustement des autres facteurs de risque cardiovasculaires. Il en résulte que l'évaluation du CACS est considérée

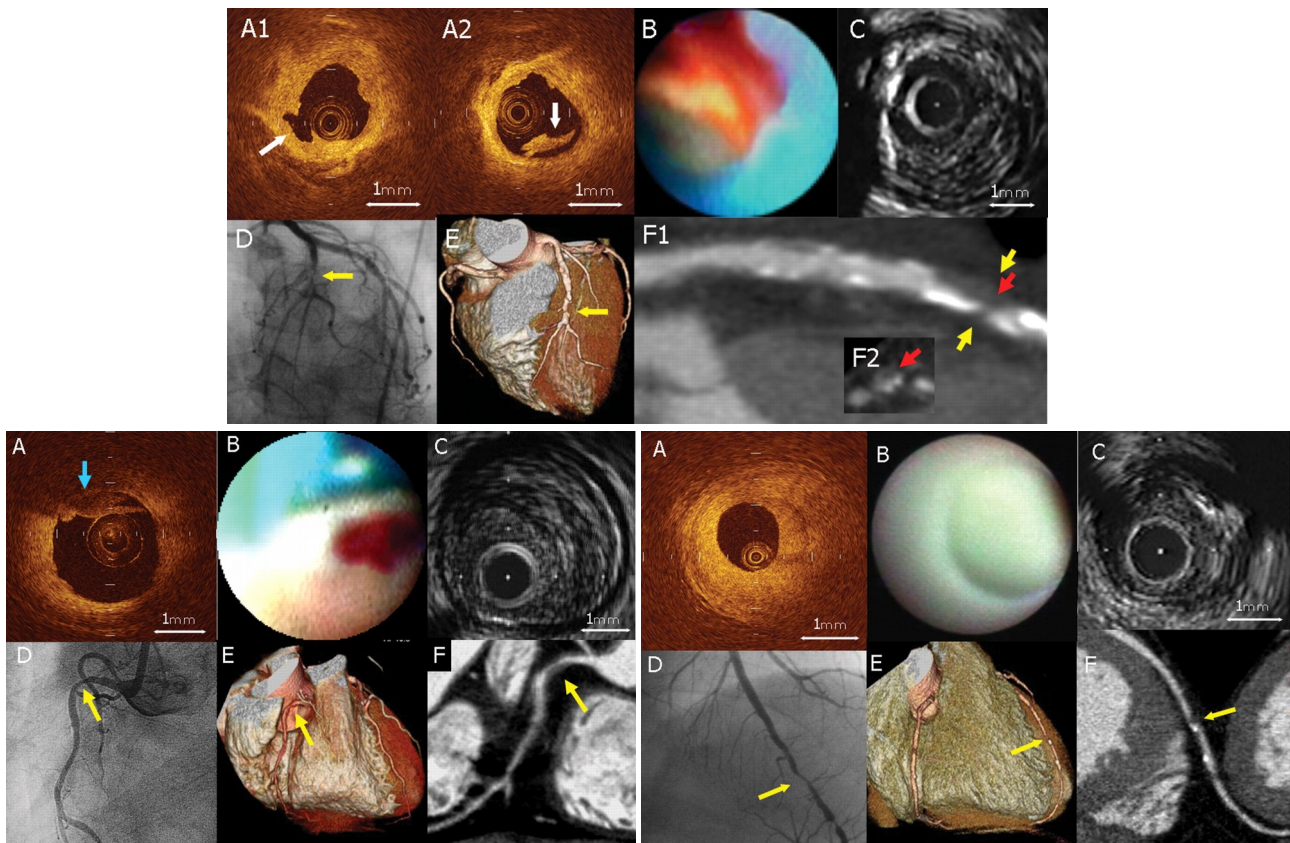


Figure 18. Plaque présentant une rupture de capsule fibreuse (en haut), plaque non-rupture responsable d'un ACS (en bas, à gauche) et plaque stable (en bas, à droite) visualisées suivant plusieurs modalités d'imagerie : OCT (A), angioscopie (B), IVUS (C), angiographie (D) et CCTA – en rendu volumique (E) et en reformation multiplanaire (F). (Ozaki *et al.* 2011)

comme raisonnable (classe de recommandation IIa/b, niveau de preuve B) pour l'évaluation du risque cardiovasculaire des sujets asymptomatiques à risque intermédiaire (Greenland *et al.* 2010).

#### **3.4.1.2 Imagerie en angiographie par tomодensitométrie.**

L'angiographie par tomодensitométrie (CCTA, *coronary computed tomography angiography*) permet l'identification de plaques individuelles et l'évaluation de leur vulnérabilité. Il a été montré que les plaques présentant une faible atténuation (< 30 HU), associée à une large plage lipidique et un faible contenu en fibres, sont associées aux ACS (Motoyama *et al.* 2007; Motoyama *et al.* 2009). Cependant, il a été montré que les plaques responsables de ACS secondaires à un phénomène d'érosion endothéliale ne peuvent pas être distingués des plaques stables par imagerie CCTA (Figure 18) (Ozaki *et al.* 2011).

#### **3.4.1.3 Imagerie échographique**

L'imagerie échographique des artères carotides en mode bidimensionnel (B-mode) permet d'apprécier l'épaisseur intima-média (CIMT, *carotid intima-media thickness*) mais également d'identifier des plaques carotidiennes individualisées tandis que l'analyse Doppler permet d'évaluer les perturbations de flux.

La mesure de la CIMT a été développée comme facteur indicatif de la charge athérosclérotique (Touboul *et al.* 2012). Cette mesure se fait de façon standardisée sur la paroi profonde de l'artère carotide commune au minimum à 5 mm en amont de la bifurcation carotidienne ; elle est réalisée entre les interfaces échogènes lumière vasculaire-intima et média-adventice, parallèles en absence de plaque. Cette mesure est typiquement comprise entre 0.6 et 0.9 mm. Les plaques sont identifiées par une protrusion luminale de 0.5 mm ou de 50 % de l'épaisseur intima-média adjacente, ou un épaississement de 1.5 mm minimum.

Plusieurs études ont montré une association, indépendante des facteurs de risque traditionnels, entre l'augmentation de la CIMT et l'incidence de CAD (Lorenz *et al.* 2007) ainsi qu'avec la présence de plaques carotidiennes (Belcaro *et al.* 2001). Il en résulte que l'évaluation de la CIMT est considérée comme raisonnable (classe de recommandation IIa, niveau de preuve B) dans le cadre de l'évaluation du risque cardiovasculaire de sujets asymptomatiques (Greenland *et al.* 2010). Plus récemment, une méta-analyse a montré l'absence de preuve d'association entre la progression de la CIMT et le risque cardiovasculaire (Lorenz *et al.* 2012).

Similairement à l'IVUS, l'échographie permet l'analyse des plaques d'athérome carotidiennes sur la base de leur échogénicité, permettant ainsi d'apprécier le caractère fibreux ou lipidique des plaques,

ainsi que leur calcification (Dauzat *et al.* 2013). L'utilisation de produit de contraste vasculaire permet une meilleure délimitation des plaques mais aussi l'appréciation de la néo-vascularisation (Feinstein 2004; Coli *et al.* 2008). Récemment, une méta-analyse a montré que l'évaluation de la morphologie des plaques carotidiennes permet une meilleure prédiction de la maladie coronaire que la CIMT (Inaba, Chen, et Bergmann 2012).

Dans le cas d'atteintes cérébrovasculaires symptomatiques, l'évaluation par échographie Doppler des perturbations du flux associé aux lésions fait partie des recommandations cliniques (Thapar *et al.* 2013).

### 3.4.1.4 Imagerie par MRI

L'imagerie MRI est principalement utilisée pour l'évaluation des conséquences ischémiques postérieures à l'événement coronaire (Florian *et al.* 2011), ce qui dépasse le cadre de cette revue. Cependant, comme mentionné dans le rapport du groupe de travail ACCF/AHA sur l'évaluation du risque cardiovasculaire chez le patient asymptomatique (Greenland *et al.* 2010), l'utilisation de diverses séquences MRI peut permettre l'évaluation de l'athérosclérose à différents sites vasculaires. Toutefois, quelle que soit la méthodologie, en l'absence de validation à large échelle par des études prospectives multi-centriques, le niveau de preuve de ces procédures reste insuffisant (C) pour être recommandé en usage clinique.

La visualisation des plaques carotidiennes en MRI en présence de gadolinium a été décrite comme permettant d'appréhender la taille du cœur lipidique (J. Cai *et al.* 2005), la vascularisation intra-plaque (suivant une séquence spécifique) (Kerwin *et al.* 2003) et l'intégrité de la capsule fibreuse en relation avec les événements cérébrovasculaires (Yuan *et al.* 2002). L'imagerie des artères coronaires est plus compliquée du fait de plus leurs petites dimensions et des mouvements de ces vaisseaux. L'angiographie par MRI (MRA, *magnetic resonance angiography*), qui présente un certain nombre d'avantages par rapport à l'angiographie aux rayons X (procédure non irradiante et non invasive), permet l'identification d'atteintes sténosantes tri-tronculaires et du tronc commun de l'artère coronaire gauche (W. Y. Kim *et al.* 2001). Les séquences d'images en sang noir (*black blood*), obtenues en l'absence de produit de contraste, permettent une meilleure appréhension des parois vasculaires (Fayad *et al.* 2000) et du remodelage excentrique (Miao *et al.* 2009). L'étude par Miao *et al.* (Miao *et al.* 2009) présente des résultats obtenus dans le cadre de l'étude MESA (*Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*), utilisant des scanner 1.5 T avec *gating* à l'ECG permettant l'obtention d'images avec une résolution spatiale axiale de ~ 0.8 mm.

Un autre développement de l'imagerie MRI consiste en l'utilisation d'agents de contraste ciblés afin de réaliser l'imagerie moléculaire de la vulnérabilité des plaques (voir ci-dessous).

### 3.4.2 Imagerie moléculaire

L'imagerie moléculaire repose sur l'utilisation d'agents de contraste ciblant un processus moléculaire spécifique. L'agent de contraste peut être détecté par différentes modalités (optique, ultrasons, MRI, SPECT, PET), bien que du fait de leur haute sensibilité, les modalités d'imagerie nucléaire et, dans une moindre mesure, le MRI soient plus particulièrement adaptées. Dans cette partie, les agents de contraste développés pour l'imagerie moléculaire de l'athérosclérose seront présentés suivant le mécanisme moléculaire ciblé et pas suivant la modalité d'imagerie employée.

Les mécanismes moléculaires utilisés par les phénomènes inflammatoires sont particulièrement étudiés puisque ces phénomènes représentent un critère majeur de vulnérabilité. ; on peut distinguer les approches visant à cibler les cellules inflammatoires et en particulier les macrophages, le type cellulaire le plus abondant des plaques, les molécules d'adhésion, impliquées dans le recrutement des cellules inflammatoires, ou d'autres molécules surexprimées dans le contexte inflammatoire. D'autres phénomènes également liés à la vulnérabilité des plaques, dont l'accumulation de lipides, l'apoptose, la néovascularisation, l'hémorragie intra-plaque la protéolyse, l'oxydation et la calcification, peuvent également être ciblés.

L'imagerie de la thrombose, qui répond à un problème clinique distinct, n'est que succinctement évoquée et l'imagerie visant à visualiser les défauts de perfusion et l'ischémie myocardique consécutifs de la thrombose intra-vasculaire n'est pas traitée ici.

#### 3.4.2.1 Macrophages

La présence d'une capsule fibreuse présentant une forte inflammation, avec notamment une infiltration importante de macrophages, est un critère majeur de vulnérabilité. Deux des techniques d'imagerie moléculaires, considérées comme les plus avancées à ce jour, l'imagerie TEP au [<sup>18</sup>F]-fluorodésoxyglucose (FDG) et l'imagerie MRI aux USPIO (*ultra small superparamagnetic iron oxide*), ciblent les macrophages.

**FDG.** Le FDG est un analogue du D-glucose dans lequel le groupement hydroxyle du carbone 2 du glucose est remplacé par un atome de fluor-18. La biodistribution du FDG reflète le transport et la phosphorylation du glucose (cf. Partie expérimentale : Imagerie). Ce radiopharmaceutique est largement utilisé en oncologie nucléaire pour le suivi de tumeurs malignes présentant un métabolisme glucidique élevé. Il a été montré que les cellules inflammatoires peuvent également

## Revue bibliographique

présenter un métabolisme glucidique important (Kubota *et al.* 1994). Il a donc été postulé que la captation de FDG pourrait permettre de visualiser les plaques d'athérome présentant une inflammation importante et de ce fait vulnérables (Vallabhajosula et Fuster 1997). En analysant des images d'examen PET au FDG réalisées sur indication oncologique, une accumulation de FDG a été observée sur les grandes artères de patients présentant des risques cardiovasculaires (Yun *et al.* 2001; Yun *et al.* 2002). La première étude de FDG sur indication cardiovasculaire a été réalisée par Rudd *et al.* (Rudd *et al.* 2002). Cette étude réalisée sur 8 patients a montré une accumulation de FDG (rapportée à l'intégrale de l'activité sanguine) ~28 % plus importante au niveau des lésions carotidiennes ayant entraîné une manifestation clinique par rapport aux lésions carotidiennes sans conséquences cliniques. De plus, l'analyse autoradiographique d'échantillons d'endartériectomie a montré une colocalisation entre la captation du traceur et les zones riches en macrophages. Cette observation a été confirmée par Tawakol *et al.* (Tawakol *et al.* 2006) avec une franche corrélation ( $r = 0.85$ ;  $p < 0.0001$ ) entre l'infiltration de macrophages sur les plaques obtenues après endartériectomie et la captation focale de FDG au sein de ces plaques. Cependant, ce résultat n'a pas été reproduit dans une étude multicentrique récente, évaluant des artériectomies fémorales (Myers *et al.* 2012). D'autres études ont montré une corrélation entre la captation de FDG dans les carotides et les marqueurs d'inflammation systémique (CRP) (Choi *et al.* 2011; S. J. Yang *et al.* 2013) ou d'inflammation (Graebe *et al.* 2009) ou de vulnérabilité (taille du cœur nécrotique) (Silvera *et al.* 2009) des plaques.

L'imagerie au FDG des artères coronaires se révèle plus compliquée du fait de l'importante captation de FDG par le myocarde, du mouvement cardiaque ainsi que de la faible taille des artères coronaires en comparaison avec d'autres lits artériels où la captation du FDG est étudiée. Néanmoins, les études de Dunphy *et al.* (Dunphy *et al.* 2005) puis, sur une plus large cohorte, de Saam *et al.* (Saam *et al.* 2010) montrent une association entre des facteurs de risque cardiovasculaires et la captation vasculaire de FDG. Un régime riche en matières grasses et pauvre en glucides permet une diminution importante de la captation myocardique de FDG (G. Williams et Kolodny 2008). L'utilisation de ce type de régime permet ainsi de visualiser des lésions athéromateuses au niveau des artères coronaires (Wykrzykowska *et al.* 2009) bien qu'un certain nombre de segments artériels demeurent ininterprétables (Saam *et al.* 2010). Il a récemment été montré que l'utilisation d'héparine permet de potentialiser l'utilisation d'acides gras par le myocarde au détriment des sucres, diminuant davantage la captation de FDG (V. Y. Cheng *et al.* 2012). L'étude par Rogers *et al.* (Rogers *et al.* 2010) effectuée sur 25 patients présentant des ACS a montré

## Revue bibliographique

que la captation de FDG par les plaques coronaires responsables des ACS est  $\sim 50\%$  plus importante que celle des lésions stables, responsables d'angor ou antérieurement revascularisées (Figure 19).

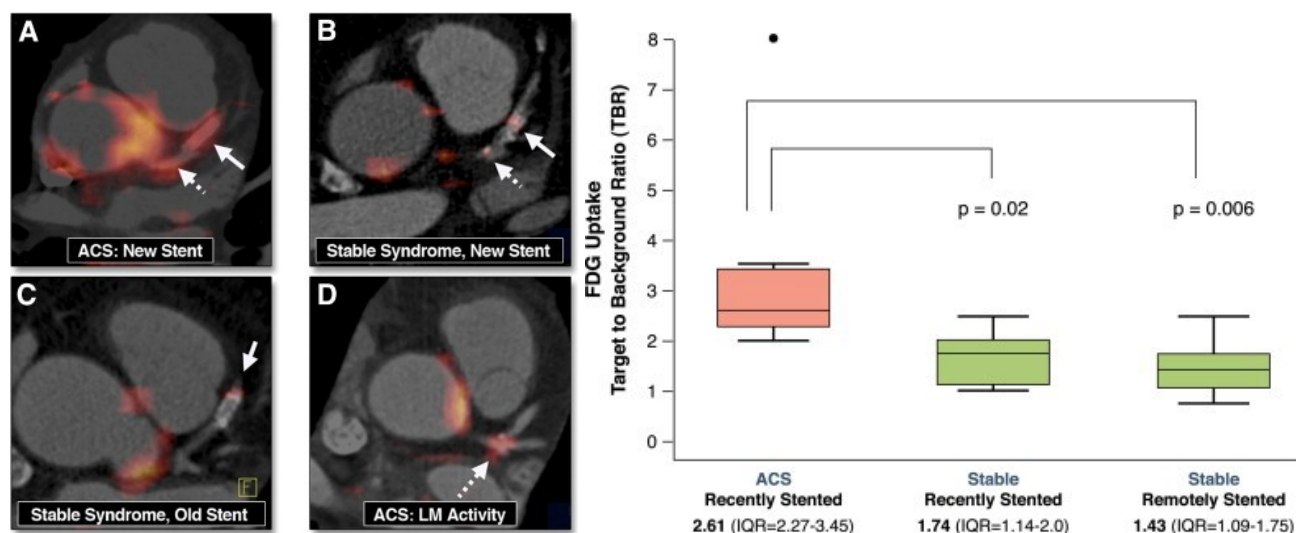


Figure 19. Captation de FDG dans les artères coronaires humaines. A gauche, exemples d'images PET/CT montrant la captation de FDG dans des artères coronaires présentant des plaques responsables de ACS, en présence (A) ou non (D) de stent, et de lésions stables avec un stent récent (B) ou plus ancien (C). A droite, la quantification de la captation de FDG montre une captation significativement plus forte au niveau des plaques coronaires responsable de ACS, par rapport aux plaques stables ayant subi une angioplastie récente ou plus ancienne. LM (*left main coronary artery*), tronc commun de l'artère coronaire gauche. (Rogers *et al.* 2010).

Bien que des essais cliniques de thérapeutiques ait été menés en utilisant la captation de FDG comme critère d'évaluation (sur d'autres territoires vasculaires que les artères coronaires) (Tahara *et al.* 2006), l'utilisation de FDG à plus grande échelle dans l'imagerie de l'athérosclérose coronaire nécessite davantage de validations, tout comme son utilisation dans l'évaluation de l'inflammation systémique comme marqueur de risque cardiovasculaire (Cocker *et al.* 2012).

Le FDG étant déjà largement utilisé en pratique clinique au début des années 2000, son évaluation dans les modèles pré-cliniques d'athérosclérose n'est pas antérieur aux études réalisées chez l'homme. La première étude animale de FDG dans l'évaluation de l'athérosclérose, utilisant une sonde endovasculaire, date de 2001 (Lederman *et al.* 2001) tandis que la première étude utilisant l'imagerie PET non invasive chez le lapin date de 2004 (Ogawa *et al.* 2004). Les premières études utilisant le FDG dans les modèles murins d'athérosclérose datent de 2006 (Laitinen *et al.* 2006; Matter *et al.* 2006) et la première étude d'imagerie utilisant une caméra dédiée à l'étude du petit animal a été présentée en 2007 (Laurberg *et al.* 2007). Ces études sont davantage détaillées et présentées en regard des résultats obtenus dans le cadre de ce travail de thèse en Partie

expérimentale : Imagerie.

**USPIO.** Les USPIO (*ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide*) sont des agents de contraste superparamagnétiques utilisés en MRI. Ces dérivés d'oxyde de fer, présentant une formulation nanométrique (Weissleder *et al.* 1990), sont capables de franchir la barrière endothéliale et sont reconnus par les cellules phagocytaires ; leur évaluation a été menée pour diverses applications (Y.-X. J. Wang, Hussain, et Krestin 2001). Plusieurs formulations d'USPIO ont été mises sur le marché comme agent de contraste MRI, le plus ancien – Lumirem – ayant reçu l'approbation pour commercialisation de la FDA (*Food and Drug Agency*) en 1996 (Leung 2004). Un certain nombre de formulations d'USPIO ont été retirées du marché depuis leur commercialisation en raison de problèmes de toxicité (Y.-X. J. Wang 2011).

Dans le contexte de l'athérosclérose, ces particules permettent l'évaluation du contenu des lésions en cellules phagocytaires reflétant l'état inflammatoire. Alternativement, l'association d'un *coating* et de molécules d'adressage peut permettre à ces particules de présenter un autre comportement, e.g. cibler des molécules d'adhésion (développé dans les sections correspondantes ci-dessous).

L'utilisation de USPIO dans un modèle d'athérosclérose chez le lapin a permis la visualisation de lésions aortiques et a démontré la captation de ces particules par les macrophages des plaques (Ruehm *et al.* 2001). L'imagerie MRI des USPIO a été réalisée chez des patients avant endarterectomie. Le signal MRI a été détecté dans les plaques carotidiennes et a été corrélé *ex vivo* à la présence de macrophages (Kooi *et al.* 2003; Trivedi *et al.* 2006). Dans les carotides toujours, l'utilisation de fortes doses de statines a permis de mettre en évidence une réduction du signal MRI lié aux USPIO (T. Y. Tang, Howarth, *et al.* 2009). Sur un effectif de 20 patients présentant des sténoses carotidiennes, les patients présentant des symptômes d'atteintes cérébrovasculaires ont montré par MRI une captation d'USPIO plus importante que les sujets asymptomatiques (Howarth *et al.* 2009). Récemment, des séquences MRI permettant la visualisation de contraste positif (plus simple à traiter et quantifier) avec des particules superparamagnétiques ont été développées (Sigovan et Canet-Soulas 2013). Cependant, l'imagerie MRI des atteintes coronaires est pour le moment non réalisable en clinique (T. Y. Tang, Muller, *et al.* 2009).

**TSPO.** Les cellules inflammatoires activées présentent un fort niveau d'expression de TSPO (*translocator protein* ou récepteur périphérique aux benzodiazépines) (Canat *et al.* 1993). PK11195, un ligand des TSPOs, a été utilisé en imagerie PET après radiomarquage au carbone-11 ; l'étude sur 32 patients présentant des sténoses carotidiennes a montré une captation plus importante du traceur (et une plus faible atténuation au CT) dans les plaques carotidiennes responsables d'événements

cérébrovasculaires par rapport aux carotides controlatérales (Gaemperli *et al.* 2012).

**CCR2.** Les cellules inflammatoires expriment le récepteur aux chimiokines CCR2 qui a pour ligand MCP-1. La visualisation des plaques d'athérome dans un modèle d'athérosclérose chez le lapin a été réalisée avec la molécule MCP-1 radiomarquée à l'iode-125 (Ohtsuki *et al.* 2001) en imagerie *ex vivo* et en imagerie planaire après radiomarquage au technétium-99m (Hartung *et al.* 2007).

**LOX-1.** LOX-1 est exprimé par différents types cellulaires dans le contexte inflammatoire, notamment les ECs, les SMCs et les macrophages. L'imagerie de LOX-1 a permis l'identification de plaques aortiques dans un modèle d'athérosclérose chez le lapin par utilisation d'un anticorps monoclonal anti-Lox-1 radiomarqué au technétium-99m et imagerie planaire à 24 h p.i. (Ishino *et al.* 2008). Par approche multimodale, l'utilisation de nanoparticules lipidiques couplées à l'indium-111, au gadolinium et à un fluorophore et décorées d'anticorps anti-Lox-1 a également permis la visualisation de lésions athérosclérotiques chez la souris apoE<sup>-/-</sup> par imageries SPECT et MRI, données confirmées *ex vivo* (D. Li *et al.* 2010).

**MSR.** Le récepteur éboueur MSR (*macrophage scavenger receptor*) ou SR-A est exprimé par les macrophages retrouvés dans les plaques d'athérome. Les micelles (ou nanoparticules lipidiques) couplées au gadolinium et associées à des anticorps anti-MSR ont montré une bonne captation par les macrophages *in vitro* (Lipinski *et al.* 2006), et ont permis la visualisation *in vivo* de plaques aortiques de souris apoE<sup>-/-</sup> par imagerie MRI effectuée 24 h post-injection (V. Amirbekian *et al.* 2007).

**CD36.** CD36, fortement exprimé par les macrophages et les SMCs, a été utilisé pour effectuer l'imagerie de plaques aortiques de souris apoE<sup>-/-</sup>. Une étude analogue à celle décrite pour le MSR présente l'imagerie MRI (post-contraste) effectuée 24 h après injection de nanoparticules lipidiques à gadolinium couplées à des anticorps anti-CD36 qui a permis la visualisation de plaques au niveau de la crosse aortique (Lipinski *et al.* 2009).

#### 3.4.2.2 Molécules d'adhésion

Les molécules d'adhésion sont exprimées par les ECs, mais aussi par d'autres types cellulaires des plaques, et participent au recrutement des cellules inflammatoires.

**P-sélectines.** Les sélectines sont impliquées dans les étapes initiales du recrutement leucocytaire, notamment le roulement et la capture secondaire impliquant les thrombocytes activés. L'imagerie des P-sélectines (et d'autres molécules d'adhésion) a été effectuée par tCEUS (Lindner 2002). Plus récemment, l'utilisation de USPIOs couplées à un anticorps ciblant la P-sélectine (VH10-VUSPIO)

a permis l'imagerie de l'athérosclérose chez la souris apoE<sup>-/-</sup> en MRI (Jacobin-Valat *et al.* 2011).

**VCAM-1.** La molécule d'adhésion VCAM-1 constitue l'une des cibles moléculaires les plus largement étudiées pour l'imagerie de l'athérosclérose. L'imagerie des lésions de la crosse aortique de souris apoE<sup>-/-</sup> a été réalisée par tCEUS avec l'injection de micro-bulles lipidiques porteuses d'anticorps ciblant VCAM-1 (Kaufmann *et al.* 2007). L'imagerie MRI de MPIO ciblant à la fois VCAM-1 et la P-sélectine a montré, dans le sinus aortique de souris apoE<sup>-/-</sup>, une augmentation de signal de 3.5 fois par rapport au contrôle (McAteer *et al.* 2008). L'association d'un peptide ciblant VCAM-1 à des USPIO donne un agent d'imagerie MRI (USPIO-R832) permettant de visualiser les plaques de souris apoE<sup>-/-</sup> à 24 h p.i. (Burtea *et al.* 2012). L'utilisation de nanobodies ciblant VCAM-1 et radiomarqués au technétium-99m permet la visualisation de plaques d'athérome chez la souris apoE<sup>-/-</sup> en imagerie SPECT (Broisat *et al.* 2012). Des peptides sélectionnés par phage-display et exprimés en surface de nanoparticules magnéto-fluorescentes ont été utilisés pour réaliser l'imagerie de VCAM-1 dans des lésions athéromateuses de souris apoE<sup>-/-</sup>, par MRI (Kelly *et al.* 2005; Nahrendorf *et al.* 2006) et par PET, alors sous forme tétramérique et radiomarké au fluor-18 (Nahrendorf *et al.* 2009).

D'autres molécules peptidiques, décrites comme ligands de VCAM-1 (Ling *et al.* 2000) ou leurs dérivés, ont été évaluées pour l'imagerie de VCAM-1 au sein du laboratoire (Broisat *et al.* 2007; Dimastromatteo 2010) ; ces molécules sont décrites dans la Partie expérimentale : Imagerie.

### 3.4.2.3 Activité protéolytique

L'imagerie de l'activité enzymatique liée aux cellules inflammatoires présente l'intérêt de rendre compte de l'état inflammatoire des plaques, mais aussi, notamment dans le cas de l'imagerie des MMPs, d'imager directement le processus de dégradation de la capsule fibreuse menant à son amincissement.

**MMP.** Les MMPs dégradent la ECM et participent notamment à l'amincissement et à la fragilisation de la capsule fibreuse ; l'activité MMP est liée aux cellules inflammatoires. Un agent de contraste MRI marqué au gadolinium, P947, a été évalué sur des modèles pré-cliniques d'athérosclérose et sur tissu humain issu d'endartérectomies (Lancelot *et al.* 2008; Vardan Amirbekian *et al.* 2009; Ouimet *et al.* 2012). L'imagerie SPECT des MMPs a également été réalisée dans le modèle de souris apoE<sup>-/-</sup> avec ligature carotidienne avec un inhibiteur des MMPs radiomarké : [<sup>123</sup>I]-CGS 27023A (Schäfers *et al.* 2004); cette molécule a également été évaluée pour l'imagerie PET après marquage au fluor-18 (Breyholz *et al.* 2007). Le [<sup>111</sup>In]-RP782 a été utilisé pour l'imagerie SPECT des MMPs dans un

modèle de remodelage du myocarde en post-infarctus (H. Su *et al.* 2005) dans un modèle d'athérosclérose accéléré (Zhang *et al.* 2008), ainsi que dans l'aorte de souris apoE<sup>-/-</sup> (Razavian *et al.* 2011). Similairement, un autre inhibiteur des MMPs, RP805 a également été évalué comme agent d'imagerie dans des modèles murins d'athérosclérose après radiomarquage au technétium-99m (Ohshima *et al.* 2009). Ses performances dans le suivi thérapeutique expérimentale ont été évaluées (Fujimoto *et al.* 2008) et comparées à l'annexine V (Luma *et al.* 2010) (voir ci-dessous). L'imagerie de la MMP membranaire MT1-MMP a été réalisée dans un modèle d'athérosclérose chez le lapin par imagerie planaire 24 h après injection d'anticorps anti-MT1-MMP radiomarqué au technétium-99m (Kuge *et al.* 2010). D'autres traceurs activables – basés sur la pénétration cellulaire – pour l'imagerie nucléaire (Watkins *et al.* 2009) ou MRI (Olson *et al.* 2010) de l'activité MMPs sont également évalués, dans d'autres contextes que l'athérosclérose.

Par imagerie SPECT, un inhibiteur de MMP à large spectre radiomarqué au technétium-99m a permis l'imagerie de l'athérosclérose dans un modèle de lapin (Hartung *et al.* 2009).

Globalement, l'approche visant à imager en imagerie nucléaire les MMPs par utilisation de petites molécules (souvent décrit comme inhibiteurs de MMPs) semble plus aisément transférable en clinique par rapport à l'utilisation d'anticorps entiers, qui présentent une cinétique sanguine bien plus lente nécessitant un temps d'imagerie tardif ce qui implique, entre autre, une dosimétrie élevée.

L'imagerie de sondes NIRF activables par clivage enzymatique permet la visualisation directe de l'activité protéolytique, comme déjà mentionné pour l'imagerie intravasculaire. L'imagerie par FMT d'une sonde constituée de la séquence substrat de gélatinase, dont le clivage enzymatique augmente la fluorescence de 200 fois *in vitro*, permet la détection de lésions aortiques de souris apoE<sup>-/-</sup> (J. Deguchi *et al.* 2006).

**Cathépsines.** Les cathépsines sont des enzymes lysosomiales abondantes dans les cellules inflammatoires. L'imagerie FMT de sonde NIRF activée par l'action de la cathépsine B permet la visualisation de l'athérosclérose dans un modèle murin (J. Chen *et al.* 2002).

### 3.4.2.4 Accumulation de lipides et oxydation

La taille du cœur lipidique est un facteur de vulnérabilité ; ce cœur est principalement constitué de lipides provenant de LDL. L'oxydation des LDL retenues dans l'espace sous-endothélial est responsable de la réponse inflammatoire des plaques et peut donc être une cible pertinente pour l'imagerie de la vulnérabilité associée à l'inflammation.

**LDL.** Les LDL sont les principales lipoprotéines athérogènes. Des LDLs natifs marqués au

technétium-99m (Lees *et al.* 1988) et des oxLDL marqué au technétium-99m (Iuliano *et al.* 1996) ont permis la visualisation de l'athérosclérose au niveau des artères carotides chez l'homme dans le cadre d'études pilotes, cependant la cinétique de ces traceurs n'est pas compatible avec leur utilisation en routine clinique. Un peptide radiomarqué à l'iode-125 spécifique de oxLDL a montré en imagerie *ex vivo* une bonne fixation dans les plaques aortiques de lapin WHHLMI, corrélée au degré d'inflammation des lésions (Nishigori *et al.* 2013)

**MDA.** Le malondialdéhyde (MDA) est un épitope d'oxydation notamment présent sur les résidus lysine de l'apoB. L'utilisation d'anticorps spécifiques de cet épitope radiomarqué à l'iode-125 a permis de mettre en évidence une fixation sur les plaques de lapin WHHL *ex vivo* ainsi qu'en imagerie planaire (Tsimikas *et al.* 1999), modulée par l'effet de régime (Torzewski *et al.* 2004). La séquence peptidique IK-17 est spécifique de l'épitope MDA ; son radiomarquage à l'iode-125 donne un radiotracer qui a montré *ex vivo* une accumulation dans l'aorte de souris LDLR<sup>-/-</sup> (Briley-Saebo *et al.* 2008; Briley-Saebo *et al.* 2012). L'imagerie MRI de lésions de souris apoE<sup>-/-</sup> a été réalisée par utilisation de LUSPIO (*lipid-coated ultra-small superparamagnetic iron particles*) conjugués avec des anticorps ciblant deux épitopes d'oxydation : MDA et phospholipides oxydés (Briley-Saebo *et al.* 2012).

### 3.4.2.5 Apoptose

L'apoptose est impliquée à plusieurs niveaux dans la vulnérabilité. L'apoptose des SMCs de la capsule fibreuse est impliquée dans son amincissement tandis que l'apoptose des macrophages (associée à une efférocytose inefficace) participe à la formation d'un coeur lipidique volumineux.

**Annexine V.** Les éléments apoptotiques sont caractérisés par une expression de phosphatidylsérine sur le feuillet externe de la membrane plasmique ; ce phospholipide est reconnu par l'annexine V.

Dans un modèle d'athérosclérose induite chez le lapin par désendothélialisation de l'aorte, l'utilisation d'annexine V marquée au technétium-99m a montré à 2 h p.i. une captation 9.3 fois supérieure dans les lésions par rapport au tissu artériel sain, corrélée à l'infiltration de macrophages, et un rapport d'activité lésion sur sang de 3.0 (Kolodgie, Petrov, *et al.* 2003). La spécificité de cette imagerie a été démontrée par la réduction de la captation dans les lésions en présence d'un inhibiteur de caspase (Sarai *et al.* 2007) et en présence d'un traitement aux statines (Hartung *et al.* 2009). Une étude clinique pilote a démontré la possibilité de visualiser les plaques d'athérome carotidiennes responsables d'événements cérébrovasculaires récents avec [99mTc]-Annexine V (Kietselaer *et al.* 2004).

**Caspase.** L'activation des caspases est impliquée dans l'apoptose (Galluzzi *et al.* 2011). Des sondes destinées à l'évaluation de cette activité par imagerie nucléaire ont été développées mais n'ont pas été évaluées dans le contexte de l'athérosclérose expérimentale (Bauer *et al.* 2005; Aloya *et al.* 2006).

#### 3.4.2.6 Néovascularisation et hémorragie intra-plaque

Les éléments sanguins provenant des vaisseaux présents dans les plaques avancées sont associés à une augmentation de la taille du coeur lipidique (Kolodgie, Gold, *et al.* 2003). Ainsi, l'imagerie de la vascularisation des plaques – déjà réalisée dans les artères carotides par CEUS – et des produits issus de l'hémorragie intra-plaque est pertinente pour rendre compte de la vulnérabilité.

**Néovaisseaux.** L'intégrine  $\alpha V\beta 3$  est spécifique des éléments néo-vasculaires et le peptide RGD, en particulier dans sa forme cyclique est spécifique de cette intégrine. La détection de la néovascularisation en imagerie nucléaire par utilisation de RGD radiomarqué a été réalisée dans le cadre de l'imagerie oncologique (Haubner *et al.* 2001) et par la suite adaptée à l'imagerie de l'athérosclérose (Decristoforo *et al.* 2006; Haubner 2006). Ce motif peptidique a également été adapté à l'imagerie MRI et tCEUS, par couplage sur des nanoparticules marquées au gadolinium (Winter *et al.* 2003) et sur des micro-bulles (Leong-Poi *et al.* 2005), respectivement. Des constructions multivalentes de RGD cyclique ont également été évaluées pour l'imagerie de l'angiogenèse, mais pas dans des modèles d'athérosclérose (Sancey *et al.* 2007).

#### 3.4.2.7 Calcification

Bien que le caractère calcifié des plaques soit identifiable par imagerie anatomique et rende davantage compte de lésions stables, reflétant la charge athérosclérotique globale (CACs), le processus de calcification et la présence de calcifications focales est associé à la vulnérabilité (Ehara *et al.* 2004).

Le processus de calcification actif peut être visualisé par imagerie moléculaire, notamment par imagerie PET après injection de [ $^{18}\text{F}$ ]-fluorure de sodium ([ $^{18}\text{F}$ ]-NaF). Dweck *et al.* (Dweck *et al.* 2012) ont rapporté une captation coronaire importante de [ $^{18}\text{F}$ ]-NaF chez les sujets présentant un historique d'événements coronaires et un score de risque élevé.

### 3.5 Conclusion sur l'imagerie

Tandis que l'imagerie anatomique est déjà largement validée par d'importants essais cliniques (e.g. PROSPECT, MESA) et a démontré une valeur pronostique additionnelle par rapport aux facteurs de risques traditionnels, l'imagerie moléculaire n'en est qu'à un stade précoce de son développement ou

## Revue bibliographique

de validation. L'utilisation du PET-FDG pour l'imagerie nucléaire de la plaque d'athérome vulnérable est actuellement la méthode d'imagerie de l'athérosclérose vulnérable la plus avancée, mais n'est toujours pas validée dans le cadre d'importants essais cliniques (multi-centriques) et l'évaluation récente de thérapeutiques avec le FDG n'a pas permis de discriminer les groupes traités et contrôles sans qu'il ait toutefois put être établi si cette observation était liée à l'absence d'efficacité du traitement ou au manque de sensibilité de l'imagerie PET-FDG. Des études prospectives, telle que l'étude BioImage (Muntendam *et al.* 2010), qui prévoit notamment l'évaluation d'une cohorte d'individus asymptomatiques à haut-risque de CAD par imagerie CCTA, MRI et PET-FDG, devrait permettre d'évaluer l'intérêt de ces différentes modalités d'imagerie dans l'évaluation du risque cardiovasculaire.

## Partie expérimentale : Biomécanique

### 1 Introduction

La majorité des accidents coronaires causés par thrombose murale associée à des plaques d'athérome sont liés à la rupture physique de la capsule fibreuse de ces lésions (Falk *et al.* 2013). Il a été montré par analyse biomécanique menée à partir de coupes histologiques d'artères coronaires humaines pathologiques que l'élévation de la contrainte pariétale circonférentielle est associée aux sites de rupture de la capsule fibreuse (Richardson, Davies, et Born 1989; G. C. Cheng *et al.* 1993).

La rupture de plaque est un phénomène controversé dans le très répandu modèle murin d'athérosclérose : la souris déficiente en apolipoprotéine E ou apoE<sup>-/-</sup> (Schwartz *et al.* 2007; Jackson *et al.* 2007). L'étude développée dans ce chapitre présente l'évaluation des contraintes pariétales au sein de ce modèle murin d'athérosclérose. Elle s'articule autour de l'évaluation des propriétés mécaniques des constituants de l'aorte murine présentant des lésions athéromateuses et, en s'appuyant sur cette évaluation, de la modélisation par la méthode des éléments finis des contraintes pariétales suivant un protocole permettant la prise en compte des contraintes résiduelles.

#### 1.1 Bases de biomécanique

##### 1.1.1 Quelques notions

En mécanique des milieux continus, la contrainte est une grandeur décrivant les efforts intérieurs mis en jeu au sein d'un milieu déformable. C'est une grandeur homogène à une pression, i.e. une force par unité de surface (exprimée en N·m<sup>-2</sup> ou Pa).

Un matériau soumis à une contrainte peut se déformer suivant la direction de la contrainte. Cette déformation  $\varepsilon$  (grandeur sans unité), ou étirement  $\lambda$  ( $\lambda = 1 + \varepsilon$ ), est liée à l'amplitude de la contrainte ainsi qu'aux propriétés mécaniques du matériau. Dans le cas de matériaux élastiques, homogènes et isotropes, la relation entre la contrainte ( $\sigma$ ) et la déformation ( $\varepsilon$ ) est décrite en tout point et suivant toutes les directions par la loi de Hooke :

$$\sigma = E \varepsilon \quad (1)$$

avec E, le module de Young, qui est homogène à une pression (exprimé en kPa) et rend compte de la rigidité du matériau étudié suivant l'axe de l'effort appliqué. De pair avec le module de Young, le coefficient de Poisson ( $\nu$ ) permet de caractériser le matériau considéré, en décrivant son comportement suivant la direction perpendiculaire à l'effort appliqué et donc sa compressibilité (avec pour les matériaux incompressibles :  $\nu = 0.5$ ). Les liquides sont considérés comme quasi

## Partie expérimentale : Biomécanique

incompressibles, or les matériaux biologiques sont largement constitués d'eau. Il en résulte que l'on peut considérer les matériaux biologiques, y compris les éléments artériels, comme quasi-incompressibles (Carew, Vaishnav, et Patel 1968).

Dans le cas de matériaux parfaitement élastiques, lorsqu'une contrainte est appliquée la déformation est instantanée. Ce n'est pas le cas de matériaux présentant une composante visqueuse (viscoélasticité), auquel cas la déformation évolue dans le temps.

La réponse élastique est caractérisée par une déformation réversible. Elle n'est valable que pour un domaine de contrainte donnée, en fonction du matériau considéré. Au delà, on assiste à une déformation plastique (ou fluage) pour laquelle le matériau considéré est modifié de façon irréversible (déformation plastique) ; ce domaine de ductilité est également variable en fonction des matériaux. Une contrainte supérieure aboutit à la fracture du matériau et à la propagation de la fissure qui dépend de la ténacité du matériau.

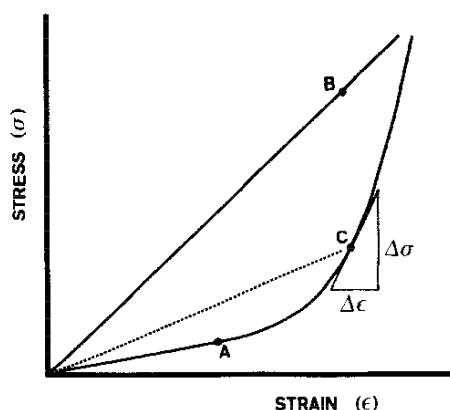


Figure 1. Courbes schématiques d'une réponse non linéaire (courbe passant par A et C) et d'une réponse linéaire (droite passant par B), présentant la contrainte ( $\sigma$ , *stress*) en fonction de la déformation ( $\epsilon$ , *strain*). En cas de réponse linéaire, le rapport  $\sigma/\epsilon$  constant est égal au module de Young  $E$ . Dans une réponse non linéaire,  $\sigma/\epsilon$  augmente avec la déformation. Pour une déformation ou contrainte donnée, la rigidité du matériau peut-être décrit par  $\Delta\sigma/\Delta\epsilon$ , qui définit le module d'élasticité incrémental  $E_{inc}$ . Pour caractériser le comportement du matériau en tout point, les fonctions densité d'énergie de déformation sont utilisées. (Dobrin, 1978)

Le tissu artériel soumis à une contrainte présente une déformation réversible mais pas nécessairement proportionnelle à la contrainte. Il s'agit d'un comportement non linéaire, définissant les matériaux hyper-élastiques (Figure 1). Une déformation donnée peut être liée à la contrainte par le module d'élasticité incrémental ( $E_{inc}$ ), cependant ce module varie avec la déformation. Pour décrire plus largement la relation entre contrainte et déformation, les fonctions densité d'énergie de déformation sont utilisées. Le comportement de matériaux homogènes et isotropes est décrit, sous l'hypothèse d'incompressibilité, par la fonction densité d'énergie de déformation de type Néo-Hookéen :

$$W = \frac{E}{6} (I_1 - 3) \quad (2)$$

## Partie expérimentale : Biomécanique

avec  $W$  l'énergie de déformation,  $E$  le module de Young et  $I_1$  une grandeur caractéristique de la déformation (premier invariant du tenseur de déformation de Cauchy-Green droit).

D'autres modèles (ou lois) de comportement plus complexes ont été proposés pour rendre compte avec plus de justesse du comportement non linéaire du tissu artériel (Demiray 1972; Fung, Fronek, et Patitucci 1979; Delfino *et al.* 1997; Holzapfel 2000; Holzapfel *et al.* 2005), qui présente une augmentation de la rigidité lors de l'inflation de la paroi artérielle, liée à la présence de fibres d'élastine et de collagène (Wolinsky et Glagov 1964) et un comportement anisotrope (variable suivant la direction considérée) lié à l'organisation de ces fibres au sein des tissus suivant des directions préférentielles (Holzapfel 2000).

### 1.1.2 La contrainte pariétale

**Contrainte résiduelle.** En l'absence de toute charge extérieure, il a été montré que les artères présentent un niveau de contrainte non nul. Ceci est notamment montré par l'ouverture d'un anneau artériel isolé suite à une section radiale. L'ouverture de l'anneau traduit la dissipation de ces contraintes résiduelles (Chuong et Fung 1986; Vaishnav et Vossoughi 1987).

**Composant de la contrainte liée au sang.** En conditions physiologiques, la paroi artérielle est sollicitée mécaniquement par la circulation du sang. Celle-ci est responsable de contraintes de cisaillement, parallèles au flux sanguin, mais aussi d'une pression, exercée perpendiculairement à la surface de la paroi (Burton 1954). La pression sanguine est responsable d'une compression radiale de la paroi artérielle mais aussi d'une composante circonférentielle de la contrainte pariétale (Falk, Shah, et Fuster 1995). Cette composante circonférentielle est décrite par la loi de Laplace (Eq. 3) : au sein d'un élément vasculaire parfaitement cylindrique de rayon  $r$ , la présence d'une pression  $P$  exercée par le sang sur la paroi vasculaire d'épaisseur  $h$  est responsable d'une contrainte pariétale circonférentielle  $\sigma$  :

$$\sigma = \frac{P r}{2 h} \quad (3)$$

Dans un élément vasculaire présentant une géométrie plus complexe, l'appréhension des contraintes pariétales nécessite une approche plus complexe, telle que la modélisation en éléments finis.

**Considérations sur la contrainte résiduelle.** Il est intéressant de noter que la présence d'une contrainte extérieure (pression sanguine) tout au long du développement des éléments artériels est impliquée dans leur structuration histologique tendant à minimiser la contrainte pariétale à l'état physiologique (en présence de pression sanguine) (Taber et Eggers 1996; Cardamone *et al.* 2009).

C'est cette structuration qui est responsable de la présence de contraintes résiduelles d'une amplitude non négligeable (Fung et Liu 1989; Greenwald *et al.* 1997). Il a été montré lors de l'étude d'échantillons d'artères coronaires humaines que lorsque ces contraintes résiduelles sont négligées, la contrainte pariétale est surestimée (Ohayon *et al.* 2007).

### 1.1.3 La modélisation en éléments finis

**Méthode des éléments finis.** La méthode des éléments finis est utilisée pour résoudre numériquement des équations aux dérivées partielles qui représentent le comportement dynamique de systèmes physiques (Reddy 2005). Cette approche débute par une étape de segmentation qui discrétise l'espace considéré en un pavage ; les pavés étant les éléments finis. Ces éléments discrets présentent un comportement caractérisé par une équation aux dérivées partielles ; dans le cas de la paroi artérielle, ce sont les fonctions densité d'énergie de déformation. À l'application de contraintes extérieures, le système (auquel des conditions limites ont été attribuées) répond suivant le comportement attribué aux éléments finis, pour converger (par itérations) vers une solution approchée unique. Cette solution présente l'espace segmenté, déformé par la contrainte extérieure, avec en chaque nœud (jonction d'éléments finis) un état défini (contrainte, déformation).

**Application dans le cas de l'athérosclérose.** Dans le cas de l'étude de la contrainte pariétale de vaisseaux athéromateux, l'analyse en éléments finis peut être effectuée à partir d'échantillons d'artères *ex vivo*, (Richardson, Davies, et Born 1989; Loree *et al.* 1992; G. C. Cheng *et al.* 1993; H. Huang *et al.* 2001; Ohayon *et al.* 2007) ou à partir d'acquisitions d'imagerie IVUS (R. T. Lee *et al.* 1993; Ohayon *et al.* 2001; Veress *et al.* 2000) ; dans ces deux cas, l'analyse est limitée à une répartition de contraintes au sein de la paroi vasculaire en deux dimensions. D'autres études ont été réalisées à partir de géométries tridimensionnelles obtenues à partir d'images MRI en utilisant des modèles d'interaction fluide-structure (D. Tang *et al.* 2004; C. Yang *et al.* 2007; Teng *et al.* 2010). La possibilité de dissiper les contraintes résiduelles par ouverture d'un anneau artériel permet d'avoir accès aux données de contraintes résiduelles (Vaishnav et Vossoughi 1987) ; une analyse prenant en compte ce paramètre devra nécessairement être menée à partir d'échantillons tissulaires (Ohayon *et al.* 2007), et non pas sur la base d'acquisitions non invasives ou invasives d'images de la paroi vasculaire.

### 1.1.4 La rupture

Le concept de rupture fait référence à la séparation (perte de continuité) d'un matériau. Cette rupture intervient au-delà d'un seuil de contrainte maximale caractéristique du matériau étudié. La fatigue

d'un matériau est un processus qui modifie les propriétés locales d'un matériau sous l'action de contraintes et déformations variables dans le temps (inférieures aux valeurs limites provoquant l'endommagement macroscopique du matériau) ; cela correspond à une altération microscopique du matériau. La conséquence de la fatigue est un abaissement de la valeur du seuil de rupture (Nalla, Kinney, et Ritchie 2003). Dans le cadre de la plaque d'athérome, la rupture peut survenir en tension, liée à une augmentation de la contrainte circonférentielle, ou en cisaillement (*shear failure*), par délamination liée à l'augmentation des contraintes de cisaillement à l'interface de matériaux concentriques hétérogènes au sein de la plaque (Falk, Shah, et Fuster 1995). Dans les deux cas, la fracture locale engendre une accumulation de contraintes à ses extrémités que la propagation de la rupture de proche en proche jusqu'à la lumière vasculaire permet de dissiper. L'augmentation de contrainte est principalement liée à la pression sanguine qui peut par ailleurs causer la fatigue des constituants de la capsule fibreuse en raison de son amplitude cyclique (Falk, Shah, et Fuster 1995).

### **1.2 Contexte du travail expérimental**

#### **1.2.1 Les apports de l'approche biomécanique sur la vulnérabilité.**

**Contrainte et critères de vulnérabilité.** Des analyses par modélisation en éléments finis réalisées à partir de coupes histologiques d'artères coronaires de patients ayant subi un événement coronaire montrent une élévation de la contrainte pariétale circonférentielle aux sites de rupture de la capsule fibreuse (Richardson, Davies, et Born 1989; G. C. Cheng *et al.* 1993). Les sites de rupture ont également été associés à une élévation de la densité en macrophages (Lendon *et al.* 1991). Ce phénomène est expliqué par une diminution du seuil de rupture liée à l'appauvrissement de la capsule fibreuse en collagène (Burleigh *et al.* 1992) associée à la diminution de synthèse et à la dégradation du collagène en présence de macrophages (cf. Revue Bibliographique et (Fuster *et al.* 2005)). Les critères de vulnérabilité que sont la taille du cœur lipidique et la faible épaisseur de la capsule fibreuse sont liés à l'augmentation de la contrainte dans la capsule fibreuse (Loree *et al.* 1992; M. J. Davies *et al.* 1993; Finet, Ohayon, et Rioufol 2004; Ohayon *et al.* 2008). Ceci est d'autant plus vrai que les composants du cœur nécrotique présentent une faible rigidité responsable d'une redistribution des contraintes dans la capsule fibreuse (Loree, Tobias, *et al.* 1994). Le caractère excentrique des lésions est également associé à une vulnérabilité augmentée (R. T. Lee et Kamm 1994; Ohayon *et al.* 2008). L'analyse d'artères coronaires présentant des lésions rompues a permis de mettre en évidence un seuil de rupture à 300 kPa (G. C. Cheng *et al.* 1993). Une analyse tridimensionnelle, avec une segmentation effectuée à partir d'images MRI de carotides pathologiques et une modélisation des interactions fluide-structure, a montré une valeur de

contrainte critique à 263 kPa pour les plaques rompues contre 132 kPa pour les plaques stables (Teng *et al.* 2010).

**Contrainte résiduelle et vulnérabilité.** Il a été montré que la paroi artérielle présente un niveau non négligeable de contraintes en l'absence de toute contrainte extérieure ; ce sont les contraintes résiduelles (Vaishnav et Vossoughi 1987). Classiquement, les contraintes résiduelles sont négligées lors de l'évaluation des contraintes pariétales, les constructions à partir d'images *in vivo* ou de coupes histologiques ne permettant pas l'évaluation de la contrainte résiduelle. Or il a été montré que ce raccourci est responsable d'une erreur importante dans l'évaluation de la contrainte pariétale. En effet, l'étude par Ohayon *et al.* (Ohayon *et al.* 2007) a montré, à partir d'analyse d'échantillons de tissu coronaire frais pour lequel un état de contrainte résiduel a été déterminé, que les contraintes maximales sont surestimées en négligeant les contraintes résiduelles.

### 1.2.2 Vulnérabilité dans les modèle murins d'athérosclérose

Les critères de vulnérabilité, définis chez l'homme, s'appliquent mal aux lésions de souris qui présentent des morphologies sensiblement différentes (épaisseur de la capsule fibreuse, présence inconstante de cœur lipidique distinct, d'excentricité) (Coleman *et al.* 2006; I. C. Campbell *et al.* 2013). Similairement, bien que les tissus soient constitués de molécules organiques semblables (collagène), leur densité apparaît très variable selon l'espèce considérée, résultant en des propriétés mécaniques hétérogènes (Hayenga *et al.* 2011). Des observations de rupture de plaque ont été rapportées au niveau de l'artère brachio-céphalique (BCA, *brachiocephalic artery*) (Bond et Jackson 2011). Ces observations sont controversées à ce site anatomique (Schwartz *et al.* 2007). L'absence de rupture des lésions de la crosse aortique est plus consensuel.

### 1.3 Objectifs, principe et originalité de l'étude

La souris apoE<sup>-/-</sup> est un modèle d'étude de l'athérosclérose communément utilisé. Tandis que les contraintes pariétales sont étudiées depuis près de 25 ans dans les artères coronaires humaines (Richardson, Davies, et Born 1989; G. C. Cheng *et al.* 1993), peu de travaux ont été menés sur les contraintes pariétales des vaisseaux de souris apoE<sup>-/-</sup> présentant des lésions athéromateuses (Vengrenyuk *et al.* 2010; I. C. Campbell *et al.* 2013). L'étude présentée ici porte sur l'évaluation des contraintes mécaniques au sein de plaques d'athérome présentes dans la crosse aortique de souris apoE<sup>-/-</sup> ne présentant pas de rupture. L'évaluation biomécanique a pour objectif d'apporter des éléments d'explication à cette différence entre espèces.

Ce travail expérimental, réalisé en étroite collaboration avec l'équipe DyCTiM du laboratoire

## Partie expérimentale : Biomécanique

TIMC-IMAG, s'articule autour de deux points majeurs. 1) La caractérisation fine des propriétés mécaniques des matériaux constitutifs de la paroi d'aorte de souris, incluant les lésions et la paroi artérielle saine, identifiés par histologie. Cette caractérisation s'effectue en faibles déformations auquel cas leur comportement est assimilé à celui de matériaux élastiques, en utilisant un test de microindentation réalisée par microscopie de force atomique (AFM, *atomic force microscopy*) adaptée à l'étude d'échantillons tissulaires ; 2) La modélisation en éléments finis des contraintes pariétales présentes au sein de la paroi aortique athéromateuse de souris apoE<sup>-/-</sup>. Cette modélisation s'effectue à partir d'échantillons pour lesquels les différents matériaux identifiés par histologie présentent des propriétés rhéologiques de matériaux hyperélastiques, déduits des mesures en AFM. De plus, la méthodologie adoptée permet de prendre en compte les contraintes résiduelles pour une évaluation plus précise des contraintes pariétales. Le site anatomique étudié a été choisi pour avoir accès aux contraintes résiduelles. Enfin, la distribution des contraintes pariétales est étudiée en regard de la distribution des cellules inflammatoires au sein des lésions.

## 2 Matériel & Méthodes

### 2.1 Étude des propriétés mécaniques locales du tissu aortiques de souris par microscopie de force atomique

#### 2.1.1 Animaux & préparation des échantillons

Des souris femelles apoE<sup>-/-</sup> (n = 5) ont été reçues à l'âge de 5 semaines (Charles-River) et mises sous régime hypercholestérolémiant (Safe). À l'âge de 25 ou 30 semaines, les animaux ont été euthanasiés par injection intra-péritonéale de pentobarbital sodique. L'aorte a été rapidement prélevée et placée dans du milieu de Krebs-Henseleit contenant 0.026 mM d'EDTA (KH) avant d'être soigneusement nettoyée des tissus adhérents sous loupe binoculaire (Discovery V8, Zeiss). La crosse aortique a été placée dans du composé OCT (*optimal cutting temperature*) et congelée en utilisant du 2-méthylbutane refroidi à l'azote liquide. Des coupes de tissus de 16 µm et 6-8 µm d'épaisseur ont été réalisées au cryostat (HM505E, Microm) sur la zone de la crosse souhaitée et placées sur des lames Polysine (Thermo-Scientific). Les coupes de 16 µm ont été placées dans du milieu KH à 4 °C jusqu'à leur analyse en AFM, réalisée dans les heures suivant leur préparation ; les coupes de 6-8 µm ont été utilisées pour l'analyse histologique.

Une étude préliminaire a été menée sur un animal (souris apoE<sup>-/-</sup>, 30 semaines, sous régime hypercholestérolémiant) afin de valider l'absence d'influence de la congélation sur la mesure des propriétés mécaniques des matériaux constitutifs des anneaux aortiques. Après prélèvement sur animal euthanasié et nettoyage, un segment d'aorte a été placé dans de la gélatine alimentaire (25 % dans KH, 37°C) et refroidi à 4 °C. Deux anneaux adjacents de 100 µm d'épaisseur ont été obtenus par coupe en tissu frais en utilisant un vibratome (HM650V, Microm). L'un des deux anneaux a été collé (cyanoacrylate) sur une lame de verre et conservé dans du KH à 4 °C jusqu'à son analyse en AFM alors que le second a subi un cycle de congélation-décongélation (congélation par immersion dans du 2-méthylbutane refroidi à l'azote liquide, et décongélation dans du KH à 4 °C) avant de subir la même procédure.

#### 2.1.2 Colorations histologiques & marquages immunohistochimiques

Les coupes adjacentes à celles analysées en AFM ont servi aux colorations histologiques trichrome HES et à la coloration des lipides (Oil Red O) ainsi qu'au marquage immunohistochimique des cellules musculaires lisses (SMCs, *smooth muscle cells*).

**Coloration HES.** La coloration histologique trichrome HES (hématoxyline, érythrosine, safran) est effectuée à température ambiante sur des lames fixées à l'acétone à -20 °C (10 min), avec deux

## Partie expérimentale : Biomécanique

bains successifs de 2 min d'hématoxyline (Gill II, Labonord) et d'érythrosine (Extrabluish, Fluka), tous deux suivis d'un lavage abondant à l'eau courante (3 min). La déshydratation des lames effectuée par deux bains successifs d'éthanol 100 % précède le bain de safran à 0.33 % dans de l'éthanol 100 % (Microm). Après lavage à l'éthanol 100 %, les lames sont passées en phase organique (Xylène) et le montage entre lame et lamelle est effectué en utilisant un milieu de montage en phase organique. Cette coloration histologique permet de visualiser les noyaux (bleu sombre), le cytoplasme (rose pâle) et les fibres de collagène (jaune orangé).

**Coloration Oil Red O.** La coloration histologique Oil Red O permet de visualiser les lipides en rouge. Les lames séchées à l'air sont placées dans une solution de propylène glycol 100 % (2 min) avant d'être colorées par un solution de Oil Red O à 0.5 % dans du propylène glycol 100 % préchauffé (10 min, 60°C). Après un bain de propylène glycol 85 % (2 à 5 min), les lames sont rincées à l'eau distillée (2 min) et une contre-coloration à l'hématoxyline (Gill II, Labonord) est effectuée (2 min) ; après rinçage à l'eau courante (3 min), un montage entre lame et lamelle est effectué en phase aqueuse.

**Marquage de SMCs.** Le marquage immunohistochimique des SMCs est effectué à température ambiante sur les lames fixées à l'acétone -20 °C. Après blocage des peroxydases endogènes avec une solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0.45 % (15 min), une étape de blocage pour diminuer la fixation non spécifique avec une solution tampon de fixation (PBS, *Phosphate Buffered Saline*, FSG, *Fish Skin Gelatin* 0.5 %, sérum 10 %) (60 min) est réalisée préalablement à l'incubation de l'anticorps primaire (anti- $\alpha$ -actin des cellules musculaires lisses, A5691, Sigma) au 1:800e dans du tampon de fixation. Cet anticorps étant couplé à la phosphatase alcaline, la révélation est effectuée directement après l'étape de lavage en utilisant du Permanent Red (Vector Laboratories) avant d'effectuer une contre-coloration à l'hématoxyline et un montage en phase aqueuse (comme décrit ci-dessus).

Les images ont été numérisées en utilisant les systèmes d'acquisition respectifs de la loupe binoculaire (Discovery V8, Zeiss) ou du microscope optique (BX41, Olympus) utilisés.

### **2.1.3 Identification et des constituants des lésions et définition des zones de plaque**

Les deux colorations histologiques (HES et lipides) et le marquage immunohistochimique des SMC a permis de subdiviser les lésions athéromateuses en trois zones distinctes (Figure 2). Les zones présentant une forte coloration au safran ont été identifiées comme zones de fibrose intense (HyFb). Les zones colonisées par les cellules musculaires lisses (identifiées par leur marquage spécifique) ont été définies comme zones de fibrose cellulaire (CeFb). Enfin, les zones présentant une

## Partie expérimentale : Biomécanique

coloration des lipides colocalisée avec des zones présentant des cellules au cytoplasme large ou des zones hypo- ou acellulaires ont été identifiées comme zones riches en lipides (LpRi).

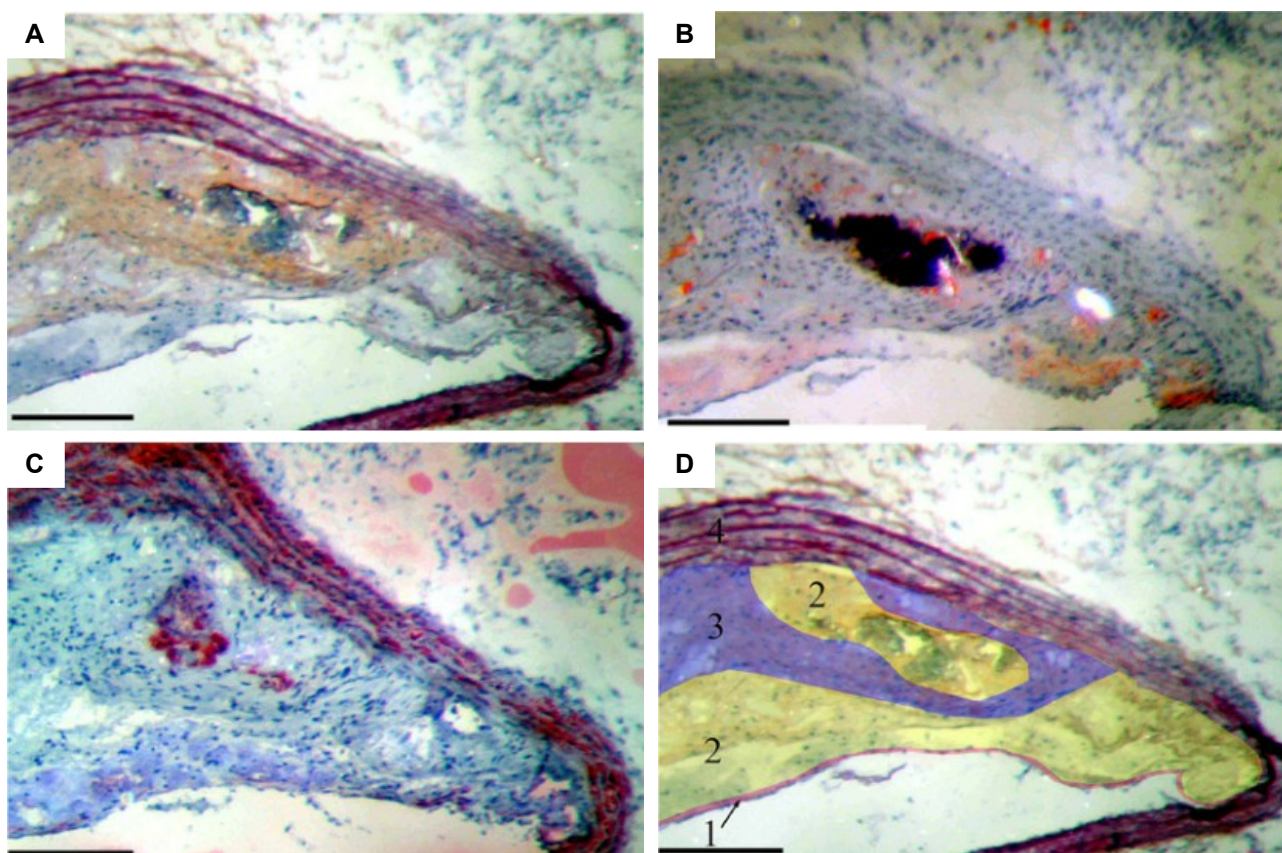


Figure 2. Identification des constituants des lésions sur la base des colorations histologique trichrome HES (A) et lipidique Oil Red O (B) et du marquage immunohistochimique des cellules musculaires lisses (C) ; définition des zones de plaque (D) : de fibrose cellulaire (CeFb, 1), riches en lipides (LpRi, 2) et de fibrose intense (HyFb, 3) et identification de la média (4). Barre d'échelle : 200 µm.

### 2.1.4 Protocole AFM

**Protocole d'acquisition AFM.** L'étude des propriétés mécaniques des tissus a été réalisée en utilisant un appareillage asservi de microscopie de force atomique (Nanowizard II, JPK instruments) adapté à l'analyse à l'échelle tissulaire. Les tissus étudiés ont été maintenus dans du milieu KH à température ambiante tout au long de l'analyse réalisée dans les 4 heures suivant la coupe et la décongélation concomitante de l'anneau artériel. Sur l'ensemble des animaux inclus dans l'étude, un total de 200 sites a été analysé avec pour chaque point : 1) l'indentation et l'enregistrement de courbes de réponse (courbe force-indentation,  $n \approx 5$  par site) et 2) l'analyse de ces courbes par ajustement au modèle de Hertz. Les sites analysés ont été catégorisés comme appartenant à une des 3 zones définies au sein de la néo-intima (HyFb, CeFb ou LpRi) ou au sein de la média comme lame élastique ou espace entre lames élastiques. Ces zones ont pu être ainsi

## Partie expérimentale : Biomécanique

identifiées par observation du tissu rétro-éclairé concomitante à l'acquisition de données en AFM en regard des marquages histologiques des coupes adjacentes (Figure 3).

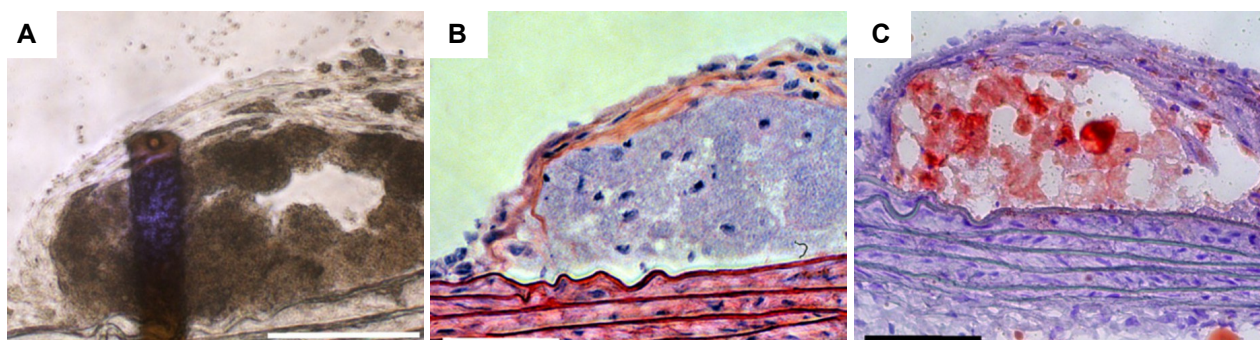


Figure 3. Exemple d'analyse AFM. (A) Vue au cours de l'acquisition AFM : le porte-à-faux réfléchit le laser, et la pointe sphérique est au niveau d'une zone identifiée comme la capsule, par marquage fibreux intense en coloration trichrome HES (B), recouvrant une zone riche en lipide identifiée par le marquage Oil Red O (C). Barre d'échelle : 100  $\mu\text{m}$ .

Les échantillons tissulaires ont été indentés par un porte-à-faux muni d'une pointe sphérique de borosilicate (5  $\mu\text{m}$  et 12  $\mu\text{m}$  de diamètre ; Novascan) présentant une constante de raideur de ressort comprise entre 0.1 et 0.3  $\text{N.m}^{-1}$ . La rigidité du porte-à-faux  $k$  a été déterminée par calibration thermique, suivant les instructions du fabricant. Lors de l'indentation, un déplacement vertical connu  $\Delta z$  est imposé à la base du porte-à-faux par un matériau piézoélectrique (Figure 4). La position de la pointe du porte-à-faux est obtenue par mesure de la réflexion d'un faisceau laser ciblant cette pointe.

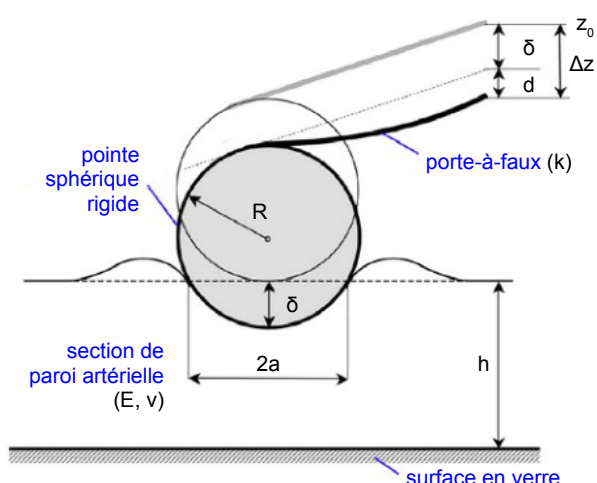


Figure 4. Schéma du dispositif d'AFM présentant le porte-à-faux de rigidité  $k$ . Son déplacement à la base produit  $\Delta z$  qui peut être décomposé en la déflexion  $d$  du porte-à-faux et l'indentation  $\delta$  de la pointe sphérique de rayon  $R$  dans le tissu de module de Young  $E$  et de coefficient de Poisson  $\nu$  au niveau du point d'analyse.

**Relation force-indentation.** L'indentation  $\delta$  de la sphère dans le tissu est inférieure au déplacement de la base de porte-à-faux en raison de sa déflexion  $d$  (Figure 4). En connaissant la rigidité du porte-

## Partie expérimentale : Biomécanique

à-faux  $k$ , l'amplitude de la déflexion  $d$  permet de déduire la force  $F$  appliquée sur la pointe sphérique du porte-à-faux, lorsque l'on admet être dans un modèle élastique pur, en condition de charge quasi-statique (Darling *et al.* 2007). Ceci implique une approche à faible vitesse, ce qui a été respecté dans le cadre de cette étude ( $\sim 0.6 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ). On obtient ainsi expérimentalement une relation force-indentation.

**Ajustement au modèle de Hertz.** L'hypothèse que les tissus biologiques analysés répondent aux caractéristiques d'un milieu élastique linéaire semi-infini est posée. Lors de l'indentation de profondeur d'indentation  $\delta$  d'un tel milieu par une sphère de rayon  $R$ , la force  $F$  exercée sur cette sphère répond à :

$$F = K R^{1/2} \delta^{3/2} \quad (4)$$

avec  $K$ , le module de contact :

$$K = \frac{4}{3} \frac{E}{(1-\nu^2)} \quad (5)$$

où  $E$  et  $\nu$  sont respectivement le module de Young et le coefficient de Poisson du matériau indenté. En émettant l'hypothèse que ces matériaux sont incompressibles ( $\nu = 0.5$ ), on obtient :

$$F = \frac{16E}{9} R^{1/2} \delta^{3/2} \quad (6)$$

Cette relation correspond au modèle de Hertz (K. L. Johnson 1987) auquel les courbes expérimentales force-indentation ont été ajustées (JPK IP fitting software). Cette relation permet l'évaluation du module de Young ( $E$ ) local du matériau en chaque point étudié (Figure 5).

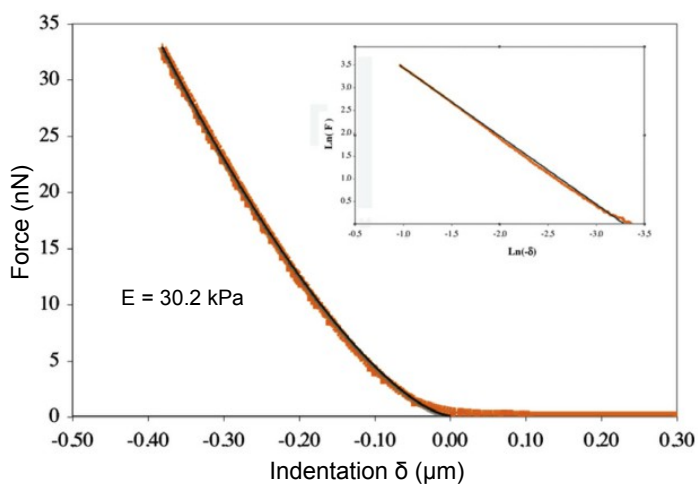


Figure 5. Exemple de courbe expérimentale force-indentation (orange) ajustée au modèle de Hertz (noir).

La validation de la méthodologie a été effectuée par analyse de polymères synthétiques (Polyacétate de vinyle) dont la rigidité est connue (Tracqui *et al.* 2011).

## 2.2 Étude des contraintes dans le tissu aortique de souris

### 2.2.1 Animaux & anneaux aortiques

Les souris femelles apoE<sup>-/-</sup> (n = 25) et C57BL/6J (n = 20) ont été reçues à l'âge de 5 semaines (Charles River Laboratory). Les animaux apoE<sup>-/-</sup> ont été placés sous régime hypercholestérolémique (caséine 20 %, cholestérol 0.15 %, Harlan). À l'âge de 7, 15, 20, 25 et 30 semaines, les animaux ont été euthanasiés par injection létale de pentobarbital sodique (n = 3 à 5 animaux contrôles et apoE<sup>-/-</sup> par temps). L'aorte a été prélevée et immergée dans du milieu de Krebs-Henseleit avec 0.026 mM d'EDTA (KH) et la crosse aortique a été nettoyée des tissus adhérents sous loupe binoculaire (Discovery V8, Zeiss) avant d'être transférée dans un moule contenant de la gélatine en solution (25 % dans du KH, 37 °C). L'échantillon a été refroidi à 4 °C et plongé dans du KH refroidi à la glace. Un anneau de 200 µm d'épaisseur a été découpé entre l'artère brachio-céphalique et l'artère carotide commune gauche en tissu frais grâce à l'emploi d'un vibratome (HM650V, Microm). L'anneau aortique a été rincé abondamment avec du KH chauffé et rapidement incisé radialement à l'opposé de la petite courbure de la crosse aortique, dans une zone dépourvue de lésions athéromateuses. Une ouverture de l'anneau aortique est alors observée qui rend compte de la dissipation des contraintes présentes dans cet élément tissulaire en l'absence de toute autre contrainte (contraintes résiduelles). 45 min après l'incision, la géométrie de l'élément tissulaire a cessé d'évoluer ; l'anneau aortique se trouve dans une conformation ouverte et l'angle d'ouverture est mesuré (Figure 6). Cet angle est défini comme l'angle entre les deux extrémités créées par l'incision et ayant pour sommet le point sur la face interne de l'anneau aortique à l'opposé du point d'incision (Vaishnav et Vossoughi 1987). La section aortique immédiatement adjacente à l'anneau artériel prélevé a été fixée pendant 24 h avant d'être incluse en paraffine. Sur cet échantillon, des coupes de 4 µm d'épaisseur ont été réalisées en utilisant un microtome (HM340E, Microm) et ont servi aux colorations histologiques et aux marquages immunohistochimiques.

## Partie expérimentale : Biomécanique

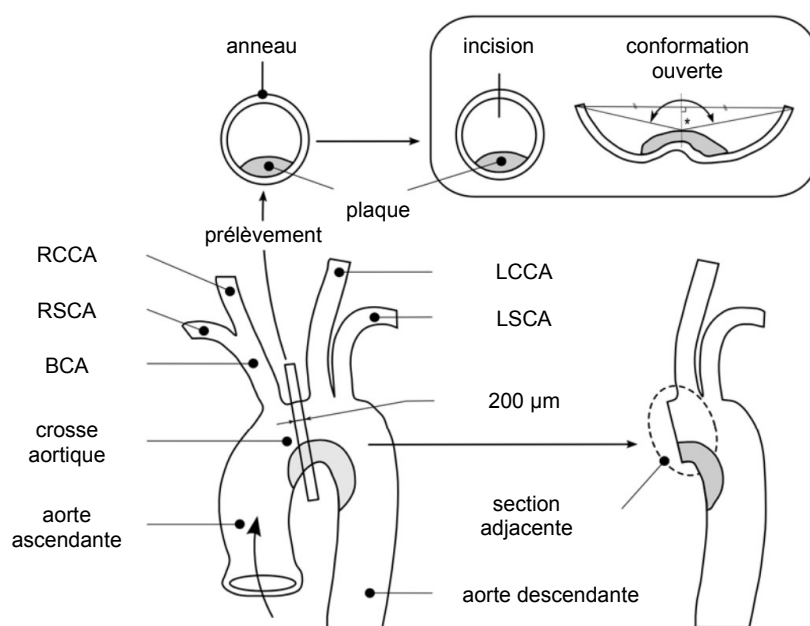


Figure 6. Schéma du protocole expérimental mis en œuvre dans l'étude visant à modéliser les contraintes pariétales. Un anneau artériel de 200 µm d'épaisseur est obtenu au niveau de la crosse aortique entre l'artère brachio-céphalique et l'artère carotide commune gauche. Une incision est effectuée à l'opposé de la petite courbure de la crosse aortique afin d'obtenir la conformation ouverte. BCA : artère brachio-céphalique; RCCA et LCCA : artère carotide commune droite et gauche; RSCA et LSCA : artère sub-claviaire droite et gauche.

### 2.2.2 Colorations histologiques et marquages immunohistochimiques

**Colorations histologiques.** Les coupes réalisées à partir de la section aortique adjacente à l'anneau aortique prélevé ont été utilisées pour une coloration histologique trichrome HES (hématoxyline, érythrosine, safran), van Gieson, servant à identifier l'élastine et von Kossa permettant d'identifier les dépôts minéralisés, tels que les carbonates de calcium (Figure 7, panneau A, B et E respectivement). L'ensemble de ces colorations a été effectué suivant les protocoles standard employés au service d'anatomopathologie du centre hospitalier universitaire de Grenoble.

**Marquages immunohistochimiques.** Les marquages immunohistochimiques des SMC, des macrophages et de l'endothélium vasculaire ont été réalisés en utilisant les anticorps anti- $\alpha$ -actine des cellules musculaires lisses (A5691, Sigma), anti-galectine-3, aussi appelé antigène Mac-2 (CL8942AP, Cedarlane) et anti-CD31 (SC-1506, Santa Cruz), respectivement, sur les coupes adjacentes à l'anneau aortique étudié (Figure 7, panneau C, D et F respectivement). Après déparaffinage et réhydratation des coupes, les peroxydases endogènes ont été bloquées avec 0.45 % de  $H_2O_2$  (15 min). Un démasquage des antigènes tissulaires (Vector Laboratories) a été effectué avant le marquage des SMC et de CD31 (15 min, 100°C). Une étape de blocage a été réalisée (60 min) avant de procéder à l'incubation de l'anticorps primaire : sur la nuit à 4 °C pour anti-galectine-3 (1:10 000e) et anti-CD31 (1:3000e) et 60 min à température ambiante pour anti-SM- $\alpha$ -actine (1:800e). Pour ce dernier, directement couplé à la phosphatase alcaline, l'étape de révélation au permanent red suit les lavages effectués après l'incubation de l'anticorps. Pour les deux autres,

## Partie expérimentale : Biomécanique

l'incubation d'un anticorps secondaire biotinylé et du complexe avidine-biotine couplé à l'activité peroxydase est nécessaire avant d'effectuer l'étape de révélation au DAB (3,3'-Diaminobenzidine).

Les tissus sont contre-colorés à l'hématoxyline et le montage entre lame et lamelle est effectué.

Les images ont été numérisées en utilisant les systèmes d'acquisition respectifs de la loupe binoculaire (Discovery V8, Zeiss) ou du microscope optique (BX41, Olympus) utilisés.

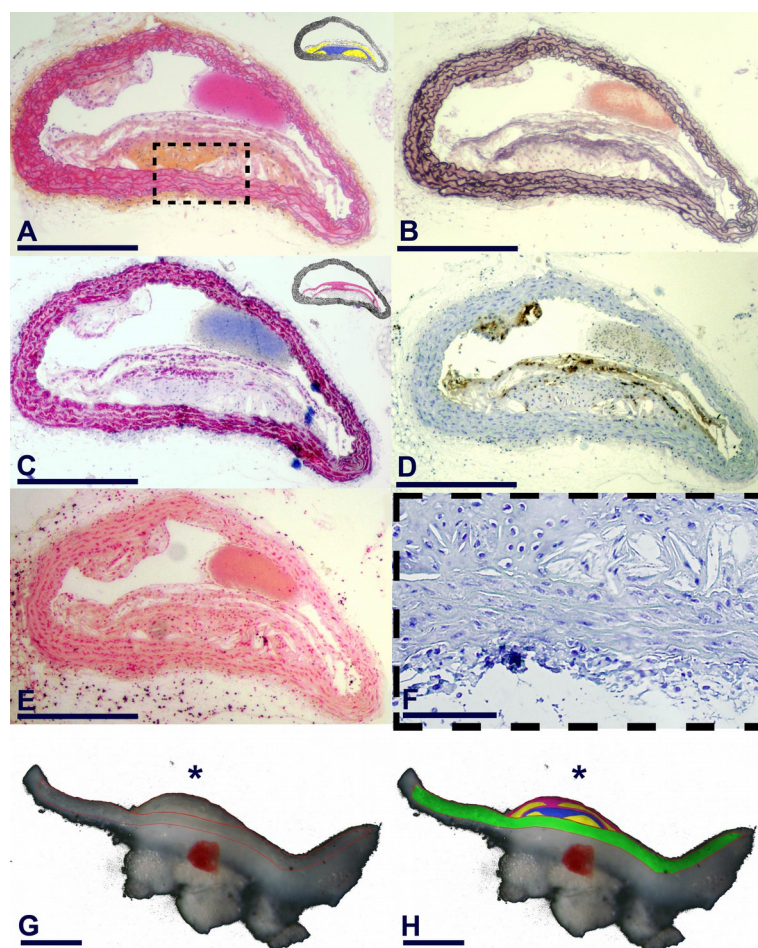


Figure 7. Exemple représentatif de l'analyse histologique et immunohisto-chimique (A à F) et de la délimitation des zones intra-plaque pour modélisation mathématique (G & H). A, coloration histologique HES permettant la visualisation des noyaux (bleu), des cytoplasmes (rose) et de la fibrose (orange) ; B, coloration histologique van Gieson, colore les fibres élastiques (noir) ; C, immunomarquage de l' $\alpha$ -actine spécifique des SMCs (violet) ; D, immunomarquage Mac-2 spécifique des macrophages (marron) ; E, coloration histologique von Kossa montrant l'absence de calcifications ; F, immunomarquage de CD31 montrant l'absence de vascularisation intra-plaque ; G, Photographie de crosse aortique après coupure radiale permettant de déterminer l'angle d'ouverture et (H) détermination dans l'intima de zones riches en lipides (LpRi, jaune), de fibrose cellulaire (CeFb, rose) et de fibrose intense (HyFb, bleu) ainsi que de la média (vert), à partir de la coloration histologique HES (A) et du marquage IHC des SMCs (C). \* : coté luminal. Barre d'échelle : 500  $\mu$ m.

### 2.2.3 Identification des constituants des lésions et définition des zones de plaque sur la conformation ouverte

Les mêmes zones de la néointima que celles dont les propriétés mécaniques ont été étudiées par AFM ont été définies en utilisant la coloration HES et le marquage des SMCs (Figure 7 ; panneaux A et C, respectivement). Les zones de fibrose intense (HyFb) ont été identifiées par un marquage intense au safran de la coloration trichrome HES. Les zones de fibrose cellulaire (CeFb) sont caractérisées par un marquage des SMCs au sein de la néo-intima. Les zones riches en lipides (LpRi) sont définies par l'absence de ces deux marquages au sein du tissu néointimal ou dans des

zones vacuolaires dans ce tissu. Ces zones identifiées sur les coupes adjacentes ainsi que la zone correspondant au reste du tissu artériel (média, délimitée par les limitantes élastiques interne et externe et présentant un marquage des SMCs, et adventice, tissu conjonctif présentant un marquage des fibres de collagène) sont reproduites sur l'anneau artériel en configuration ouverte (Figure 7 ; panneaux G et H).

#### 2.2.4 Analyse en éléments finis

**Segmentation.** L'image de l'artère en conformation ouverte sur laquelle les différentes zones considérées ont été reproduites a servi de base à la construction d'un maillage lissé comprenant ~ 1500 nœuds, chacun connecté à 3 ou 4 nœuds. Ce maillage a été utilisé pour la modélisation en éléments finis en utilisant le code de calcul ANSYS (Ansys, Inc.) après attribution d'un modèle de comportement mécanique aux éléments de ce maillage.

**Lois de comportement.** Le comportement des trois zones définies au sein de la néo-intima a été modélisé par une loi de comportement isotrope linéaire incompressible de type Néo-Hookéen.

$$W = \frac{E}{6} (\bar{I}_1 - 3) + \frac{\kappa}{2} (J - 3)^2 \quad (7)$$

La fonction d'énergie utilisée prend en compte le module de Young des différents matériaux. Les valeurs du module de Young utilisés pour la modélisation avec une rhéologie murine sont ceux obtenus par étude AFM :  $E_{LpRi} = 5.5$  kPa,  $E_{CeFb} = 10.4$  kPa et  $E_{HyFb} = 59.4$  kPa. La modélisation avec rhéologie humaine est effectuée en utilisant des valeurs de Young décrites dans la littérature (R. T. Lee *et al.* 1991; Loree, Tobias, *et al.* 1994) :  $E_{LpRi} = 5$  kPa,  $E_{CeFb} = 500$  kPa et  $E_{HyFb} = 900$  kPa.

Le comportement de la paroi artérielle en dehors des plaques a été considéré comme anisotrope nonlinéaire incompressible, suivant la loi de comportement proposée par Holzapfel *et al.* (Holzapfel *et al.* 2005).

$$W = \frac{E}{6} (\bar{I}_1 - 3) + \frac{k_1}{k_2} (\exp(k_2((1-\rho)(\bar{I}_1 - 3)^2 + \rho(\bar{I}_4 - 3)^2)) - 1) + \frac{\kappa}{2} (J - 3)^2 \quad (8)$$

Les caractéristiques rhéologiques humaines sont directement issues de l'étude par Holzapfel *et al.* (Holzapfel *et al.* 2005), alors que les caractéristiques rhéologiques murines ont été déduites des caractéristiques morphologiques observées au sein de la média des souris apoE<sup>-/-</sup> étudiées ainsi que des modules de Young des constituants de la média déterminés par AFM.

La description des fonctions densité d'énergie de déformation rendant compte du comportement des matériaux se trouve largement développée par ailleurs (Mesnier 2011; Ohayon *et al.* 2012).

## Partie expérimentale : Biomécanique

**Modélisation.** Les calculs statiques en éléments finis (ANSYS) ont porté sur 1) la reconstitution des états de contraintes et de déformations résiduelles par simulation de fermeture de l'anneau artériel ouvert, *via* l'appareillement des nœuds présents aux extrémités des anneaux en conformation ouverte sur le plan médian entre ces nœuds (Raghavan *et al.* 2004; Ohayon *et al.* 2007), donnant ainsi les états de contrainte et de déformation résiduels et 2) la mise sous pression des anneaux artériels refermés en appliquant une pression correspondant à la pression artérielle systolique : 14.6 kPa soit 110 mmHg sur la face interne de l'anneau refermé. Cette mise sous pression a été réalisée sur les anneaux en prenant en compte ou non les contraintes résiduelles calculées lors de la fermeture de l'anneau artériel aboutissant ainsi aux états de contraintes physiologiques (rés. +) et (rés. -), respectivement. Ceci est illustré en Figure 8. Une simulation supplémentaire faisant varier la pression appliquée radialement à la paroi entre 11.1 kPa et 14.6 kPa correspondant à la variation entre la pression artérielle diastolique et systolique a été effectuée afin d'analyser l'amplitude des variations de déformation au cours du cycle cardiaque.

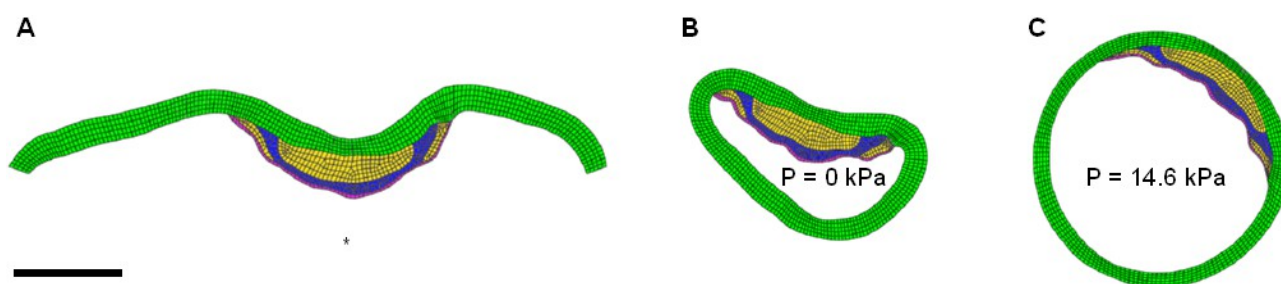


Figure 8. Exemple de modélisation à partir d'un anneau d'aorte de souris apoE<sup>-/-</sup> en conformation ouverte (A) segmenté en distinguant les zones de plaque riches en lipides (LrRi, jaune), de fibrose cellulaire (CeFb, rose) et de fibrose intense (HyFb, bleu) du reste du tissu artériel (blanc). La première étape de la modélisation permet de recréer une conformation fermée (B) et donne accès aux déformations et contraintes résiduelles. La seconde étape de la modélisation permet d'obtenir l'état physiologique du vaisseau, en appliquant une pression à la surface interne de 14.6 kPa, à partir de la conformation ouverte et prenant en compte les contraintes et déformations résiduelles (C, état physiologique (rés. +)) ou en les ignorant (état physiologique (rés. -)). \* : coté luminal. Barre d'échelle : 500  $\mu$ m.

La simulation en éléments finis permet de calculer les déformations et les contraintes en chaque nœud. Les valeurs considérées dans le cadre de cette étude sont deux grandeurs scalaires calculées à partir des tenseurs utilisés lors de la simulation : les déformations équivalentes (grandeur sans unité) et les contraintes équivalentes (exprimés en kPa). L'interpolation linéaire des valeurs de contraintes et de déformations entre les nœuds permet de générer des cartographies complètes pour l'ensemble de la coupe de l'artère.

### 2.2.5 Analyse des résultats

**Morphologie.** La coloration trichrome HES adjacente à l'anneau aortique prélevé a servi à la

## Partie expérimentale : Biomécanique

mesure de l'épaisseur de la média et de l'adventice. En cas de présence de lésions athéromateuses, ces valeurs ont été évaluées à l'arrière des plaques. L'épaisseur de l'intima a également été mesurée en présence de plaques de même que la surface occupée par les zones HyFb, CeFb et LpRi et la surface totale de la lésion.

Les images de la coloration van Gieson marquant les lames élastiques ont été utilisées pour caractériser la tortuosité des lames élastiques. Cet indice de tortuosité est défini comme :

$$\tau = \frac{L}{C} \quad (9)$$

avec L la longueur de l'élément mesuré et C la longueur de l'arc entre les deux extrémités de l'élément mesuré (Figure 9). Cette tortuosité a été systématiquement mesurée au niveau de la petite courbure de l'anneau issue de la crosse aortique, i.e. dans la média à l'arrière des plaques (lorsque présentes) chez la souris apoE<sup>-/-</sup>.

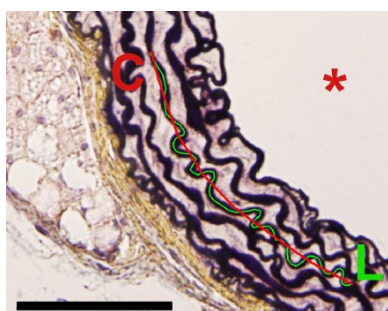


Figure 9. La tortuosité des lames élastiques a été définie par un index de tortuosité  $\tau$ , correspondant au rapport de la longueur de l'élément mesuré (L, vert) sur la longueur de l'arc entre les deux extrémités de l'élément mesuré (C, rouge), tel que présenté sur la coloration van Gieson d'une portion d'aorte de souris dépourvue de lésion. Barre d'échelle : 100  $\mu\text{m}$ .

**Infiltration de macrophages.** La quantification de l'infiltration des macrophages a été effectuée par la mesure de la surface présentant un marquage Mac-2 positif au sein des plaques (ImageJ, NIH). Cette analyse a été effectuée en subdivisant les plaques en 4 régions (avant, centre, arrière et épaulement de la plaque) tel que présenté en Figure 10. Les résultats sont présentés en densité de macrophages (% de la surface, i.e. pourcentage de l'aire de la zone analysée occupée par les

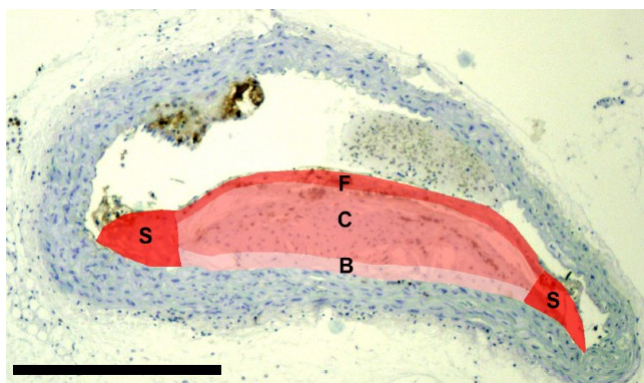


Figure 10. Distinction de régions de la néo-intima aortique de souris apoE<sup>-/-</sup> utilisé dans l'analyse : l'avant (F), le centre (C), l'arrière (B) et les épaulements (S) de la plaque sont individualisés. Barre d'échelle : 500  $\mu\text{m}$ .

## Partie expérimentale : Biomécanique

macrophages) ou en répartition des macrophages (% de la surface totale infiltrée, i.e. aire occupée par les macrophages dans la région considérée sur l'aire totale occupée par les macrophages dans la lésion analysée).

**Quantification des contraintes et déformations.** Les régions définies au sein des lésions athéromateuses pour la quantification des macrophages ont été utilisées pour quantifier régionalement les contraintes et déformations. Pour ce faire, ces régions ont été reportées sur les cartographies de contraintes et de déformations et quantifiées (ImageJ, NIH). Les valeurs de contraintes et de déformations maximales et moyennes au sein des différentes régions des plaques analysées sont obtenues.

### **2.3 Analyse des données et traitement statistique**

Le test de Student a été utilisé pour les valeurs appariées ou non et l'analyse de corrélation a été effectuée en utilisant le coefficient de corrélation de Pearson (Systat, SigmaStat). Les différences ont été considérées comme significatives pour  $P < 0.05$ . Les données sont présentées comme moyenne  $\pm$  erreur type.

### 3 Résultats

#### 3.1 Propriétés mécaniques des tissus aortiques de souris

**Lésions.** L'analyse des lésions a été effectuée en distinguant systématiquement la zone de la plaque dans laquelle l'indentation a été effectuée ; après ajustement des courbes expérimentales au modèle de Hertz, le module de Young est déduit en chaque point. Les résultats sont présentés dans le Tableau 1. Au sein des lésions, la rigidité moyenne et médiane est la plus importante dans les zones de fibrose intense (HyFb), puis dans les zones de fibrose cellulaire (CeFb) et enfin elle est la plus faible dans les zones riches en lipides (LpRi). L'amplitude de variation du module de Young mesuré est importante pour l'ensemble des trois zones étudiées, avec des valeurs de rigidité maximale dépassant la valeur moyenne de 2.3, 2.6 et 3.7 fois l'écart type pour les zones LpRi, CeFb et HyFb respectivement.

Zone de plaque	Sites analysés		Module de Young (kPa)			
	(n)	Moyenne	Amplitude	Q1	Q2	Q3
riches en lipides (LpRi)	18	5.5 ± 3.5	0.6 – 13.7	3.2	5.0	6.8
fibrose cellulaire (CeFb)	74	10.4 ± 5.7	1.6 – 25.0	6.3	9.9	13.8
fibrose intense (HyFb)	97	59.4 ± 47.4	5.6 – 233.8	21.8	50.0	80.1

Tableau 1. Modules de Young évalués par AFM au sein de zones riches en lipides, de fibrose cellulaire et de fibrose intense de plaques d'athérome aortiques de souris apoE<sup>-/-</sup>. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± erreur type. De plus, l'amplitude des valeurs obtenues sur l'ensemble des sites analysés (n) est indiquée, ainsi que le premier quartile (Q1), la médiane (Q2) et le troisième quartile (Q3).

**Effet de la congélation.** Les résultats de l'étude visant à évaluer l'effet de la congélation par analyse (n = 116) des trois zones de plaque étudiées sont présentés en Tableau 2. Aucune différence significative n'est observée entre la rigidité mesurée du tissu frais et de l'anneau aortique ayant subi un cycle de congélation-décongélation dans les trois zones de plaque étudiées. Dans les deux cas également, la rigidité la plus élevée est observée au sein des zones HyFb, puis dans les zones CeFb et elle est la plus faible au niveau des zones LpRi.

Zone de plaque	Module de Young (kPa)	
	tissu frais	congélation
riches en lipides (LpRi)	2.9 ± 2.4	3.3 ± 2.6
fibrose cellulaire (CeFb)	12.9 ± 1.5	11.0 ± 1.70
fibrose intense (HyFb)	22.2 ± 4.9	23.3 ± 4.0

Tableau 2. Modules de Young évalués par AFM au sein de zones riches en lipides, de fibrose intense et de fibrose cellulaire au sein de plaques d'athérome aortiques de souris apoE<sup>-/-</sup> obtenus par analyse en tissu frais ou sur tissu ayant subi un cycle de congélation-décongélation.

## Partie expérimentale : Biomécanique

**Média.** Les propriétés mécaniques de la média ont également été évaluées par AFM en distinguant les lames élastiques de  $2.4 \pm 0.4 \mu\text{m}$  d'épaisseur de l'espace entre deux lames élastiques d'une épaisseur moyenne de  $9.2 \pm 2.0 \mu\text{m}$ . Les lames élastiques ont montré une rigidité 13.9 fois plus importante celle observée dans l'espace inter-lamellaire (Tableau 3).

Zone de la média	Module de Young (kPa)
lames élastiques	$58.3 \pm 6.3$
espace entre lames élastiques	$4.2 \pm 0.7$

Tableau 3. Modules de Young évalués par AFM de la média d'anneaux aortiques de souris apoE<sup>-/-</sup>, en distinguant les indentations effectuées sur les lames élastiques de celles réalisées entre ces lames élastiques.

### 3.2 Caractéristiques morphologiques et histologiques des anneaux aortiques

**Constitution des lésions.** Des lésions athéromateuses ont été observées sur la petite courbure de la crosse aortique de souris apoE<sup>-/-</sup> âgées de 20, 25 et 30 semaines. Aucune évolution significative n'a été observée dans la taille des lésions mesurées ni dans la répartition des zones LpRi, CeFb et HyFb à ces trois temps (Tableau 4).

	Age (semaines)		
	20	25	30
<b>Surface lésion (mm<sup>2</sup>)</b>	$0.084 \pm 0.013$	$0.115 \pm 0.024$	$0.112 \pm 0.061$
<b>Composition lésion (% surface totale)</b>			
riches en lipides (LpRi)	$53.0 \pm 5.5$	$57.4 \pm 6.7$	$39.2 \pm 12.8$
fibrose cellulaire (CeFb)	$24.4 \pm 5.5$	$15.9 \pm 5.0$	$14.6 \pm 7.5$
fibrose intense (HyFb)	$22.6 \pm 6.8$	$26.7 \pm 8.6$	$46.2 \pm 16.6$

Tableau 4. Paramètres morphologiques des lésions observées sur les sections de crosse aortique de souris apoE<sup>-/-</sup> de 20, 25 et 30 semaines.

**Infiltration de macrophages.** Aucun macrophage n'a été observé au sein du tissu vasculaire analysé chez les animaux contrôles. Parmi les souris apoE<sup>-/-</sup>, la distribution des macrophages au sein des différentes régions des plaques n'a pas présenté d'évolution significative entre 20, 25 et 30 semaines. Une localisation préférentielle des macrophages dans les épaulements des lésions et une faible infiltration de macrophages à l'arrière des plaques ont été observées (Figure 11).

## Partie expérimentale : Biomécanique

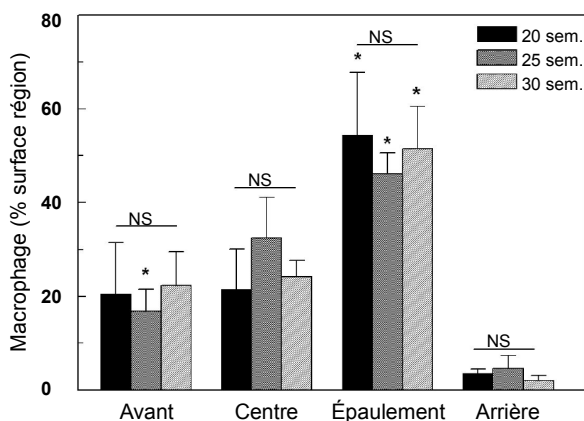


Figure 11. Densité des macrophages à l'avant, au centre, à l'arrière et aux épaulements de lésions aortiques de souris apoE<sup>-/-</sup> âgées de 20, 25 et 30 semaines. \* P < 0.05 vs. Arrière.

**Néo-vascularisation et calcifications.** Au sein des animaux inclus dans l'étude, il n'a pas été constaté de néovascularisation ni de calcifications, comme attesté par le marquage négatif des cellules endothéliales (CD31) et la coloration négative des calcifications (von Kossa) dans le tissu néo-intimal, respectivement (exemples représentatifs en Figure 7).

**Paroi artérielle.** La développement des lésions a pour corollaire un épaissement de l'intima, qui a pu être quantifié à partir de l'âge de l'apparition des lésions. En l'absence de lésion, l'intima correspond à l'endothélium vasculaire et à sa lame basale (Figure 12A). Alors que l'épaisseur de la média n'a pas présenté d'évolution au cours du temps dans le groupe contrôle, elle a été significativement augmentée chez les animaux apoE<sup>-/-</sup> de façon concomitante à l'apparition des lésions (P < 0.01 vs. 7 semaines et P < 0.05 vs contrôle à 25 et 30 semaines) (Figure 12B). Similairement, l'adventice a également présenté un épaissement ; cette tunique est significativement plus épaisse chez les animaux apoE<sup>-/-</sup> que chez les animaux contrôles à 25 et 30 semaines (P < 0.05) (Figure 12C).

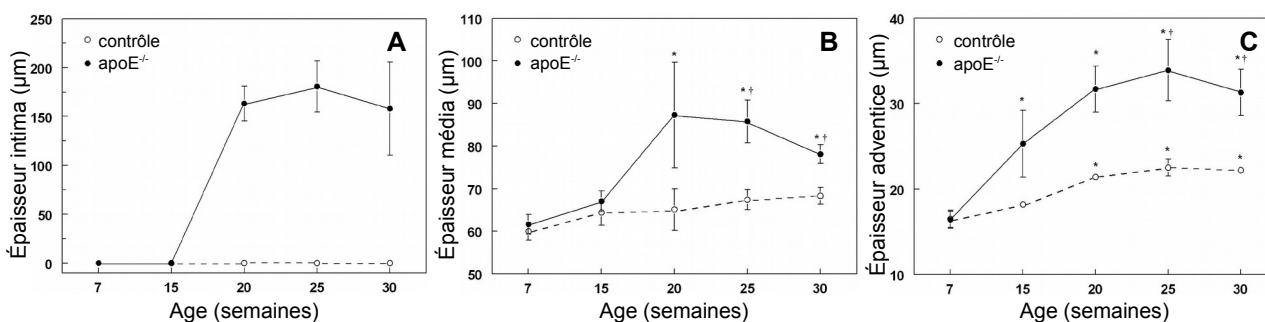


Figure 12. Épaisseur des différentes couches du tissu artériel : intima (A), média (B) et adventice (C), évaluées au niveau de la petite courbure de la crosse aortique chez les souris contrôles et apoE<sup>-/-</sup> âgées de 7 à 30 semaines. Les mesures de l'épaisseur de la média et de l'adventice sont effectuées à l'arrière des lésions lorsque présentes. \* P < 0.01 vs. 7 semaines ; † P < 0.05 vs. contrôle.

## Partie expérimentale : Biomécanique

Enfin, la tortuosité des lames élastiques a présenté une évolution similaire, significativement diminuée chez les apoE<sup>-/-</sup> à 20, 25 et 30 semaines (P < 0.05 vs. 7 semaines et P < 0.05 vs. contrôles à 25 et 30 semaines) alors qu'aucune évolution significative n'a été observée chez les animaux contrôle (P = NS tous âges vs. 7 semaines) (Tableau 5). Ces paramètres rendent ainsi compte d'une modification de la paroi artérielle à l'arrière des lésions.

	Age (semaines)				
	7	15	20	25	30
<b>Tortuosité lames élastiques</b>					
contrôle	1.32 ± 0.03	1.36 ± 0.04	1.35 ± 0.07	1.29 ± 0.03	1.31 ± 0.02
apoE <sup>-/-</sup>	1.26 ± 0.03	1.23 ± 0.03	1.16 ± 0.06 *	1.10 ± 0.02 *†	1.05 ± 0.02*†

Tableau 5. Évaluation de la tortuosité des lames élastiques sur des sections de crosse aortique de souris contrôles et apoE<sup>-/-</sup>. P < 0.05 \* vs. 7 semaines, † vs. contrôle.

### 3.3 Ouverture de l'anneau artériel

L'ouverture de l'anneau aortique consécutive à son incision effectuée au niveau de la grande courbure de la crosse aortique a présenté un angle constant dans le temps pour l'ensemble des animaux contrôles de l'étude (P = NS tout âge vs. 7 semaines). Chez les souris apoE<sup>-/-</sup>, une augmentation de l'angle d'ouverture a été observée avec l'apparition des lésions (20, 25 et 30 semaines, P < 0.05 vs. 7 semaines et P < 0.05 vs. contrôles à 25 et 30 semaines) (Figure 13).

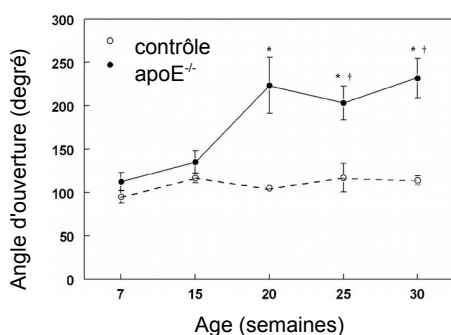


Figure 13. Angle d'ouverture des anneaux de 200 µm d'épaisseur de tissu frais de crosse aortique souris apoE<sup>-/-</sup> et contrôles de 7 à 30 semaines. \* P < 0.01 vs. 7 semaines; † P < 0.05 vs. contrôle.

L'angle d'ouverture a présenté une corrélation positive avec l'épaisseur de la média, de l'adventice ainsi qu'avec l'index de tortuosité des lames élastiques ( $r^2 = 0.49$ ,  $r^2 = 0.55$ ,  $r^2 = 0.49$  respectivement, P < 0.001), mais pas avec l'épaisseur de l'intima ( $r^2 = 0.03$ , P = NS) (Figure 14).

## Partie expérimentale : Biomécanique

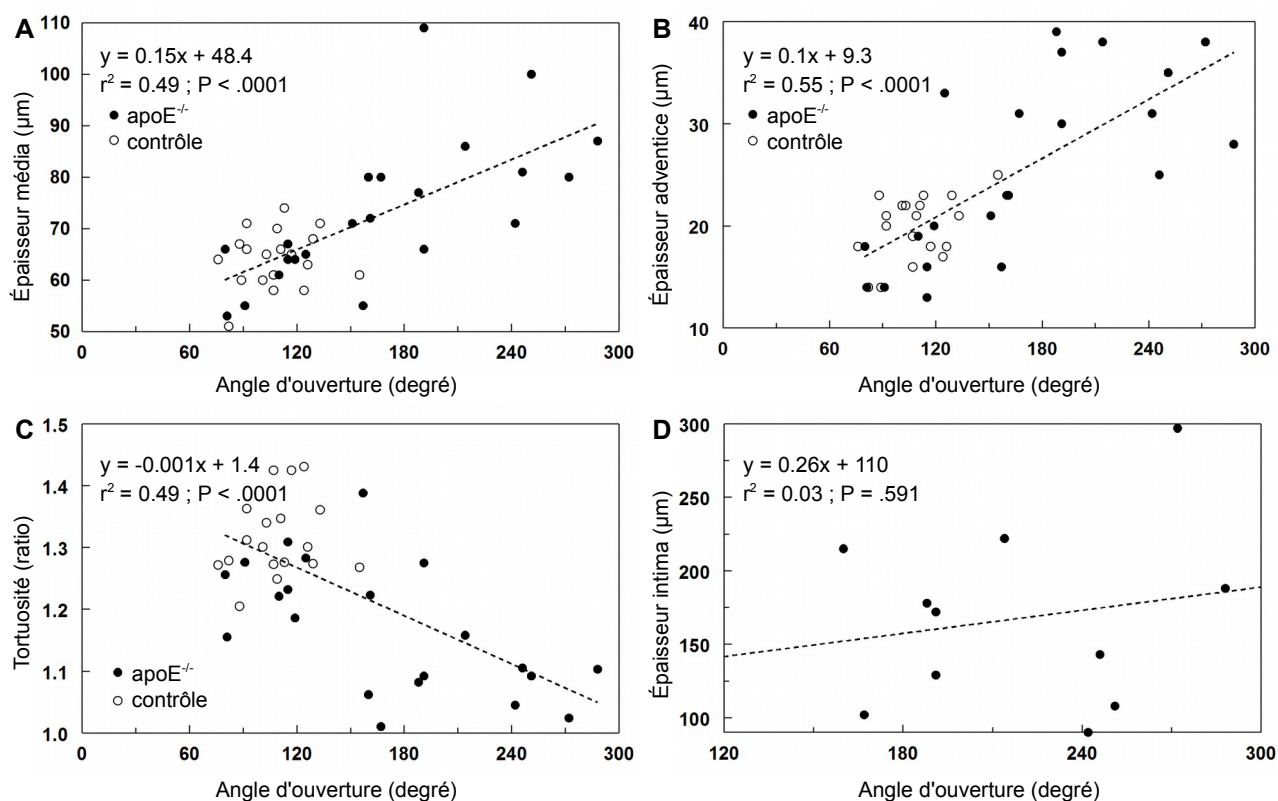


Figure 14. Analyses de corrélation par régression linéaire entre l'angle d'ouverture d'anneaux de crosse aortique de souris *apoE*<sup>-/-</sup> et contrôle et l'épaisseur de la média (A), de l'adventice (B), l'index de tortuosité des lames élastiques (C) et l'épaisseur de l'intima (D).

### 3.4 Caractérisation biomécanique par modélisation en éléments finis

#### 3.4.1 Étude de l'aorte de souris

Un exemple représentatif des cartographies de déformations et de contraintes obtenues par modélisation en élément finis à partir des anneaux en conformation ouverte auxquelles une rhéologie murine a été attribuée est présenté en Figure 15. Ces cartographies, rendant compte de l'état résiduel et de l'état physiologique en prenant en compte (res. +) et en négligeant (rés. -) les contraintes résiduelles ont été quantifiées. Les contraintes maximales, moyennes et les déformations moyennes ont été quantifiées dans les différentes régions des plaques et dans la média à partir des cartographies correspondantes ; les résultats de ces quantifications sont présentés en Figure 16 A, B et C respectivement.

## Partie expérimentale : Biomécanique

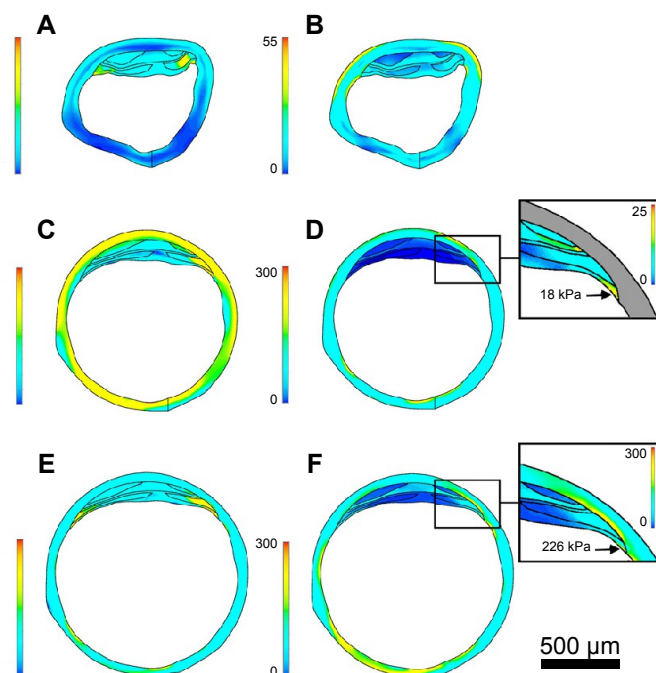


Figure 15. Cartographies de déformation (A, C, E) et de contraintes (B, D, F) obtenues par analyse en éléments finis à partir de la conformation ouverte d'un anneau d'aorte de souris apoE<sup>-/-</sup> considéré comme non déformé ni contraint. Les résultats à l'état résiduel (A, B) et à l'état physiologique (rés. +) (C, D) et (rés. -) (E, F) de déformation ( $\epsilon$ ) et de contrainte ( $\sigma$ ) sont exprimés sans unités et en kPa respectivement. Les maxima de contraintes au sein des lésions sont identifiés par des flèches et présentés dans les encadrés avec une échelle adaptée. Barre d'échelle : 500  $\mu$ m.

**Lésions.** Les contraintes résiduelles et les contraintes physiologiques dans les lésions s'élèvent en moyenne à  $4 \pm 1$  kPa et  $4 \pm 0$  kPa et atteignent au maximum  $27 \pm 7$  kPa et  $19 \pm 3$  kPa. Elles sont dans tous les cas  $\leq 35$  kPa, à l'exception d'un cas en condition résiduelle à 74 kPa. Lorsque les contraintes résiduelles sont négligées, la contrainte maximale est surestimée de 14.2, 4.0, 2.9 et 3.6 fois dans les épaulements, à l'avant, au centre et à l'arrière des plaques ; dans les épaulements des lésions où elle est la plus élevée, la contrainte maximale est ainsi de  $19 \pm 3$  kPa ( $\leq 35$  kPa) et  $276 \pm 75$  kPa ( $\leq 650$  kPa) pour les contraintes physiologique (rés. +) et (rés. -). Similairement, une diminution ou une tendance à la diminution des contraintes moyennes est observée entre les conditions physiologiques (rés. -) et (rés. +), avec notamment des diminutions de 4.5, 4.0 et 2.6 fois dans les épaulement, le centre et à l'arrière des plaques ( $P < 0.05$ ).

À l'exception de la contrainte maximale dans les épaulements dans le cas physiologique (rés. -), la contrainte moyenne et maximale observée est systématiquement significativement plus élevée dans la média que dans les lésions.

**Média.** Les contraintes moyennes et maximales dans la média de souris apoE<sup>-/-</sup> à l'état résiduel sont plus faibles qu'à l'état physiologique ( $25 \pm 2$  kPa et  $85 \pm 13$  kPa vs.  $105 \pm 10$  kPa et  $249 \pm 25$  kPa, respectivement). Une observation similaire peut être faite pour les animaux contrôles qui présentent des contraintes résiduelles moyennes et maximales s'élevant à  $8 \pm 0$  kPa et  $24 \pm 2$  kPa et des contraintes physiologiques moyennes et maximales de  $125 \pm 10$  kPa et  $248 \pm 14$  kPa ( $P < 0.05$ ).

## Partie expérimentale : Biomécanique

Les contraintes résiduelles moyennes et maximales sont respectivement 3.2 et 3.5 fois plus importantes chez les souris apoE<sup>-/-</sup> que chez les souris contrôles (P < 0.05), alors que les contraintes physiologiques ne sont pas significativement différentes. Lorsque les contraintes résiduelles sont négligées, la contrainte moyenne dans la média de souris apoE<sup>-/-</sup> est surestimée de 39 % (P < 0.05) et la contrainte maximale de 79 % (P = 0.06) alors que chez les souris contrôle aucun effet significatif n'est observé.

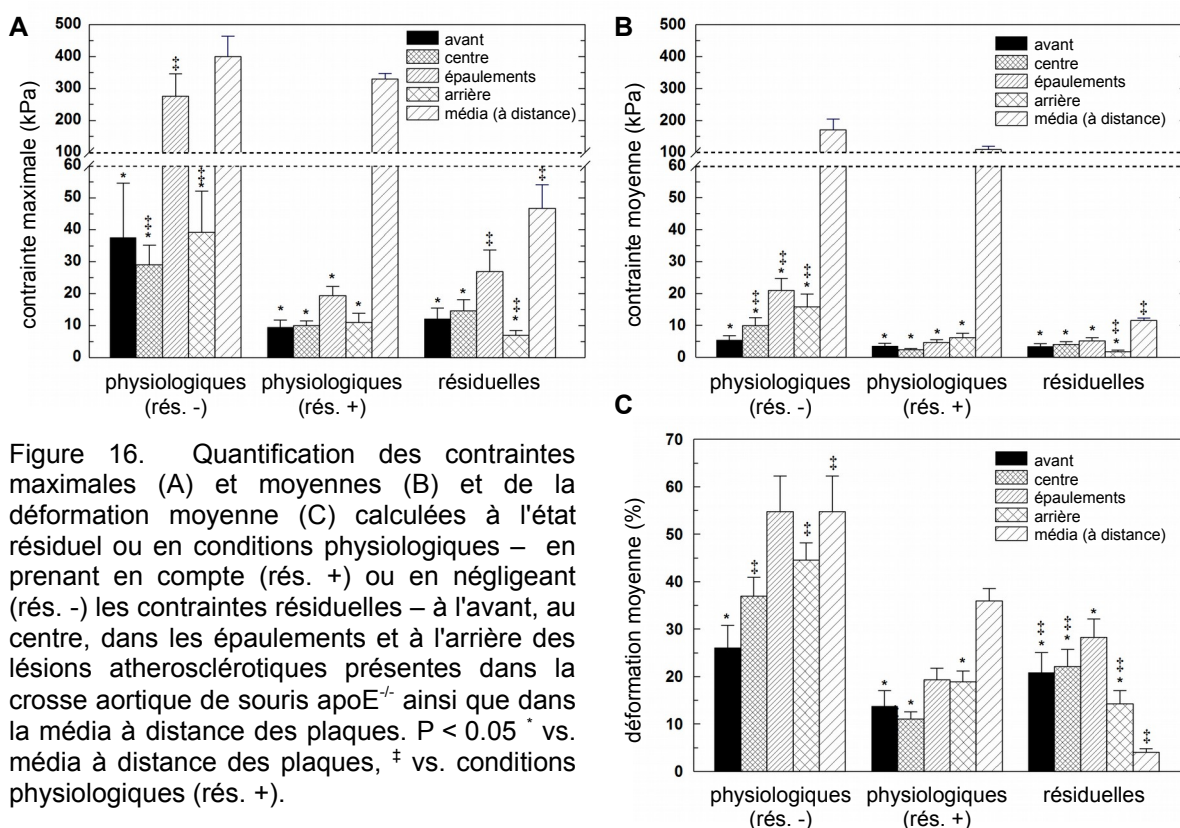


Figure 16. Quantification des contraintes maximales (A) et moyennes (B) et de la déformation moyenne (C) calculées à l'état résiduel ou en conditions physiologiques – en prenant en compte (rés. +) ou en négligeant (rés. -) les contraintes résiduelles – à l'avant, au centre, dans les épaulements et à l'arrière des lésions athérosclérotiques présentes dans la crosse aortique de souris apoE<sup>-/-</sup> ainsi que dans la média à distance des plaques. P < 0.05 \* vs. média à distance des plaques, † vs. conditions physiologiques (rés. +).

**Analyse de corrélation.** Les contraintes et déformation moyennes ainsi que l'amplitude de déformation au cours du cycle cardiaque observées au sein des différentes régions de la plaque ont été comparées à l'infiltration des macrophages au sein de ces zones. Aucune corrélation entre ces paramètres mécaniques et l'infiltration des macrophages, qu'elle soit considérée en terme de densité ou en distribution relative au sein des plaques, n'a été observée (Tableau 6).

	Contrainte moyenne	Déformation moyenne	Amplitude de déformation
<b>Région</b>			
Avant	-0.348 (.360)	-0.213 (.578)	0.287 (.456)
Centre	-0.030 (.945)	-0.308 (.417)	-0.276 (.472)
Épaulements	-0.497 (.171)	-0.216 (.574)	-0.477 (.194)
Arrière	0.146 (.707)	-0.244 (.534)	0.419 (.261)
<b>Ensemble</b>	-0.270 (.111)	-0.219 (.196)	-0.170 (.321)
<b>Total infiltrée</b>	0.330 (.386)	0.280 (.465)	0.527 (.145)

Tableau 5. Coefficients de corrélation de Pearson (R) entre l'infiltration de macrophages dans les lésions au niveau de sections de crosse aortique de souris apoE<sup>-/-</sup> et la contrainte physiologique moyenne, la déformation physiologique moyenne et l'amplitude de variation de la déformation entre la pression systolique et diastolique. Les valeurs de P sont indiquées entre parenthèses. Pour l'analyse, l'infiltration des macrophages est exprimée en % de la surface (dans les différentes régions de la plaque et pour l'ensemble de la lésion) ou en % de la surface totale infiltrée.

### 3.4.2 Étude de l'influence des propriétés mécaniques

L'analyse en éléments finis a également été effectuée à partir des anneaux d'aorte de souris apoE<sup>-/-</sup> en conformation ouverte en utilisant des propriétés mécaniques alternatives correspondant à une rhéologie humaine (Figure 17). La distribution des contraintes et déformations au sein de l'anneau artériel et des lésions est fortement affectée. La contrainte maximale mesurée à l'état physiologique (rés. +) à l'interface entre la néo-intima et la lumière de l'aorte a été déterminée à  $8.4 \pm 2.6$  kPa en rhéologie murine et  $182.3 \pm 55.9$  kPa en rhéologie humaine ( $P < 0.001$ ).

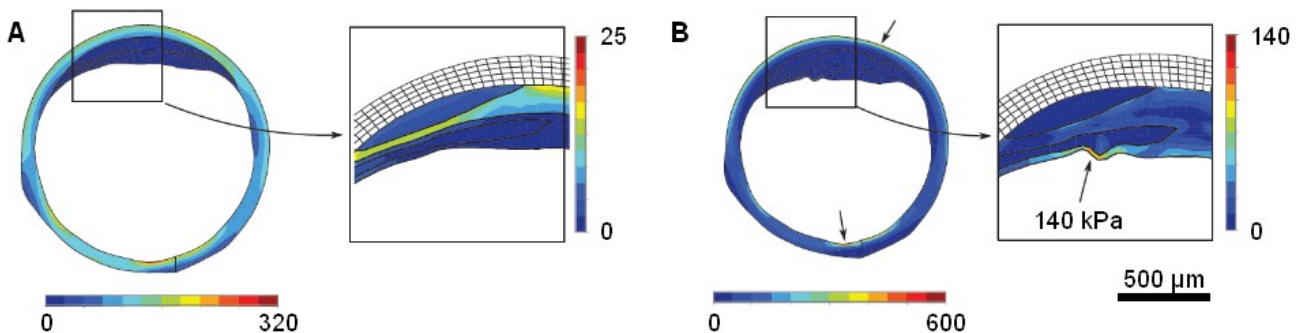


Figure 17. Cartographies de contrainte à l'état physiologique (rés. +) obtenues à partir de la conformation ouverte d'un anneau d'aorte de souris apoE<sup>-/-</sup> considéré comme non déformé ni contraint en utilisant lors de l'analyse en éléments finis une rhéologie murine (A) ou humaine (B). Les résultats sont exprimés en kPa ; les maxima sont identifiés par des flèches. Les encadrés montrent les contraintes maximales au sein des lésions avec des échelles adaptées. Barre d'échelle : 500 µm.

## 4 Discussion

### 4.1 Principaux résultats de l'étude biomécanique

Cette étude a permis d'identifier les propriétés mécaniques locales au sein du tissu artériel de la crosse aortique pathologique de souris apoE<sup>-/-</sup> âgées de 25 et 30 semaines. La rigidité des tissus de lésions murines est globalement faible par rapport au reste du tissu artériel et aux tissus des plaques d'athérome humaines décrite par ailleurs (R. T. Lee *et al.* 1991).

L'évaluation des contraintes mécaniques pariétales a été effectuée par modélisation en éléments finis dans des anneaux aortiques de souris apoE<sup>-/-</sup> de 20, 25 et 30 semaines porteurs de plaques d'athérome. Cette analyse présente une approche permettant d'analyser le niveau de contraintes résiduelles et de déduire le niveau de contrainte observé à l'état physiologique. Il a été montré que les tissus constituant la plaque d'athérome murine ne sont que faiblement sollicités mécaniquement, contrairement au reste de l'anneau artériel. Cette situation diffère de ce qui est observé dans les plaques vulnérables d'artères coronaires humaines, qui présentent une contrainte élevée dans la capsule fibreuse (Richardson, Davies, et Born 1989). En conservant une géométrie lésionnelle murine et en utilisant une rhéologie humaine, il a été montré que ce comportement est principalement imputable à la faible rigidité des matériaux constituant les lésions athéromateuses aortiques de souris apoE<sup>-/-</sup>.

Le faible niveau de contrainte constaté au niveau des lésions aortiques de souris apoE<sup>-/-</sup>, lié à la faible rigidité des matériaux constitutifs de ces lésions, donne un élément d'explication de l'absence de rupture de plaque dans ce modèle. Par ailleurs, ces résultats confirment au sein du modèle apoE<sup>-/-</sup> l'importance des contraintes résiduelles dans l'évaluation des contraintes pariétales et n'ont pas montré de relation entre les paramètres mécaniques et l'inflammation évaluée par infiltration de macrophages.

### 4.2 Caractérisation du tissu aortique étudié

#### 4.2.1 Morphologie des portions artérielles pathologiques

Les plaques d'athérome ont été observées dans la crosse aortique de souris apoE<sup>-/-</sup> sous régime hypercholestérolémique à partir de 18 semaines. Ces lésions apparaissent en coupes histologiques comme propulsives, sans épaissement de l'intima dans la paroi artérielle en dehors des lésions au même niveau de coupe comme précédemment décrit par Coleman *et al.* (Coleman *et al.* 2006).

Cette morphologie diffère des portions de coronaires humaines porteuses de plaques d'athérome vulnérables, qui présentent une hyperplasie de l'intima sur tout le pourtour du vaisseau avec une

zone d'épaississement plus important au sein de laquelle on retrouve un cœur lipidique confluent. La partie fibreuse entre ce cœur lipidique et la lumière vasculaire constitue la capsule fibreuse, site de rupture des plaques (M. J. Davies et Thomas 1985). La présence de ces lésions est responsable d'un remodelage excentrique de la paroi vasculaire à l'arrière de la plaque (Glagov *et al.* 1987).

#### 4.2.2 Identification des zones de plaque

Les lésions athéromateuses étudiées en AFM ont été subdivisées en trois zones : fibrose intense (HyFb), fibrose cellulaire (CeFb) et zone riche en lipides (LpRi).

**Coupes à froid.** Dans la partie dédiée à l'étude AFM, les coupes tissulaire étudiées sont obtenues par coupe de tissu congelé et non fixé. La coloration trichrome HES, marquant les noyaux et le cytoplasme des cellules ainsi que les fibres de collagène, a été principalement utilisée pour identifier les zones HyFb, *via* la coloration jaune-orangée typique du safran (Prophet *et al.* 1992). La coloration trichrome HES a également permis de visualiser des zones présentant des cellules au large cytoplasme ainsi que des zones hypo- voire acellulaires ; la coloration des lipides a montré une bonne colocalisation avec ces zones, permettant de les classer dans la zone LpRi. Enfin, le marquage de l'isoforme de l' $\alpha$ -actine spécifique des cellules musculaires lisses par l'utilisation d'un anticorps spécifique permet de visualiser la colonisation de la néo-intima par ces cellules issues de la média. Ces cellules jouent un rôle majeur dans la synthèse de la matrice extra-cellulaire (Doran, Meller, et McNamara 2008) et contribuent ainsi à la fibrose du tissu néo-intimal. Les zones comportant ces cellules ont été identifiées au sein de la zone CeFb.

**Coupe en paraffine.** La partie de l'étude consacrée à la modélisation des contraintes utilise des zones tout à fait analogues à celles de l'étude AFM, identifiées de façon sensiblement différente. En effet, dans cette partie de l'étude, les coupes adjacentes à l'anneau utilisées pour la modélisation ont été traitées de façon à faire une étude histologique en paraffine. La contrainte de ce procédé est la nécessité de déshydrater les coupes ce qui ne permet pas de préserver les lipides au sein de la section (DiDonato et Brasaemle 2003). Ainsi, aucune coloration de lipides n'a pu être effectuée. Cependant, une bonne colocalisation a été observée entre les zones riches en lipides et les zones hypocellulaires ou acellulaires non fibrotiques, comme cela a été constaté par étude de coupes à froid dans le cadre de notre étude et par d'autres groupes (J. L. Johnson *et al.* 2005). Ceci permet donc d'identifier les zones LpRi, indépendamment de la coloration spécifique. Pour identifier les zones HyFb et CeFb, tout comme dans la première partie de l'étude, la coloration trichrome HES et le marquage immunohistochimique de cellules musculaires lisses ont été respectivement utilisés.

*De facto*, les zones CeFb ont systématiquement été *a minima* identifiées sur l'ensemble du pourtour des lésions à l'interface avec la lumière vasculaire, et après identification des HyFb intense, le reste du tissu vasculaire a été identifié comme LpRi. Sur l'analyse des coupes à froid, la présence de fréquentes inclusions lipidiques dans les plaques d'athérome justifie cette identification par défaut en zone LpRi. Similairement, Hayenga *et al.* (Hayenga *et al.* 2011) présentent des plaques aortique de souris apoE<sup>-/-</sup> essentiellement identifiées comme lipidiques.

#### 4.2.3 Composition des plaques

**Capsule fibreuse.** Les zones de fibrose cellulaire sont principalement retrouvées sous la couche endothéliale, participant à la formation de ce qui s'apparente à une capsule fibreuse, mais aux dimensions bien plus modestes en comparaison de la capsule fibreuse observée dans la plaque humaine. En effet, dans le cas de lésions humaines, une capsule fibreuse d'épaisseur inférieure à 65 µm est considérée comme un critère majeur de vulnérabilité (Naghavi *et al.* 2003b). En proportion (malgré une morphologie différente), l'ensemble des lésions aortiques de souris apoE<sup>-/-</sup> observées dans cette étude peut être considérée comme vulnérables à l'égard de ce critère.

Des zones CeFb sont également retrouvées à l'intérieur des lésions, identifiées alors comme capsule fibreuses enfouies (*buried fibrous cap*), dont la signification et la portée en terme de stabilité de plaque sont discutées plus loin (exemple en Figure 7 et Figure 18). Ces zones ne présentent pas systématiquement de coloration au safran, probablement en raison d'une densité variable en collagène fibrillaire. Ceci est illustré avec les différents exemples présentés : en Figure 2 on retrouve un couche de CeFb dans ce qui s'apparente à une capsule fibreuse, avec une faible coloration au safran (et également un faible marquage des SMCs), en Figure 3 cette zone présente une forte coloration au safran tandis que la Figure 7 présente une situation intermédiaire. À

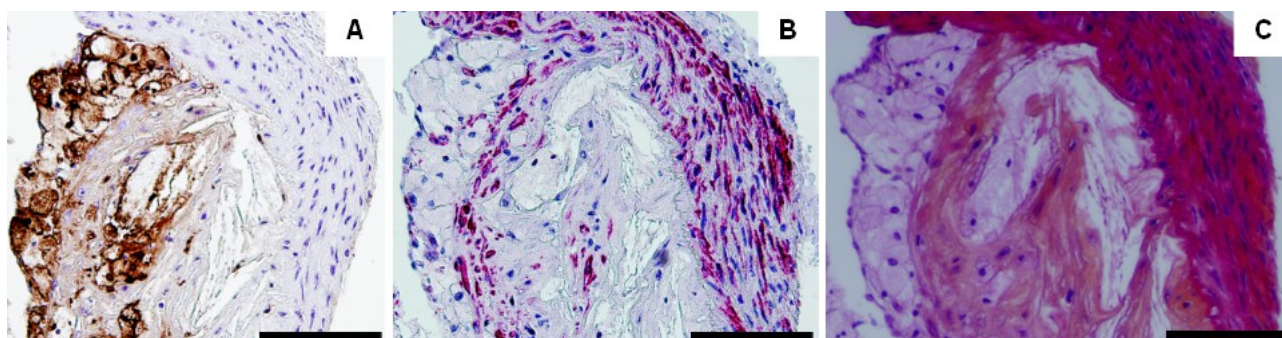


Figure 18. Dépôt xanthomateux constitué de larges cellules spumeuses identifiées par le marquage des macrophages (A) en superficie d'une structure identifiée comme capsule fibreuse enfouie, identifiée par le marquage des SMCs (B) et la coloration du collagène au safran (orange) sur la coloration trichrome HES (C), présent dans une lésion de crosse aortique de souris apoE<sup>-/-</sup>. Barre d'échelle : 100 µm.

l'inverse, des zones présentant un marquage intense au safran et de structure apparentée à une capsule fibreuse enfouie peuvent ne pas présenter de marquage des SMCs (exemple en Figure 2, contre-exemple en Figure 18).

**Plages lipidiques.** Les lésions observées dans cette étude n'ont pas systématiquement présenté de cœur lipidique unique et confluent tel que défini au niveau des plaques humaine athéromateuses ou fibroathéromateuses (Stary *et al.* 1995). Les zones LpRi correspondent à des zones riches en macrophages chargés de lipides ou à des dépôts de lipides extra-cellulaires peu confluents ou organisés en amas, multiples généralement. Ces zones de dépôt extracellulaire ont par endroit montré la présence de cristaux de cholestérol.

**Macrophages.** L'infiltration de macrophages a été observée pour l'ensemble des lésions étudiées, en quantité et distribution variable en fonction des lésions considérées. Globalement peu de macrophages ont été observés à l'arrière des plaques et davantage dans les épaulements, tels que définis ici, pour des lésions murines protrusives (Coleman *et al.* 2006). Ces macrophages ont été observés dans le tissu intimal en densité variable et, pour une partie des lésions, au niveau de dépôts superficiels de macrophages à caractère xanthomateux difficiles à appréhender sur un plan biomécanique (cf. plus loin ; exemple en Figure 18).

**Néo-vascularisation.** Dans le cadre de cette étude, aucune vascularisation n'a été observée au sein des lésions présentes sur la crosse aortique de souris apoE<sup>-/-</sup>. Une étude par Moulton *et al.* (Moulton *et al.* 1999) a montré que chez la souris apoE<sup>-/-</sup> présentant des lésions du tronc aortique d'épaisseur intimale comprise entre 100 et 250 µm l'incidence de présence de néovaisseaux est de 2.9 %. Une épaisseur de la néo-intima moyenne de ~ 160 µm a été observée chez les animaux porteurs de plaques dans la présente étude. Du fait du faible effectif présentant des lésions avancées, il n'est pas étonnant de ne pas avoir observé de néovaisseau dans les lésions.

**Calcification.** Le marquage de l'hydroxyapatite par la coloration histologique von Kossa permet de mettre en évidence les calcifications (Meloan et Puchtler 1985). L'incidence des calcifications étant faible parmi les animaux apoE<sup>-/-</sup> (Zeadin *et al.* 2009), leur absence dans le cadre de cette étude ne présentant qu'un modeste effectif aux âges les plus avancés n'est pas étonnant.

### 4.2.4 Évolution des lésions

Aucune évolution dans la taille et dans la composition relative des différentes zones de plaques n'a été constatée entre les souris apoE<sup>-/-</sup> âgées de 20, 25 et 30 semaines. Similairement, la densité en macrophages n'a pas présenté d'évolution entre les animaux de 20 et 30 semaines. Cette absence

## Partie expérimentale : Biomécanique

d'évolution apparente entre les animaux des différents âge inclus dans l'étude peut être expliquée par une relativement faible population pour chaque point et également par une variabilité dans la sévérité des lésions retrouvées au sein d'animaux de même âge (Nakashima *et al.* 1994). Ces lésions étant peu discriminées histologiquement, l'analyse biomécanique a été menée sur l'ensemble des plaque sans distinction de l'âge de l'animal à partir duquel l'anneau aortique a été prélevé.

### 4.2.5 Caractérisation de la paroi artérielle

**Épaississement.** La présence de lésions chez les animaux de 20 semaines est concomitante à des changements dans la paroi du vaisseau au site de formation des lésions. En effet, un épaississement significatif de la paroi artérielle est observé. À l'arrière de la plaque (qui constitue un épaississement de l'intima), on observe un épaississement de la média et de l'adventice.

Lutgens *et al.* (Lutgens *et al.* 2001) ont rapporté un épaississement de la média d'aortes de souris apoE<sup>-/-</sup> présentant des lésions peu avancées, comparables à ceux de la présente étude.

Cependant Lutgens *et al.* montrent que pour des lésions plus avancées (les animaux de l'étude étant âgées de 52 semaines au maximum), une diminution de l'épaisseur de la média concomitante à la dégradation des lames élastiques et à un remodelage excentrique peut être observée ; ces phénomènes sont plus marqués en périphérie que sur l'aorte thoracique (la crosse aortique n'étant pas évaluée).

**Lames élastiques.** Comme décrit précédemment (Wolinsky et Glagov 1964), les lames élastiques présentent un caractère tortueux sur coupe tissulaire, en l'absence de pression sanguine. Cette étude démontre une diminution de cette tortuosité des lames élastiques à l'arrière des lésions. Ceci est interprété comme une rigidification du tissu vasculaire, ne présentant pas de rétraction responsable du plissement des lames élastiques. La rigidification du tissu avec la pathologie athérosclérotique est un phénomène parfaitement décrit chez l'homme : il s'agit de l'artériosclérose qui est systématiquement associée à l'athérosclérose avancée (Stary *et al.* 1995). La diminution de la tortuosité avec l'âge des souris de l'étude rend compte de la progression de l'artériosclérose.

### 4.2.6 Angle d'ouverture

La coupure de la paroi artérielle effectuée sur la grande courbure de la crosse aortique (i.e. à l'opposé des lésions présentes de façon reproductible sur la petite courbure) donne lieu à une ouverture de l'anneau artériel considéré. Cette ouverture correspond à une dissipation des contraintes résiduelles présentes dans cette paroi, qui est alors considérée comme libérée des contraintes pariétales (Matsumoto, Hayashi, et Ide 1995). L'ouverture de l'anneau aortique est

## Partie expérimentale : Biomécanique

quantifié par la mesure de l'angle d'ouverture tel que défini par Chuong et Fung (Chuong et Fung 1986). L'évolution de l'ouverture de l'anneau artériel reflète donc un changement de l'état de contrainte résiduel. On observe une augmentation de cet angle d'ouverture concomitante à l'apparition des lésions sur l'anneau aortique à 20 semaines et pas d'évolution significative à partir du moment où des lésions sont présentes ; cette évolution n'est pas observée chez les animaux contrôles d'âge correspondant mais ne développant pas de lésions. Ceci signifie que le processus pathologique est responsable d'une modification des contraintes pariétales résiduelles.

L'épaisseur de la média et de l'adventice ainsi que la tortuosité des lames élastiques à l'arrière des lésions ont montré de bonnes corrélations avec l'angle d'ouverture de l'anneau artériel ( $R^2 = 0.49$ ,  $R^2 = 0.55$  et  $R^2 = 0.49$ , respectivement ;  $P < 0.001$  dans les trois cas). Par contre, il n'y a pas de corrélation entre l'épaississement de l'intima et l'angle d'ouverture ( $P = NS$ ). Ceci suggère une faible participation de la néo-intima, et à l'inverse une contribution importante du reste de la paroi artérielle, aux niveaux de contraintes résiduelles observés dans les anneaux présentant des lésions. Ces observations préliminaires concordent avec les données obtenues par modélisation en éléments finis et quantifications des champs de contraintes et déformations.

### 4.3 Étude des propriétés mécaniques des anneaux d'aorte

L'étude des propriétés rhéologiques des matériaux constitutifs d'aortes pathologiques de souris apoE<sup>-/-</sup> âgées de 18 à 30 semaines a été réalisée par micro-indentation *via* un dispositif AFM sur coupes de tissus dans les zones de plaques identifiées par analyse histologique ainsi que dans les lames élastiques et l'espace inter-lamellaire de la média.

#### 4.3.1 Considération sur le protocole expérimental

**Avantage de l'étude en coupe à froid.** L'étude par AFM a été menée sur des coupes d'anneau artériel de 16  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, réalisées sur tissu congelé. Ces coupes d'anneaux artériels ont été obtenues par coupe de tissu congelé. Ceci présente plusieurs avantages par rapport à l'analyse sur tissu frais. 1) Les échantillons sont plus simples à obtenir et à étudier ; les anneaux obtenus par coupe au vibratome en tissu frais (dont l'épaisseur peut difficilement être inférieure à 100  $\mu\text{m}$ ) présentent une propension à flamber lors de l'indentation, donnant ainsi des relations force-indentation non interprétables suivant le modèle utilisé. 2) L'évaluation histologique est plus fine, étant donné qu'il est possible d'obtenir des coupes directement adjacentes à la coupe étudiée sur lesquelles plusieurs marquages ou colorations peuvent être effectués, qu'il est possible d'étudier la coupe même qui a servi à l'analyse en AFM en fin de protocole et qu'au cours de l'analyse, la faible

## Partie expérimentale : Biomécanique

épaisseur de coupe permet de localiser finement les zones étudiées.

**Congélation.** Une expérience préliminaire visant à valider l'absence de modifications sensibles induites par la congélation du tissu artériel a été menée. Cette évaluation, effectuée par AFM, a montré des propriétés mécaniques similaires dans les trois zones de plaque entre deux anneaux aortiques successifs de 100  $\mu\text{m}$  obtenus à partir de tissu frais. Un anneau est évalué sans congélation, l'autre après un cycle de congélation-décongélation. Il en a été conclu que la congélation effectuée suivant les procédés mis en place ne perturbe pas les propriétés mécaniques des matériaux constitutifs des lésions athéromateuses présents sur les anneaux aortiques de souris apoE<sup>-/-</sup>.

En effet, une congélation rapide de tissus biologiques, telle qu'obtenue lors de l'immersion dans un fluide porté à très basse température, permet d'éviter la formation de cristaux d'eau, principaux responsables des dommages occasionnés par la congélation. L'utilisation du 2-méthylbutane, refroidi à l'azote liquide jusqu'à son point de fusion ( $\sim -160$  °C à pression atmosphérique), plutôt que directement de l'azote liquide a pour avantage de ne pas engendrer de phénomène de dégazage, qui peuvent être responsables de cryofractures sur l'échantillon tissulaire (Fischer *et al.* 2008). Contrairement à ce qui a été observé dans cette étude, un effet sensible de la congélation à  $-20$  °C sur les propriétés mécaniques de tissu vasculaire a été rapporté (Venkatasubramanian *et al.* 2010), validant la nécessité d'une congélation rapide.

**Comparaison des données obtenues avec l'expérience préliminaire.** Les coupes de 16  $\mu\text{m}$  d'épaisseur et les coupes en tissus frais de 100  $\mu\text{m}$  (évaluées dans le cadre de l'étude préliminaire mentionnée ci-dessus) ont montré des valeurs de rigidité similaires dans les zones CeFb et LpRi. Cependant les valeurs obtenues par analyse de zone HyFb sont sensiblement différentes. L'explication la plus probable de cette observation tient à la grande hétérogénéité des tissus au sein des plaques et plus particulièrement à celle de ceux classés comme appartenant à la zone HyFb ( $E_{\text{HyFb}}$  a été mesuré à des valeurs allant de 5.6 à 233.8 kPa, cf. ci-dessous). Ainsi les zones HyFb de l'anneau artériel utilisé pour l'évaluation de l'effet de la congélation peuvent présenter en moyenne une rigidité plus faible que celle obtenue dans l'ensemble de l'étude en coupes à froid, en moyenne.

### 4.3.2 Considérations sur la technique et le modèle utilisés et leurs limites

**Rugosité de surface.** Les coupes tissulaires effectuées à froid présentent une certaine irrégularité de surface, comme le montre par exemple l'analyse de l'épaisseur de coupes tissulaires effectuées dans des conditions similaires par microscopie acoustique (observations des expérimentateurs,

## Partie expérimentale : Biomécanique

(Saijo *et al.* 2007)). Ces irrégularités peuvent être de l'ordre de grandeur de la profondeur d'indentation pour la taille de la pointe sphérique utilisée. Or, dans le modèle considéré, la relation force-indentation est ajustée à un modèle considérant une surface parfaitement plane. Il a été constaté lors de l'expérimentation qu'un certain nombre de tirs ont présenté un mauvais ajustement au modèle notamment avec une imprécision dans l'évaluation du point de contact. Cette difficulté liée à l'utilisation de l'AFM a déjà été rapportée dans la littérature (Dimitriadis *et al.* 2002). Ces tirs ont été écartés de l'analyse finale. Cependant il ne peut être exclu que des tirs présentant un ajustement correct au modèle ont été effectués sur une surface non parfaitement régulière et donc que les propriétés rhéologiques déduites ait été faussées ; l'ordre de grandeur de l'erreur liée à cette limitation n'est que difficilement évaluable.

**Indentation.** La faible profondeur d'indentation (0.5 – 1  $\mu\text{m}$ ) par rapport à l'épaisseur du tissu étudié (coupes de 16  $\mu\text{m}$ ) signifie que l'on peut considérer le tissu analysé comme substrat semi-infini, ce qui est un préalable à l'utilisation du modèle de Hertz (Dimitriadis *et al.* 2002).

Cependant, du fait également de la faible profondeur d'indentation (0.5 – 1  $\mu\text{m}$ ), les propriétés rhéologiques obtenues sont celles correspondant à l'échelle microscopique. Ces propriétés sont fortement dépendantes de l'organisation du tissu à cette échelle microscopique, et pourraient ne pas refléter correctement les propriétés mécaniques observées à l'échelle macroscopique (e.g. tests de traction) où des déformations d'un plus grand ordre de grandeur mettent à contribution la structuration histologique du tissu (e.g. fibres de la matrice extra-cellulaire) (McKee *et al.* 2011). Cette limitation est inhérente à l'utilisation de la méthodologie AFM sur des structures de cette échelle. En effet, afin de réaliser une plus grande indentation, l'épaisseur de l'échantillon tissulaire doit également augmenter (afin de préserver l'hypothèse du substrat semi-infini) ; or, l'augmentation dans la dimension longitudinale sans augmenter les dimensions de la coupe (limite de la structure étudié) induit une propension du tissu à flamber lors de l'indentation, ce qui rend impossible l'analyse de la relation force-indentation. De plus, en réalisant une indentation importante, responsable d'une déformation importante, l'hypothèse de petites déformations n'est plus valable (Dimitriadis *et al.* 2002). Dans des tissus présentant une plus grande surface de section, et donc une moindre limitation quant à la profondeur d'indentation, il a été montré que le module de Young estimé dépend de la profondeur d'indentation (Elkin *et al.* 2007).

La faible vitesse d'indentation ( $\sim 0.6 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ; indentation quasi-statique) permet de considérer la composante visqueuse de la réponse tissulaire comme négligeable et donc l'évaluation des données obtenues dans le cadre d'un modèle élastique pur et non visco-élastique (Darling *et al.* 2007).

## Partie expérimentale : Biomécanique

Le grand diamètre des pointes utilisées par rapport aux dimensions des structures du tissu évalué (5 ou 12  $\mu\text{m}$ ), permet de moyenniser localement la rigidité mesurée du tissu. De plus, puisque l'on se trouve dans le domaine élastique, l'utilisation de pointes sphériques permet de s'affranchir de fortes déformations locales (Dimitriadis *et al.* 2002) ; l'hypothèse de faibles déformations peut donc être posée, ce qui est un préalable à l'utilisation du modèle de Hertz.

**Modèle de Hertz.** L'évaluation a été effectuée par ajustement des données expérimentales au modèle de Hertz. Comme mentionné précédemment, l'utilisation de ce modèle implique de travailler en petites déformations (élastique/linéaire) dans un substrat quasi-infini (Dimitriadis *et al.* 2002). Ces conditions sont considérées comme remplies dans le procédé expérimental employé.

**Incompressibilité.** De même, afin de déduire le module de Young à partir du modèle de Hertz, il est nécessaire de connaître le coefficient de Poisson. L'hypothèse de l'incompressibilité des matériaux, posée ici, revient à poser un coefficient de Poisson  $\nu = 0.5$  et permet donc de déduire dans cette hypothèse le module de Young. Dans ces conditions, le module de cisaillement est proportionnel au module de Young ( $E = 3\mu$ ). L'hypothèse d'incompressibilité, liée à la forte teneur en eau des matériaux biologiques, est une assumption raisonnable dans le cas du tissu vasculaire (Carew, Vaishnav, et Patel 1968).

**Isotropie.** L'étude est effectuée par indentation suivant la direction longitudinale uniquement, les coupes tissulaires étant effectuées suivant cet axe. Les propriétés rhéologiques reflètent donc celles du matériau suivant cet axe. Il est considéré que cette réponse est représentative de la réponse suivant tous les axes : on émet l'hypothèse d'isotropie.

### 4.3.3 Comparaison aux données de la littérature

Les propriétés mécaniques de la paroi artérielle saine ont largement été étudiées en particulier à partir d'échantillons artériels issus de grands animaux ou d'échantillons humains obtenus *post-mortem* (Dobrin 1978). A contrario, peu d'études décrivent les propriétés mécaniques des plaques athéromateuses dont la mesure représente une plus grande difficulté. Bien que la souris soit un modèle de prédilection pour l'étude des phénomènes biologiques, peu d'études biomécaniques ont ainsi été réalisées sur des échantillons de tissu murin.

**Considérations sur les techniques d'évaluation des propriétés mécaniques.** Les tests de micro-indentations sont menés sous l'hypothèse de faibles déformations auquel cas les matériaux sont considérés comme parfaitement élastiques. Ces tests donnent accès au module de Young ( $E$ ) qui reflète la rigidité du matériau analysé (Donna M. Ebenstein et Pruitt 2006; McKee *et al.* 2011).

## Partie expérimentale : Biomécanique

Les tests de tensions, compression, inflation (relation pression-diamètre, ou pression-volume) sont effectués à l'échelle macroscopique pour laquelle le comportement non linéaire des tissus doit être considéré. Ainsi, la rigidité peut être exprimée par un module d'élasticité incrémental ( $E_{inc}$ , variable avec la déformation) auquel cas une gamme de valeur de  $E_{inc}$  est donnée pour la gamme de déformations physiologiques (Hudetz 1979). L'évaluation de la rigidité d'un segment artériel peut être présentée par sa compliance (variation de volume pour une variation de pression donnée) ou son inverse : le module d'élasticité de pression (ou module de Peterson) (Peterson, Jensen, et Parnell 1960), ou encore des grandeurs assimilées : module d'élasticité pression-déformation ( $E_p$ , *pressure-strain elastic modulus*) et module d'élasticité circonférentiel ( $E_{\theta}$ , *circumferential elastic modulus*) (R. T. Lee et Kamm 1994). Dans l'ensemble des cas, l'évaluation est effectuée sous l'hypothèse de faible déformation axiale, vérifiée en condition physiologique (Patel et Fry 1966; Cardamone *et al.* 2009). Le tissu artériel présentant une rigidification avec l'étirement, les éléments évalués mécaniquement doivent être étirés pour correspondre à leur déformation physiologique (Dobrin 1978). À noter que la déformation axiale physiologique des artères de souris est plus importante que celle des artères de porc qui elle-même est plus importante que celle des artères humaines (van Andel, Pistecky, et Borst 2003; Collins *et al.* 2011).

Les résultats obtenus sont comparés à d'autres résultats obtenus par tests de micro-indentation ainsi qu'aux données de tests à l'échelle macroscopique, qui sont les techniques de référence pour déterminer les propriétés mécaniques des matériaux. À noter que d'autres techniques à différents degrés de maturité, telles que la microscopie acoustique (Saijo *et al.* 2007), l'analyse par aspiration avec micropipette (Matsumoto *et al.* 2002), l'élastographie (Korte *et al.* 2000) ou la modulographie (Le Floc'h *et al.* 2009), permettent également l'évaluation des propriétés mécaniques de tissus biologiques. Des tests fonctionnels, comme la technique de référence de mesure de la vitesse de pouls (PVW, *pulse-wave velocity*) permettent également d'appréhender la rigidité artérielle, la vitesse du pouls étant liée au  $E_{inc}$  de la paroi artérielle par l'équation de Moens–Korteweg (Cavalcante *et al.* 2011).

Dans l'ensemble des cas présentés pour comparaison, on s'intéresse au comportement des matériaux en conditions quasi-statiques afin de s'affranchir de la composante visqueuse. En effet, l'évaluation des propriétés mécaniques et la modélisation qui suit sont réalisées en négligeant la composante visqueuse. Il est toutefois intéressant de noter que cette approximation peut être significative ; l'étude de Lee *et al.* (R. T. Lee *et al.* 1991) par exemple, a montré une rigidification de 7 % de la capsule fibreuse avec l'augmentation de la fréquence de compression dans une gamme

## Partie expérimentale : Biomécanique

correspondant à la fréquence physiologique du pouls (1 à 2 Hz), ce qui a été discuté comme pouvant être un élément d'explication de l'augmentation de la prévalence de rupture de plaque avec l'élévation du rythme cardiaque (Muller, Tofler, et Stone 1989).

**Paroi artérielle saine.** Le module de Young a été évalué par micro-indentation longitudinale *via* un dispositif AFM dans les lames élastiques et de l'espace inter-lamellaire de la média d'aorte de souris *apoE<sup>-/-</sup>* de 25 – 30 semaines. Les valeurs obtenues ( $58.3 \pm 6.3$  et  $4.2 \pm 0.7$  kPa, respectivement) sont comparables aux valeurs retrouvées dans la littérature.

En effet, dans le même modèle animal, Hayenga *et al.* (Hayenga *et al.* 2011) ont rapporté des valeurs médianes, obtenus suivant une méthodologie similaire de 76.7 et 9.8 kPa, pour les deux mêmes tissus respectivement. Toujours par indentation longitudinale, Matsumoto *et al.* (Matsumoto *et al.* 2004) ont rapporté des valeurs de rigidité de  $\sim 180$  kPa et  $\sim 52$  kPa pour les lames élastiques et l'espace inter-lamellaire de média d'aorte de porc respectivement, tandis que dans des conditions expérimentales similaire mais pour des artères musculaires de plus faible diamètre, Oie *et al.* (Oie *et al.* 2009) ont rapporté des valeurs de rigidité de lames élastiques, de la limitante élastique interne et de l'espace inter-lamellaire de  $50.8 \pm 13.8$ ,  $69.0 \pm 12.8$  kPa et  $17.0 \pm 9.0$  kPa respectivement. L'indentation longitudinale d'artères fémorales humaines a permis l'évaluation de la rigidité à 34.3 kPa (Lundkvist *et al.* 1996).

Chez la souris, l'étude de la relation pression-diamètre a permis de déduire des valeurs de rigidité circonférentielle dans la crosse aortique de 75 – 100 kPa (Guo et Kassab 2003). Une méthodologie similaire a montré une valeur de  $E_{inc}$  de  $\sim 200$  kPa pour une pression de 100 mmHg dans l'aorte ascendante de souris C57Bl/6J (Carta *et al.* 2009).

Comme présenté dans la revue de Dobrin (Dobrin 1978), le module d'élasticité de pression ( $E_p$ ) a été évalué, par différentes méthodes à échelle macroscopique, à 34 – 147 kPa dans l'aorte ascendante chez le chien, et augmente vers la distalité jusqu'à des valeurs de 154 – 353 kPa dans de l'aorte abdominale, et de 169 – 962 kPa dans les grandes artères musculaires. Des valeurs similaires ont été observées chez le chat et l'homme. L'élastine obtenue à partir de ligaments et d'aorte présente un module d'élasticité incrémental  $E_{inc}$  variant entre 150 et 410 kPa entre un état entièrement relâché et la rupture.

**Tissu fibreux lésionnel.** Dans le cadre de cette étude, le module de Young est évalué par AFM sous l'assomption d'isotropie et de linéarité (discuté ci-dessus) à  $59.4 \pm 47.4$  kPa et  $10.4 \pm 5.7$  kPa pour les zones de néo-intima classées comme fibrose intense (HyFb) et fibrose cellulaire (CeFb).

## Partie expérimentale : Biomécanique

Une grande hétérogénéité dans les valeurs obtenues a été constatée, reflétant le caractère hétérogène du tissu lésionnel au sein des zones définies.

Hayenga *et al.* (Hayenga *et al.* 2011) ont mené une étude similaire à la nôtre, visant à évaluer la rigidité d'anneaux d'aorte de souris apoE<sup>-/-</sup>, mais en réalisant des indentations longitudinales en tissu frais. L'ajustement des courbes force-indentation au modèle de Hertz a montré de faibles rigidités au sein du tissu lésionnel : hormis quelques points présentant des rigidités plus importantes (jusqu'à 37 kPa), l'ensemble des tirs a montré des rigidité < 10 kPa. Similairement, l'étude par Barrett *et al.* (Barrett *et al.* 2009) présente une évaluation des propriétés mécaniques par indentation quasi-statique (jusqu'à 0.5 mm) de lésions carotidiennes humaines donnant accès au module de cisaillement, lui-même lié sous les hypothèses d'incompressibilité et d'isotropie au module de Young. Cette étude présente des valeurs de rigidité moyenne de 33 kPa (21 – 300 kPa). Toujours par AFM, une évaluation de la rigidité de l'espace sous-endothélial à partir d'une indentation *en face* (direction radiale) d'artère carotide bovine desendothélialisée a montré de faibles valeurs de rigidité :  $E = 2.7 \pm 1.1$  kPa (proche de celle obtenue par évaluation de la rigidité de l'endothélium) (Peloquin *et al.* 2011). Par micro-indentation *via* AFM, Chai *et al.* (Chai *et al.* 2013) ont rapporté une valeur de rigidité médiane de 30 kPa (6 - 891 kPa) dans la capsule fibreuse de plaques carotidiennes humaines.

Lee *et al.* (R. T. Lee *et al.* 1991) ont proposé une étude des matériaux constitutifs de la capsule fibreuse de plaques humaines présentes sur l'aorte abdominale. Cette étude a été réalisée par des tests dynamiques de compressions radiales, à des fréquences proches de celle du pouls, et en utilisant un spectromètre mécanique asservi. Des rigidités de  $510 \pm 220$  kPa,  $900 \pm 220$  kPa et  $2340 \pm 1090$  kPa ont été observées pour des capsules fibreuses classées comme cellulaires, hypocellulaires et calcifiées respectivement. Une étude menée par la même équipe et présentant une évaluation en condition de charge quasi-statiques (R. T. Lee *et al.* 1992) a montré une rigidité plus faible que celle précédemment rapportée lors de l'évaluation dynamique de capsules fibreuses de lésions d'aorte abdominale humaine : les tissus non fibreux, fibreux et calcifiés ont présenté des rigidités de  $42 \pm 18$ ,  $82 \pm 33$  et  $355 \pm 246$  kPa respectivement. Loree *et al.* (Loree, Grodzinsky, *et al.* 1994) ont rapporté des valeurs de rigidité de  $927 \pm 468$  kPa,  $2312 \pm 2180$  kPa, et  $1466 \pm 1284$  kPa pour des plaques classées comme cellulaires, hypocellulaires et calcifiées après évaluation par tests de traction statique. Hoplapfel *et al.* (Holzapfel, Sommer, et Regitnig 2004) ont présenté une évaluation de la limite à la rupture par test de traction, suivant les axes longitudinaux et circonférentiels, effectuée sur des échantillons de capsule fibreuse issus de lésions d'artères

## Partie expérimentale : Biomécanique

iliaques humaines. Cette limite de rupture en traction de la capsule fibreuse, selon la direction circonférentielle, a été déterminée à  $255 \pm 80$  kPa. Cette limite de rupture est du même ordre de grandeur que la limite en rupture observée dans la média saine (à l'opposé de la lésion), qui s'élève à  $202 \pm 70$  kPa. A partir de ces tests, sous l'hypothèse d'incompressibilité, Barrett *et al.* (Barrett *et al.* 2009) ont déduit des rigidités de 840 kPa et 1200 kPa selon les directions circonférentielles et axiales, respectivement. L'étude de deux échantillons d'endartériectomie par tests de traction a donné des valeurs de rigidité moyenne par plaque de 336 et 574 kPa (Heiland *et al.* 2013).

**Lipides.** L'évaluation par AFM des zones riches en lipides (LpRi) a montré, comme attendu, une faible rigidité :  $5.5 \pm 3.5$  kPa, avec là aussi une certaine hétérogénéité, ces zones ne représentant pas uniquement des zones purement lipidiques, rarement observées dans les lésions murines étudiées.

L'étude par AFM de lésions de souris apoE<sup>-/-</sup> de Hayenga *et al.* (Hayenga *et al.* 2011) a montré que 86 % des tirs dans les plaques ont révélé une rigidité  $< 5$  kPa, correspondant à des zones lipidiques de rigidité médiane 1.5 kPa.

L'étude par Loree *et al.* (Loree, Tobias, *et al.* 1994) présente une évaluation de la rigidité de la composante lipidique des lésions par analyse dynamique de préparations de triacylglycérol enrichies en cholestérol libre par un rhéomètre à torsion. Ce test donne accès au module de cisaillement qui, sous l'hypothèse d'incompressibilité et d'isotropie, est égale à 3 fois le module de Young. Pour une évaluation à 1 Hz, le module de Young a été estimé comme compris entre 0.1 à 0.9 kPa pour un contenu en cholestérol variant de 0 % à 50 %. La rigidification observée a été attribuée à la présence de cristaux de cholestérol. Cette rigidité ainsi mesurée est plus faible en moyenne que dans notre étude où les zones LpRi présentent un contenu plus hétérogène que des mélanges de lipides purs.

**Comparaison qualitative entre espèces.** Wolinsky et Glagov (Wolinsky et Glagov 1967) ont observé qu'au sein de 10 espèces différentes de mammifères (y compris l'homme et la souris) le nombre de lames élastiques de la média de l'aorte abdominale est proportionnel au diamètre du vaisseau et à la tension circonférentielle moyenne. La tension pariétale circonférentielle est comprise entre 7 – 200 N/m pour les différentes espèces, mais normalisée à la lame élastique, cette valeur est approximativement constante pour l'ensemble des animaux (2 – 3 N/m). Similairement, la tension circonférentielle normalisée par l'épaisseur du vaisseau donne une contrainte circonférentielle approximativement constante entre espèce. Les tests mécaniques à l'échelle macroscopique présentent des valeurs de rigidité d'aorte saine variant avec le lit vasculaire, l'âge, mais ne variant que peu entre espèces (Dobrin 1978; Wagenseil et Mecham 2009). L'évaluation du

## Partie expérimentale : Biomécanique

tissu artériel sain par indentation présente également des valeurs du même ordre de grandeur quelle que soit l'espèce considérée (Hayenga *et al.* 2011; Oie *et al.* 2009; Lundkvist *et al.* 1996; Matsumoto *et al.* 2004). Ces valeurs sont difficilement comparables aux valeurs obtenues grâce aux tests à l'échelle macroscopique en l'absence de modèle de comportement non linéaire.

Le tissu fibreux lésionnel de souris présente une rigidité plus faible dans des zones similaires (suivant l'évaluation histologique) issues d'échantillons humains (R. T. Lee *et al.* 1991; Loree, Grodzinsky, *et al.* 1994; Holzapfel, Sommer, et Regitnig 2004; Barrett *et al.* 2009). Cette observation a été confirmée par une étude postérieure à la nôtre et réalisée dans des conditions similaires (Hayenga *et al.* 2011).

**Comparaison qualitative entre techniques.** Une grande hétérogénéité est observée dans les valeurs de rigidité de tissus fibreux issus de l'intima. Sur du tissu humain, Barrett *et al.* (Barrett *et al.* 2009) ont rapporté des valeurs de rigidité moyenne de 33 kPa par test d'indentation, tandis que Lee *et al.* (R. T. Lee *et al.* 1991) ont rapporté des valeurs de rigidité de 510 – 900 kPa en moyenne par tests de compression radiale.

Une revue récente comparant les méthodes d'indentation aux tests de tension a montré une sous-estimation de la rigidité obtenue par indentation (McKee *et al.* 2011). Cette erreur est attribuée au fait que la mesure ne porte que sur les propriétés locales et ne met pas en jeu l'organisation macroscopique du tissu, notamment les fibres fortement impliquées dans la résistance mécanique suivant une orientation particulière (e.g. cas des tendons). Un autre élément pouvant expliquer cette différence tient à la présence de liquide (incompressible), qui ne participe que faiblement aux propriétés mécaniques lors de faibles déformation locales ; à cet égard, les propriétés mécaniques mesurées aux déformations macroscopiques rendent plus justement compte des propriétés réellement rencontrées *in vivo*.

La sensibilité des tests de nano-indentation à la profondeur d'indentation est reconnue comme source potentielle d'erreur ; cette observation a été nommée ISE, *indentation size effect* (Rodriguez et Gutierrez 2003). Cependant, à contrario de ce qui est rapporté par McKee *et al.*, cet effet (observé dans un cadre plus général que celui des tissus biologiques) tend à surestimer la rigidité mesurée par micro-indentation. Dans les tissus biologiques, il a été montré que l'augmentation de la profondeur d'indentation pouvait être responsable d'une augmentation de la rigidité mesurée ; l'analyse d'une même zone de cerveau de rat a présenté une rigidité de  $\sim 100$  kPa pour une indentation de  $0.5 \mu\text{m}$ , alors qu'à  $3 \mu\text{m}$  d'indentation, cette rigidité a été évaluée à  $\sim 300$  kPa. (Elkin *et al.* 2007). Bien que cet effet n'ait pas été aussi marqué pour d'autres zones, la rigidité évaluée a systématiquement

## Partie expérimentale : Biomécanique

augmenté avec une profondeur d'indentation  $> 1 \mu\text{m}$ . L'explication la plus probable à ce phénomène est toutefois le comportement non-linéaire du cantilever avec l'augmentation de la charge, qui est un biais expérimental reconnu (Thormann, Pettersson, et Claesson 2009).

Ebenstein *et al.* (D. M. Ebenstein et Pruitt 2004) ont montré que les dimensions de la pointe avec laquelle l'indentation est effectuée peut également être un biais méthodologique : l'indentation de gel d'agarose avec une pointe sphérique de  $10 \mu\text{m}$  de diamètre a montré des valeurs de rigidité apparente inférieures à celles obtenues avec des pointes de  $50$ ,  $100$  et  $800 \mu\text{m}$  de diamètre.

Cependant, un nombre important d'études présente des validations concluantes des méthodes d'évaluation de rigidité par tests d'indentation. Par exemple, Miller et Morgan (G. J. Miller et Morgan 2010) ont publié une étude comparant l'évaluation des propriétés mécaniques effectuées par tests de compression macroscopique et tests de micro-indentation sur du cartilage articulaire. Les deux techniques ont permis d'évaluer un module de Young à des valeurs proches, présentant une corrélation positive entre elles ( $r^2 = 0.49$ ).

**Conclusion sur la comparaison des valeurs de rigidité obtenues dans la littérature.** La littérature concernant les propriétés mécaniques des tissus vasculaires est très abondante mais aussi très hétérogène avec des différences de plusieurs ordres de grandeurs d'écart en fonction des tissus analysés et des méthodologies employées. Comme discuté ci-dessus, la méthodologie AFM adaptée à l'évaluation de la rigidité d'échantillons tissulaires présente un certain nombre de limitations parmi lesquelles la faible profondeur d'indentation par rapport aux dimensions du tissu. Il se pourrait en effet que cette limitation tende à sous-estimer la rigidité des matériaux évalués. Nos résultats ainsi que les différentes études citées dans cette partie de discussion sont présentés dans le Tableau 7.

Étude	Origine, Espèce	Tests	E ou assimilé (kPa)
<b>Paroi artérielle saine</b>			
<b>Lames élastiques</b>			
Présentée ici	Crosse aortique, souris	Micro-indentation	$58.3 \pm 6.3$
Hayenga <i>et al.</i> 2011	Aorte abdominale, souris	Micro-indentation	76.7
Matsumoto <i>et al.</i> 2004	Aorte thoracique, porc	Micro-indentation	~ 180
Oie <i>et al.</i> 2009	Carotide, porc	Micro-indentation	$50.8 \pm 13.8$
<b>Espace inter-lamellaire</b>			
Présentée ici	Crosse aortique, souris	Micro-indentation	$4.2 \pm 0.7$
Hayenga <i>et al.</i> 2011	Aorte abdominale, souris	Micro-indentation	9.8
Matsumoto <i>et al.</i> 2004	Aorte thoracique, porc	Micro-indentation	~ 52

## Partie expérimentale : Biomécanique

Oie <i>et al.</i> 2009	Carotide, porc	Micro-indentation	17.0 ± 9.0
<b>Tissu fibreux lésionnel</b>			
Barrett <i>et al.</i> 2009	Carotide, homme	Micro-indentation	33 (21 – 300)
Peloquin <i>et al.</i> 2011	Carotide bovine	Indentation <i>en face</i>	2.7 ± 1.1
Chai <i>et al.</i> 2013	Carotide, homme	Micro-indentation	30 (6 – 891)
Holzappel, Sommer, et Regitnig 2004	Artère iliaque, homme	Traction	(840)
Heiland <i>et al.</i> 2013	Carotide, homme	Compression	336 – 574
<b>Tissu fibreux dense/hypocellulaire</b>			
Présentée ici	Crosse aortique, souris	Micro-indentation	59.4 ± 47.4 (5.6 – 233.8)
Lee <i>et al.</i> 1991	Aorte abdominale, homme	Compression	900 ± 220 kPa
Lee <i>et al.</i> 1992	Aorte abdominale, homme	Compression	82 ± 33
Loree, Grodzinsky, <i>et al.</i> 1994	Aorte thoracique et abdominale, homme	Traction	2312 ± 2180
<b>Tissu fibreux cellulaire</b>			
Présentée ici	Crosse aortique, souris	Micro-indentation	10.4 ± 5.7 (1.6 – 25.0)
Lee <i>et al.</i> 1991	Aorte abdominale, homme	Compression	510 ± 220
Lee <i>et al.</i> 1992	Aorte abdominale, homme	Compression	42 ± 18
Loree, Grodzinsky, <i>et al.</i> 1994	Aorte thoracique et abdominale, homme	Traction	927 ± 468
<b>Lipides/Tissu lésionnel riche en lipides</b>			
Présentée ici	Crosse aortique, souris	Micro-indentation	5.5 ± 3.5 (0.6 – 13.7)
Hayenga <i>et al.</i> 2011	Aorte abdominale, souris	Micro-indentation	1.5
Loree, Tobias, <i>et al.</i> 1994	Préparation lipidique	Rhéométrie à torsion	0.1 – 0.9

Tableau 7. Récapitulatif des propriétés mécaniques du tissu artériel. Pour plus de détails cf. texte de la partie 4.3.

En dépit de ces considérations, les résultats obtenus sont cohérents avec une partie de la littérature dans le domaine. Ainsi, le tissu fibreux des lésions apparaît comme moins rigide (1 à 2 ordres de grandeur) que le tissu fibreux de l'intima des plaques humaines. La rigidité évaluée dans les zones riches en lipides (qui tel que défini ne représente pas uniquement du lipide pur) est du même ordre de grandeur (légèrement supérieur) que celle des mélanges lipidiques, classiquement utilisés pour rendre compte de la rigidité des zones lipidiques des plaques.

#### 4.4 Profils de distribution des contraintes et déformations pariétales

La conformation ouverte de l'anneau aortique, considérée comme libre de toute contrainte, a été segmentée. La modélisation en éléments finis a été réalisée à partir de ce maillage en considérant une épaisseur unitaire sous l'hypothèse des déformations planes, avec des propriétés rhéologiques assignées après étude histologique de coupes adjacentes. Cette modélisation a d'abord permis d'obtenir un état de contrainte résiduelle (fermeture de l'anneau) puis physiologique (mise sous pression de l'anneau refermé).

##### 4.4.1 Limites de l'étude par modélisation

**Uniformité histologique des lésions.** Les propriétés rhéologiques attribuées aux différents éléments segmentés ont été définies à partir de l'évaluation histologique des coupes obtenues à partir du tronçon adjacent à l'anneau aortique utilisé pour la modélisation. L'hypothèse de l'uniformité de la lésion dans sa constitution histologique, sur l'épaisseur de l'anneau (200  $\mu\text{m}$ ) et avec le tronçon artériel adjacent, est donc posée.

**Définition de zones.** La subdivision des plaques en 3 zones aux propriétés rhéologiques propres ne reflète pas correctement la complexité des lésions où des zones peuvent présenter des propriétés mécaniques évoluant de façon continue dans différentes directions de l'espace.

L'analyse en éléments finis requière une discrétisation de l'espace, ainsi, les changements de propriétés rhéologiques sont nécessairement discrets. De ce fait, la présence de bords francs aux zones définies ne présente pas en soi de problèmes.

À noter enfin que par nécessité pour le calcul numérique, l'ensemble des zones à l'interface avec la lumière vasculaire a été défini comme zone de fibrose cellulaire, ne rendant probablement pas justement compte de l'influence (ou plutôt de l'absence d'influence mécanique) des dépôts xantomateux retrouvés au niveau de certaines plaques.

**Dissipation de la contrainte résiduelle.** L'ouverture de l'anneau aortique reflète la dissipation des contraintes résiduelles au sein de cet anneau (Matsumoto, Hayashi, et Ide 1995). L'hypothèse est émise que l'ensemble des contraintes résiduelles sont dissipées par cette ouverture ; ainsi la modélisation débute à partir d'un état non contraint. Cette hypothèse est une approximation et constitue une limitation de l'approche par modélisation (Matsumoto *et al.* 2004) bien que ce soit une approximation beaucoup moins forte que de simplement négliger la contrainte résiduelle.

**Déformations planes.** La modélisation est effectuée à partir du maillage de l'anneau aortique en conformation ouverte présentant une épaisseur unitaire (maillage plan). Ainsi, l'étude de la

## Partie expérimentale : Biomécanique

répartition des contraintes est restreinte à la coupe réalisée et ne prend pas en compte la géométrie tridimensionnelle des vaisseaux et des lésions. Cette limitation s'applique aussi bien lors de l'évaluation de l'état résiduel que de l'état physiologique. Dans les deux cas la direction circonférentielle est en théorie principalement sollicitée (ouverture plane et loi de Laplace). En dépit de cela, une étude récente comparant la modélisation en éléments finis réalisée à partir d'échantillons histologiques segmentés en coupe ou en trois dimensions à partir de différents niveaux de coupes montre une différence importante entre les méthodes (Nieuwstadt *et al.* 2013).

**Conformation initiale de l'anneau aortique.** Par extension du point mentionné ci-dessus, il est important de préciser que l'image de l'anneau artériel a pu présenter lors de son incision un certain degré de torsion hors du plan dont il n'a pas été possible de rendre compte dans l'hypothèse de travail (ouverture plane) ; la fermeture de l'anneau artériel dans le plan génère donc un niveau de contrainte résiduelle pas entièrement représentatif de l'état résiduel réel.

**Charge quasi-statique.** Les simulations de mise sous pression ont été réalisées pour une condition de charge quasi-statique (ou deux charges quasi-statiques, dans le cas de l'évaluation de l'amplitude de déformation entre diastole et systole). Cette étude ne rend pas compte du comportement visco-élastique de la paroi artérielle répondant au caractère pulsatile du pouls (Holzapfel, Gasser, et Stadler 2002).

Les matériaux considérés répondent à deux types de lois de comportement. Les mesures effectuées en AFM sont directement utilisées pour caractériser le comportement des matériaux de l'intima sous l'hypothèse d'isotropie selon un modèle de comportement de type Néo-Hookéen tandis que sur la base des mesures effectuées dans la média, un modèle anisotrope et non linéaire est construit (Holzapfel *et al.* 2005). Dans les deux cas, les tissus ont été considérés comme quasi-incompressibles. L'étude de ces modèles n'est pas considérée comme entrant dans le cadre de ce travail de thèse ; leurs implications et limitations sont largement commentées par ailleurs (Mesnier 2011). À noter que, tel que discutée en partie 4.3, l'évaluation des propriétés rhéologiques des constituants de l'anneau artériel, intégrées dans les modèles de comportement, présente ses propres limitations.

### 4.4.2 Distribution des contraintes pariétales dans l'aorte de souris apoE<sup>-/-</sup>

**Les contraintes pariétales résiduelles.** Comme montré par l'évolution de l'angle d'ouverture des anneaux aortiques, le processus pathologique est responsable d'une modification de la contrainte résiduelle pariétale de la crosse aortique de souris apoE<sup>-/-</sup>. Cette modification est observée dans la

## Partie expérimentale : Biomécanique

média qui présente une contrainte résiduelle moyenne de  $25 \pm 2$  kPa. Ceci représente une sollicitation de 3.2 fois celle des animaux contrôles ; les lésions athéromateuses ne sont que faiblement sollicitées ( $4 \pm 1$  kPa en moyenne).

L'étude par Gregersen *et al.* (Gregersen *et al.* 2007) présente une évaluation de la contrainte résiduelle par mesure de la longueur circonférentielle à la face interne et externe d'anneaux aortiques de souris apoE<sup>-/-</sup> avant et après coupure radiale et, conformément à nos observations, met en évidence une augmentation des contraintes résiduelles avec le processus pathologique.

**Les contraintes pariétales sous pression physiologique.** L'évaluation des contraintes pariétales à pression physiologique prenant en compte les contraintes résiduelles montre que la contrainte présente dans les lésions est en moyenne faible, restant du même ordre de grandeur qu'en l'absence de pression sanguine, soit  $4 \pm 0$  kPa. De plus, il n'y a pas de concentrations de contraintes : la contrainte maximale dans les lésions reste  $\leq 35$  kPa. Cette contrainte est systématiquement largement inférieure à la contrainte présente dans la média ( $105 \pm 10$  kPa en moyenne, avec des contraintes maximales  $\leq 365$  kPa). Cette observation montre une faible sollicitation mécanique des lésions aortiques murines.

L'observation du faible niveau global de contrainte dans les lésions murines a également été rapportée récemment par d'autres groupes (I. C. Campbell *et al.* 2013). Cette observation contraste avec les analyses effectuées chez l'homme qui montrent une concentration des contraintes dans la capsule fibreuse des plaques d'athéromes, généralement aux épaulements associés aux sites de ruptures lorsque la contrainte est supérieure à 300 kPa (Richardson, Davies, et Born 1989; Loree *et al.* 1992; G. C. Cheng *et al.* 1993; Finet, Ohayon, et Rioufol 2004; Ohayon *et al.* 2008).

**Influence de la contrainte résiduelle.** Malgré la relativement faible amplitude des contraintes résiduelles, leur prise en compte permet d'éviter la surestimation des contraintes pariétales présentes à pression physiologique, notamment dans les lésions. Plus particulièrement, dans les épaulements des plaques (telles que définies pour des plaques murines), qui sont les régions qui présentent en moyenne les contraintes les plus élevées, la contrainte est 14.2 fois supérieure lorsque les contraintes résiduelles sont ignorées, atteignant des valeurs proches de celle évaluées dans la média ( $276 \pm 71$  kPa en moyenne et jusqu'à 650 kPa au maximum).

L'évaluation des contraintes résiduelles apparaît donc comme nécessaire à une évaluation précise des contraintes pariétales, similairement à ce qui avait déjà été rapporté lors de l'étude d'artères coronaires humaines (Ohayon *et al.* 2007). La présence de lésions entraînant une augmentation de la contrainte résiduelle, cette évaluation apparaît d'autant plus importante dans le contexte de la

pathologie athéromateuse.

**Influence de la rhéologie.** Notre étude indique qu'en conditions physiologiques, la contrainte présente dans les lésions murines a été fortement augmentée lorsque des propriétés rhéologiques humaines (rigidité augmentée) ont été assignées aux matériaux constitutifs de ces lésions. En effet, la contrainte maximale évaluée à l'interface entre la lumière du vaisseau et la lésion passe de  $8.4 \pm 2.6$  kPa en rhéologie murine à  $182.3 \pm 55.9$  kPa en rhéologie humaine.

L'étude par Loree *et al.* (Loree, Tobias, *et al.* 1994) montre que la contrainte dans la capsule fibreuse des plaques augmente d'autant plus que les propriétés mécaniques du cœur lipidique sont faibles ; les forces se répartissent en effet dans les matériaux rigides, générant en leur sein une forte contrainte. Ainsi, il n'est pas surprenant qu'en augmentant la rigidité des matériaux constitutifs des plaques de souris, on observe une plus forte contrainte.

L'étude par Vengrnyuk *et al.* (Vengrenyuk *et al.* 2010) a montré une contrainte pariétale maximale élevée au niveau de lésions dans l'artère brachiocéphalique (du même ordre de grandeur que dans les lésions coronaires humaines vulnérables). Dans cette étude, la modélisation par méthode des éléments finis a été réalisée en négligeant la contrainte résiduelle et en utilisant une rhéologie humaine. Ces deux éléments ainsi que le site anatomique choisi peuvent expliquer la disparité avec nos résultats.

**Conclusion.** L'étude par modélisation en éléments finis à partir d'anneaux aortiques de souris a mis en évidence plusieurs points. 1) Les contraintes résiduelles sont augmentées dans le contexte pathologique. 2) Les contraintes dans les plaques sont faibles. 3) En négligeant les contraintes résiduelles, les contraintes dans les plaques sont surestimées. 4) En utilisant une rhéologie humaine, les contraintes dans les plaque sont surestimées.

### 4.4.3 Implications en termes de vulnérabilité

La rupture de plaque survient suite à une concentration de contrainte pariétale, en particulier de contrainte circonférentielle dans la capsule fibreuse (Richardson, Davies, et Born 1989; Falk, Shah, et Fuster 1995).

**Relation morphologie–rhéologie–contrainte pariétale.** Dans les plaques d'artères coronaires humaines, le seuil de rupture a été estimé à  $\sim 300$  kPa de contrainte pariétale (G. C. Cheng *et al.* 1993). Cette estimation ne prend pas en compte les contraintes résiduelles et donc surestime le seuil de contrainte à rupture (Ohayon *et al.* 2007). Des critères morphologiques (épaisseur de la capsule fibreuse et dimensions du cœur lipidique) présentent un effet sensible sur le niveau de contrainte de

## Partie expérimentale : Biomécanique

la capsule fibreuse (Loree *et al.* 1992; M. J. Davies *et al.* 1993; Loree, Tobias, *et al.* 1994; Finet, Ohayon, et Rioufol 2004; Ohayon *et al.* 2008).

Le faible niveau de contraintes observé dans les lésions athérosclérotiques murines de la crosse aortique par rapport à celui observé au sein des lésions humaines vulnérables apparaît donc comme un élément majeur explicatif de la stabilité des lésions murines. La faible rigidité des matériaux constituant ces lésions est responsable d'une faible sollicitation mécanique. Notre étude montre que l'utilisation de la rhéologie de matériaux humains, plus rigides, est responsable à elle seule d'une augmentation importante des contraintes maximales dans les lésions, indépendamment de leur morphologie. Similairement, l'étude par modélisation en éléments finis d'artères idéalisées de Akyildiz *et al.* (Akyildiz *et al.* 2011) montre une influence importante de la rigidité (dans la gamme de valeurs rapportées dans la littérature pour le tissu fibreux de plaques coronaires humaines) sur la contrainte maximale dans la capsule fibreuse.

La morphologie des plaques aortiques de souris apoE<sup>-/-</sup> diffère fortement de celle des lésions coronaires vulnérables humaines. Les distinctions essentielles sont l'absence d'épaississement de l'intima en dehors de la plaque (Nakashima, Wight, et Sueishi 2008), un caractère protrusif de la plaque (s'opposant au remodelage excentrique), l'absence de réelle capsule fibreuse et de réel cœur lipidique au profit d'inclusions lipidiques plus diffuses (Coleman *et al.* 2006). À noter que la rhéologie des matériaux est impliquée dans la morphogenèse des lésions, expliquant les différences entre espèces. En effet, par extension des observations de Loree *et al.* (Loree, Tobias, *et al.* 1994), on peut aisément concevoir une confluence des zones lipidiques au sein de lésions humaines globalement rigides, alors que la relativement faible rigidité des matériaux constituant les lésions murines pourrait expliquer l'absence de cœurs lipidiques confluents au profit de larges zones enrichies en lipides pour la majorité des lésions observées. Similairement, les contraintes pariétales se distribuent préférentiellement dans l'intima des lésions humaines, laissant en arrière une média relativement peu sollicitée, qui présente alors un certain degré de déstructuration et en conséquence une réactivation de la prolifération cellulaire aboutissant à un remodelage excentrique jusqu'à un niveau où la contrainte pariétale suffisante permet un maintien de la structure tissulaire (Korshunov, Schwartz, et Berk 2007). Chez la souris, sur le site et à l'âge étudié, malgré la présence de lésions, la média reste la structure majoritairement sollicitée ce qui explique l'absence de remodelage excentrique (Coleman *et al.* 2006).

**Contrainte de cisaillement.** L'expérimentation mise en place n'était pas destinée à l'évaluation de l'effet des contraintes de cisaillement exercées par le flux sanguin sur la vulnérabilité. La contrainte

## Partie expérimentale : Biomécanique

de cisaillement ou plutôt sa perturbation est extrêmement importante dans l'athérogenèse notamment en favorisant la dysfonction endothéliale (développé dans la partie Revue Bibliographique). Même chez la souris qui présente une amplitude de contrainte de cisaillement 20 fois supérieure à celle rencontrée chez l'homme (Weinberg et Ross Ethier 2007), cette contrainte reste très modeste par rapport à la contrainte pariétale (de l'ordre de dizaines de  $\text{dyn/cm}^2$ , ie.  $\sim \text{Pa}$ , vs. centaines de kPa). Dès lors, en dehors des processus biologiques liés à la contrainte de cisaillement, son impact sur la vulnérabilité est très limité, comme attesté par les études modélisant les interactions fluide-structure (C. Yang *et al.* 2007; Teng *et al.* 2010).

**Inflammation.** L'importance de l'infiltration des macrophages dans la capsule fibreuse sur l'abaissement du seuil de contrainte à la rupture a été montré chez l'homme (Lendon *et al.* 1991). Cette observation est liée à la diminution du contenu en collagène de la capsule fibreuse (Burleigh *et al.* 1992), secondaire à une diminution de la synthèse des fibres de matrice extra-cellulaire et à l'augmentation de leur dégradation enzymatique dues au contexte inflammatoire (développé dans la partie Revue Bibliographique et P. K. Shah 2009).

La présence de marqueurs de l'inflammation telle que MMP-1 (R. T. Lee *et al.* 1996) et NF- $\kappa$ B, mais aussi des macrophages (Hallow *et al.* 2009) sont en relation avec la contrainte pariétale dans les artères coronaires humaines. L'étirement des cellules, lié à la contrainte locale, induit l'expression du NF- $\kappa$ B (Hishikawa *et al.* 1997) qui est responsable de l'expression de différents signaux pro-inflammatoires tel que la molécule chémoattractrice CCL2 (X. Gao *et al.* 2007) responsable du recrutement des macrophages (Gunn *et al.* 1997).

Les lésions évaluées au dans la crosse aortique de souris apoE<sup>-/-</sup> ont présenté une inflammation importante. Cependant, contrairement à ce qui a été montré par Hallow *et al.* (Hallow *et al.* 2009) pour les lésions coronaires chez l'homme, aucune corrélation entre l'infiltration de macrophages et des paramètres biomécaniques (y compris l'étirement au cours du cycle cardiaque) n'a été observée. Cette différence avec la situation observée dans les coronaires humaines peut être attribuée à la faible sollicitation mécanique des plaques aortiques murines (la déformation au cours du cycle cardiaque est  $\leq 6.6\%$  dans les plaques).

**Considérations sur le modèle d'étude.** Les animaux inclus dans le protocole expérimental n'ont pas présenté de cas de rupture de plaques. Dans une étude portant sur la stabilité de plaques de 99 souris apoE<sup>-/-</sup>, Zhou *et al.* (Zhou *et al.* 2001) ont montré que malgré une alimentation enrichie en homocystéine et un âge avancé (jusqu'à 12 mois), aucune rupture de plaque n'a été observée sur le tronc aortique, et un seul cas de rupture a été observé sur les artères coronaires. Ces observations

## Partie expérimentale : Biomécanique

ont été complétées par des tests mécaniques ne montrant pas de diminution du contenu en collagène. Similairement, Calara *et al.* (Calara *et al.* 2001) ont rapporté 3 ruptures de plaque au sur le tronc aortique sur 82 souris apoE<sup>-/-</sup> ou LDLR<sup>-/-</sup> étudiées.

Dans le cadre de cette étude, les plaques aortiques de souris apoE<sup>-/-</sup> n'ont pas présenté de néovascularisation ni de calcifications intra-plaques, qui sont deux critères de vulnérabilité reconnus des plaques coronaires humaines. Chez l'homme, l'hémorragie intra-plaque est liée à la rupture de capillaires issus de *vasa vasorum* irriguant la plaque, comme présenté par Barger et Beeuwkes (Barger et Beeuwkes 1990) ; la présence de cette vascularisation est associée à une augmentation de la vulnérabilité (Moreno *et al.* 2004). La présence de calcifications dans les plaques d'athérome est aussi associée à une vulnérabilité augmentée (P. J. Fitzgerald, Ports, et Yock 1992) *via* une augmentation de la contrainte de cisaillement intra-plaque (Falk, Shah, et Fuster 1995). Des études de modélisation en éléments finis d'inclusion rigides au sein de la capsule fibreuse suggèrent que la présence de microcalcifications dans la capsule fibreuse peut être responsable d'une augmentation locale de contrainte, mais les conséquences de ce phénomène sur la rupture de plaque restent encore à étudier (Vengrenyuk *et al.* 2006; Kelly-Arnold *et al.* 2013). N'ayant observé aucune calcification sur coupe tissulaire (l'échelle à laquelle les observations ont été effectuées permettant la visualisation de microcalcifications lorsque présentes), il n'a pas été nécessaire de prendre en compte ce paramètre. L'appréhension de ces paramètres va dans le sens de la stabilité des plaques étudiées.

Des ruptures de plaque sur l'artère brachio-céphalique de souris apoE<sup>-/-</sup> ont été suggérées (J. L. Johnson et Jackson 2001; H. Williams *et al.* 2002; J. L. Johnson *et al.* 2005; Jackson *et al.* 2007). Ces observations restent toutefois contestées (Schwartz *et al.* 2007; Falk *et al.* 2007) ; les lignes qui suivent résument cette controverse.

Les observations de discontinuité dans l'endothélium vasculaire associé à la présence d'érythrocytes dans la plaque sont présentées comme attestant la rupture (Jackson *et al.* 2007). Ces observations sont interprétées comme témoins de la rupture de la capsule fibreuse *ante mortem*, la présence d'érythrocytes dans la plaque ne pouvant résulter d'un artefact lié à la manipulation du tissu *ex vivo*. De plus, la présence de structures dénommées capsules fibreuses enfouies (*buried fibrous cap*) associées à la fibrine est présentée comme attestant d'épisodes passés de rupture et de guérison de la plaque, la fibrine étant le marqueur résiduel d'un processus de thrombose associé à la rupture antérieur de la plaque. L'absence de thrombus mural tel qu'observé chez l'homme est attribuée à la rapidité de la thrombolyse chez la souris (Tsakiris *et al.* 1999) qui présente de plus des thrombi de

## Partie expérimentale : Biomécanique

taille plus modeste en raison des dimensions anatomiques réduites ; enfin, les animaux sont sacrifiés indépendamment de la présence de signes cliniques contrairement au patient succombant à un infarctus consécutif à la thrombose coronaire liée à la rupture de plaque.

Ces arguments sont en partie contestés (Schwartz *et al.* 2007). Les structures décrites comme capsules fibreuses enfouies pourraient représenter des épisodes successifs de croissance de plaques par dépôts xanthomateux sur des lésions plus anciennes. Un point majeur développé à l'encontre de l'hypothèse de rupture est que l'observation d'un phénomène de rupture présuppose l'existence d'une réelle capsule fibreuses recouvrant un cœur lipidique, or les lésions murines (comme discuté précédemment) ne présentent pas systématiquement une telle morphologie. L'observation de rupture de plaque telle que décrite par Jackson *et al.* montre de petites zones de disruption, généralement davantage observées sur les dépôts xantomateux et pas au travers de la capsule fibreuse, suggérant la prédominance de phénomènes biologiques de dégradation enzymatique de fibres par rapport au phénomène mécanique de rupture lié à la contrainte pariétale ; cette observation s'apparente donc davantage à l'érosion de plaque, mais qu'il n'est pas possible de définir en tant que tel en l'absence de thrombose (Bentzon et Falk 2010).

### 5 Conclusion & ouverture

L'étude présentée ici a été réalisée en étroite collaboration avec l'équipe DyCTiM du laboratoire TIMC-IMAG et en particulier les Drs. Philippe Tracqui, Nicolas Mesnier et Jacques Ohayon, qui ont réalisé l'essentiel du travail d'évaluation des propriétés mécaniques par tests de micro-indentation et de modélisation en éléments finis afin d'évaluer les contraintes et déformations pariétales.

Cette étude a permis d'évaluer des propriétés mécaniques présentes dans les aortes de souris apoE<sup>-/-</sup> présentant des lésions athéromateuses dès 18 semaines. La rigidité du tissu lésionnel apparaît comme plus faible que celle du tissu de la média des artères. Cette observation contraste avec ce qui est observé chez l'homme, où le tissu fibreux de l'intima présente une rigidité importante.

Conformément aux observations antérieures, il a été montré que le développement de lésions au sein de la paroi artérielle de souris apoE<sup>-/-</sup> est responsable d'une élévation de la contrainte résiduelle au sein de l'anneau artériel. La modélisation en éléments finis a montré que la prise en compte de cette contrainte résiduelle est nécessaire à une évaluation précise de l'état de contrainte et qu'en son absence la contrainte, et notamment la contrainte maximale, est surestimée. Il a également été constaté que les plaques de souris apoE<sup>-/-</sup> ne sont que faiblement sollicitées mécaniquement par

## Partie expérimentale : Biomécanique

rapport au reste de la paroi artérielle, contrairement à ce qui est observé au niveau des artères coronaires humaines. Cette faible sollicitation mécanique est attribuée à la faible rigidité du tissu des plaques. Enfin, aucun rapport entre l'inflammation évaluée par l'infiltration de macrophages et des paramètres mécaniques n'a pu être établie dans ce modèle animal.

Ainsi, les observations de faible rigidité et sa conséquence, une faible contrainte au niveau des lésions présentes sur la crosse aortique de souris apoE<sup>-/-</sup> peuvent constituer un élément d'explication de l'absence de rupture de plaque des animaux étudiés.

La collaboration entre les deux équipes qui ont participé à l'élaboration des travaux ici présentés se poursuit, notamment avec un projet visant à la validation de l'approche de l'évaluation des propriétés mécaniques de lésions athéromateuses par modulographie. Ce projet consiste en l'évaluation des propriétés rhéologiques de tissus artériels de lapin, y compris de tissus de lésions athéromateuse issues d'aortes de lapin hypercholestérolémiques WHHL, par micro-indentation en AFM et s'appuyant sur une analyse histologique fine. Cette évaluation sera utilisée pour la validation d'une approche de modulographie menée à partir d'acquisitions IVUS réalisées sur les mêmes échantillons tissulaires. Tandis que la modulographie apparaît comme une technique d'avenir pour l'identification de la vulnérabilité des plaques d'athéromes à partir d'acquisitions endocoronaires et que sa validation présente un intérêt majeur (Le Floc'h 2009), cette étude peut également apporter des éléments nouveaux quant à la portée des résultats décrits dans l'étude présentée ici.

## Partie expérimentale : Imagerie

### 1 Introduction

La détection précoce de l'athérome vulnérable est un objectif majeur dans le domaine de la cardiologie (cf. partie Revue Bibliographique). Les plaques d'athérome vulnérables se caractérisent entre autres facteurs par un processus inflammatoire intense. Dans le contexte inflammatoire, un certain nombre de molécules – telle que VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) – sont exprimées et participent au recrutement de leucocytes, notamment des monocytes ou macrophages, au sein de la plaque. L'objectif de ce travail expérimental est d'étudier, au sein d'un modèle murin d'athérosclérose – la souris déficiente en apolipoprotéine-E (apoE<sup>-/-</sup>), des molécules radiomarquées spécifiques de ce processus inflammatoire dans le but de réaliser l'imagerie moléculaire de l'athérome vulnérable. Plus spécifiquement, l'étude porte 1) sur des peptides dérivés de la molécule HLA-B2702, décrit comme ligand de VCAM-1 et 2) sur le [<sup>18</sup>F]-fluorodésoxyglucose (FDG), décrit pour s'accumuler dans les cellules inflammatoires au métabolisme intense.

#### 1.1 Peptides dérivés de la molécule HLA-B2702

##### 1.1.1 Origine & intérêt du peptide

La protéine HLA-B est une protéine de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité humain (HLA, *human leucocyte antigen*), impliquée dans la présentation de peptides antigéniques par la grande majorité des types cellulaires. Plusieurs centaines d'allèles de cette protéines sont identifiés à ce jour et classés au sein de différents groupes sérologiques (e.g. les allèles HLA-B\*2701, HLA-B\*2702 font partie du groupe sérologique HLA-B27).

Il a été montré que des molécules du HLA de classe I solubles étaient capable de prolonger la durée de vie de certaines allogreffes (H. S. Davies, Pollard, et Calne 1989). Cette découverte, associée à la difficulté de purification des molécules de HLA de classe I solubles, a mené à des études sur les capacités immunomodulatrices de peptides de synthèse correspondant à des régions de molécules de HLA de classe I. Ainsi, il a été montré que des peptides dérivés de l'hélice  $\alpha 1$  (résidus 60 à 84) dans le domaine  $\alpha 1$  de molécules de HLA-B de classe I affectent la fonction de lymphocytes T (Clayberger *et al.* 1990; Clayberger *et al.* 1993). Il a en particulier été montré que le peptide dont la séquence est retrouvée dans l'allotype HLA-B2702 permet l'inhibition de la lyse médiée par des lymphocytes T cytotoxiques pleinement différenciés de manière non allèle spécifique (Krensky et Clayberger 1994).

## Partie expérimentale : Imagerie

Des recherches menées pour identifier les mécanismes d'action de ces peptides ont permis de mettre en évidence la liaison entre, d'une part, le peptide correspondant aux résidus 75 à 84 de la molécule HLA-B2702 (peptide B2702p, natif ou modifié) et des protéines de la famille de Hsp70 (*Heat shock protein 70*) (Nossner *et al.* 1996; Woo *et al.* 1997; Ling *et al.* 2000), l'hème oxydase (Iyer *et al.* 1998), la  $\beta$ -tubuline (Tarazona *et al.* 2000) et VCAM-1 (Ling *et al.* 2000) d'autre part.

### 1.1.2 Travaux antérieurs & contexte du travail expérimental

La molécule VCAM-1 est une molécule d'adhésion impliquée dans l'adhésion de leucocytes ; elle est exprimée dans un contexte inflammatoire tel que l'athérosclérose (Ley et Huo 2001). Or la présence d'un processus inflammatoire intense au sein de lésions athéromateuses est un critère de vulnérabilité (Naghavi *et al.* 2003a). VCAM-1 apparaît ainsi comme une cible moléculaire pertinente pour l'imagerie des plaques d'athérome vulnérables. Il a été démontré que le peptide correspondant aux résidus 75 à 84 de la molécule HLA-B2702 (peptide B2702p) se liait à la molécule d'adhérence VCAM-1 (Ling *et al.* 2000). Une étude d'imagerie menée sur un modèle d'athérosclérose chez le lapin avec B2702p radiomarqué à l'iode-125 et au technétium-99 a montré des résultats encourageants (Broisat *et al.* 2007). En effet, l'affinité de liaison à VCAM-1 a été déterminée à 0.3  $\mu$ M par polarisation de fluorescence en utilisant une version du peptide couplée à un fluorophore. Par ailleurs, l'étude chez l'animal a montré une stabilité *in vivo* du radiomarquage et une captation dans les lésions jusqu'à 4.8 fois supérieure à celle observée dans le tissu vasculaire sain. Cependant, une activité circulante trop importante n'a pas permis la réalisation de l'imagerie *in vivo*. Pour pallier à ce problème, une stratégie consistant à effectuer des mutations systématiques sur le peptide et à étudier, après radiomarquage au technétium-99m, le comportement de ces peptides dérivés a été entreprise (Dimastromatteo 2010). Du fait de la quantité de molécules à tester, le choix du modèle d'étude s'est porté sur la souris apoE<sup>-/-</sup> avec ligature carotidienne dans lequel une carotide est ligaturée afin d'induire la formation de lésions mimant les caractéristiques inflammatoires des plaques d'athérome vulnérables alors que la carotide controlatérale demeure saine et reflète le niveau de captation du traceur dans un tissu vasculaire contrôle (Kumar et Lindner 1997; Schäfers *et al.* 2004). L'évaluation en imagerie *in vivo* et par prélèvement de tissus *ex vivo* a permis de sélectionner un des peptides dérivés du peptide B2702p (nommé B2702p1) pour ses caractéristiques favorables tant en terme de stabilité radiochimique, de captation lésionnelle (2.6 fois celle du tissu contrôle) et de cinétique sanguine (ratio lésion-sur-sang à 1.4). L'évaluation par polarisation de fluorescence de la liaison de B2702p1 (modifié pour porter un fluorophore) à VCAM-1 a montré une affinité de 15  $\mu$ M.

### 1.1.3 Objectif du travail expérimental

La suite du projet consistait à poursuivre l'évaluation préclinique de B2702p1, en recherchant des stratégies alternatives de radiomarquage dans l'optique d'un transfert de cette molécule en clinique. Plusieurs séries d'expériences d'imagerie, appuyées par des données *ex vivo*, ont été menées en utilisant différents lots de peptide L-B2702p1 radiomarqué au technétium 99m sur le modèle de souris apoE<sup>-/-</sup> avec ligature carotidienne et le modèle de souris apoE<sup>-/-</sup> sous régime hypercholestérolémiant. Des difficultés ont été rencontrées dans la reproduction des données obtenues antérieurement (Dimastromatteo 2010) et l'objectif de cette étude a été recentré sur la compréhension de ces problèmes. Dans ce cadre, l'étude a porté (1) sur l'étude de la liaison entre, d'une part, le peptide B2702p1, son dérivé tétramérique ou son prédécesseur (B2702p) et, d'autre part, la molécule VCAM-1, (2) sur l'étude de stabilité radiochimique de ce peptide (B2702p1) avec les différentes stratégies de radiomarquage envisagées.

## 1.2 Étude du [<sup>18</sup>F]-fluorodésoxyglucose

### 1.2.1 Le [<sup>18</sup>F]-fluorodésoxyglucose (FDG)

Le FDG ([<sup>18</sup>F]-2-désoxy-2-fluoro-D-glucose) est un analogue du D-glucose dans lequel le groupement hydroxyle du carbone 2 du glucose est remplacé par un atome de fluor-18 (Figure 1).

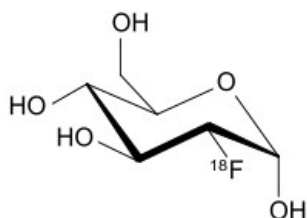


Figure 1. Formule topologique du [<sup>18</sup>F]-2-désoxy-2-fluoro-D-glucose (FDG).

Cette molécule présente un comportement biologique analogue au 2-désoxy-D-glucose (2-DG). Étant reconnu par les transporteurs au glucose (GLUT) et substrat de l'hexokinase, le FDG subit une phosphorylation en position 6 dans le cytoplasme de la cellule dans laquelle le traceur est capté. Sa phosphorylation en FDG-6-phosphate lui confère une faible perméabilité membranaire, l'empêchant de ressortir de la cellule. De plus, n'étant pas reconnu par la phosphohexose isomérase, il n'est pas dégradé dans la voie de la glycolyse. La réaction de déphosphorylation du FDG-6-phosphate par la glucose-6-phosphatase est classiquement considérée comme minimale (Gallagher *et al.* 1978). Il en résulte que la biodistribution du FDG reflète le transport et la phosphorylation du glucose.

La désintégration  $\beta^+$  du fluor-18, largement majoritaire (97%) et effectuée par conversion d'un proton en neutron, conduit à la production d'un isotope stable de l'oxygène : l'oxygène-18. Le groupement en 2 devient, après capture d'un proton, un groupement hydroxyle, donnant une

molécule de D-glucose-6-phosphate qui peut entrer dans la voie de la glycolyse. Le D-glucose-6-phosphate, marqué à l'oxygène-18 est non radioactif et sans conséquence sur la métabolisation de la molécule. Cette désintégration produit également un neutrino et un positron d'une énergie de 634 keV qui après un parcours moyen dans un milieu biologique de 0.6 mm va s'annihiler par interaction avec un électron en produisant deux photons de 511 keV émis suivant une même direction et dans des sens opposés. La détection en coïncidence de ces deux photons permet l'imagerie tomographique par émission de positron (PET, *positron emission tomography*) de cette molécule.

Le FDG a été largement utilisé pour étudier *in vivo* le métabolisme glucidique du myocarde (Ratib *et al.* 1982) et du cerveau (Reivich *et al.* 1979) en particulier. C'est également le radiotraceur le plus utilisé en oncologie nucléaire, avec une large gamme d'applications (Rigo *et al.* 1996; Almuhaideb, Papathanasiou, et Bomanji 2011). L'utilisation du FDG a permis de mettre en évidence un métabolisme glucidique important au sein de cellules inflammatoires (Kubota *et al.* 1992).

### **1.2.2 L'utilisation du FDG dans l'athérome**

L'utilisation du FDG pour l'imagerie de l'athérosclérose chez l'homme fait l'objet d'importantes recherches depuis plus de 10 ans (développé en partie Revue Bibliographique). La visualisation de l'athérome vulnérable chez l'homme, dans le cadre de la mise en place d'une stratégie diagnostique est l'enjeu ultime dans ce domaine de recherche en imagerie. Toutefois, la capacité à visualiser des lésions à caractère vulnérable au sein de modèles expérimentaux d'athérosclérose est également un enjeu d'importance, ne serait-ce que pour l'évaluation longitudinale de nouvelles thérapeutiques dans le cadre de recherches pré-cliniques. Ainsi, la capacité du FDG à visualiser les lésions inflammatoires au sein de modèles animaux a été étudiée. L'athérosclérose a été pour la première fois détectée avec le FDG par sonde intravasculaire au niveau d'artères iliaques de lapin dont l'endothélium a été lésé (Lederman *et al.* 2001). Sur le modèle de lapin hypercholestérolémique, la captation de FDG par l'aorte thoracique a pu être observée par imagerie PET (Ogawa *et al.* 2004). Chez la souris, peu d'études utilisant le FDG pour imager les plaques ont été menées et ont montré des résultats contradictoires (Laitinen *et al.* 2006; Matter *et al.* 2006; Laurberg *et al.* 2007; Rudd *et al.* 2007; Nahrendorf *et al.* 2008; Zhao *et al.* 2008; Silvola *et al.* 2011; Hag *et al.* 2012). Les résultats des études s'intéressant à la captation du FDG dans les modèles murins d'athérosclérose sont discutés plus bas au regard des résultats de l'étude présentée ici (cf. 4.2).

### 1.2.3 La captation du FDG par le tissu adipeux brun

Le tissu adipeux brun (BAT, *brown adipose tissue*) est impliqué dans la thermogenèse sans frisson ; c'est le mécanisme spécifique de la thermogenèse, les autres étant liés à l'augmentation du métabolisme soit global sous contrôle d'hormones thyroïdiennes, soit musculaire, lié à l'activité physique ou aux frissons thermiques, soit encore à la prise alimentaire. L'activité du BAT est régulée par le système nerveux sympathique et, en cas d'activation, il peut présenter un métabolisme énergétique (y compris glucidique) important (Cannon et Nedergaard 2004). Il a été montré que la captation de FDG dans le BAT peut être importante, aussi bien chez l'homme adulte (Nedergaard, Bengtsson, et Cannon 2007) que chez le rongeur (Laurberg *et al.* 2007; Mirbolooki *et al.* 2011).

### 1.2.4 Objectif de l'étude

L'objectif de l'étude était d'évaluer la captation de FDG chez la souris apoE<sup>-/-</sup> présentant des lésions athéromateuses à un stade avancé par imagerie PET/CT en utilisant une caméra dédiée à l'imagerie du petit animal de dernière génération. Cette analyse *in vivo* a été complétée par une étude *ex vivo* poussée comprenant une évaluation de la biodistribution du FDG par comptage gamma d'échantillons tissulaires et d'organes et par autoradiographie de coupes de la crosse aortique. L'analyse par autoradiographie permet de discriminer et de quantifier la captation de FDG dans les plaques d'athérome et dans le tissu artériel dépourvu de plaque mais aussi dans le BAT péri-aortique qui se trouve directement en continuité avec l'adventice. Ainsi l'hypothèse testée dans cette étude est qu'une captation importante dans le BAT péri-aortique pourrait potentiellement compromettre l'imagerie au FDG de plaques d'athérome du fait de la proximité entre ces structures.

Les animaux ont été traités de façon à optimiser la fixation dans les plaques par contraste avec les autres tissus et notamment le tissu adipeux brun péri-aortique. Ceci inclut une période de jeûne durant la nuit précédant l'expérimentation, une anesthésie au pentobarbital sodique réalisée une heure avant l'injection de FDG et le maintien de cette anesthésie durant la période d'accumulation du FDG – période tout au long de laquelle l'animal a été chauffé à 37°C, i.e. température excédant le point de consigne chez la souris – et enfin un temps final d'étude tardif pour ce traceur (3 h p.i.) (K.-H. Lee *et al.* 2005; Fueger *et al.* 2006; Toyama *et al.* 2004; Rudd *et al.* 2007). En plus de ces conditions, l'effet de l'administration du propranolol, bêta-bloquant non sélectif décrit pour diminuer la captation de FDG par le BAT (Tatsumi *et al.* 2004), a également été évalué toujours dans le cadre de l'optimisation des conditions pour l'imagerie des plaques d'athéromes.

## 2 Matériel & Méthodes

### 2.1 Molécules étudiées

La liste des peptides étudiés dans le cadre de ce travail est présentée en Tableau 1. Ces peptides sont constitués des séquences peptidiques B2702p ou B2702p1 dérivées du peptide correspondant aux résidus 75 à 84 de la molécule HLA-B2702 (séquence originelle : H<sub>2</sub>N-RENLRIALRY-COOH) telle que sélectionnée dans les travaux antérieurs (Dimastromatteo 2010). Diverses modifications ont été réalisées à l'extrémité  $\alpha$ -amino-terminale (N-term) afin de permettre la détection des peptides par fluorescence (ajout d'un fluorophore) ou par rayonnement gamma (ajout d'un radioélément).

Pour la détection en fluorescence, un groupement fluorescéine de 376 Da été ajouté en N-term avec un espaceur comportant 2 acides aminés "histidine-glycine" (ou HG). En milieu aqueux, ce groupement présente un maximum d'absorption à 494 nm et un maximum d'émission à 521 nm.

Les peptides radiomarqués au technétium-99m ont été obtenus selon 2 stratégies de marquage : utilisation d'un cœur Tc-tricarboxyle *via* la méthode Isolink (kit commercial Isolink) ou utilisation d'un cœur Tc-hydrazino par la méthode HYNIC. Afin de favoriser le radiomarquage *via* la méthode Isolink, les ligands peptidiques ont été fonctionnalisés du côté N-term par une histidine sur laquelle se complexe le technétium-99m et une glycine est ajoutée comme espaceur. La méthode HYNIC est une voie alternative pour préparer des molécules technétiées. Dans ce travail, le groupement HYNIC est ajouté au préalable sur les peptides du côté N-term. Une glycine, jouant le rôle d'espaceur, est également présente entre le groupement HYNIC et la séquence d'intérêt. La tricine a été choisie comme coligand. Le radiomarquage au fluor-18 a été réalisé par l'ajout d'une [<sup>18</sup>F]-fluorobenzaldéhyde sur un précurseur oxiamine (peptide B2702p1 modifié) ; il a été réalisé au sein de la structure recherche et développement de la société Advanced Accelerator Applications, SA. Les différentes stratégies de radiomarquages sont détaillées plus loin (voir 2.3)

Le Tableau 1 présente les différentes séquences des peptides étudiés ainsi que leur modification du côté N-term, leur fournisseur et les différents lots utilisés. La synthèse peptidique, effectuée par les différents fournisseurs, est faite en phase solide selon la chimie Fmoc, à partir d'acides aminés de la série L ou D. La masse moléculaire théorique des peptides linéaires est comprise entre 1.4 et 1.9 kDa; le peptide tétramérique présente une masse moléculaire théorique de 7.2 kDa.

Le FDG est synthétisé par la société Advanced Accelerator Applications, SA et utilisé dans sa formulation commerciale.

## Partie expérimentale : Imagerie

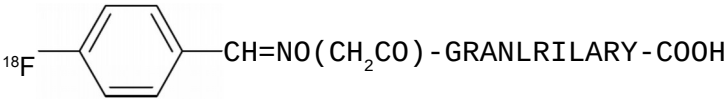
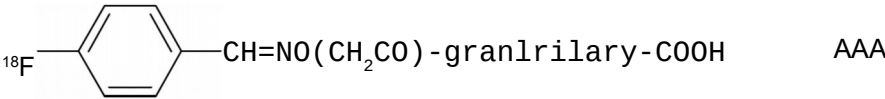
Nom	Séquence	Origine (lot)
L-B2702p	H <sub>2</sub> N-HGRENLRILARY-COOH	DCM
L-B2702p1	H <sub>2</sub> N-HGRANLRILARY-COOH	Eurogen. (1, 2, 3), DCM (4)
D-B2702p1	H <sub>2</sub> N-hgranlrilary-COOH	ERAS
HYNIC-L-B2702p1	HYNIC-GRANLRILARY-COOH	DCM
HYNIC-D-B2702p1	HYNIC-granlrilary-COOH	AAA
Fluorescéine-L-B2702p	Fluorescéine-HGRENLRILARY-COOH	DCM (1), ERAS (2)
Fluorescéine-L-B2702p1	Fluorescéine-HGRANLRILARY-COOH	DCM (1), ERAS (2)
Fluorescéine-tetra-L-B2702p1	Fluorescéine-K(K(RANLRILARY-COOH)×2)×2	DCM
[ <sup>18</sup> F]-FBA-L-B2702p1	 $^{18}\text{F}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}=\text{NO}(\text{CH}_2\text{CO})-\text{GRANLRILARY}-\text{COOH}$	AAA
[ <sup>18</sup> F]-FBA-D-B2702p1	 $^{18}\text{F}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}=\text{NO}(\text{CH}_2\text{CO})-\text{granlrilary}-\text{COOH}$	AAA

Tableau 1. Peptides utilisés dans l'étude. Les peptides sont synthétisés à partir d'acides aminés de série L (majuscule) ou de série D (minuscule). HYNIC : groupement acide hydrazino-nicotinique ; DCM : Département de Chimie Moléculaire, Grenoble I ; ERAS : Eras Labo, SARL ; Eurogen. : Eurogentec, SA. ; AAA : Advanced Accelerator Applications, SA.

## 2.2 Étude de la liaison des peptides à VCAM-1

### 2.2.1 Analyse en SPR

**Principe.** La résonance des plasmons de surface (SPR, *surface plasmon resonance*) est un phénomène physique sur lequel est basé un système de mesure de liaison entre deux molécules (Myszka 1997; Myszka, Jonsen, et Graves 1998). A l'interface entre deux milieux possédant des indices de réfraction différents, un faisceau de lumière monochromatique et cohérente arrivant suivant un angle supérieur à l'angle limite (dépendant des indices de réfraction des milieux considérés) subit un phénomène de réflexion interne totale. Il n'y a alors pas de réfraction mais création d'une onde évanescente qui se propage perpendiculairement à l'interface. Un feuillet d'or

localisé à cette interface peut dissiper une partie de l'énergie lumineuse *via* un phénomène de résonance entre son plasmon et l'onde évanescente qui ne survient qu'à un angle précis pour des indices de réfraction donnés. Une mesure de cet angle pour lequel on observe le phénomène de résonance permet de suivre les changements de l'indice de réfraction, qui varie avec la masse des molécules présentes à l'interface. Sur une surface présentant une molécule immobilisée à l'interface (ligand), cette mesure permet de mettre en évidence la fixation de son partenaire (analyte) *via* un changement de masse (donc de l'indice de réfraction) qui va entraîner un changement de l'angle auquel le phénomène de résonance est observé. Cet angle est exprimé en unité de résonance (RU).

L'analyse est effectuée ici par une mesure de la réponse lorsque l'analyte se trouve à un état d'équilibre de liaison dans le système microfluidique, en fonction de la concentration en analyte. La réponse de la piste présentant le ligand d'intérêt immobilisé est soustraite de la piste contrôle, donnant ainsi un signal correspondant à la fixation spécifique. Ces données sont ajustées au modèle de simple interaction ligand-récepteur (BIAevaluation software, Biacore) (Eq. 1) :

$$B(c) = \frac{B_{\max} \times c}{K_D + c} \quad (1)$$

$B(c)$  est la fixation en fonction de la concentration en analyte,  $B_{\max}$  la fixation maximale (toutes deux exprimées en RU),  $c$  la concentration en analyte, et  $K_D$  la constante de dissociation à l'équilibre (tout deux exprimés en mol/L ou M).

**Conditions expérimentales.** L'affinité pour les protéines recombinantes VCAM-1 humaine et murine (R&D Systems) a été étudiée par une analyse basée sur la spectroscopie SPR (Biacore 3000, Biacore). La protéine recombinante murine ICAM-1 (R&D Systems) a été utilisée comme contrôle négatif. Les protéines recombinantes ont été immobilisées sur une puce CM5 (Biacore) par couplage amine suivant les recommandations du constructeur. Des solutions d'analytes (fragment d'anticorps anti-VCAM-1 servant de contrôle et L-B2702p) à des concentrations allant de 2 nM à 740 nM dans du tampon (PBS-P20 0.005%) ont été mises en contact avec les surfaces de la puce portant les ligands immobilisés durant une phase d'association de 180 s avant une phase de dissociation de 180 s avec le tampon seul, puis régénération de la surface (tampon citrate pH = 2).

### 2.2.2 Analyse en polarisation de fluorescence

**Principe.** Une molécule fluorescente peut être excitée avec un maximum d'efficacité à une longueur d'onde donnée (dépendante de la nature du fluorophore), après quoi elle retourne à son état fondamental en émettant de la lumière autour d'une longueur d'onde donnée. Lorsque cette

## Partie expérimentale : Imagerie

molécule est excitée par une lumière polarisée, la lumière émise présente également un certain degré de polarisation suivant la liberté de rotation de la molécule en solution. La capacité rotatoire d'une molécule seule est supérieure à celle d'un complexe où elle est liée à un partenaire ; le degré de polarisation de la lumière émise est donc supérieur dans ce dernier cas. Ainsi la mesure de la polarisation de fluorescence permet de quantifier l'interaction d'une molécule fluorescente à un partenaire (Lakowicz 2006; Sörme *et al.* 2003). L'analyse présentée ici a été effectuée pour des concentrations croissantes du ligand (partenaire d'interaction du peptide fluorescent) par mesure de l'intensité de fluorescence suivant une polarisation parallèle et perpendiculaire à la polarisation de la lumière émise. Les valeurs de polarisation sont données par :

$$P = \frac{(I_{\text{par}} - I_{\text{per}})}{(I_{\text{par}} + I_{\text{per}})} \quad (2)$$

où  $P$  est la polarisation,  $I_{\text{par}}$  l'intensité de la lumière émise suivant une polarisation parallèle au faisceau incident et  $I_{\text{per}}$  l'intensité de la lumière émise suivant une polarisation perpendiculaire au faisceau incident : un facteur d'homogénéisation, constant pour une expérience donnée, a été appliqué à  $P$  suivant l'ajustement du gain des photomultiplicateurs recueillant la fluorescence suivant les deux vecteurs de polarisation de façon à obtenir une valeur basale de 35 mP. Dans les conditions contrôles, un volume équivalent de tampon de dilution du ligand a été ajouté à la solution contenant la molécule à titrer. Les données de polarisations en fonction de la concentration en ligand titré ont été systématiquement testées pour ajustement au modèle d'interaction ligand-récepteur suivant l'équation 3 (Slide Write Plus) :

$$P(c) = P_0 \frac{(P_{\text{max}} - P_0) \times c}{K_D + c} \quad (3)$$

où  $P(c)$  est la polarisation en fonction de la concentration ligand,  $P_0$  la polarisation basale de la solution de peptide fluorescence,  $P_{\text{max}}$  la polarisation maximale (exprimés en mP),  $c$  la concentration en ligand et  $K_D$  constante de dissociation à l'équilibre (toutes deux exprimés en M).

**Conditions expérimentales.** L'affinité des peptides L-B2702p, L-B2702p1 et du térapeptide L-B2702p1 couplés à un fluorophore (la fluorescéine) pour les molécules recombinantes VCAM-1 et Hsp70 a été étudiée dans différentes conditions expérimentales. Les expériences ont été effectuées sur les polarimètres LS50 (Perkin Elmer) ou POLARstar Omega (BMG Labtech) dans les tampons TBS, HEPES/NaCl 50 mM ou HEPES/KCl 50 mM. Différentes concentrations en (tétra)peptides ont été testées, allant de 350 à 36 nM. Enfin, le ligand était soit la molécule recombinante VCAM-1 humaine ou murine (R&D Systems) soit la molécule recombinante humaine Hsp70 (Enzo Life

## Partie expérimentale : Imagerie

Science) systématiquement utilisée à partir de leur formulation concentrée (1 mg/mL ou plus) afin d'obtenir des gammes de concentrations ayant pour concentration maximale 1.5–2.9  $\mu\text{M}$  (selon les expériences) avec une faible variation de volume. La mesure de la polarisation était effectuée plusieurs minutes après ajout du ligand titré. Ces conditions sont résumées dans le Tableau 2.

Appareil	Tampon	Concentration maximale de la molécule titrée ( $\mu\text{M}$ )		Concentration solution titrée (nM)		
		VCAM-1	Hsp70	Fluorescéine-L-B2702p	Fluorescéine-L-B2702p1	Fluorescéine-tetra-L-B2702p1
Polarimètre LS50	HEPES/NaCl 50 mM	1.9		79		
	HEPES/NaCl 50 mM	2.4		36		
	HEPES/NaCl 50 mM		1.8	93		
	TBS	0.5		300		
POLARstar Omega	TBS	1.5		38		
	HEPES/NaCl 50 mM	2.0	3.0	350	32	
	HEPES/KCl 50mM	2.0	2.0	109	82	66
	HEPES/KCl 50mM	2.9				213

Tableau 2. Conditions expérimentales utilisées lors des expériences de polarisation de fluorescence. L'appareil et le tampon de dilution utilisés lors des différentes expériences sont présentés, ainsi que la concentration en peptide de la solution titrée et la concentration maximale en molécule titrée.

### 2.2.3 Analyse par saturation de liaison de molécules radiomarquées

**Principe.** L'analyse de liaison par saturation peut être effectuée directement en immobilisant le ligand sur une surface et en incubant puis en dosant (mesure de la radioactivité) le partenaire de liaison radioactif à des concentrations croissantes. L'obtention du signal de liaison spécifique se fait en soustrayant à la fixation totale l'activité mesurée dans les conditions contrôles (fixation non spécifique). Le signal de fixation spécifique peut être ajusté au modèle d'interaction ligand-récepteur à l'équilibre (Limbird 2004) :

$$B(c) = \frac{B_{\max} \times c}{K_D + c} \quad (1)$$

où  $B(c)$  est la fixation spécifique en fonction de la concentration en molécule radiomarquée,  $B_{\max}$  la fixation maximale (exprimée en cpm, *count per minute*),  $c$  la concentration en molécule radioactive et  $K_D$  la constante de dissociation à l'équilibre (exprimés en M).

**Conditions expérimentales.** Les expériences de liaison par saturation ont été réalisées en immobilisant la protéine recombinante VCAM-1, le ligand des molécules à tester, par adsorption (100  $\mu\text{L}$  de solution à 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dans un tampon PBS, adsorbé pendant une nuit à 4°C), dans les

puits d'une plaque 96-puits ; des puits incubés avec une solution de PBS seul ou adsorbés avec une protéine non ciblée par les ligands servent de contrôle. Une étape de blocage est réalisée afin de minimiser la fixation non spécifique (différentes conditions ont été testées : solution sérum 10 %, BSA 2 %, temps d'incubation 1 h, 3 h à température ambiante), puis l'incubation de la molécule radiomarquée à des concentrations croissantes (1h à température ambiante) est effectuée. Une fois l'incubation terminée, on considère que l'interaction entre la molécule et son ligand est à l'équilibre. Une étape de lavage permet de supprimer une partie du signal non spécifique. L'activité des puits est alors comptée (Cobra II auto-gamma, Packard) et soustraite à l'activité présente dans les puits contrôles afin de rendre compte uniquement de la fixation spécifique. Cette valeur de fixation spécifique est alors ajustée au modèle de simple interaction ligand-récepteur à l'équilibre (Eq. 1) en utilisant un logiciel permettant l'ajustement à des modèles non linéaires (Slide Write Plus). Toutes les molécules évaluées ont montré une bonne stabilité radiochimique dans leur milieu de marquage (cf. 3.2).

### **2.3 Radiomarquage et analyse de stabilité des peptides**

#### **2.3.1 Stratégies de radiomarquage au technétium-99m**

##### **2.3.1.1 Méthode Isolink**

Le radiomarquage des peptides synthétisés avec une histidine en position N-terminale s'effectue par méthode Isolink, en 2 étapes successives. Une première étape consiste à former le précurseur tricarbonyle ( $[^{99m}\text{Tc}-(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ ) *via* le kit commercial Isolink. Au cours de la seconde étape le précurseur tricarbonyle échange rapidement ses molécules d'eau avec les ligands donneurs, notamment l'histidine. Les sites potentiels de coordination du  $^{99m}\text{Tc}$  sont l'azote présent dans le cycle de l'imidazole, le groupement amine en N-terminal et également le groupement NH amide de la liaison peptidique.

La préparation du précurseur tricarbonyle est effectuée par ajout au kit commercial Isolink (Mallinckrodt) de 2200 à 3700 MBq d'un éluat frais de pertechnétate de sodium (issu d'un générateur  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ ). Le volume final est de 1 mL. La solution est chauffée à 95°C pendant 20 min dans un bloc chauffant pour former le précurseur tricarbonyle. La solution très basique est neutralisée à pH 7-8. Dans un second temps, le ligand peptidique est incubé avec le précurseur tricarbonyle. Ainsi, 370-444 MBq de précurseur Tc-tricarbonyle sont ajoutés à 50–200 µg de produit. Après incubation 30 min à 60°C et refroidissement, la pureté radiochimique (RCP, *radiochemical purity*) est déterminée par radio-HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

### 2.3.1.2 Méthode HYNIC

Le 6-hydrazino nicotinamide (HYNIC) est un chélateur bifonctionnel utilisé pour le radiomarquage au technétium-99m. Dans cette approche il est nécessaire d'utiliser un coligand afin de compléter la sphère de coordination du technétium. Dans cette étude, la tricine a été choisie comme coligand et les peptides d'intérêt ont été synthétisés au préalable avec le groupement HYNIC.

Le radiomarquage est effectué avec 10–200 µg de peptide-HYNIC incubé en présence de tricine (100 mg/mL), de 185 MBq d'un éluat frais de pertechnétate de sodium (issu d'un générateur  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), de chlorure d'étain dans du HCl 0.04 N (0.8 mg/mL) et d'un tampon acétate d'ammonium 0.25 M à pH = 5.5. La cinétique de réaction se fait à température ambiante pendant 20 min. Après radiomarquage, la pureté radiochimique est déterminée par radio-HPLC.

### 2.3.2 Stratégies de radiomarquage du fluor-18

Le radiomarquage des peptides au fluor-18 est effectué par la société Advanced Accelerator Applications. Brièvement, les peptides précurseurs porteurs d'un groupement oxime en N-terminal sont mis en présence de [18F]-fluorobenzaldéhyde (préalablement synthétisé par réaction de fluoration de son propre précurseur, 10 min, 90°C) durant 20 min à 110°C. L'analyse de la pureté radiochimique par radio-HPLC est effectuée à la réception du produit.

### 2.3.3 Analyse par radio-HPLC

La pureté radiochimique des différentes molécules radiomarquées (au technétium-99m ou au fluor-18), leur stabilité dans le milieu de marquage ainsi que leur stabilité *in vitro* et *in vivo* est suivie par HPLC (Shimadzu) en phase inverse équipée d'un radiodétecteur ( $\gamma$ -RAM Model 4, LabLogic). Les molécules radiomarquées sont éluées sur une colonne en phase inverse (silice greffée C18). Les conditions de radio-HPLC sont ajustées en fonction des molécules étudiées avec un gradient d'éluant constitué par 2 éluants A et B, à un débit de 1 mL/min. L'éluant A contient 0.1 % d'acide trifluoroacétique (TFA, trifluoroacetic acid) et l'éluant B est un mélange acétonitrile-eau (90:10 ; v/v) contenant 0.1 % TFA.

### 2.3.4 Analyse de stabilité dans le milieu de marquage

La stabilité dans le milieu de marquage est étudiée au cours du temps en conservant le marquage à température ambiante. La pureté radiochimique est alors contrôlée immédiatement et 6 h après radiomarquage selon les conditions habituelles de radio-HPLC.

### **2.3.5 Analyse de stabilité *in vitro* par incubation dans du sang**

La stabilité des peptides radiomarqués a été étudiée *in vitro* par incubation dans du sang de souris ou humain. Le produit technétié ou fluoré a été incubé à 37°C dans du sang de souris ou humain dans un rapport inférieur à 1/10 (37 MBq/mL) et analysé par radio-HPLC aux différents temps choisis (30 min, 60 min, 90 min, 120 min et 180 min) en prélevant un aliquot de sang de 50-150 µL. Un prélèvement immédiatement après la mise en contact avec le sang et sans incubation à 37°C est défini comme le temps initial (0 min). Pour chacun des prélèvements, une première centrifugation (2 min à 4000 g) permet de séparer le plasma des cellules sanguines. Pour éliminer les protéines plasmatiques, le plasma est soit filtré sur une membrane (NanoSep 30K oméga, Pall Life sciences) soit additionné d'acide trichloroacétique (TCA, *trichloroacetic acid*) et rapidement centrifugé 15 min ou 3 min à 3000 rpm. L'activité liée aux cellules sanguines, aux protéines plasmatiques ainsi que l'activité restante dans le plasma (fraction libre du plasma) sont comptées. La stabilité du traceur est alors appréciée en analysant la fraction libre du plasma par radio-HPLC dans les conditions habituelles.

### **2.3.6 Analyse de stabilité *in vivo***

La stabilité des peptides radiomarqués est également étudiée *in vivo* chez la souris. Pour cela, le peptide technétié ou fluoré est injecté à l'animal par la veine caudale. Après le temps d'incubation choisi pour l'analyse, l'animal anesthésié est euthanasié par dislocation cervicale et du sang est prélevé par ponction cardiaque avec une seringue héparinée. Ensuite, de manière similaire à l'analyse *in vitro* par incubation dans du sang, l'échantillon sanguin est centrifugé (2 min, 4000 g) et le plasma filtré ou précipité au TCA. L'activité des 3 fractions est mesurée et la fraction libre du plasma étudiée par radio-HPLC. L'analyse de l'urine prélevée après euthanasie se fait directement par radio-HPLC.

### **2.3.7 Analyse des radiochromatogrammes**

L'acquisition et l'analyse des radiochromatogrammes sont effectuées en utilisant le logiciel Laura (LabLogic). Après correction du bruit de fond lorsque cela est nécessaire, les aires d'intérêt sont tracées sous les pics d'activités majoritaires et les aires sous la courbe sont intégrées. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'aire d'intérêt par rapport à l'ensemble des aires intégrées.

## **2.4 Étude sur souris apoE<sup>-/-</sup>**

### **2.4.1 Animaux et protocole expérimental des études sur les peptides**

Des souris femelles apoE<sup>-/-</sup> (n = 29) sont reçues à 6 semaines (Charles-River, France). Ces animaux

## Partie expérimentale : Imagerie

sont nourris avec un régime standard (Safe) durant l'ensemble du protocole. Après une semaine de stabulation, les animaux subissent la ligature d'une carotide (gauche), alors que la carotide controlatérale (droite) est préservée. Trois semaines après l'intervention, les animaux, alors âgés de 10 semaines, sont inclus dans le protocole expérimental destiné à évaluer le peptide [<sup>99m</sup>Tc]-L-B2702p1 (radiomarké par la méthode Isolink) *in vivo* et *ex vivo*.

Le peptide [<sup>99m</sup>Tc]-L-B2702p1 (marquage Isolink) ainsi que le peptide [<sup>99m</sup>Tc]-HYNIC-D-B2702p1 sont étudiés dans le modèle de souris apoE<sup>-/-</sup> sous régime hypercholestérolémiant. Les animaux (n = 3 pour chaque peptide, soit n = 6) sont inclus dans le protocole expérimental à l'âge de 35 ± 2 semaines, après avoir été nourris avec un régime hypercholestérolémiant (Western Avogadro, Safe) durant les 11 ± 1 semaines précédant l'expérimentation. Les deux protocoles expérimentaux qui viennent d'être mentionnés sont détaillés ci-dessous.

### **2.4.1.1 Ligature carotidienne**

Les animaux sont anesthésiés par injection intra-péritonéale d'une solution de kétamine-xylazine (100 mg/kg de kétamine et 10 mg/kg de xylazine) et analgésiés par injection sous-cutanée de carprofène 4 mg/kg. Une incision para-médiane gauche est effectuée sur la face ventrale de la souris au niveau cervical et les tissus sont délicatement écartés jusqu'à ce que l'artère carotide commune gauche soit apparente. L'artère est isolée des tissus adjacents (notamment du nerf vague) et un fil chirurgical Sofsilk 5-0 est passé autour de la carotide. Le fil est remonté du côté crânial jusqu'à la bifurcation carotidienne où il est serré, entraînant une cessation du flux sanguin. L'incision des plans cutanés est refermée par deux points de suture puis l'effet de l'anesthésique est antagonisé par une injection sous-cutanée d'atipamezole 1 mg/kg.

### **2.4.1.2 Protocole expérimental d'étude de [<sup>99m</sup>Tc]-L-B2702p1 (marquage Isolink) dans le modèle de souris apoE<sup>-/-</sup> avec ligature carotidienne**

Cette étude présente cinq séries expérimentales où trois semaines après la chirurgie, les animaux sont inclus dans le protocole d'étude (n = 6, 6, 4, 7 et 6 pour les séries expérimentales indépendantes). Ces séries expérimentales sont réalisées dans des conditions très similaires à celles de l'étude dite historique (Dimastromatteo 2010). Une solution de peptide L-B2702p1 radiomarké au technétium-99m par la méthode Isolink est injectée dans une veine latérale de la queue. La dose injectée des différentes séries est présentée sur le Tableau 3 (partie 3.3). Les lots de peptides utilisés (lot #2, #3 ou #4) et les séries expérimentales indépendantes (1 avec les lots #2, 3 avec le lot #3 et 1 avec le lot #4) sont également présentés sur le Tableau 3. Deux heures après injection (p.i.), les animaux sont anesthésiés sous isoflurane 2% (Baxter). Une acquisition SPECT/CT ou une

## Partie expérimentale : Imagerie

acquisition planaire sont réalisées entre 2 et 3 h p.i. À 3 h p.i., les animaux encore sous anesthésie sont euthanasiés par dislocation cervicale ou par injection intra-péritonéale de pentobarbital sodique (~300 µL à 54,7 mg/mL) et une étude *ex vivo* de biodistribution par prélèvement d'organes et de tissus (comprenant le prélèvement des carotides lésées et contrôles) est réalisée.

### **2.4.1.3 Protocole expérimental d'étude des peptides [<sup>99m</sup>Tc]-L-B2702p1 (marquage Isolink) et [<sup>99m</sup>Tc]-D-HYNIC-B2702p1 dans le modèle de souris apoE<sup>-/-</sup> sous régime hypercholestérolémiant**

Les peptides L-B2702p1 & HYNIC-D-B2702p1 radiomarqués au technétium-99m par la méthode Isolink et par la méthode HYNIC respectivement ont été évalués dans le modèle de souris apoE<sup>-/-</sup> sous régime hypercholestérolémiant *in vivo* et *ex vivo* suivant deux protocoles sensiblement différents.

Pour le peptide L-B2702p1 (provenant du lot #3 et radiomarqué au <sup>99m</sup>Tc par la méthode Isolink), les animaux sont anesthésiés sous isoflurane 2% à 2 h p.i. avant d'être imagés par une acquisition SPECT/CT d'une heure et euthanasiés par dislocation cervicale 3 h p.i. Une analyse *ex vivo* est réalisée par étude de biodistribution par prélèvement de tissus et organes – comprenant le prélèvement de l'aorte et l'étude de la fixation au sein des différents segments aortiques, également évalués pour l'étendue des lésions présentes par segment.

Pour le peptide [<sup>99m</sup>Tc]-D-HYNIC-B2702p1, deux des trois animaux sont immédiatement anesthésiés à l'isoflurane 2% après injection et imagés par une série d'acquisition SPECT/CT durant 3 h, tandis que le dernier animal n'est imagé qu'entre 135 et 180 min p.i. À 3 h p.i., les animaux sont euthanasiés par dislocation cervicale et une analyse de biodistribution *ex vivo* est réalisée, comprenant le prélèvement des tissus et organes d'intérêt ainsi que l'analyse par autoradiographie des segments d'aortes.

### 2.4.2 Animaux et protocole expérimental de l'étude FDG

Vingt-deux (22) souris femelles apoE<sup>-/-</sup> âgées de 36 ± 2 semaines et nourries avec un régime hypercholestérolémiant (Western Avogadro chow, Safe) pendant 24 ± 6 semaines ont été utilisées pour l'étude. L'expérimentation a été précédée d'une période de jeûne d'une nuit (14 h). Le FDG (12 ± 2 MBq) a été administré par une injection dans la veine caudale (i.v.). Les animaux du groupe A (groupe contrôle, n = 7) ont été injectés vigiles et maintenus à température ambiante (24°C) pendant la période d'accumulation. À 135 min p.i., ces animaux ont été anesthésiés à l'isoflurane 2% dans un mélange air-oxygène 1:1 (Minerve) pour permettre l'imagerie. Les animaux des groupe B (n = 7) et C (n = 6) ont été anesthésiés une heure avant l'injection de FDG avec 0.055 mg/kg de pentobarbital sodique (Ceva Santé Animale) administré par voie intra-péritonéale (i.p.). Immédiatement après anesthésie, les animaux du groupe C ont reçu 10 mg/kg de propranolol i.p (Sigma-Aldrich). Les animaux des deux groupes ont été placés sur un lit chauffé à 37°C et supplémenté en oxygène (Minerve) et l'anesthésie a été maintenue par une infusion i.p. de pentobarbital sodique à 0.020 mg/kg/h. La profondeur de l'anesthésie a été vérifiée par monitoring respiratoire et cardiaque (SA Instruments) ainsi qu'en testant les réflexes de retrait. Des mesures de glycémie (ACCU-CHEK, Robé Médical) ont été réalisées avant la mise à jeun des animaux, juste

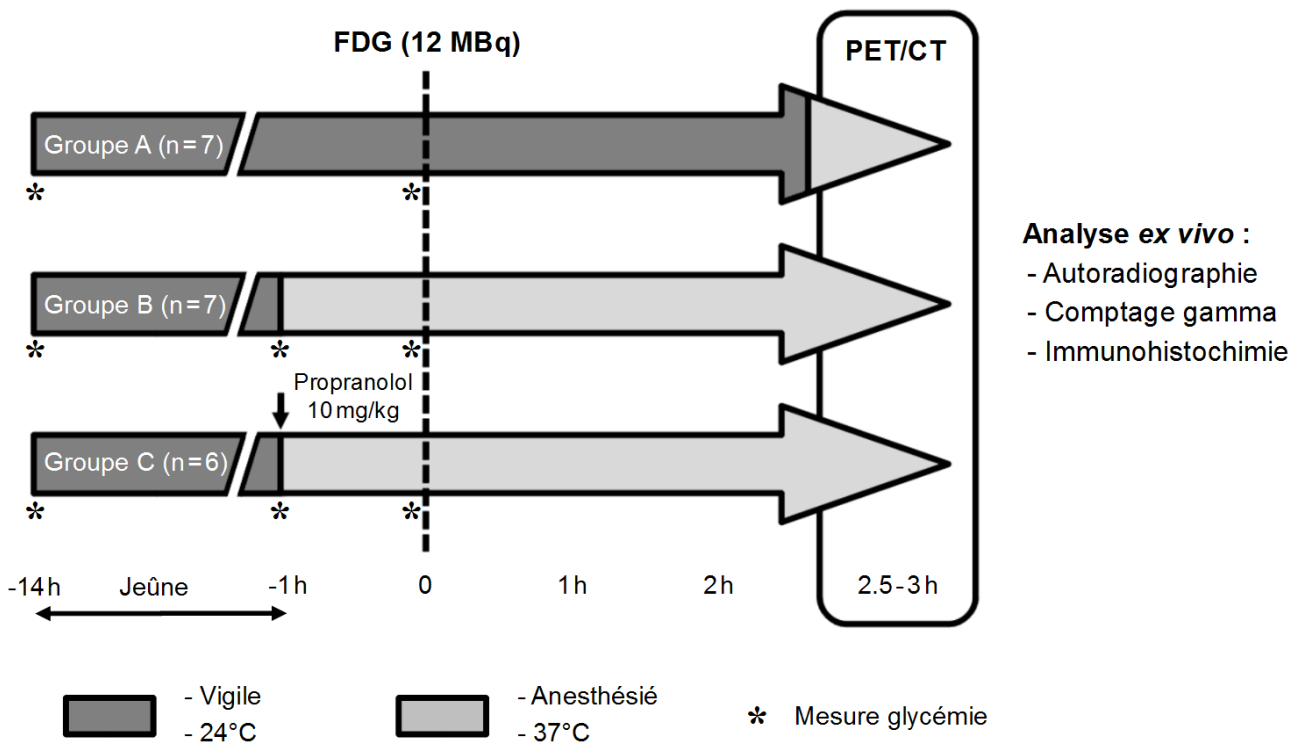


Figure 2. Schéma du protocole expérimental suivi au cours de l'étude de la captation du FDG sur le modèle de souris apoE<sup>-/-</sup> âgées de 36 semaines et nourries avec un régime hypercholestérolémiant.

## Partie expérimentale : Imagerie

avant l'injection de FDG et, pour les groupes B et C, avant l'induction de l'anesthésie. Pour l'ensemble des animaux de l'étude FDG, une acquisition PET de 30 min a été réalisée à 150 min p.i. et les animaux ont été euthanasiés 3 h après l'injection de FDG par dislocation cervicale sous anesthésie. Une analyse de biodistribution *ex vivo* a été réalisée, comprenant le prélèvement des tissus et organes d'intérêt ainsi que le prélèvement de la crosse aortique étudiée par autoradiographie. Un schéma du protocole expérimental est présenté en Figure 2.

### 2.4.3 Imagerie

#### 2.4.3.1 Imagerie SPECT/CT

**Paramètres d'imagerie.** Les animaux anesthésiés sont placés sur un lit chauffé et une acquisition par tomographie d'émission monophotonique (SPECT, *Single Photon Emission Computed Tomography*) corps entier ou focalisée sur la région cervicale est effectuée. Il s'agit d'acquisitions hélicoïdales effectuées sur le système avec 4 têtes d'acquisitions (nanoSPECT/CT, Bioscan) équipées de collimateurs sténopés comprenant 9 ouvertures de 1.4 mm de diamètre (collimation haute sensibilité) ou 10 ouvertures de 1.2 mm de diamètre (collimation haute résolution). L'acquisition est effectuée par 24 projections de durée variable et ajustée pour atteindre la durée d'acquisition souhaitée. Dans tous les cas, les repères anatomiques sont obtenus grâce à une acquisition tomographique hélicoïdale aux rayons X (CT, *Computed Tomography*), réalisée généralement juste avant l'acquisition SPECT avec les paramètres suivants : 240 projections, 500 ou 1000 ms par projection, *pitch* = 1, *binning* 1:4, 45 kVp. Les acquisitions CT et SPECT sont reconstruites en utilisant les algorithmes proposés par le constructeur avec les logiciels InVivoScope et HiSPECTng, respectivement. Les images sont fusionnées et quantifiées en traçant des volumes d'intérêt (VOI, *volumes of interest*) sur les zones à quantifier en utilisant le logiciel InVivoScope versions 1.3 et supérieures (Bioscan).

**Modèle de ligature carotidienne.** L'étude du peptide [<sup>99m</sup>Tc]-L-B2702p1 radiomarcqué par la méthode Isolink sur le modèle de ligature carotidienne est réalisé en imagerie SPECT/CT hormis dans le cas de la série expérimentale Lot #3 série 3. L'acquisition corps entier ou focalisée sur la région cervicale (suivant les séries expérimentales) est réalisée sur une durée de 60 min avec pour temps final 3 h p.i.. Les images sont quantifiées avec un premier VOI tracé sur la zone qui correspond anatomiquement au site de ligature de la carotide et qui présente un maximum de fixation focale – cette zone est considérée comme le reflet de l'activité lésionnelle *in vivo* – et un seconde VOI, symétrique au premier par rapport à l'axe sagittal médian de l'animal, considérée comme contrôle. Le ratio lésion sur contrôle est ainsi déterminé *in vivo*.

**Modèle de souris sous régime hypercholestérolémiant.** Pour les études sur modèle de souris sous régime hypercholestérolémiant, des acquisitions corps entier sont effectuées. Dans le cas de l'étude de [<sup>99m</sup>Tc]-L-B2702p1 (marquage Isolink), une acquisition unique est effectuée entre 2 et 3 h p.i.

Dans le cas de l'étude du peptide [<sup>99m</sup>Tc]-HYNIC-D-B2702p1, deux des trois animaux étudiés ont fait l'objet d'acquisitions dynamiques décomposées en une série de cinq acquisitions SPECT consécutives (durée : 15, 30 et 45 min) se terminant 15, 45, 90, 135 et 180 min p.i. ; le dernier animal a été imagé par une acquisition SPECT de 45 min se terminant à 180 min p.i. Des VOI ont été tracés sur les principaux organes ainsi que sur la partie supérieure du médiastin présentant un hypersignal au CT et identifié comme la crosse aortique, permettant ainsi une étude dynamique de la biodistribution de la molécule radioactive *in vivo*.

**Quantification.** La quantification des images SPECT/CT est réalisée en utilisant le logiciel InVivoScope versions 1.3 et supérieures (Bioscan). L'activité mesurée dans les tissus est corrigée de la décroissance, ramenée au volume du VOI mesuré et à la dose injectée ; elle est exprimée en pourcentage de la dose injectée par cm<sup>3</sup> (ou mL) de tissus (%ID/mL), suivant la formule (Eq. 4) :

$$\text{Activité tissu (DI/mL)} = \frac{\text{Activité tissu (MBq)} / \text{Volume tissu (mL)}}{\text{Dose injectée (MBq)}} \times 100 \quad (4)$$

#### 2.4.3.2 Imagerie PET/CT

Les acquisitions double modalité PET/CT corps entier ont été réalisées sur un système dédié à l'imagerie du petit animal (caméra nanoPET/CT, Bioscan). Les acquisitions PET de 10, 15 et 20 min pour les temps précoces ou 30 min pour le temps final ont été réalisées avec un mode de détection de coïncidences de '1-3'. La reconstruction a été réalisée en utilisant l'algorithme constructeur 2D OSEM (Nucline 1.07 ou plus, Bioscan). Des acquisitions CT ont été réalisées en série avec les acquisitions PET. Ces acquisitions consistent en 180 projections hélicoïdales d'un *pitch* = 1 de 600 ms, avec la source de rayons X à 45 kVp et un mode de *binning* 1:4. La reconstruction a été réalisée en utilisant l'algorithme constructeur avec un filtre Butterworth (InVivoScope versions 1.44 et supérieures, Bioscan).

Les images PET/CT fusionnées ont été quantifiées en traçant un VOI de taille constante (7.5 mm<sup>3</sup>) sur la partie supérieure du médiastin présentant un hypersignal au CT, identifié comme la crosse aortique (InVivoScope versions 1.3 et supérieures, Bioscan) ainsi que sur l'aorte thoracique descendante. L'activité mesurée dans les tissus a été ramenée au volume du VOI mesuré et à la dose injectée (%ID/mL) ; cette valeur a été ramenée au poids de la souris, donnant ainsi une valeur en

SUV (*standardized uptake value*), suivant la formule (Eq. 5) :

$$\text{Activité tissu (SUV)} = \frac{\text{Activité tissu (MBq)} / \text{Volume tissu (mL)}}{\text{Dose injectée (MBq)}} \times \text{Masse Corporelle (g)} \quad (5)$$

#### 2.4.4 Étude de biodistribution *ex vivo*

**Biodistribution par prélèvement de tissus et d'organes.** Après euthanasie, les principaux organes et tissus des animaux sont prélevés. Dans le modèle de ligature carotidienne, la carotide ligaturée (assimilée à la lésion) et la carotide controlatérale (contrôle) sont également prélevées. Pour l'étude de L-B2702p1 radiomarqué à l'Isolink, l'aorte est prélevée, soigneusement nettoyée et subdivisée en 12 segments auquel une note est attribuée suivant l'étendue des lésions (0 à 3) ; les segments notés 3 sont assimilés à la lésion et les segments notés 0 sont considérés comme le tissu vasculaire contrôle. Les échantillons prélevés sont pesés et leur activité est mesurée (Cobra II auto-gamma, Packard). L'activité est corrigée du bruit de fond, de la décroissance, rapportée à la masse de tissu et à la dose injectée et est exprimée en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu (%ID/g), suivant la formule (Eq. 6) :

$$\text{Activité tissu (%ID/g)} = \frac{\text{Activité tissu (MBq)} / \text{Masse tissu (g)}}{\text{Dose injectée (MBq)}} \times 100 \quad (6)$$

Alternativement, pour une comparaison homogène avec les valeurs de quantification d'imagerie exprimées en SUV, les valeurs de captation tissulaire peuvent également être rapportés au poids des animaux, donnant ainsi une valeur en DUR (*differential uptake ratio*) suivant la formule (Eq. 7) :

$$\text{Activité tissu (DUR)} = \frac{\text{Activité tissu (MBq)} / \text{Masse tissu (g)}}{\text{Dose injectée (MBq)}} \times \text{Masse Corporelle (g)} \quad (7)$$

**Coupes tissulaires et autoradiographie.** Afin de valider l'expression de VCAM-1 dans le modèle animal par marquage immunohistochimique, certaines artères carotidiennes sont récupérées et placées dans un moule contenant du gel pour congélation (Tissue-Tek), puis congelées dans du 2-méthylbutane refroidi dans de l'azote liquide. Dans le cas du peptide [<sup>99m</sup>Tc]-HYNIC-D-B2702p1, l'aorte est récupérée, rapidement nettoyée et coupée en segments. Ces segments sont inclus dans un bloc de Tissue-Tek puis congelés dans du 2-méthylbutane refroidi dans de l'azote liquide et des coupes de 20 µm d'épaisseur sont réalisées (HM505E, Microm). Ces coupes sont exposées sur un écran autoradiographique (08SR2025, Fujifilm) pendant une durée de 15 h. L'écran autoradiographique est lu sur un phosphorimager (BAS-5000, Fujifilm) en utilisant le logiciel Image Reader (Fujifilm) et analysé sur le logiciel Image Gauger (Fuji). Des régions d'intérêt (ROIs, *regions of interest*) sont tracées sur les lésions athéromateuses (lésions) ainsi que sur les parois

## Partie expérimentale : Imagerie

aortiques saines (contrôle). Les résultats sont corrigés du bruit de fond et, grâce à l'utilisation d'échantillons tissulaires d'activité connue (dont l'activité a également été quantifiée), l'activité est convertie en %ID/g de façon similaire à ce qui est présenté pour l'étude FDG (voir ci-dessous). Dans tous les cas, les ratios lésion-sur-contrôle et lésion-sur-sang sont calculés à partir de ces données *ex vivo*.

Dans le cas de l'étude FDG, après euthanasie, des échantillons de tissus et d'organes ont été prélevés, pesés et leur activité comptée (Cobra II autogamma, Packard). La crosse aortique a été prélevée et congelée dans du Tissue-Tek avec d'autres échantillons de tissus d'activités connues dans du 2-méthylbutane refroidi à  $-40^{\circ}\text{C}$ . Des coupes de 8 et 20  $\mu\text{m}$  d'épaisseur ont été obtenues (HM505E, Microm) ; les coupes de 20  $\mu\text{m}$  ont été exposées sur un écran d'autoradiographie (08SR2025, Fujifilm) avant d'être analysées par un phosphorimager (BAS-2500, Fujifilm). Après l'exposition, ces coupes sont colorées par une coloration trichrome HES (Haematoxylin, Erythrosine, Safran) alors que les coupes adjacentes servent au marquage immunohistochimique. Après coloration histologique trichrome HES, les coupes exposées en autoradiographie sont numérisées (Discovery.V8, Zeiss) et des zones d'intérêt correspondant aux lésions athéromateuses, au tissu vasculaire sain et à la graisse brune péri-aortique sont tracées sur les images. Les images histologiques sont fusionnées avec les images autoradiographiques (Gimp 2.6.8) et les ROI sont utilisées pour quantifier l'activité présente dans les structures correspondantes sur l'image autoradiographique (ImageJ 1.46). Par ailleurs, des échantillons de tissus d'activités connues ont également été quantifiés de la même façon afin de permettre la conversion entre PSL/ $\text{mm}^2$  et MBq/g ; cette conversion est réalisée en utilisant la valeur obtenue après régression linéaire des valeurs d'activité en PSL/ $\text{mm}^2$  et MBq/g avec une ordonnée à l'origine nulle (Figure 3). Une méthodologie similaire utilisant des échantillons de référence pour réaliser une quantification des acquisitions autoradiographiques a été décrite précédemment (Matter *et al.* 2006).

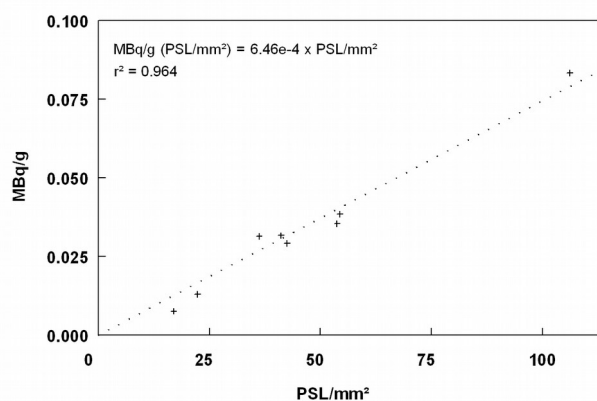


Figure 3. Exemple de conversion entre PSL/ $\text{mm}^2$  et MBq/g réalisée pour chaque quantification d'autoradiographie grâce à des échantillons de tissus d'activités connues.

### 2.4.5 Immunohistochimie

Le marquage immunohistochimique de VCAM-1 est réalisé sur des coupes de 8 µm obtenues avec un cryostat (HM505E, Microm) à partir de blocs contenant les carotides ligaturées et contrôles ainsi que des coupes d'aorte de souris apoE<sup>-/-</sup> nourries avec un régime hypercholestérolémiant.

Après fixation des coupes dans de l'acétone à -20°C pendant 5 min, le blocage des peroxydases endogènes est réalisé en plaçant les lames dans une solution aqueuse de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0.45% sur 15 min à 20°C. Suit une étape de blocage : solution PBS, gélatine de peau de poisson (FSG) 0.5%, sérum d'âne 10% et solution d'avidine block (Vector Lab Inc.), 1 h à 20°C. L'incubation de 0.5 µg/mL d'anticorps primaire polyclonal produit chez la chèvre et dirigé contre VCAM-1 (sc-1504 (C-19), Santa-Cruz Biotechnology), dilué dans un tampon similaire à la solution de blocage mais où la solution d'avidine block est remplacée par celle de biotine block (Vector Lab Inc.), est réalisée pendant 18 h à 4°C. L'incubation de 4.8 µg/mL d'anticorps secondaire – polyclonal biotinylé produit chez l'âne et dirigé contre les IgG de chèvre (Jackson ImmunoResearch), dilué dans du PBS-FSG 0.5%-sérum 10% – se fait pendant 1 h à 20°C. Enfin, le complexe avidine-biotine lié à l'activité peroxydase (Vectastain ABC kit, Vector Lab Inc.) est incubé (1 h, 20°C) et le marquage est révélé par un chromogène sensible à l'activité peroxydase : le 3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (Peroxydase substrate kit DAB, Vector Lab Inc.) incubé 5 min à 20°C. Une contre-coloration à l'hématoxyline est effectuée.

Le marquage des macrophages du tissu adipeux brun a été réalisé sur des coupes de tissu congelé de 8 µm d'épaisseur de crosse aortique prélevée sur les animaux de l'étude FDG en utilisant des anticorps anti-F4/80 et anti-uncoupling protein 1 (UCP-1), respectivement, suivant un protocole très similaire à celui utilisé pour le marquage de VCAM-1. Brièvement, après fixation par un bain de méthanol-acétone 1:1 ou à l'acétone -20°C, le blocage des peroxydases endogènes est réalisé avec du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0.45%. Après une étape de blocage utilisant le sérum approprié (1 h, température ambiante), l'anticorps primaire (anti-F4/80, 1:200, eBioscience ou anti-UCP-1, 1:500, sc-6528 (C17), Santa Cruz Biotechnology) est incubé pendant une nuit à 4°C. L'anticorps secondaire approprié (simple stain mouse MAX PO (rat), N-Histofine ou Jackson ImmunoResearch) est incubé (30 min et 1 h, température ambiante) avant la révélation réalisée par le kit Histogreen (Histoprim) ou l'incubation successive de solution ABC et DAB (Vector Lab Inc.) et la contre-coloration à l'hématoxyline.

La spécificité des marquages a été systématiquement vérifiée par omission d'anticorps primaire sur des lames contrôles. Les images ont été numérisées par acquisition avec un système photographique

## Partie expérimentale : Imagerie

lié à une loupe binoculaire (Discovery.V8, Zeiss) ou microscope optique (BX41, Olympus).

### **2.5 Analyse statistique**

Les valeurs numériques sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  écart type. Le test de Levene ou de Fisher est réalisé pour déterminer s'il y a égalité des variances. Suivant si les variances sont égales ou non, les tests non paramétriques : test t de Student pour données appariées et test de Mann-Whitney sont respectivement réalisés (PSPP 0.7.8, LibreOffice 4.0) pour rendre compte de la significativité des résultats. La significativité des coefficient de corrélations de Pearson a également été testée (Soper 2013). Une valeur de P de 0.05 ou inférieure est considérée comme statistiquement significative.

### 3 Résultats

#### 3.1 Analyse de liaison des peptides à VCAM-1

##### 3.1.1 Analyse en SPR

##### 3.1.1.1 Validation de la méthode – liaison de dérivés d'anticorps à VCAM-1

L'analyse en spectroscopie SPR a permis de mettre en évidence une cinétique rapide de fixation entre le fragment d'anticorps anti-VCAM-1 servant de contrôle et la molécule recombinante murine VCAM-1 immobilisée, l'équilibre étant atteint en moins de 180 s quelque soit la concentration en analyte (Figure 4A). La réponse à l'équilibre en fonction de la concentration en analyte a pu être ajustée au modèle d'interaction ligand-récepteur sur deux expériences indépendantes avec une concentration finale en analyte de 50 nM (Figure 4B). L'affinité a ainsi été mesurée à  $8.6 \pm 0.4$  nM.

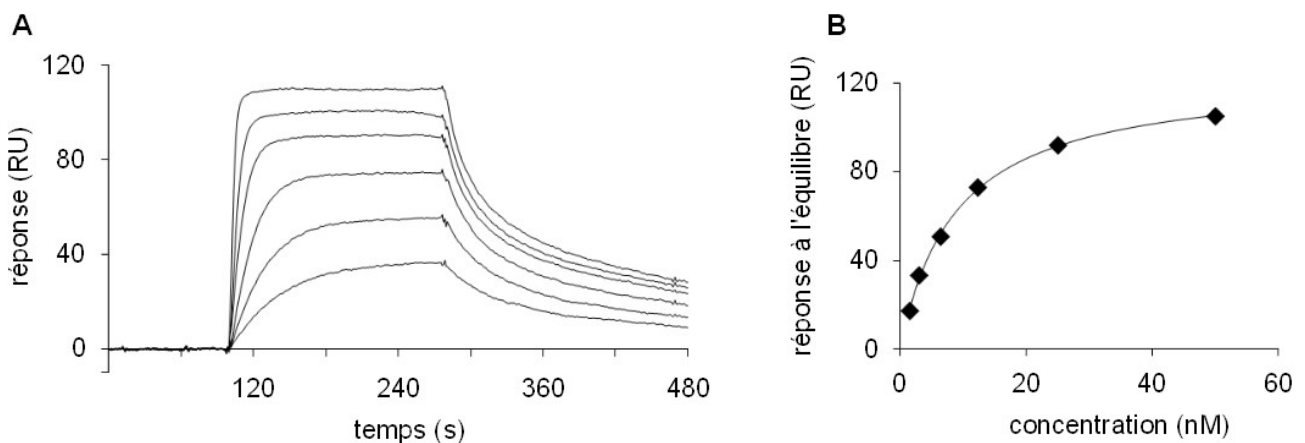


Figure 4. Analyse SPR en état stationnaire de la liaison d'un fragment d'anticorps à la molécule VCAM-1 recombinante murine. A. Sensogrammes spécifiques pour les concentrations en analyte de 2 nM à 50 nM. B. Réponse à l'équilibre en fonction de la concentration en analyte.

##### 3.1.1.2 Analyse du peptide L-B2702p

L'analyse de la liaison du peptide L-B2702p aux protéines recombinantes humaine et murine VCAM-1 immobilisées a été menée en spectroscopie SPR (Figure 5). Quelle que soit la concentration en peptide, la réponse du système est instantanée. L'analyse effectuée a montré une réponse à l'équilibre proportionnelle à la concentration en analyte (coefficient de régression linéaire  $r^2 = 0.924$  &  $r^2 = 0.998$  respectivement pour l'analyse de la fixation aux protéines VCAM-1 recombinantes murine et humaine) et n'a ainsi pas pu être ajustée de façon satisfaisante au modèle de liaison ligand-récepteur.

Une approche consistant à immobiliser le peptide L-B2702p et à utiliser la protéine recombinante

## Partie expérimentale : Imagerie

murine VCAM-1 comme analyte a été testée. La réponse obtenue n'a pas pu être ajustée au modèle (résultats non présentés).

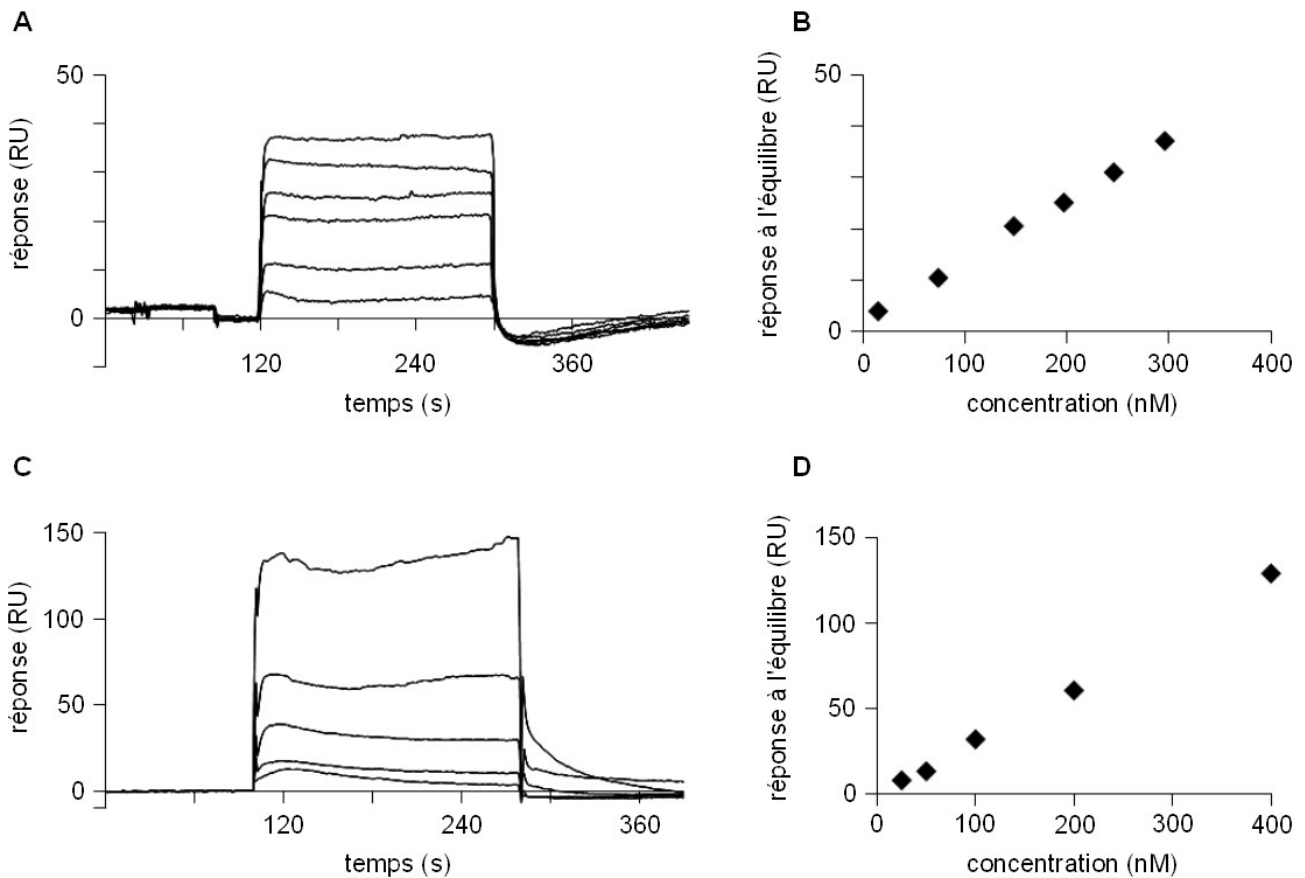


Figure 5. Analyse SPR en état stationnaire de la liaison de L-B2702p pour la molécule VCAM-1 recombinante murine (A & B) et humaine (C & D). Sensograms spécifique pour les concentration en analyte de 15 nM à 296 nM (A) et 25 nM à 400 nM (C). Réponse à l'équilibre en fonction de la concentration en analyte (B & D).

### 3.1.2 Analyse en polarisation de fluorescence

#### 3.1.2.1 Validation de la méthode – liaison du peptide Fluorescéine-L-B2702p à Hsp70

L'ajout de protéine humaine recombinante Hsp70 à une solution de peptide Fluoresceine-L-B2702p a entraîné une augmentation de 2.5 fois de la fluorescence mesurée. Cette augmentation a présenté une saturation à une concentration en Hsp70 de 1.8  $\mu$ M (Figure 6), qui n'a pas été observée dans les conditions contrôles. L'évolution de la polarisation de fluorescence en fonction de la concentration en Hsp70 a pu être ajustée au modèle d'interaction lors de deux expériences indépendantes ; l'affinité de cette liaison a ainsi été mesurée à  $0.7 \pm 0.2 \mu$ M.

## Partie expérimentale : Imagerie

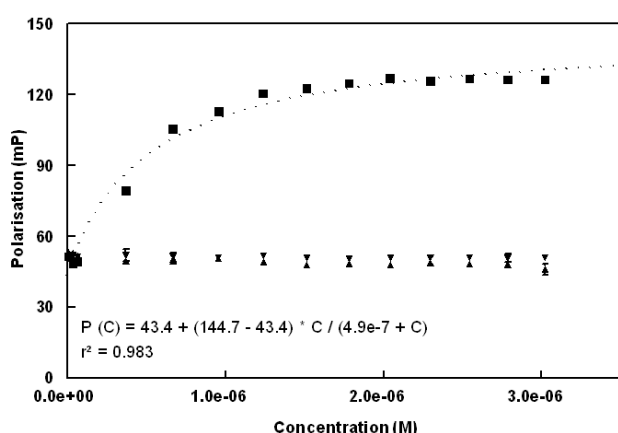


Figure 6. Liaison de L-B2702p avec Hsp70 mis en évidence par polarisation de fluorescence. (▼) Solution de Fluoresceine-L-B2702p1 seul à 430 nM, (■) avec ajout de Hsp70 jusqu'à 3  $\mu$ M de concentration finale, (▲) avec ajout de tampon HEPES/NaCl 50 mM correspondant au volume ajouté dans le puits Hsp70. (---) Courbe ajustée au modèle d'interaction ligand-récepteur.

### 3.1.2.2 Analyse des peptides Fluoresceine-L-B2702p, Fluoresceine-L-B2702p1 et du térapeptide Fluoresceine-tera-L-B2702p1

Dans l'ensemble des expériences menées (conditions présentées en Tableau 2, partie 2.2), la polarisation de la lumière émise par les solutions de peptides L-B2702p, L-B2702p1 et le térapeptide L-B2702p1 couplés à la fluorescéine n'a pas été sensiblement modifiée par l'ajout de concentration croissante de protéine recombinante VCAM-1, tout comme dans les puits contrôles où rien ou seul le tampon été ajouté (Figure 7). Les courbes de polarisation en fonction de la concentration en VCAM-1 n'ont pas pu être ajustées au modèle d'interaction ligand-récepteur.

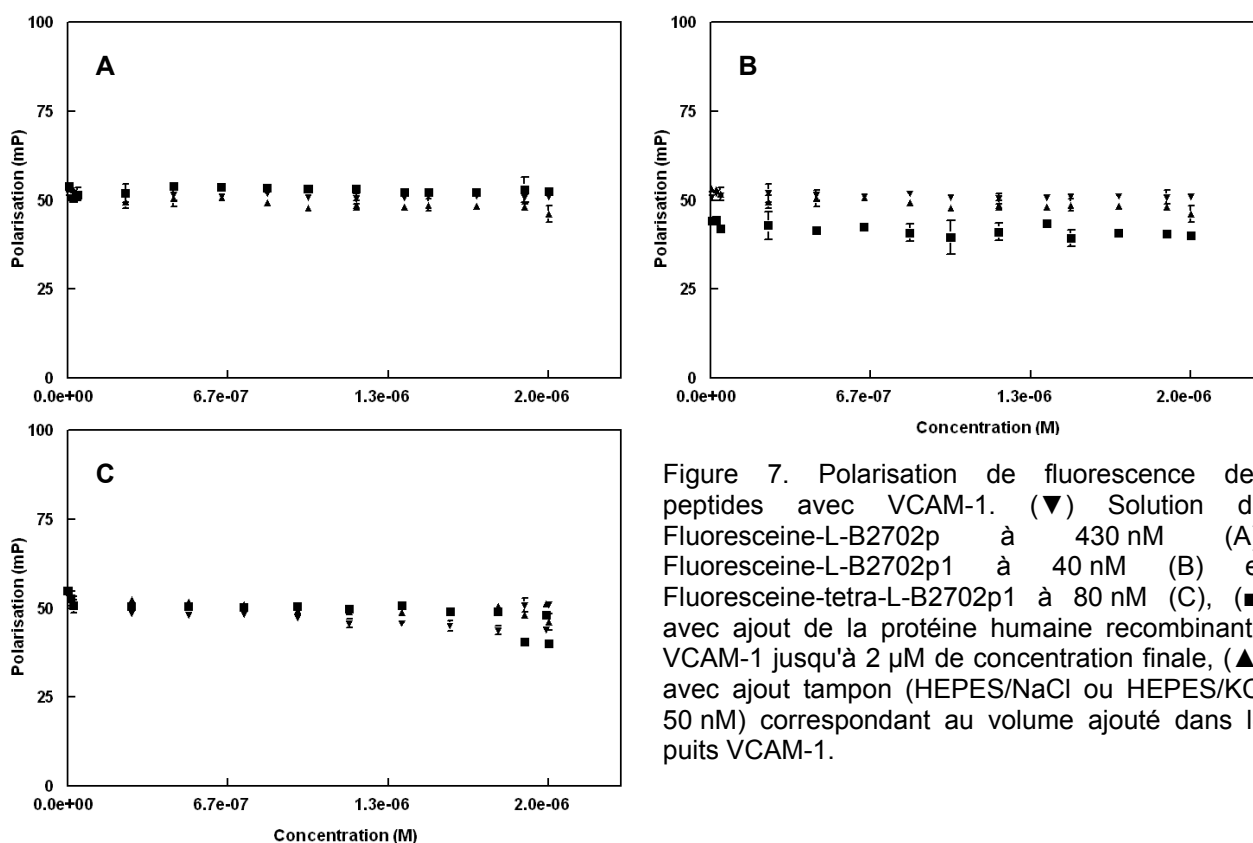


Figure 7. Polarisation de fluorescence des peptides avec VCAM-1. (▼) Solution de Fluoresceine-L-B2702p à 430 nM (A), Fluoresceine-L-B2702p1 à 40 nM (B) et Fluoresceine-tetra-L-B2702p1 à 80 nM (C), (■) avec ajout de la protéine humaine recombinante VCAM-1 jusqu'à 2  $\mu$ M de concentration finale, (▲) avec ajout tampon (HEPES/NaCl ou HEPES/KCl 50 nM) correspondant au volume ajouté dans les puits VCAM-1.

### 3.1.3 Analyse par saturation de liaison de molécules radiomarquées

#### 3.1.3.1 Validation de la méthode - liaison de dérivés d'anticorps à VCAM-1

La fixation spécifique du fragment d'anticorps anti-VCAM-1 radiomarqué à la protéine humaine recombinante VCAM-1, obtenue par soustraction de l'activité comptée dans les puits où VCAM-1 a été adsorbé (fixation totale) à l'activité comptée dans les puits contrôles (fixation non spécifique), a pu être ajustée au modèle d'interaction ligand-récepteur (Figure 8). Cette expérience a été réalisée en duplicata, pour les protéines VCAM-1 recombinantes humaine et murine ; les valeurs d'affinité obtenues ont été de  $33.3 \pm 6.6$  nM et  $11.3 \pm 7.5$  nM respectivement.

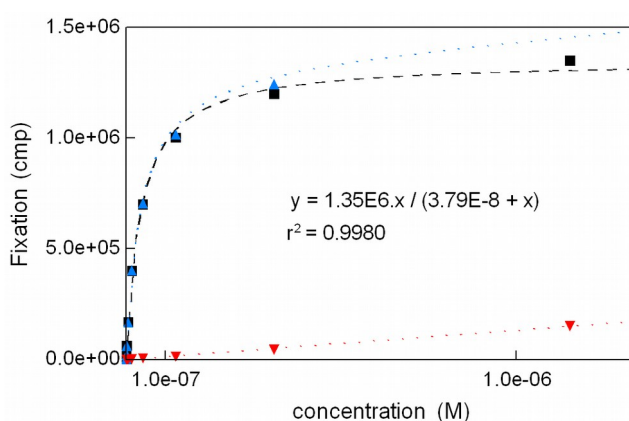


Figure 8. Liaison d'un fragment d'anticorps à VCAM-1. (▲) Liaison totale dans les puits présentant de la protéine humaine recombinante VCAM-1, (▼) liaison non spécifique, (■) liaison spécifique à VCAM-1, ajustée au modèle d'interaction ligand-récepteur.

#### 3.1.3.2 Analyse des peptides B2702p, B2702p1 marqués via Isolink et du peptide B2702p1 marqué via HYNIC

Des expériences de saturation ont été menées pour les peptides radiomarqués [ $^{99m}\text{Tc}$ ]-L-B2702p, [ $^{99m}\text{Tc}$ ]-L-B2702p1 (tous deux radiomarqués par la méthode Isolink), [ $^{99m}\text{Tc}$ ]-HYNIC-L-B2702p1 et [ $^{99m}\text{Tc}$ ]-HYNIC-D-B2702p1 (Figure 9). Dans l'ensemble des cas, les fixations dans les puits présentant VCAM-1 et dans les puits contrôles n'ont pas été sensiblement différentes quelle que soit la concentration en peptide. L'activité résultante de la différence entre ces deux conditions, considérée comme spécifique, n'a pas présenté de variation avec l'augmentation de la concentration en peptide, restant proche de la valeur nulle ; elle n'a pas pu être ajustée au modèle d'interaction ligand-récepteur.

## Partie expérimentale : Imagerie

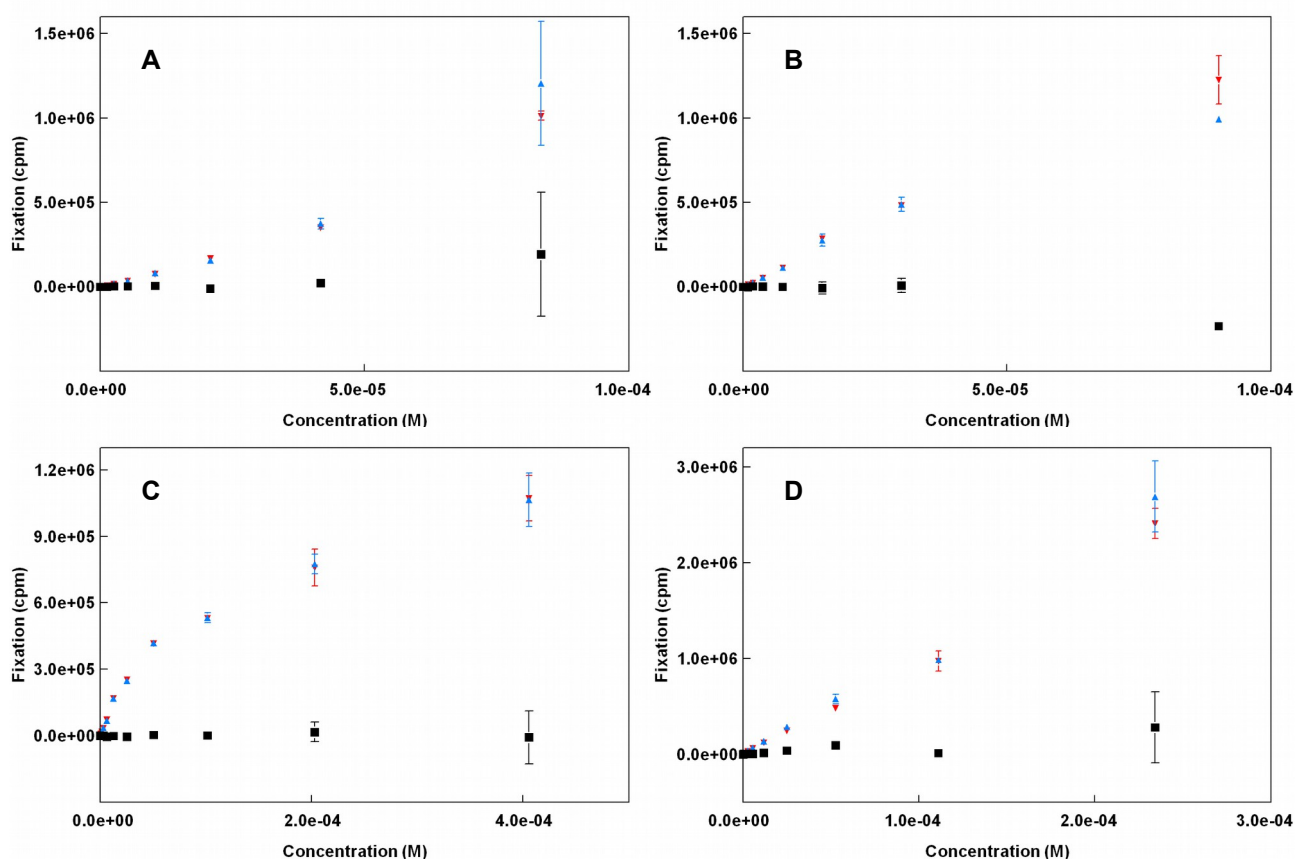


Figure 9. Expérience de liaison en puits entre VCAM-1 et les peptides radiomarqués  $[^{99m}\text{Tc}]$ -L-B2702p (marquage Isolink) (A),  $[^{99m}\text{Tc}]$ -L-B2702p1 (marquage Isolink) (B),  $[^{99m}\text{Tc}]$ -HYNIC-L-B2702p1 (C) ou  $[^{99m}\text{Tc}]$ -HYNIC-D-B2702p1 (D). Liaison dans les puits contrôle non traités (C, D) ou recouverts de protéine murine recombinante ICAM-1 (A, B) ( $\blacktriangledown$ ) ou recouverts de protéine humaine recombinante VCAM-1 ( $\blacktriangle$ ), liaison spécifique à VCAM-1 résultante ( $\blacksquare$ ).

### 3.1.4 Bilan sur l'analyse de liaison des peptides à VCAM-1

L'ensemble des méthodes évaluées ont été validées soit par l'utilisation de fragment d'anticorps ciblant VCAM-1 soit par utilisation de la molécule Hsp70 décrite comme ligand du peptide B2702p. Cependant, quelque soit la méthode employée, la liaison entre VCAM-1 et les différents peptides testés (récapitulé dans le Tableau 3) n'a pas été observée.

Peptide	Technique
L-B2702p	SPR, saturation
L-B2702p1	SPR, saturation
HYNIC-L-B2702p1	saturation
HYNIC-D-B2702p1	saturation
Flourescéine-L-B2702p	polarisation
Flourescéine-L-B2702p1	polarisation
Flourescéine-tetra-L-B2702p1	polarisation

Tableau 3. Peptides testés dans le cadre de l'analyse de liaison à VCAM-1, par analyse en SPR (SPR), analyse en polarisation de fluorescence (polarisation) ou analyse par saturation en puits (saturation); à noter que les peptides analysés par saturation en puits ont préalablement été radiomarqués au technétium-99m. Pour plus de détails cf. texte de la partie 3.1.

## 3.2 Stabilité des peptides radiomarqués

### 3.2.1 Peptide [<sup>99m</sup>Tc]-L-B2702p1 (marquage Isolink)

**Radiomarquage.** Le peptide L-B2702p1 radiomarqué *via* Isolink et analysé dans son milieu de marquage a présenté un pic d'activité majoritaire élué à 19:19 min représentant 97 % et 92 % de l'activité totale mesurée immédiatement après radiomarquage et 6 h après radiomarquage respectivement (Figure 10A).

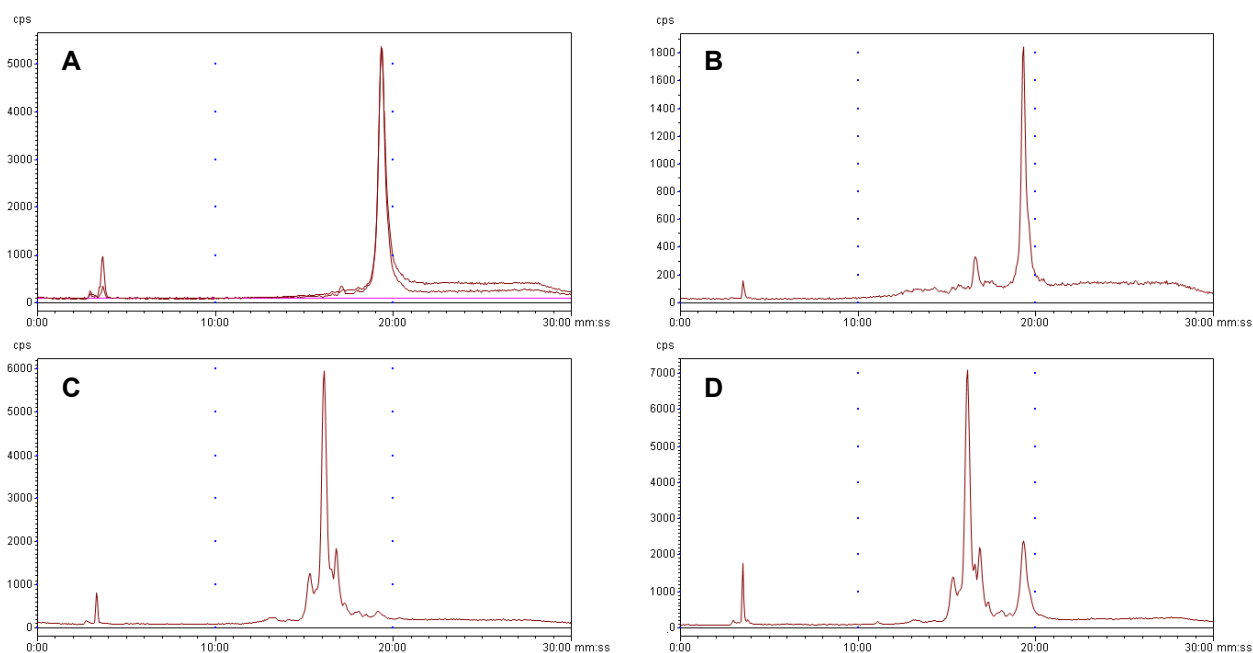


Figure 10. Profils de stabilité de [<sup>99m</sup>Tc]-L-B2702p1 (marquage Isolink). (A) Superposition de radiochromatogrammes du produit technétié immédiatement après marquage et à 6 h post-radiomarquage. (B) Radiochromatogramme de la fraction libre du plasma obtenu après prélèvement du sang de souris *in vivo* 3 h p.i. (C) Radiochromatogramme de la fraction libre du plasma à 30 min d'incubation *in vitro* dans le sang de souris. (D) Radiochromatogramme de la fraction C avec co-injection du produit de marquage initial.

**Stabilité *in vivo*.** L'étude de la stabilité *in vivo* de ce peptide dans le sang de souris prélevé 180 min après injection du produit de marquage a démontré que  $35 \pm 9$  % de cette activité est retrouvée dans la fraction libre du plasma ;  $40 \pm 2$  % et  $25 \pm 10$  % de l'activité restante étant liée aux protéines plasmatiques et aux cellules sanguines, respectivement. L'analyse de la fraction libre a mis en évidence un pic majoritaire dont le temps de rétention (Figure 10B) correspond à celui du produit initial (Figure 10A).

**Stabilité *in vitro* dans le sang de souris.** L'analyse de la fraction libre du plasma issue de l'incubation *in vitro* de [<sup>99m</sup>Tc]-L-B2702p1 dans du sang de souris a présenté une dégradation du peptide pour les différents temps étudiés. L'analyse du profil HPLC de la fraction libre du plasma au

## Partie expérimentale : Imagerie

temps initial de l'incubation (juste après contact du sang) montre la présence d'un pic d'activité majoritaire présentant des épaulements et élué à 16:00 min et un second pic élué à 19:05 min. Le second pic est identifié comme correspondant au produit intègre ; il représente 22 % de l'activité totale mesurée. À 30 min d'incubation, ce pic est quantifié à 6 % de l'activité totale mesurée (Figure 10C). Une co-injection de la fraction issue de l'incubation dans le sang de souris avec du produit de marquage a permis de confirmer l'identité du pic d'éluion à ~ 19 min (19:15 min) comme étant celle correspondant au peptide technétié (Figure 10D). L'activité dans la fraction libre du plasma n'a pas présenté d'évolution au cours du temps et compte pour  $22 \pm 2$  % de l'activité totale analysée, le reste étant réparti entre la fraction liée aux protéines plasmatiques qui passe de 64 % à 48 % entre le temps initial et 180 min d'incubation et la fraction liée aux cellules sanguines qui passe de 14 % à 36 % durant ce même délai d'incubation.

**Stabilité *in vitro* dans le sang humain.** L'analyse de stabilité *in vitro* dans le sang humain a également été effectuée. Dès la mise en contact avec le sang, le pic de rétention correspondant au produit de marquage représente 54 % de l'activité mesurée et le reste de l'activité est retrouvée sous forme d'un pic avec épaulements élué à  $15:50 \pm 0:10$  min. À 60 min d'incubation, le pic correspondant au produit de marquage représente 7 % de l'activité totale mesurée.

On n'observe pas d'évolution au cours du temps (jusqu'à 180 min d'incubation) de l'activité présente dans la fraction libre ( $32 \pm 3$  %) alors que l'activité liée aux protéines plasmatiques a diminué, passant de 62 à 46 % et que celle liée aux cellules a augmentée de 8 à 18 %.

### 3.2.2 Peptide [<sup>99m</sup>Tc]-D-B2702p1 (marquage Isolink)

**Radiomarquage.** Le peptide D-B2702p1 radiomarqué au technétium-99m *via* la méthode Isolink présente un pic d'activité principal élué à 19:14 min avec une pureté radiochimique supérieure à 95 %. Le [<sup>99m</sup>Tc]-D-B2702p1 reste stable (RCP > 95 % au moins pendant 24 h dans le milieu de marquage (Figure 11A).

**Stabilité *in vitro* dans le sang humain.** L'analyse de stabilité *in vitro* de [<sup>99m</sup>Tc]-D-B2702p1 par incubation dans du sang humain a montré que la fraction libre du plasma aux différents temps d'incubation (0, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min et 180 min) présente un pic d'activité majoritaire élué à  $19:13 \pm 0.02$  avec une RCP de  $84 \pm 9$  % (Figure 11B).

Une co-injection du marquage initial avec la fraction libre du plasma récupérée après 120 min d'incubation a montré la présence d'un seul pic élué à  $19:13 \pm 0:01$  min. (Figure 11C). La co-injection permet de vérifier que le pic observé dans l'échantillon incubé correspond au peptide

technétié initial.

Le pourcentage d'activité présente dans la fraction libre a diminué au cours de l'analyse, passant de 6 % à 2 % entre le temps initial et 180 min d'incubation, tout comme le pourcentage lié aux cellules sanguines (34 % à 25 %) tandis que l'activité liée aux protéines plasmatiques est passée de 59 % à 73 % respectivement.

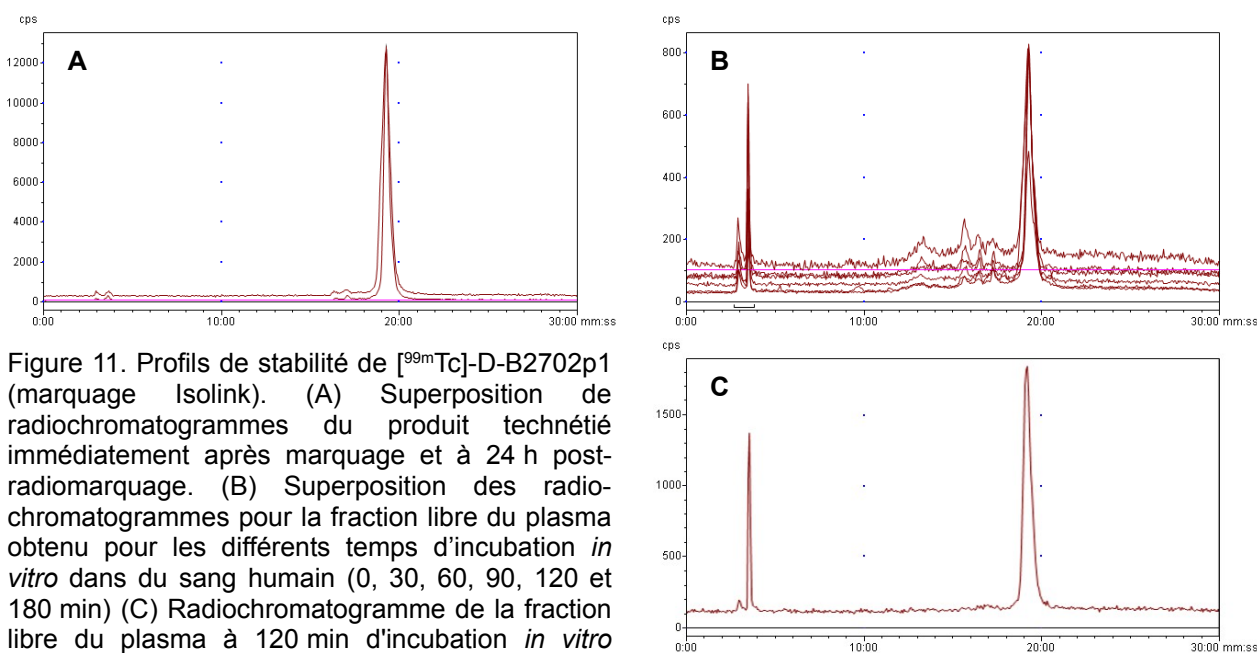


Figure 11. Profils de stabilité de  $[^{99m}\text{Tc}]\text{-D-B2702p1}$  (marquage Isolink). (A) Superposition de radiochromatogrammes du produit technétié immédiatement après marquage et à 24 h post-radiomarquage. (B) Superposition des radiochromatogrammes pour la fraction libre du plasma obtenu pour les différents temps d'incubation *in vitro* dans du sang humain (0, 30, 60, 90, 120 et 180 min) (C) Radiochromatogramme de la fraction libre du plasma à 120 min d'incubation *in vitro* dans du sang humain co-injecté avec le radiomarquage initial.

**Stabilité *in vitro* dans le sang de souris.** Une analyse de stabilité *in vitro* par incubation dans du sang de souris a été effectuée et montre un résultat similaire à ce qui a été observé lors de l'incubation dans du sang humain : une bonne stabilité du produit et une faible activité dans la fraction libre du plasma (résultats non présentés).

### 3.2.3 Peptide $[^{99m}\text{Tc}]\text{-HYNIC-L-B2702p1}$

**Radiomarquage.** Comme montré sur la Figure 12A, le peptide HYNIC-L-B2702p1 a été radiomarké au technétium-99m (méthode HYNIC) avec une bonne pureté radiochimique (> 95 %) et il est élué à 17:05 min. Il reste stable au moins 6 h dans le milieu de marquage ( $t_R = 17:04$  min, RCP > 95 %).

**Stabilité *in vivo*.** L'étude de stabilité *in vivo* du peptide  $[^{99m}\text{Tc}]\text{-HYNIC-L-B2702p1}$  dans le sang de souris 180 min après injection indique un pic majoritaire avec un temps de rétention (17:41 min) similaire au produit technétié initial (résultats non présentés).

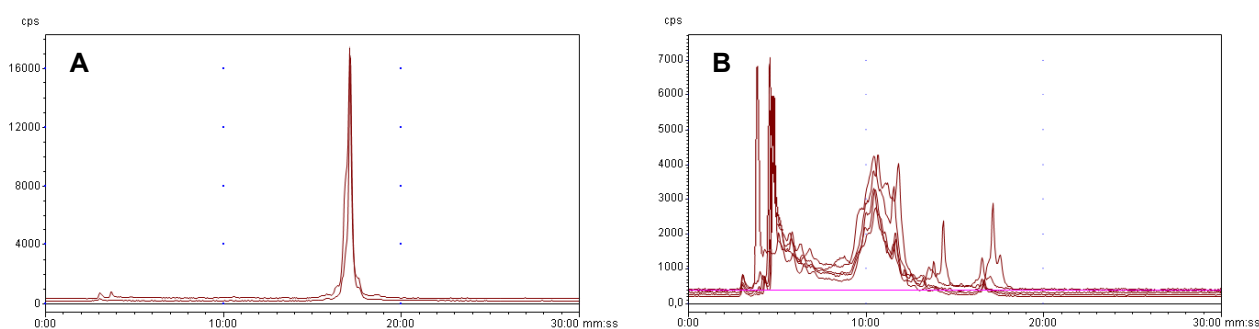


Figure 12. Profils de stabilité de [ $^{99m}\text{Tc}$ ]-HYNIC-L-B2702p1. (A) Superposition de radiochromatogrammes du produit technétié immédiatement après marquage et à 24 h post-radiomarquage. (B) Superposition des radiochromatogrammes de la fraction libre du plasma obtenus pour les différents temps d'incubation *in vitro* dans du sang de souris (30, 60, 90 et 180 min) .

**Stabilité *in vitro* dans le sang de souris.** Les études de stabilité *in vitro* de [ $^{99m}\text{Tc}$ ]-HYNIC-L-B2702p1 incubé dans le sang de souris indiquent une forte dégradation du peptide. À 30 min d'incubation, le pic d'activité correspondant au temps d'éluion du peptide technétié représente 7 % de l'activité mesurée, 2 % à 60 min, et < 1 % aux temps ultérieurs (Figure 12B).

Cette activité a été majoritairement retrouvée dans la fraction libre du plasma ( $52 \pm 3$  %) et n'a pas présenté d'évolution au cours du temps, les fractions liées aux protéines plasmatiques et aux cellules sanguines représentant  $38 \pm 3$  % et  $11 \pm 1$  % de l'activité, respectivement.

**Stabilité *in vitro* dans le sang humain.** L'étude de stabilité *in vitro* de [ $^{99m}\text{Tc}$ ]-HYNIC-L-B2702p1 dans du sang humain a montré des résultats analogues à ceux obtenus par l'étude *in vitro* réalisée dans le sang de souris, tant en termes de stabilité dans la fraction libre du plasma qu'en termes de répartition de l'activité entre les fractions étudiées (résultats non présentés).

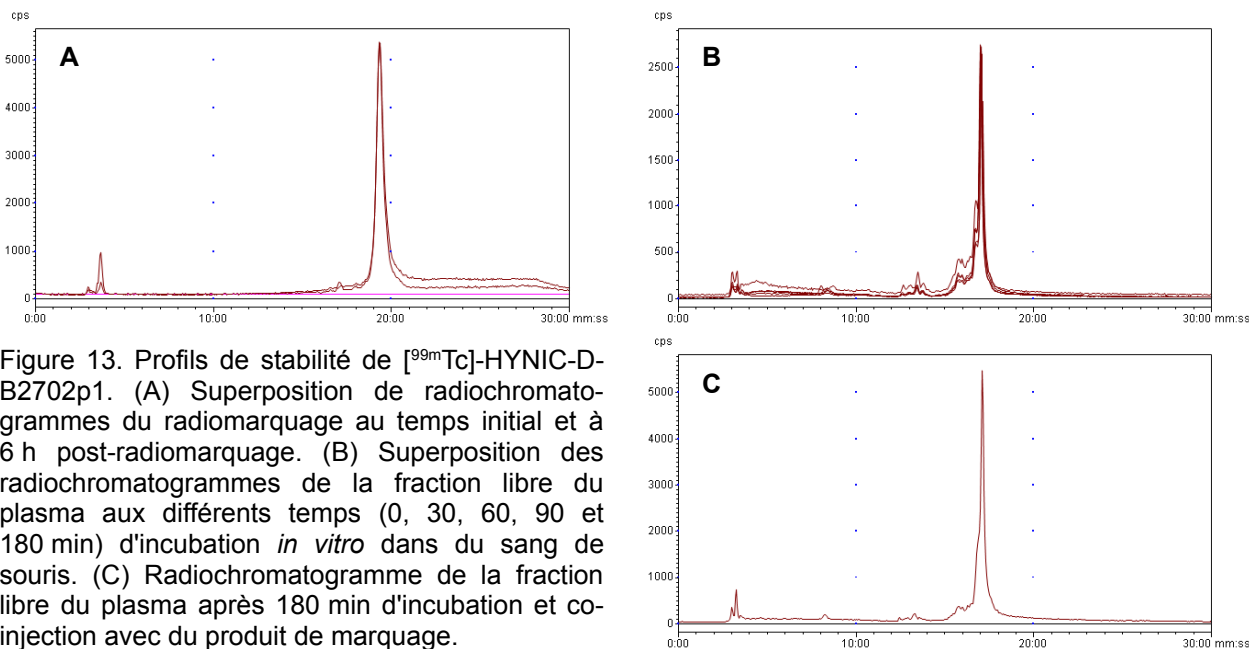
### 3.2.4 Peptide [ $^{99m}\text{Tc}$ ]-HYNIC-D-B2702p1

**Radiomarquage.** Les profils HPLC des analyses réalisées dans le milieu de marquage directement après la réalisation de celui-ci et après 6 h ont présenté un pic d'activité majoritaire élué à 16:56 min et 16:50 min avec des puretés radiochimiques de 96 % et 94 %, respectivement (Figure 13A).

**Stabilité *in vitro* dans le sang souris.** La superposition des profils HPLC obtenus par analyse de la fraction libre du plasma de 0 à 180 min d'incubation dans du sang de souris montre un seul pic d'activité représentant  $93 \pm 2$  % de l'activité totale mesurée avec un temps de rétention ( $17:00 \pm 0:03$  min) identique pour l'ensemble des échantillons (Figure 13B). La co-injection du produit de marquage avec la fraction libre du plasma obtenue à 180 min d'incubation montre un pic unique élué à 17:02 min (Figure 13C).

## Partie expérimentale : Imagerie

Au cours de l'analyse, la répartition de l'activité n'a pas évolué. La fraction libre du plasma représente  $27 \pm 4 \%$  de l'activité totale incubée, la fraction majoritaire étant liée aux protéines plasmatiques ( $48 \pm 6 \%$ ) tandis que  $25 \pm 7 \%$  de l'activité est liée aux cellules sanguines.



**Stabilité *in vitro* dans le sang humain.** L'incubation *in vitro* dans du sang humain a présenté des résultats très analogues à ceux obtenus pour l'incubation *in vitro* dans du sang de souris, en montrant une bonne stabilité de  $[^{99m}\text{Tc}]$ -HYNIC-D-B2702p1 (résultats non présentés).

L'activité liée aux protéines plasmatiques représente  $64 \pm 3\%$ , celle liée aux éléments figurés du sang  $18 \pm 4\%$ , tandis que la fraction libre du plasma compte pour  $19 \pm 4\%$  de l'activité totale incubée.

### 3.2.5 Peptide $[^{18}\text{F}]$ -FBA-L-B2702p1

**Radiomarquage.** Le radiomarquage du peptide L-B2702p1 au fluor-18 par conjugaison du  $[^{18}\text{F}]$ -fluorobenzaldéhyde *via* la liaison oxime est réalisé en partenariat avec la société AAA selon la synthèse décrite précédemment (partie 2.3). Le radiotraceur est envoyé au Laboratoire Radiopharmaceutiques Biocliniques (U1039). À réception ( $\sim 3$  h après radiomarquage), un contrôle de qualité est réalisé.  $[^{18}\text{F}]$ -FBA-L-B2702p1 est élué à 20:24 min avec une pureté radiochimique  $\sim 70 \%$  (Figure 14A). Malgré cette RCP insuffisante, une bonne stabilité est observée 6 h après marquage avec un profil d'éluion similaire (RCP  $\sim 70 \%$ ).

## Partie expérimentale : Imagerie

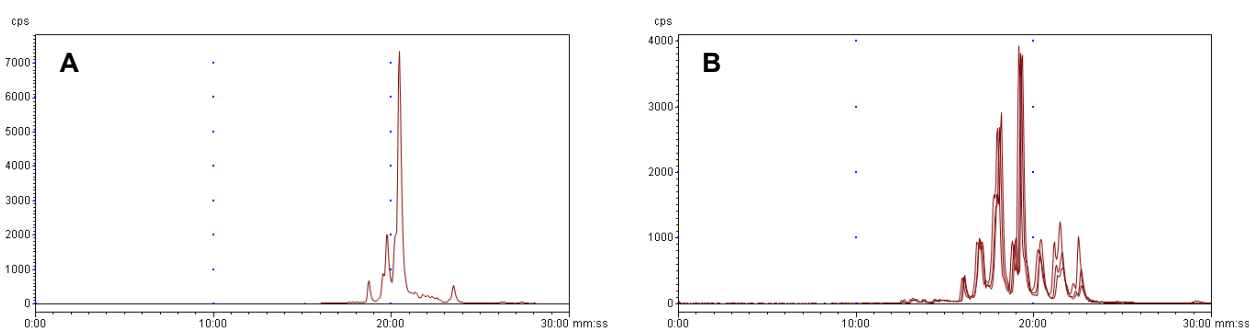


Figure 14. Profils de stabilité du  $[^{18}\text{F}]$ -FBA-L-B2702p1. (A) Radiochromatogramme à réception du produit fluoré. (B) Superposition des radiochromatogrammes de la fraction libre du plasma obtenus pour les différents temps (30, 60 et 90 min) d'incubation *in vitro* dans du sang humain

**Stabilité *in vitro* dans le sang humain.** La stabilité *in vitro* dans du sang humain a été réalisée pour  $[^{18}\text{F}]$ -FBA-L-B2702p1 en présence de 6 % d'éthanol après la mise en contact avec le sang. L'analyse HPLC révèle que, dès 30 min, la fraction libre du plasma montre une multitude de pics traduisant une forte dégradation du produit fluoré de départ. En effet, il ne reste plus que 17% et 11% du produit de départ après 30 min et 60 min d'incubation, respectivement (Figure 14B).

La fraction libre du plasma représente  $39 \pm 7$  % de l'activité totale, alors que  $38 \pm 9$  % et  $23 \pm 5$  % de cette activité sont liés aux protéines plasmatiques et aux cellules sanguines, respectivement. Ces proportions n'évoluent pas au cours de l'analyse.

### 3.2.6 Peptide $[^{18}\text{F}]$ -FBA-D-B2702p1

**Radiomarquage.** De même que pour la série L, un contrôle de qualité de  $[^{18}\text{F}]$ -FBA-D-B2702p1 est réalisé à réception du produit (~3 h après radiomarquage). Le traceur fluoré est élué à 21:07 min avec une pureté radiochimique de 68 % (Figure 15A). Une bonne stabilité est observée : l'analyse à 6 h après marquage montre un profil d'élution similaire à celui réalisé à réception du produit.

**Stabilité *in vitro* dans le sang humain.** L'étude de stabilité *in vitro* dans le sang humain pour  $[^{18}\text{F}]$ -FBA-D-B2702p1 a été réalisée avec présence de 6 % d'éthanol après la mise en contact avec le sang. Dès la mise en contact du produit fluoré dans le sang humain, on observe dans la fraction libre du plasma 2 pics d'élution distincts. Un pic majoritaire à 19:18 min indique que le produit se dégrade en un seul fragment fluoré (55 %) tandis qu'un second pic (45 %) élué à 21:02 min correspondant au produit fluoré initial. Un profil similaire est obtenu pour l'incubation à 90 min avec toujours les 2 pics distincts dans la fraction libre du plasma, élués à 18:14 min (69 %) et 20:25 min (31 %), respectivement. Sur ce radiochromatogramme (Figure 15B) on observe un décalage dans le temps de rétention du traceur par rapport à celui observé avec le marquage initial.

## Partie expérimentale : Imagerie

Le prélèvement à 90 min est co-injecté avec le marquage de départ. L'analyse avec la co-injection indique toujours un seul pic à 20:25 min mais d'intensité plus importante (Figure 15C), ce qui confirme que le produit élué à 20:25 min pour l'incubation à 90 min correspond bien au traceur

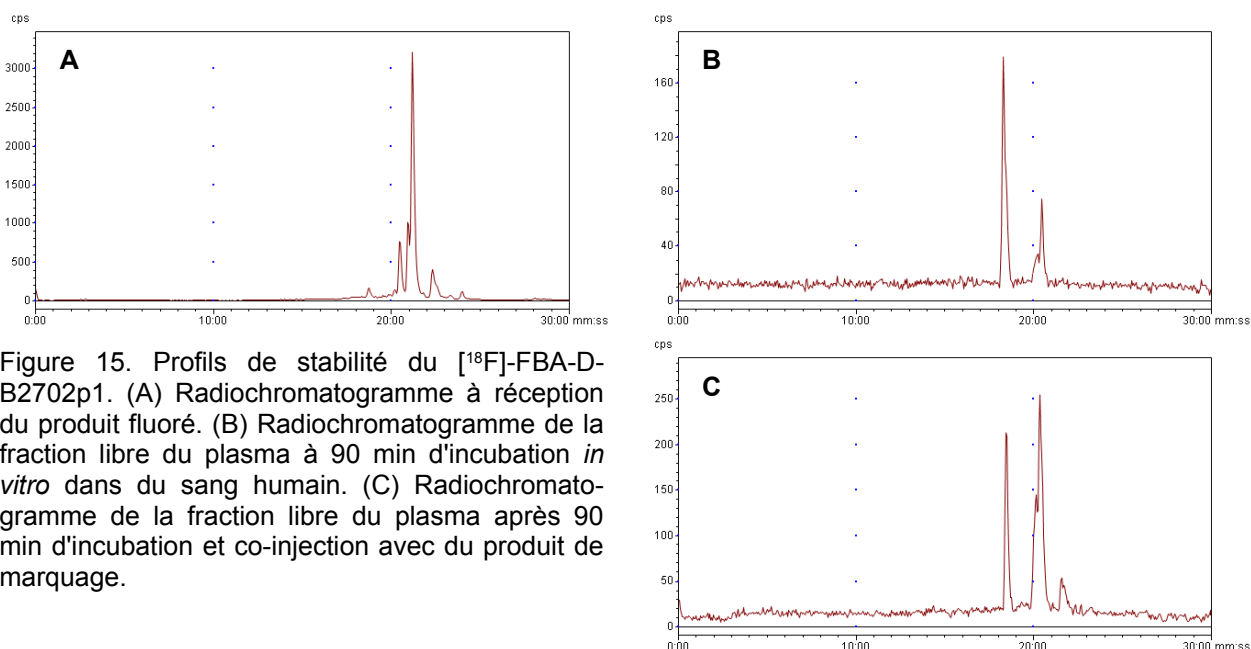


Figure 15. Profils de stabilité du [ $^{18}\text{F}$ ]-FBA-D-B2702p1. (A) Radiochromatogramme à réception du produit fluoré. (B) Radiochromatogramme de la fraction libre du plasma à 90 min d'incubation *in vitro* dans du sang humain. (C) Radiochromatogramme de la fraction libre du plasma après 90 min d'incubation et co-injection avec du produit de marquage.

L'activité de la fraction libre analysée ne représente que  $5 \pm 1\%$  de l'activité totale. L'activité liée aux cellules sanguines et aux protéines plasmatique compte pour  $33 \pm 5\%$  et  $62 \pm 5\%$ , respectivement. Les proportions n'évoluent pas au cours du temps.

### 3.2.7 Bilan sur la stabilité des peptides

Les résultats des tests de stabilité effectués sur les différents peptides sont récapitulés dans le Tableau 4. L'ensemble des peptides radiomarqués au technétium-99m montre une bonne stabilité dans le milieu de marquage, tandis que les peptides radiomarqués au fluor-18 montrent une RCP sub-optimale à la réception, mais qui n'évolue pas au cours des 6 h qui suivent. Dans l'ensemble des cas, l'incubation *in vitro* et *in vivo* des peptides de série L dans du sang entraîne leur dégradation. Pour les peptides de série D, aucune dégradation n'est observée hormis dans le cas du peptide [ $^{18}\text{F}$ ]-FBA-D-B2702p1 qui présente une dégradation modérée. Dans l'ensemble des cas, aucune différence sensible n'a été observée entre l'incubation dans du sang humain et du sang de souris.

## Partie expérimentale : Imagerie

Peptide	Stable	Instable
[ <sup>99m</sup> Tc]-L-B2702p1	marquage	sang <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i>
[ <sup>99m</sup> Tc]-D-B2702p1	marquage, sang <i>in vitro</i>	-
[ <sup>99m</sup> Tc]-HYNIC-L-B2702p1	marquage	sang <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i>
[ <sup>99m</sup> Tc]-HYNIC-D-B2702p1	marquage, sang <i>in vitro</i>	-
[ <sup>18</sup> F]-FBA-L-B2702p1	(marquage)	sang <i>in vitro</i>
[ <sup>18</sup> F]-FBA-D-B2702p1	(marquage)	(sang <i>in vitro</i> )

Tableau 4. Récapitulatif des tests de stabilities réalisés sur les différents peptides étudiés. Pour plus de détails cf. texte de la partie 3.2.

### 3.3 Étude des peptides sur le modèle de souris apoE<sup>-/-</sup>

Le peptide B2702p1 de série L radiomarké au technétium-99m par la méthode Isolink a été évalué sur le modèle d'athérosclérose accéléré par ligature carotidienne et sur le modèle d'athérosclérose induite par un régime hypercholestérolémiant. Le peptide HYNIC-B2702p1 de série D radiomarké au technétium-99m *via* le groupement HYNIC a également été évalué sur le modèle d'athérosclérose induit par un régime hypercholestérolémiant. Cette évaluation est réalisée *in vivo* par imagerie SPECT ainsi qu'en *ex vivo*.

#### 3.3.1 Imagerie *in vivo*

##### 3.3.1.1 [<sup>99m</sup>Tc]-L-B2702p1 (marquage Isolink)

Les images SPECT/CT acquises entre 2 et 3 heures après injection de [<sup>99m</sup>Tc]-L-B2702p1 radiomarké par la méthode Isolink au cours des différentes séries expérimentales effectuées sur le modèle de souris apoE<sup>-/-</sup> avec ligature carotidienne ont été quantifiées. Suivant les séries expérimentales, les images SPECT varient sensiblement. Une activité circulante importante est observée dans la région cervicale, notamment visualisée par une activité importante sur le trajet des veines jugulaires. Dans la majorité des cas étudiés, il a été possible de trouver un point chaud dans la région cervicale correspondant au site où la ligature a été effectuée (Figure 16).

## Partie expérimentale : Imagerie

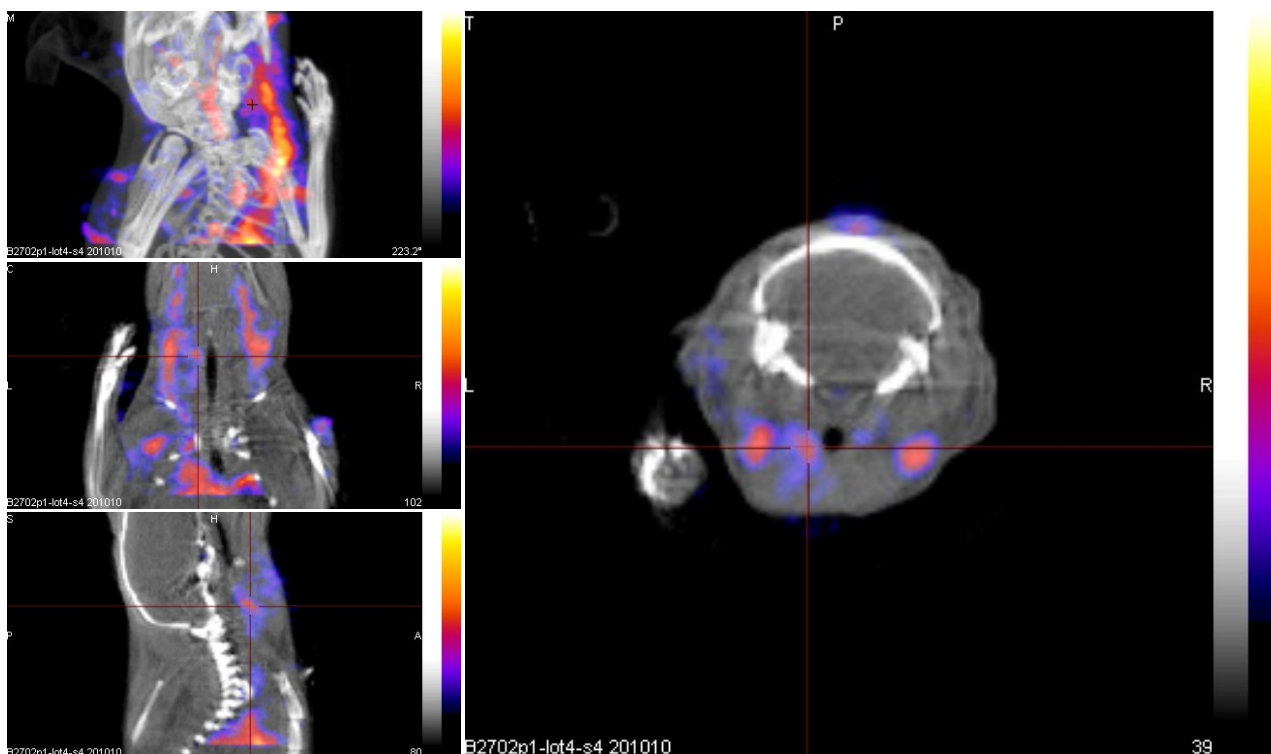


Figure 16. Image SPECT/CT représentative d'une souris apoE<sup>-/-</sup> avec ligature carotidienne acquise entre 120 et 180 min après injection de [<sup>99m</sup>Tc]-L-B2702p1 (lot #4) radiomarqué via Isolink. Les vues en projection d'intensité maximale (en haut), en coupe coronale (milieu), sagittale (bas) et transverse (droite) sont centrées sur un point chaud au niveau de la carotide gauche.

La quantification de l'activité de ce point chaud sur la zone controlatérale donne un rapport de fixation lésion-sur-contrôle (Figure 17) compris entre  $1.10 \pm 0.18$  et  $1.43 \pm 0.65$  pour les différentes séries expérimentales. Aucune variation significative entre ces différentes séries expérimentales n'a

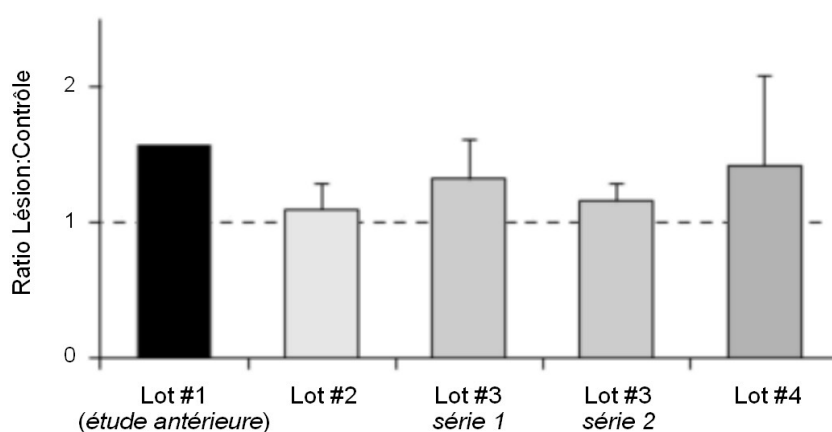


Figure 17. Rapport Lésion:Contrôle déterminé *in vivo* par quantification d'images SPECT obtenues chez la souris apoE<sup>-/-</sup> avec ligature carotidienne et injectée avec du [<sup>99m</sup>Tc]-L-B2702p1.

L'étude par imagerie après injection de cette molécule dans le modèle apoE<sup>-/-</sup> sous régime hypercholestérolémiant n'a pas permis de mettre en évidence de point chaud au niveau des lésions de la crosse aortique, localisées par un hypersignal au CT.

### 3.3.1.2 [<sup>99m</sup>Tc]-HYNIC-D-B2702p1

La distribution de [<sup>99m</sup>Tc]-HYNIC-D-B2702p1 est étudiée *in vivo* au sein du modèle de souris apoE<sup>-/-</sup> sous régime hypercholestérolémiant. Les images acquises entre 2 et 3 h p.i. présentent un hypersignal au CT au niveau du médiastin supérieur et correspondant à la crosse aortique. L'image SPECT montre un point chaud colocalisant avec l'hypersignal au CT et pouvant être interprété comme une captation focale dans la crosse aortique (Figure 18). La vue en intensité de projection

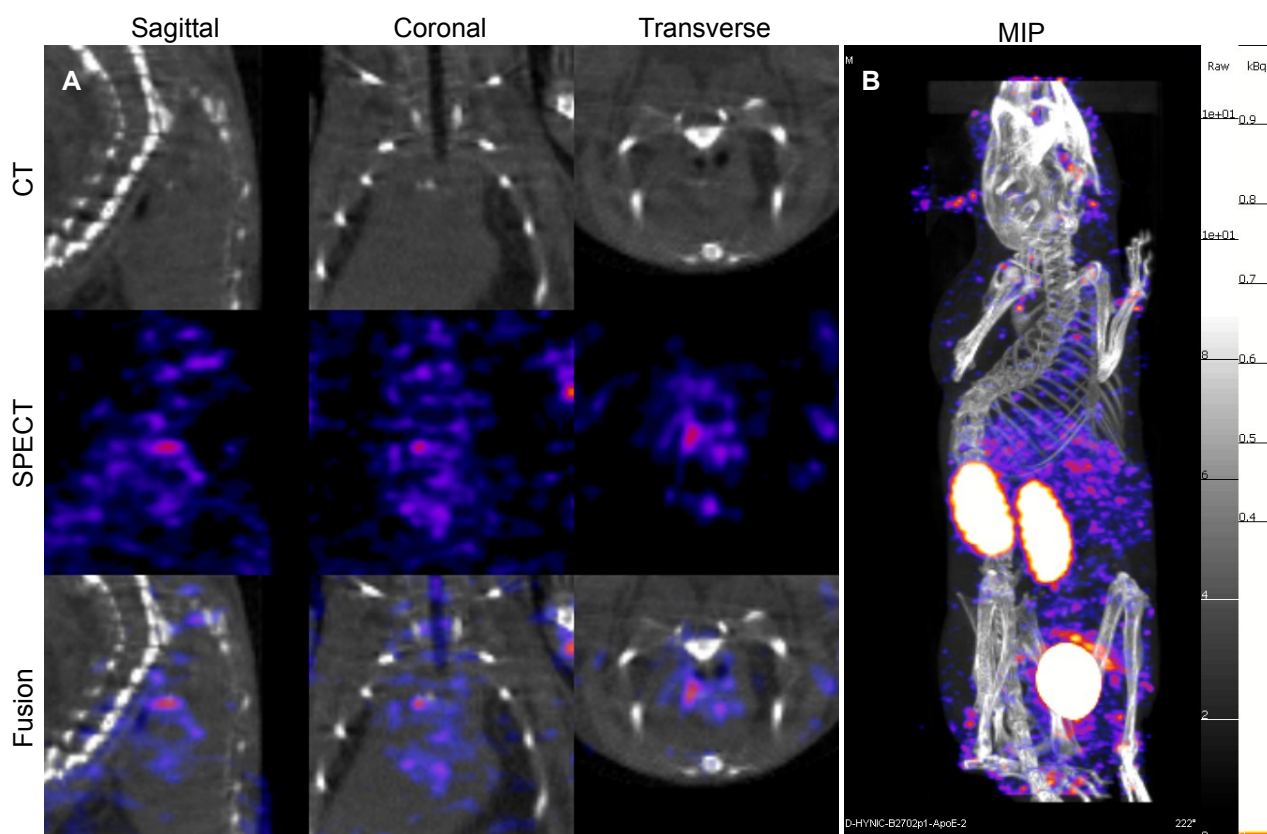


Figure 18. Image SPECT/CT représentative d'une souris apoE<sup>-/-</sup> sous régime hypercholestérolémiant acquise entre 120 et 180 min après injection de [<sup>99m</sup>Tc]-HYNIC-D-B2702p1. (A) Vues sagittales, coronales et transverses (de gauche à droite) d'acquisition CT seule, SPECT seule, ou image de fusion (de haut en bas), centrée sur la zone thoracique, présentant un hypersignal au CT. (B) Vue en projection d'intensité maximale (MIP, *maximal intensity projection*) corps entier.

maximale permet de visualiser avec l'échelle utilisée d'autres points chauds d'intensité similaire localisés au niveau du tronc, des membres et de la tête de la souris choisie comme exemple d'imagerie, non pertinents au vu de la localisation anatomique des lésions athéromateuses décrite par ailleurs. Une sous population de l'étude (n = 2/3) a été imagée en continu pendant les 3 h que durait le protocole expérimental. Grâce aux repères anatomiques fournis par le CT, une quantification de la cinétique du traceur dans les principaux organes, ainsi que dans le sang et la

## Partie expérimentale : Imagerie

région thoracique identifiée comme la crosse aortique a été effectuée sur l'acquisition SPECT (Figure 18). Une tendance à une forte diminution de l'activité sanguine passant de  $4.0 \pm 1.5$  %ID/mL à  $1.3 \pm 0.4$  %ID/mL entre les premières 15 min (0 – 15 min p.i.) et les dernières 45 min d'acquisition (135 – 180 min p.i.) a été observée. L'activité dans la région correspondant anatomiquement à la crosse aortique suit une diminution similaire ( $4.4 \pm 0.7$  %ID/g à  $1.7 \pm 0.1$ ), tandis l'activité n'évolue que peu (voire présente une tendance à l'augmentation dans le cas du rein) dans les autres organes à l'exception du cœur (Figure 19).

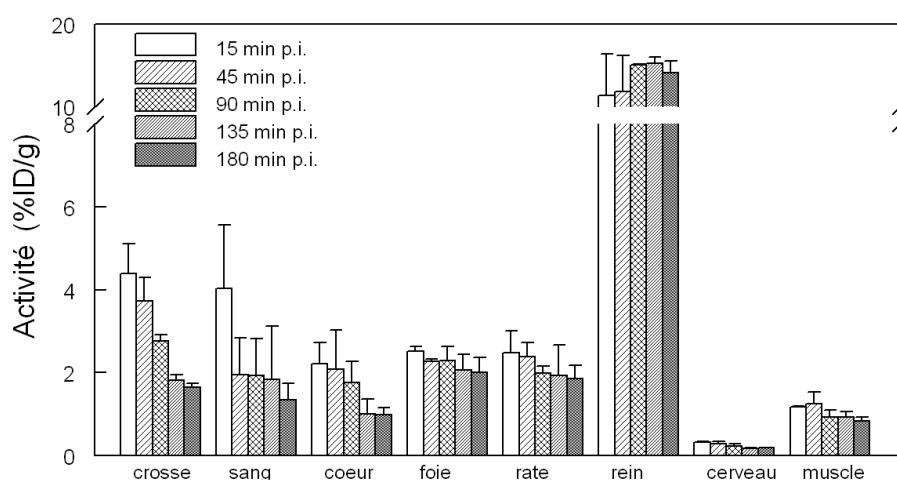


Figure 19. Quantification d'images SPECT de souris apoE<sup>-/-</sup> sous régime hypercholestérolémiant injectées avec du [<sup>99m</sup>Tc]-HYNIC-D-B2702p1.

### 3.3.2 Analyse ex vivo

#### 3.3.2.1 Expression de VCAM-1

L'expression de VCAM-1 est confirmée au sein des lésions induites par la ligature carotidienne par marquage immunohistochimique dirigé contre cette molécule d'adhésion, tandis que la carotide non ligaturée de ces mêmes souris apoE<sup>-/-</sup> de 10 semaines ne présente pas de lésions ni d'expression de VCAM-1 par l'endothélium vasculaire (Figure 20).

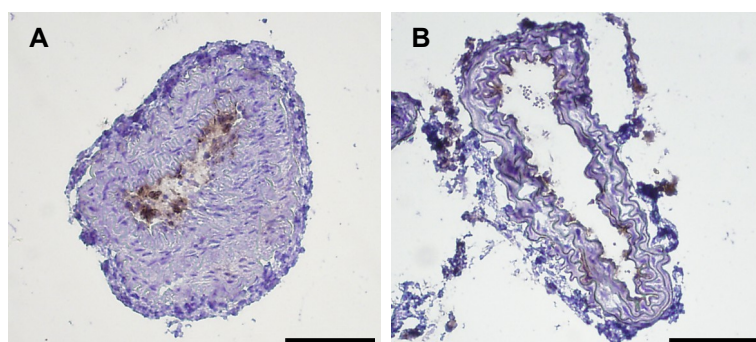


Figure 20. Expression de VCAM-1 au sein de la lésion induite par la ligature de la carotide (A) et absence d'expression dans la carotide controlatérale (B). Barre d'échelle : 100 µm.

Par ailleurs, cette même technique a permis de démontrer également l'expression de VCAM-1 dans les lésions aortiques du modèle de souris apoE<sup>-/-</sup> sous régime hypercholestérolémiant.

### 3.3.2.2 [<sup>99m</sup>Tc]-L-B2702p1 (marquage Isolink)

Les résultats de l'étude *ex vivo* réalisée chez la souris apoE<sup>-/-</sup> ligaturée 3 h après injection de [<sup>99m</sup>Tc]-L-B2702p1 (marquage Isolink) ont présenté une grande disparité entre les différentes séries expérimentales. Dans l'ensemble des séries expérimentales, la captation lésionnelle n'a jamais été significativement supérieure à la captation observée dans la carotide contrôle. Des variations importantes au niveau de la biodistribution des peptides entre les différentes séries expérimentales ont été observées dans de nombreux tissus et organes (Tableau 5). En particulier une forte variabilité de la captation carotidienne est observée ; la fixation lésionnelle varie de  $1.23 \pm 0.30$  %ID/g à  $7.02 \pm 2.67$  %ID/g (P = NS dans tous les cas par rapport à la valeur obtenue dans l'étude antérieure :  $1.28 \pm 0.96$  %ID/g) et la captation dans la carotide contrôle varie de  $1.41 \pm 0.37$  %ID/g à  $8.00 \pm 3.30$  %ID/g (P < 0.05 dans tous les cas par rapport à la valeur obtenue dans l'étude antérieure :  $0.51 \pm 0.29$  %ID/g). Le ratio lésion-sur-contrôle a été déterminé entre  $0.77 \pm 0.21$  et  $1.05 \pm 0.38$  dans les différentes séries expérimentales (P < 0.05 pour 4/5 séries et P = 0.05 pour la dernière vs. ratio de l'étude antérieure  $2.63 \pm 1.36$ ). Une forte variabilité de l'activité sanguine a également été observée, comprise entre  $1.30 \pm 0.75$  %ID/g et  $8.62 \pm 1.13$  %ID/g, valeurs supérieures à celles de l'étude antérieure :  $0.90 \pm 0.37$  %ID/g (P < 0.05 pour 4/5 séries). Le ratio lésion-sur-sang est inférieur à 1 dans 3 séries (P < 0.05 vs. étude antérieure dans 2/3 séries) et supérieur à 1 dans les 2 autres séries (P = NS vs. étude antérieure). Seules les captations hépatiques et rénales sont systématiquement supérieures à l'activité sanguine parmi les tissus prélevés (P < 0.05). Enfin, une activité biliaire importante est notée, comprise entre  $11.0 \pm 6.6$  %ID/g et  $27.1 \pm 14.3$  %ID/g dans les différentes séries expérimentales, ainsi qu'une forte activité urinaire ( $42.0 \pm 27.7$  %ID/g à  $594.4 \pm 250.1$  %ID/g).

## Partie expérimentale : Imagerie

	<b>[<sup>99m</sup>Tc]-L-B2702p1</b>					
	Lot #1 (étude antérieure)	Lot #2	Lot #3 série 1	Lot #3 série 2	Lot #3 série 3	Lot #4
Effectif (n)	5	6	6	4	7	6
DI (MBq)	35.5 ± 3.0	26.3 ± 9.5	42.8 ± 6.2 <sup>†</sup>	70.8 ± 7.1 <sup>†‡</sup>	35.6 ± 2.2 <sup>†§</sup>	151.0 ± 21.8 <sup>†‡§  </sup>
<b>Biodistribution (%ID/g)</b>						
Cœur	0.27 ± 0.12	1.76 ± 0.26 <sup>*</sup>	0.60 ± 0.33 <sup>†</sup>	1.68 ± 0.80 <sup>†‡</sup>	0.87 ± 0.13 <sup>†§</sup>	1.04 ± 0.21 <sup>†‡</sup>
Poumon	0.77 ± 0.32	5.65 ± 1.03 <sup>*</sup>	1.89 ± 1.06 <sup>†</sup>	4.02 ± 0.71 <sup>†‡</sup>	2.16 ± 0.31 <sup>†§</sup>	7.64 ± 9.92
Foie	3.06 ± 1.27	14.73 ± 2.33 <sup>*</sup>	4.87 ± 1.42 <sup>†</sup>	9.31 ± 1.72 <sup>†‡</sup>	5.31 ± 0.83 <sup>†§</sup>	7.07 ± 0.78 <sup>†‡  </sup>
Bile		11.0 ± 6.6	20.2 ± 3.1 <sup>†</sup>	19.7 ± 7.3	17.3 ± 16.1	27.1 ± 14.3 <sup>†</sup>
Rate	1.60 ± 1.57	3.00 ± 0.61	1.07 ± 0.53 <sup>†</sup>	1.65 ± 0.20 <sup>†‡</sup>	1.22 ± 0.17 <sup>†§</sup>	1.42 ± 0.30 <sup>†</sup>
Rein	4.58 ± 1.00	17.67 ± 3.20 <sup>*</sup>	6.94 ± 2.66 <sup>†</sup>	10.58 ± 2.29 <sup>†‡</sup>	16.65 ± 9.01 <sup>†‡</sup>	8.21 ± 1.53 <sup>†  </sup>
Urine	277 ± 308	154 ± 76	44.6 ± 17.6 <sup>†</sup>	42.0 ± 27.7 <sup>†</sup>	594 ± 250 <sup>†‡§</sup>	262 ± 274
Graisse	0.16 ± 0.08	1.16 ± 0.62 <sup>*</sup>	0.25 ± 0.15 <sup>†</sup>	0.40 ± 0.12 <sup>†‡</sup>	0.35 ± 0.12 <sup>†‡</sup>	0.45 ± 0.19 <sup>†‡</sup>
Thyroïde	0.65 ± 0.39	7.92 ± 3.40 <sup>*</sup>	1.22 ± 0.23 <sup>†</sup>	1.74 ± 0.91 <sup>†</sup>	1.65 ± 0.90 <sup>†‡</sup>	4.66 ± 1.22 <sup>†‡§  </sup>
Muscle	0.13 ± 0.05	1.36 ± 0.86 <sup>*</sup>	0.23 ± 0.12 <sup>†</sup>	0.51 ± 0.16 <sup>†‡</sup>	1.23 ± 1.57	0.45 ± 0.11 <sup>†‡‡</sup>
Cerveau		0.18 ± 0.03	0.08 ± 0.06 <sup>†</sup>	0.15 ± 0.02 <sup>†</sup>	0.12 ± 0.02 <sup>†</sup>	0.08 ± 0.03 <sup>†§  </sup>
Thymus		1.28 ± 0.14	0.42 ± 0.25 <sup>†</sup>	0.73 ± 0.08 <sup>†‡</sup>	0.45 ± 0.05 <sup>†§</sup>	0.44 ± 0.19 <sup>†§</sup>
Peau		1.87 ± 0.26	0.75 ± 0.33 <sup>†</sup>	1.25 ± 0.27 <sup>†‡</sup>	1.17 ± 0.33 <sup>†</sup>	1.00 ± 0.23 <sup>†</sup>
Glandes salivaires		4.39 ± 1.50	0.66 ± 0.12 <sup>†</sup>	1.87 ± 0.51 <sup>†‡</sup>	1.15 ± 0.15 <sup>†‡§</sup>	1.40 ± 0.56 <sup>†‡</sup>
Estomac		3.50 ± 1.10	0.76 ± 0.19 <sup>†</sup>	1.98 ± 0.51 <sup>†‡</sup>	1.10 ± 0.21 <sup>†‡§</sup>	1.50 ± 0.17 <sup>†‡  </sup>
Intestin		3.27 ± 1.24	0.96 ± 0.39 <sup>†</sup>	1.89 ± 0.40 <sup>†‡</sup>	3.23 ± 1.38 <sup>†</sup>	2.42 ± 1.77
Pancréas		3.08 ± 1.72	0.69 ± 0.38 <sup>†</sup>	1.50 ± 0.14 <sup>†</sup>	0.71 ± 0.09 <sup>†§</sup>	0.77 ± 0.35 <sup>†§</sup>
Sang	0.90 ± 0.37	8.62 ± 1.13 <sup>*</sup>	1.30 ± 0.75 <sup>†</sup>	5.00 ± 0.68 <sup>†‡</sup>	2.99 ± 0.28 <sup>†‡§</sup>	3.11 ± 0.69 <sup>†‡§</sup>
Lésion (carotide G)	1.28 ± 0.96	1.33 ± 0.53	2.49 ± 1.36	7.02 ± 2.67 <sup>†</sup>	1.23 ± 0.30 <sup>†§</sup>	2.19 ± 0.36 <sup>†§  </sup>
Contrôle (carotide D)	0.51 ± 0.29	1.41 ± 0.37 <sup>*</sup>	2.40 ± 0.94 <sup>†‡</sup>	8.00 ± 3.30 <sup>†‡</sup>	1.64 ± 0.36 <sup>†§</sup>	2.71 ± 0.42 <sup>†‡§  </sup>
<b>Ratios (sans unité)</b>						
Lésion :Contrôle	2.63 ± 1.36	0.95 ± 0.33 <sup>*</sup>	1.05 ± 0.38 <sup>*</sup>	0.96 ± 0.45	0.77 ± 0.21 <sup>*</sup>	0.82 ± 0.16 <sup>*</sup>
Lésion :Sang	1.41 ± 0.79	0.15 ± 0.06 <sup>*</sup>	3.06 ± 3.84	1.32 ± 0.45 <sup>†</sup>	0.41 ± 0.10 <sup>†‡§</sup>	0.73 ± 0.18 <sup>†§  </sup>

Tableau 5. Étude de [<sup>99m</sup>Tc]-L-B2702p1 radiomarqué via Isolink sur le modèle de souris apoE<sup>-/-</sup> avec ligature carotidienne. Les différentes séries expérimentales réalisées et les lots de peptide utilisés sont présentés avec les résultats *ex vivo* en comparaison avec les résultats antérieurs. P < 0.05 \* vs. Lot #1, † vs. Lot #2, ‡ vs. Lot #3 série1, § vs. Lot #3 série2, || vs. Lot #3 série3.

L'étude utilisant le modèle de souris apoE<sup>-/-</sup> sous régime hypercholestérolémiant n'a été que qualitativement comparée aux résultats issus de l'étude antérieure, puisque relevant d'un modèle biologique sensiblement différent (Tableau 6). L'activité vasculaire, aussi bien lésionnelle que contrôle, déterminée au niveau de l'aorte est plus faible que dans le modèle de ligature carotidienne (0.64 ± 0.06 %ID/g et 0.70 ± 0.12 %ID/g respectivement) ; cependant le ratio entre ces deux tissus

## Partie expérimentale : Imagerie

demeure proche et non discriminant ( $0.94 \pm 0.25$ ). L'activité sanguine est du même ordre de grandeur que dans l'autre modèle d'étude ( $2.64 \pm 0.51$  %ID/g), supérieure à l'activité du tissu vasculaire ( $P < 0.05$ ) et résultant en un ratio lésion-sur-sang défavorable à l'imagerie ( $0.25 \pm 0.04$ ). Là encore, une activité biliaire importante ( $7.1 \pm 3.7$  %ID/g) a été observée, tout comme une importante activité urinaire ( $113.5 \pm 73.9$  %ID/g).

<b>[<sup>99m</sup>Tc]-L-B2702p1</b>			
Lot #3 -- série régime			
<b>Biodistribution (%ID/g)</b>			
Cœur	$0.69 \pm 0.07$	Cerveau	$0.06 \pm 0.02$
Poumon	$1.92 \pm 0.55$	Thymus	$0.61 \pm 0.15$
Foie	$2.52 \pm 0.40$	Peau	$0.57 \pm 0.14$
Bile	$7.1 \pm 3.7$	Glandes salivaires	$0.76 \pm 0.12$
Rate	$1.04 \pm 0.23$	Estomac	$0.92 \pm 0.10$
Rein	$1.04 \pm 0.23$	Intestin	$1.76 \pm 0.99$
Urine	$114 \pm 74$	Pancréas	$0.68 \pm 0.09$
Graisse	$0.29 \pm 0.30$	Sang	$2.64 \pm 0.51$
Thyroïde	$1.10 \pm 0.54$	Lésion (aorte)	$0.64 \pm 0.06$
Muscle	$0.33 \pm 0.03$	Contrôle (aorte)	$0.70 \pm 0.12$
<b>Ratios (sans unité)</b>			
Lésion :Contrôle	$0.94 \pm 0.25$	Lésion :Sang	$0.24 \pm 0.02$

Tableau 6. Étude de [<sup>99m</sup>Tc]-L-B2702p1 radiomarqué via Isolink sur le modèle de souris apoE<sup>-/-</sup> sous régime hypercholestérolémiant.

### 3.3.2.3 [<sup>99m</sup>Tc]-HYNIC-D-B2702p1

La biodistribution de [<sup>99m</sup>Tc]-HYNIC-D-B2702p1 déterminée *ex vivo* sur le modèle de souris apoE<sup>-/-</sup> sous régime hypercholestérolémiant est présentée en Tableau 7. L'analyse par quantification d'autoradiographie de coupes d'aorte révèle une captation vasculaire importante :  $4.69 \pm 0.32$  %ID/g dans les lésions et  $3.67 \pm 0.52$  %ID/g dans le tissu vasculaire contrôle, résultant en un rapport lésion-sur-contrôle de  $1.30 \pm 0.24$ . L'activité sanguine est plus faible que l'activité vasculaire :  $1.36 \pm 0.18$  %ID/g ( $P < 0.05$ ), et donne un rapport lésion-sur-sang de  $3.50 \pm 0.60$ . Par ailleurs, l'activité biliaire est faible ( $0.56 \pm 0.12$  %ID/g), tandis que l'activité rénale et urinaire sont importantes ( $16.7 \pm 2.4$  %ID/g et  $605.2 \pm 98.0$  %ID/g, respectivement).

## Partie expérimentale : Imagerie

### [<sup>99m</sup>Tc]-HYNIC-D-B2702p1

#### Biodistribution (%ID/g)

Cœur	0.75 ± 0.12	Cerveau	0.05 ± 0.01
Poumon	2.39 ± 0.12	Thymus	0.77 ± 0.16
Foie	2.30 ± 0.65	Peau	1.84 ± 0.04
Bile	0.56 ± 0.12	Glandes salivaires	1.00 ± 0.17
Rate	1.63 ± 0.45	Estomac	1.85 ± 0.24
Rein	16.7 ± 2.4	Intestin	1.84 ± 0.18
Urine	605 ± 98	Pancréas	0.57 ± 0.01
Graisse	0.22 ± 0.00	Sang	1.36 ± 0.18
Thyroïde	1.91 ± 1.39	Lésion (aorte)	4.69 ± 0.32
Muscle	0.41 ± 0.04	Contrôle (aorte)	3.67 ± 0.52

#### Ratios (sans unité)

Lésion :Contrôle	1.30 ± 0.24	Lésion :Sang	3.50 ± 0.60
------------------	-------------	--------------	-------------

Tableau 7. Étude de [<sup>99m</sup>Tc]-HYNIC-D-B2702p1 sur modèle de souris apoE<sup>-/-</sup> sous régime hypercholestérolémiant.

### 3.4 Étude du FDG sur le modèle de souris apoE<sup>-/-</sup>

#### 3.4.1 Conditions métaboliques des animaux de l'étude FDG

La glycémie des animaux inclus dans l'étude a été mesurée avant et après la période de jeûne, juste avant l'injection de FDG. Une mesure supplémentaire a été effectuée après la période de jeûne et avant l'induction de l'anesthésie pour les animaux des groupes B et C, pour lesquelles l'injection de FDG est réalisée sur animal anesthésié (Tableau 8).

	Groupe A	Groupe B	Groupe C
Avant mise à jeun	152 ± 11	149 ± 25	153 ± 34
À jeun			
Avant anesthésie	N/A	81 ± 17 †	86 ± 6 †
À l'Injection	83 ± 17 *†	89 ± 8 *†	114 ± 14 †‡

Tableau 8. Glycémie des souris apoE<sup>-/-</sup> des groupes A, B et C exprimée en mg/dL. P < 0.05 : \* vs. groupe C; † vs. avant mise à jeun; ‡ vs. à jeun – avant anesthésie.

Les animaux inclus dans l'étude ont présenté une réduction de 44 ± 13% (P < 0.05) de la glycémie suite à la période de jeun de 14 h durant la nuit précédant l'expérimentation. La glycémie mesurée avant la mise à jeun d'une part et la glycémie à jeun d'autre part n'ont pas présenté de différence significative entre les différents groupes expérimentaux. La réduction de la glycémie est concomitante à une perte de poids de 7.4 ± 1.8 % (de 29.5 ± 3.2 g à 27.4 ± 3.2 g, P < 0.05). Les animaux du groupe B ont montré des valeurs de glycémie mesurées une heure après l'induction de l'anesthésie (soit immédiatement avant l'injection du FDG) comparables aux valeurs obtenues par la mesure précédant l'anesthésie (89 ± 8 mg/dL vs. 81 ± 17 mg/dL, P = NS) alors que les animaux du

## Partie expérimentale : Imagerie

groupe C ont présenté une glycémie à une heure d'anesthésie supérieure à la glycémie avant anesthésie ( $114 \pm 14$  mg/dL vs.  $86 \pm 6$  mg/dL,  $P < 0.01$ ).

### 3.4.2 Imagerie PET/CT

Des images PET/CT représentatives d'animaux des trois groupes expérimentaux sont présentées en Figure 21 et les résultats de la quantification d'images sont présentés dans le Tableau 9.

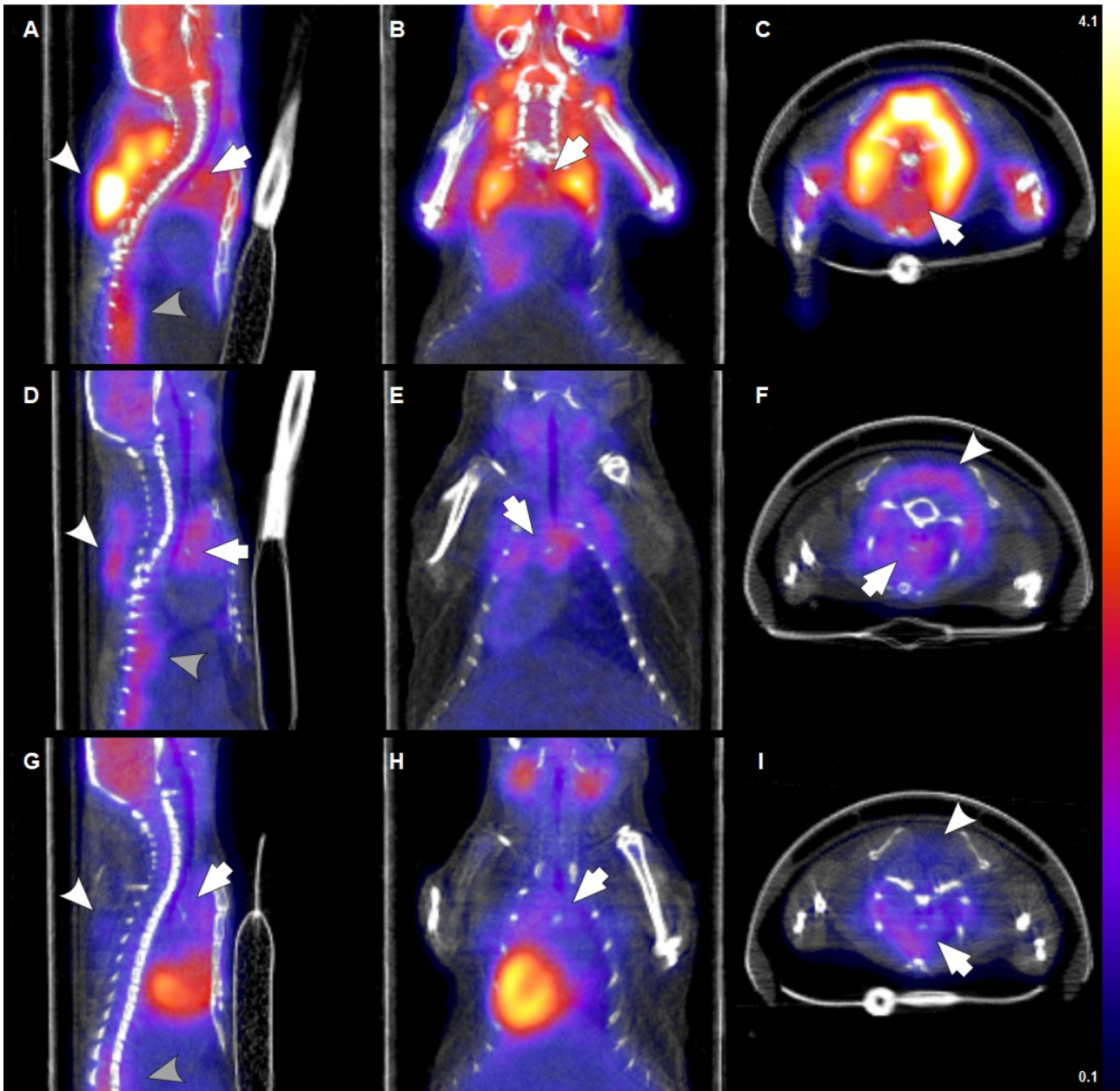


Figure 21. Images d'acquisitions PET effectuées 150 à 180 min après injection de FDG aux souris apoE<sup>-/-</sup> des groupes A (A, B, C), B (D, E, F) et C (G, H, I) fusionnées aux images CT en coupes saggitale (A, D, G), coronale (B, E, H) et transverse (C, F, I). Les coupes sont centrées sur la crosse aortique (flèche) ; le BAT scapulaire (tête de flèche blanche) et le muscle diaphragme (tête de flèche grise) sont identifiés. Les échelles des images PET sont ajustées de 0.1 à 4.1 SUV.

## Partie expérimentale : Imagerie

Pour l'ensemble des animaux inclus dans l'étude, un signal au CT d'intensité variable présent dans le médiastin supérieur au site anatomique identifié comme la crosse aortique rend compte de la présence de lésions athéromateuses. L'observation qualitative des images PET indique une activité en traceur dans la crosse aortique (Figure 21, flèche) et l'aorte thoracique descendante pour l'ensemble des groupes expérimentaux. La quantification des images PET montre que l'activité mesurée au niveau de ces structures est en moyenne significativement plus importante pour les animaux du groupe A que pour ceux du groupe B ( $P < 0.05$ ). Une forte tendance vers la significativité est constatée lorsque les animaux du groupe A sont comparés à ceux du groupe C ( $P = 0.08$  et  $P = 0.07$  pour la crosse aortique et l'aorte thoracique descendante, respectivement).

Les acquisitions PET mettent en évidence une forte captation de FDG dans le tissu adipeux brun (BAT), notamment interscapulaire (tête de flèche blanche). Cette activité est en moyenne significativement supérieure dans le groupe A par rapport aux groupes B et C ( $P < 0.05$ ). Une activité importante est observée dans la partie musculaire du diaphragme thoraco-abdominal, notamment au site de son insertion vertébrale (tête de flèche grise). Cette activité est significativement plus importante dans le groupe A que dans les groupes B et C ( $P < 0.05$ ). Le BAT interscapulaire et le muscle diaphragmatique présentent une activité supérieure à l'activité mesurée dans la crosse aortique pour le groupe A ( $P < 0.05$ ). Enfin, une activité myocardique importante est observée chez les animaux du groupe C ; cette activité est significativement supérieure à celle des animaux des deux autres groupes ( $P < 0.05$ ) et elle est également supérieure à l'activité mesurée dans la crosse aortique ( $P < 0.05$ ).

	<b>Groupe A</b>	<b>Groupe B</b>	<b>Groupe C</b>
Crosse aortique	1.4 ± 0.5	0.9 ± 0.2 *	1.0 ± 0.2
Aorte thoracique descendante	1.2 ± 0.3	0.8 ± 0.1 *	0.9 ± 0.1
Graisse brune interscapulaire	5.2 ± 2.4 †	1.1 ± 0.8 *	1.1 ± 0.4 *
Muscle diaphragme	2.7 ± 0.7 †	1.0 ± 0.3 *	0.9 ± 0.2 *
Myocarde	1.1 ± 0.5	1.0 ± 0.8	2.6 ± 1.0 *†‡

Tableau 9. Quantification des images PET acquises entre 150 et 180 min après injection de FDG aux souris apoE<sup>-/-</sup> des groupes A, B et C.  $P < 0.05$  : \* vs. groupe A, † vs. groupe B, ‡ vs. crosse aortique. Les valeurs sont exprimées en SUV.

### 3.4.3 Autoradiographie

La Figure 22 présente un exemple représentatif de coloration histologique de coupes longitudinales de crosse aortique (haut) qui ont été utilisées pour l'analyse par autoradiographie (ARG) et les images autoradiographiques correspondantes (bas).

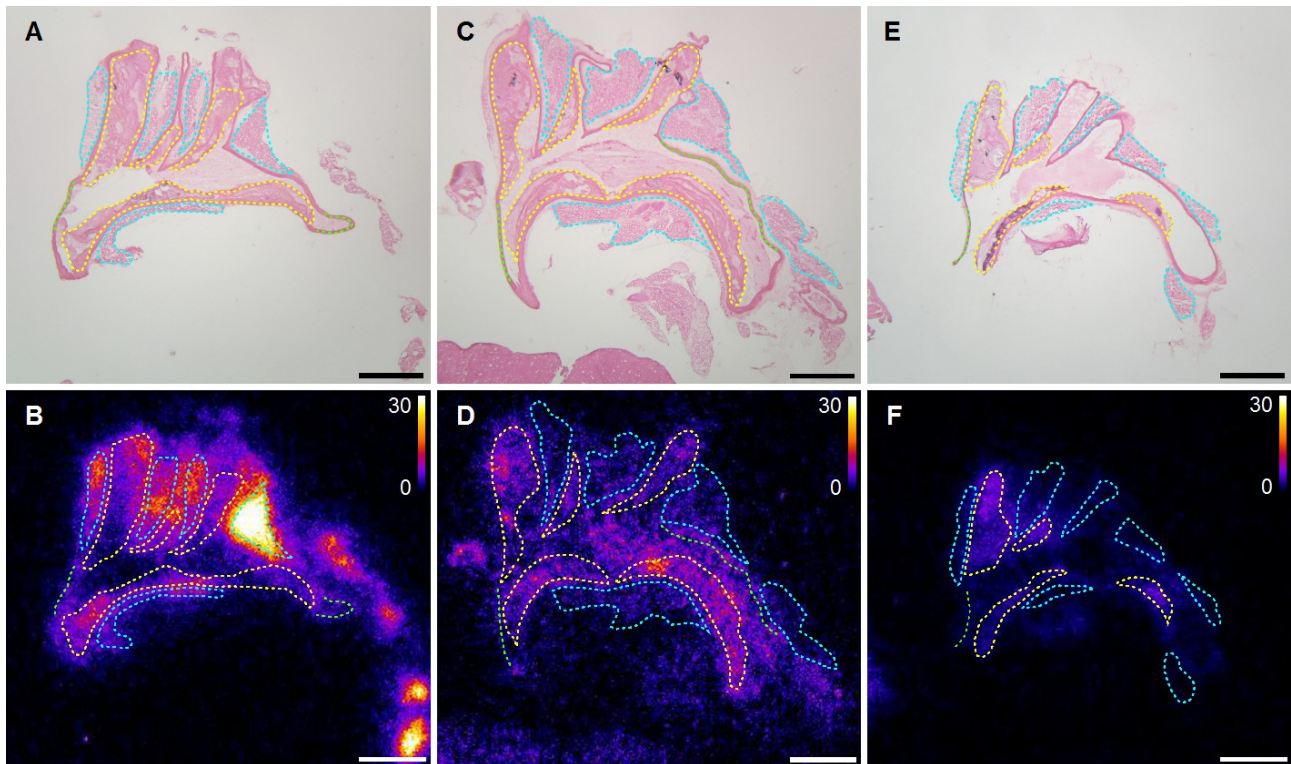


Figure 22. Analyse par autoradiographie de la captation du FDG dans la crosse aortique de souris apoE<sup>-/-</sup> des groupes A (A, B), B (C, D) et C (E, F). Coloration HES (A, C, E) et autoradiographie (B, D, F) avec les régions d'intérêt: lésions atherosclérotiques (jaune), paroi aortique dépourvue de lésions (vert) et graisse brune péri-aortique (cyan). Barre d'échelle : 1 mm. Les échelles des images autoradiographiques sont ajustées de 0 à 30 %ID/g.

La quantification de l'activité des lésions, de la paroi artérielle dépourvue de lésion, et du BAT péri-aortique est présenté en Tableau 10. La captation de FDG dans les lésions n'est pas statistiquement différente entre les différents groupes expérimentaux ( $P = NS$ ). Similairement, la captation de la paroi aortique dépourvue de lésions ne présente pas de différence entre groupes ( $P = NS$ ). La captation de FDG dans le BAT péri-aortique est similaire entre les groupes B et C ( $P = NS$ ), alors que l'accumulation à température ambiante chez les animaux non anesthésiés du groupe A se traduit par une accumulation plus importante de FDG ( $P < 0.05$ ).

Partie expérimentale : Imagerie

	Groupe A	Groupe B	Groupe C
<b>Autoradiographie (crosse aortique)</b>			
Lésion atherosclérotique	5.54 ± 2.73 ‡	5.51 ± 2.84	5.35 ± 1.13
Paroi aortique saine	1.90 ± 0.76 ††	1.89 ± 0.76 †	2.41 ± 1.25 †
Graisse brune péri-aortique	17.55 ± 10.67 †	5.69 ± 3.73 *	5.80 ± 4.37 *
<b>Prélèvement organes/tissus</b>			
Sang	0.65 ± 0.15 ††	1.29 ± 0.55 *††	0.82 ± 0.26 ††
Cœur	6.67 ± 1.72 ‡	7.52 ± 5.66	18.1 ± 12.1
Poumon	3.04 ± 0.72 ††	5.47 ± 1.51 *	4.84 ± 0.99 *
Graisse brune interscapulaire	37.6 ± 26.0 †	6.44 ± 3.41 *	6.72 ± 3.67 *
Graisse blanche abdominale	0.29 ± 0.12 ††	1.26 ± 0.66 *††	0.63 ± 0.35 *††
Peau	0.99 ± 0.48 ††	2.04 ± 1.53 ††	1.77 ± 1.30 †
Muscle quadriceps	1.56 ± 0.72 ††	1.23 ± 1.27 ††	0.65 ± 0.11 *††
Muscles paravertébraux	1.75 ± 0.92 ††	1.24 ± 1.05 ††	0.91 ± 0.24 *††
Muscle diaphragme	10.1 ± 4.8 †	3.67 ± 4.40 *	3.01 ± 1.03 *†
Glandes salivaires	5.29 ± 1.92 ‡	4.61 ± 1.69	3.40 ± 1.24 †
Bile	1.65 ± 1.39 ††	1.79 ± 1.32 †	1.26 ± 1.35 †
Intestin	2.24 ± 0.45 ††	4.46 ± 0.56 *	4.68 ± 1.38 *
Pancréas	1.99 ± 0.47 ††	2.75 ± 0.68 *	2.17 ± 0.18 †
Foie	1.03 ± 0.23 ††	2.20 ± 0.62 *†	1.94 ± 0.25 *†
Rein	1.25 ± 0.23 ††	2.18 ± 1.26 †	1.77 ± 0.40 *†
Glandes surrénales	3.83 ± 0.91 ‡	2.86 ± 1.08	2.61 ± 0.85 *†
Thyroïde	3.39 ± 1.20 ‡	5.43 ± 5.29	2.83 ± 0.99 †
Thymus	3.87 ± 1.02 ‡	4.86 ± 2.31	7.18 ± 4.54
Rate	3.24 ± 0.83 ‡	5.91 ± 1.53 *	4.39 ± 0.89 *
Ganglions lymphatiques	2.96 ± 1.17 ††	6.66 ± 3.89 *	5.19 ± 0.96 *
Moelle osseuse	3.06 ± 0.57 ‡	8.00 ± 1.91 *	5.28 ± 0.46 *
Tissu osseux	2.01 ± 0.39 ††	4.17 ± 1.82 *	3.65 ± 2.42
Cerveau	5.48 ± 2.05 ‡	4.58 ± 1.02	3.79 ± 0.92
Moelle épinière	3.00 ± 1.12 ††	2.87 ± 0.71 ‡	2.62 ± 1.94 †
Nerfs périphériques	1.19 ± 0.47 ††	1.31 ± 1.04 ††	1.12 ± 0.35 *††
Urine	38.0 ± 18.5 ††	280 ± 216 *††	153 ± 27 *††

Tableau 10. Biodistribution du FDG évaluée *ex vivo* par autoradiographie au niveau de la crosse aortique et par prélèvement d'organes ou tissus de souris apoE<sup>-/-</sup> des groupes A, B et C. P < 0.05 \* vs. groupe A, et au sein des groupes : † vs. Lésion athérosclérotique, ‡ vs. Graisse brune péri-aortique. Les valeurs sont exprimées en %ID/g.

### 3.4.4 Présence de tissu adipeux brun autour de la crosse aortique

Les principales artères présentes dans le médiastin supérieur et postérieur de souris apoE<sup>-/-</sup> apparaissent entourées d'un tissu adipeux d'aspect brun. Le marquage immunohistochimique anti-UCP-1 de coupe de crosse aortique confirme l'identité du tissu directement en continuité avec l'adventice de l'aorte comme étant du tissu adipeux brun (BAT) (Figure 23).

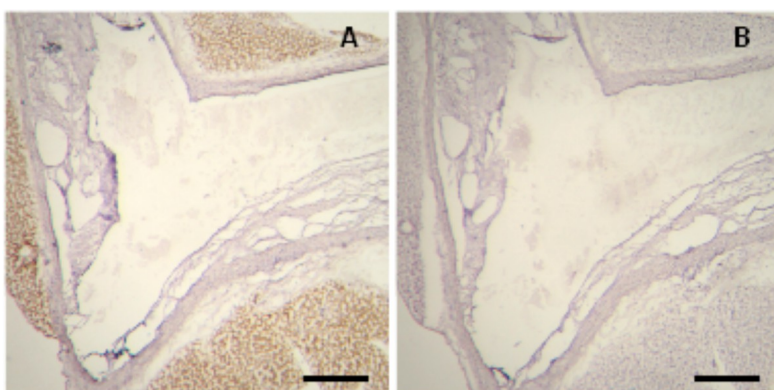


Figure 22. Présence de tissu adipeux brun péri-aortique à proximité de la crosse aortique de souris apoE<sup>-/-</sup> montrée par marquage anti-UCP-1 (A) et son contrôle de spécificité (B). Barre d'échelle : 200 µm.

### 3.4.5 Influence de l'infiltration de macrophages au sein des lésions

L'infiltration des macrophages dans les lésions athéromateuses a pu être mise en évidence par le marquage immunohistochimique anti-F4/80 réalisé sur des coupes de crosse aortique adjacentes à celles exposées en autoradiographie (Figure 24A & B). Cette infiltration a été quantifiée à  $29 \pm 15$  % de l'aire des lésions pour l'ensemble des animaux de l'étude (Figure 24C). L'infiltration des macrophages étant déterminée de manière individuelle par lésion et la quantification des plaques étant également réalisée individuellement (Figure 24A & D), une analyse de corrélation à l'échelle des lésions individuelles a pu être réalisée (Figure 24E). Cette analyse montre une corrélation positive entre l'infiltration des macrophages et l'activité lésionnelle en FDG ( $R = 0.47$ ,  $P < 0.001$ ). Cette corrélation, ou une tendance vers cette corrélation a été observée dans l'ensemble des groupes expérimentaux ( $R = 0.34$ ,  $R = 0.62$  et  $R = 0.60$  pour les groupes A, B et C, respectivement,  $P = 0.09$  pour le groupe A et  $P < 0.05$  pour les groupes B et C).

## Partie expérimentale : Imagerie

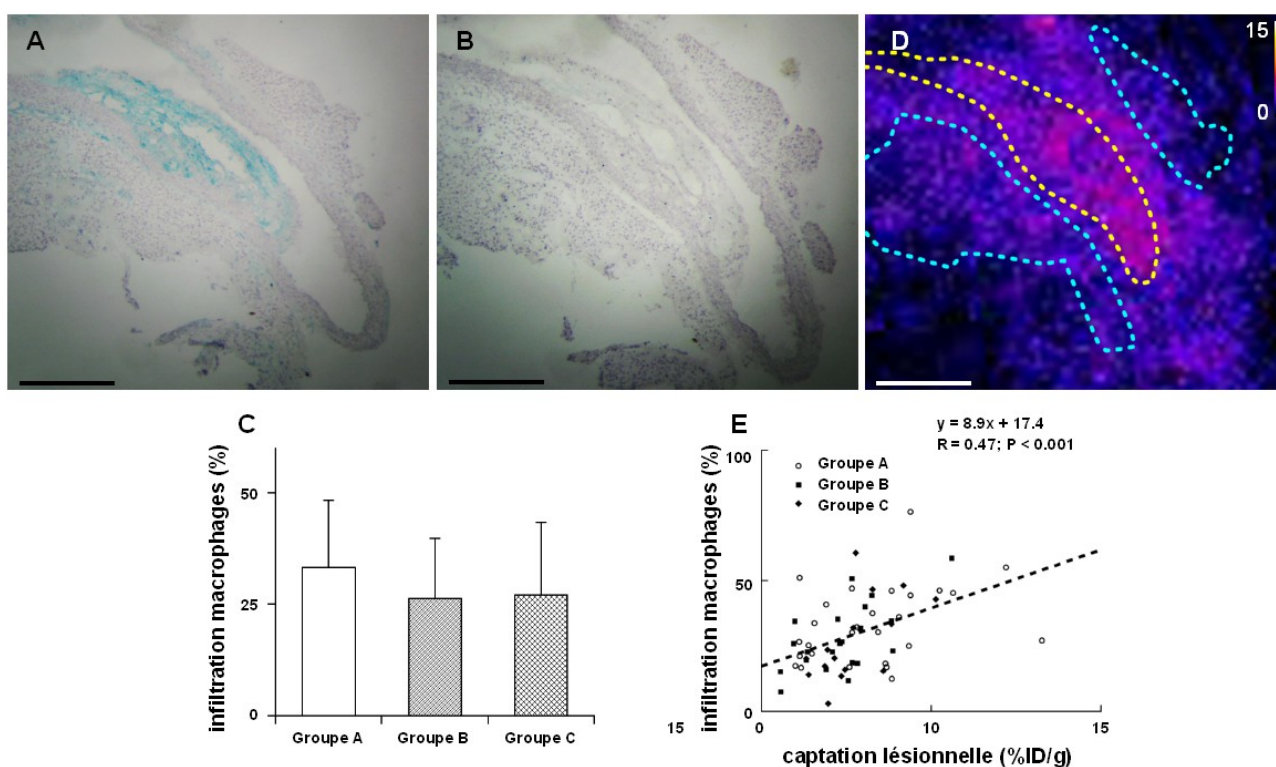


Figure 24. Présence de macrophages dans les lésions athéromateuses de la crosse aortique de souris apoE<sup>-/-</sup> montrée par marquage immunohistochimique de F4/80 (A) et son contrôle de spécificité (B). Quantification de l'infiltration de macrophages au sein des lésions dans les différents groupes expérimentaux (C). La quantification de la captation du FDG dans les lésions par autoradiographie (D) a été corrélée à l'infiltration des macrophages (E). Barre d'échelle : 200  $\mu$ m. L'échelle de l'image autoradiographique a été ajustée de 0 à 15 %ID/g.

### 3.4.6 Biodistribution ex vivo de FDG

En plus de l'analyse par autoradiographie réalisée dans la crosse aortique, une analyse par comptage gamma d'échantillons tissulaires a également été réalisée. Les résultats quantifiés de l'ensemble de l'analyse de captation de FDG ex vivo sont présentés dans le Tableau 10.

Les animaux du groupe A ont présenté une activité sanguine significativement plus faible que les animaux du groupe B ( $P < 0.05$ ), mais non significativement inférieure à ceux du groupe C ( $P = 0.08$ ). En considérant les données de l'analyse autoradiographique, on peut déterminer les rapports de fixation de FDG entre les lésions athéromateuses et les tissus directement adjacents (Figure 25). Des rapports lésions-sur-sang similaires entre les groupes expérimentaux ont été constatés ( $9.1 \pm 5.3$ ,  $6.0 \pm 4.4$  et  $7.0 \pm 2.6$  pour les groupes A, B et C, respectivement,  $P = \text{NS}$ ), tout comme pour les rapports lésion-sur-paroi saine ( $2.9 \pm 1.1$ ,  $3.5 \pm 2.9$ ,  $2.5 \pm 0.9$  pour les groupes A, B et C, respectivement,  $P = \text{NS}$ ). La forte captation dans le BAT péri-aortique mesurée chez les animaux du groupe A donne un rapport lésion-sur-BAT péri-aortique de  $0.3 \pm 0.1$ , significativement

## Partie expérimentale : Imagerie

inférieur à celui des deux autres groupes ( $1.1 \pm 0.4$  et  $1.5 \pm 1.0$  pour les groupes B et C, respectivement,  $P = \text{NS}$  pour C vs. B,  $P < 0.05$  pour C vs. A et  $P < 0.01$  pour B vs. A).

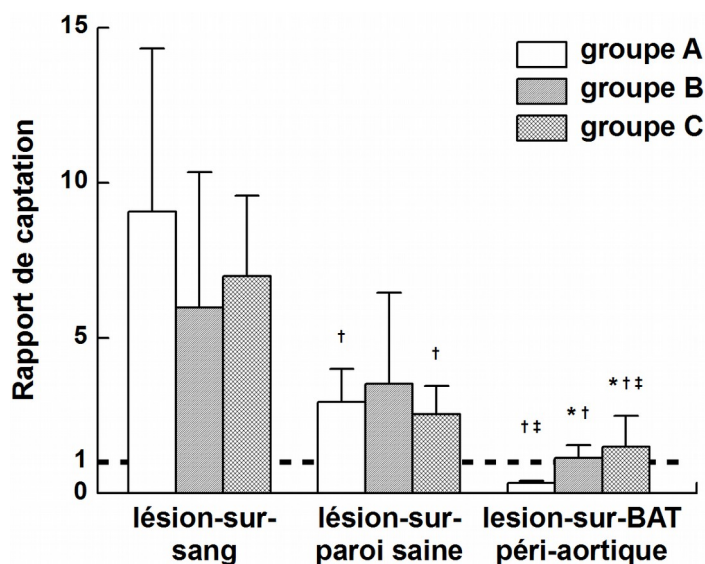


Figure 25. Rapports entre la captation du FDG dans les lésions et les tissus directement environnants (sang, paroi saine et graisse brune péri-aortique) au niveau de la crosse aortique de souris apoE<sup>-/-</sup>.  $P < 0.05$  : \* vs. groupe A ; † vs. lésion-sur-sang ; ‡ vs. lésion-sur-paroi saine.

La captation de FDG dans d'autres tissus a également été étudiée. Dans l'ensemble des groupes, les organes thoraciques prélevés (cœur, poumons et thymus) présentent une activité proche de celle observée dans les lésions ( $P = \text{NS}$  vs. lésions) à l'exception du poumon dans le groupe A. La captation dans le cœur est importante pour les animaux du groupe C et tend à être supérieure par rapport aux deux autres groupes ( $P = 0.07$  vs. groupe A et groupe B). Le muscle diaphragme à proximité de l'aorte thoracique présente une captation similaire à la captation lésionnelle dans les groupes B et C ( $P = \text{NS}$  vs lésions) et supérieure dans le groupe A ( $P < 0.05$  vs. lésions) ; cette captation est plus importante en moyenne pour les animaux du groupe A ( $P < 0.05$  vs. groupes B et C).

Le captation du FDG dans le BAT est importante dans le groupe A ( $P < 0.05$  vs. groupes B et C pour le BAT interscapulaire et péri-aortique). Dans ce groupe, la captation dans le BAT dépasse la captation lésionnelle ( $P < 0.05$  vs. lésions pour les deux BAT) alors que dans les groupes B et C ces tissus présentent une captation similaire ( $P = \text{NS}$  vs. lésions pour les deux BAT). Une corrélation entre la captation de FDG dans le BAT interscapulaire et péri-aortique est observée ( $R = 0.90$ ,  $P < 0.001$ ).

### 3.4.7 Corrélation entre données PET et données *ex vivo*

L'activité mesurée dans le VOI centré sur la crosse aortique lors de l'acquisition PET/CT a été

## Partie expérimentale : Imagerie

analysée au regard des activités mesurées *ex vivo* dans l'ensemble des tissus supposés entrer dans la composition du VOI (Figure 26). L'activité mesurée dans le BAT péri-aortique est positivement corrélée avec l'activité mesurée dans le VOI ( $R = 0.84$ ,  $P < 0.001$ ). Cette corrélation n'a pas été observée avec l'activité lésionnelle, l'activité de la paroi aortique saine, ni avec l'activité sanguine ( $R = 0.46$ ,  $R = 0.43$  et  $R = -0.42$  respectivement,  $P = \text{NS}$ ).

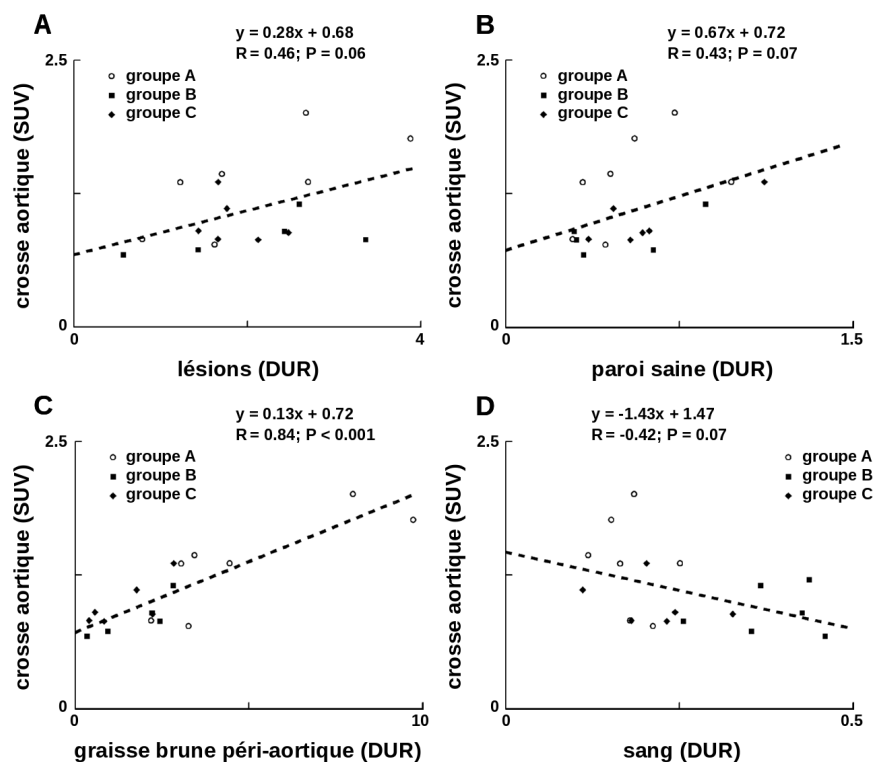


Figure 26. Étude de corrélation entre la captation de FDG quantifiée par imagerie PET d'un VOI situé dans la crosse aortique de souris apoE<sup>-/-</sup> (ordonnées A, B, C, B) et évaluée *ex vivo* au niveau des lésions (A), dans la paroi aortique dépourvue de lésions (B), la graisse brune péri-aortique (C) et l'activité sanguine (D).

## 4 Discussion

### 4.1 Peptides

#### 4.1.1 Principaux résultats de l'étude des peptides

Les différentes approches utilisées pour mesurer l'affinité entre le peptide B2702p, B2702p1 ou le tétrapeptide B2702p1 d'une part et VCAM-1 d'autre part n'ont pas permis de mettre en évidence de liaison spécifique entre les peptides et la molécule d'adhésion. Par ailleurs, l'étude des peptides après radiomarquage démontre un problème majeur de stabilité dans le sang pour les peptides synthétisés à partir d'acides aminés de la série L, tandis que ceux synthétisés à partir d'acides aminés de la série D montre une bonne stabilité après radiomarquage au technétium-99m (avec les deux méthodes de radiomarquages étudiées) mais pas après radiomarquage au fluor-18. L'étude dans le modèle de souris apoE<sup>-/-</sup> avec le peptide L-B2702p1 radiomarqué au technétium-99m *via* la méthode Isolink – qui correspond aux résultats antérieurs obtenus au sein du laboratoire – menée avant la mise en évidence du problème majeur de stabilité, n'a pas permis de visualiser les lésions athéromateuses exprimant VCAM-1. L'étude menée avec le peptide [<sup>99m</sup>Tc]-HYNIC-D-B2702p1 n'a pas non plus permis de visualiser les plaques d'athérome.

#### 4.1.2 Liaison à VCAM-1

##### 4.1.2.1 Principe des études d'interaction

**Principes de base des études de liaison.** L'ensemble des approches utilisées pour mesurer l'affinité repose sur l'hypothèse de l'existence d'une liaison entre les partenaires étudiés ; dans le cas le plus simple, cette liaison correspond au modèle d'interaction simple ligand-récepteur répondant à la loi d'action de masse (Limbird 2004). Un raffinement du modèle peut être envisagé lorsque les données expérimentales ne sont pas correctement ajustées au modèle présumé pour rendre compte du phénomène observé (liaison sur plusieurs sites, coopération, etc...) ; cela ne s'est pas révélé nécessaire dans le cadre de ces travaux expérimentaux. Dans ce modèle, la loi d'action de masse implique que les partenaires soient également accessibles, qu'il n'existe pas d'interaction partielle, que les partenaires ne soient pas altérés par la liaison et que cette liaison soit totalement réversible. Le modèle d'interaction simple ligand-récepteur répond à l'équation 8 (Eq. 8).



Dans cette équation [R] et [L] représentent la concentration en partenaires libres, [RL] la

## Partie expérimentale : Imagerie

concentration en partenaires liés (également appelée  $B$  pour *binding*),  $k_{on}$  et  $k_{off}$  les constantes cinétiques d'association et de dissociation, respectivement. Lorsque le système se trouve à l'équilibre, l'affinité entre les deux partenaires est décrite par la constante de dissociation à l'équilibre  $K_D$  (Eq. 9).

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{[R][L]}{[RL]} \quad (9)$$

Pour une concentration en  $B$  fixe, on définit également  $B_{max}$  (*maximum binding*) comme la concentration totale en  $(R)$  ( $B_{max} = [R]_{total}$ ). Dans ce cadre,  $K_D$  est définie comme la concentration en  $(L)$  pour laquelle  $B$  (i.e.  $[RL]$ ) correspond à la moitié de  $B_{max}$ . Par développement, on aboutit à une équation à 4 paramètres (Eq. 10)

$$B = \frac{[L] B_{max}}{K_D + [L]} \quad (10)$$

dont la représentation graphique donne la courbe de saturation (*saturation binding curve*, aussi appelée isotherme de saturation, *saturation isotherm*) (Figure 27).

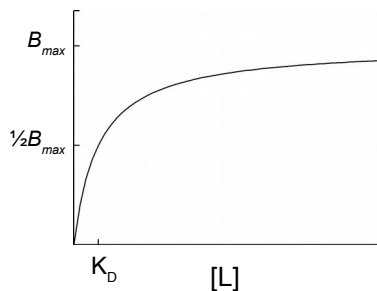


Figure 27. Courbe de saturation théorique dans un modèle d'interaction simple ligand-récepteur présentant la liaison,  $B$ , en fonction de la concentration en  $(L)$ ,  $[L]$ .  $B_{max}$  : liaison maximale ;  $K_D$  : constante de dissociation à l'équilibre.

Dans l'ensemble des approches, l'évaluation de l'affinité se base sur cette formule adaptée lorsque nécessaire. Une interprétation valide de ces données de liaison à saturation n'est obtenue que lorsque les présupposés suivants sont respectés : 1) la liaison est saturable (ce qui est le cas de toute liaison spécifique), 2) la liaison est à l'équilibre, répondant à la loi d'action de masse (par extension, cela signifie qu'il n'y a pas de phénomène de coopération), 3) la fraction de partenaire titré  $A$  libre reste toujours largement supérieure à celle liée à son partenaire (i.e.  $[L] \gg [RL]$ ) et de ce fait la concentration en  $(L)$  libre peut-être considérée comme inchangée par la liaison (Hulme et Trevethick 2010). Lorsque ce point n'est pas respecté, on observe un phénomène de déplétion en ligand. Ce point n'est pas en contradiction avec le principe de saturation : la concentration en partenaires liés ( $[RL]$  ou  $B$ ) s'élève à une proportion non nulle de  $[R]$ , en passant par  $\frac{1}{2} B_{max}$  (alors  $[L] = K_D$ ) pour tendre vers  $B_{max}$  (plateau). L'évaluation du  $K_D$  dans le cadre de ces expériences de

saturation nécessite de mesurer la liaison  $B$ , de déterminer le  $B_{max}$ , et de connaître  $[L]$  pour l'ensemble des points expérimentaux.

**Application aux études de liaison réalisées.** Dans le cas de l'analyse SPR, les résultats au plateau sont directement obtenus en soustrayant la réponse dans la piste présentant la molécule ICAM-1 immobilisée à celle présentant VCAM-1 immobilisée. Sur ces données de fixation spécifique, l'équation de liaison à saturation peut être directement appliquée (Eq. 10 ou Eq. 1). C'est également le cas dans les expériences de saturation en plaque, où les valeurs sont obtenues dans des puits avec VCAM-1 adsorbé mais aussi sur des puits contrôles, donnant par soustraction une valeur de fixation spécifique. Concernant l'analyse en polarisation de fluorescence, l'équation 10 a été adaptée pour rendre compte d'une réponse minimale du système en l'absence de liaison (polarisation liée à la molécule seul en solution) ; ceci se traduit par l'ajout d'un terme rendant compte de cette réponse minimale et l'adaptation du terme de réponse maximale, dont l'amplitude est diminuée de cette même réponse minimale (Eq. 3). De par sa nature, cette technique présente l'avantage de ne générer aucun signal lié à la fixation non spécifique (Lakowicz 2006).

### 4.1.2.2 Résultats obtenus

**Étude en SPR.** L'étude en SPR avec VCAM-1 pour ligand et le peptide L-B2702p pour analyte n'a pas permis de mettre en évidence de liaison entre ces deux molécules. Une réponse du système a été observée lors du passage des solutions contenant le peptide. Cette réponse rapide et d'amplitude directement proportionnelle à la concentration en peptide peut être considérée comme analogue à un changement de solution (le tampon utilisé était identique mais il contenait du peptide dilué en concentration croissante). Du fait de la rapidité de la réponse, le signal obtenu n'a pas pu être ajusté au modèle de fixation cinétique permettant de déterminer les constantes cinétiques d'association et de dissociation ( $k_{on}$  &  $k_{off}$ ) et d'en déduire l'affinité. La linéarité de la réponse (considérée à l'équilibre) avec la concentration en peptide n'a pas permis l'ajustement au modèle d'interaction témoignant ainsi de l'absence de liaison.

L'utilisation d'un fragment d'anticorps ciblant VCAM-1 a permis de valider la méthode ; elle a mis en évidence une affinité nanomolaire de cette molécule pour sa cible par étude de la réponse à l'équilibre ainsi que par étude cinétique (résultats non présentés pour ce dernier cas).

**Polarisation de fluorescence.** La polarisation de fluorescence a été utilisée pour tenter de mettre en évidence la liaison entre VCAM-1 et les peptides (ou le tétra-peptide) conjugués à la fluorescéine ; cette approche a également échoué.

## Partie expérimentale : Imagerie

Dans le cadre de ces expérimentations, les solutions de peptides fluorescents sont titrées par ajout de faibles volumes de solution concentrée de VCAM-1. En effet, afin d'observer la polarisation d'un complexe correspondant à la liaison de deux partenaires, il est préférable que la molécule porteuse du fluorophore présente un poids moléculaire inférieur à son partenaire afin que la liaison affecte de façon importante son mouvement en solution et ainsi diminue de façon importante la dépolarisation que celui-ci entraîne (i.e. polarise la lumière émise). L'utilisation d'une technique de saturation pour déterminer une affinité de liaison suppose que la concentration en produit à titrer soit largement inférieure au  $K_D$  afin de ne pas être confronté à une situation de déplétion en ligand. Dans le cadre spécifique de la polarisation de fluorescence, il est nécessaire que le ratio entre molécule fluorescente liée et libre soit important pour permettre la détection de la polarisation. Ces deux prérequis vont dans un même sens : ils posent cependant le problème de la sensibilité de détection du système lors de la diminution de concentration de la molécule fluorescente. La nécessité d'augmenter le gain électronique dans ces conditions conduit à l'acquisition de données bruitées et sensibles aux artefacts. Dans l'ensemble des expérimentations, la concentration en peptide ou térapeptide fluorescent variait entre 32 nM et 350 nM.

La méthode expérimentale a été validée en titrant la molécule Hsp70 – autre protéine décrite pour lier le peptide B2702p (Nossner *et al.* 1996; Woo *et al.* 1997; N. Maeda *et al.* 2007) – en se plaçant à la condition limite supérieure (350 nM de peptide fluorescéine-L-B2702p). Dans cette condition, l'affinité pour Hsp70 a été mesurée à 0.5  $\mu\text{M}$  ; deux autres expériences de polarisation de fluorescence rendaient compte de cette liaison, mais une seule autre a été retenue, l'ajustement de la courbe expérimentale au modèle n'étant pas considéré comme correct pour la seconde. Sur les deux expériences retenues, l'affinité de B2702p1 pour Hsp70 a été estimée à  $0.7 \pm 0.2 \mu\text{M}$ . Une étude de Maeda *et al.* (N. Maeda *et al.* 2007) a évalué cette affinité en spectroscopie SPR (suivant une approche de saturation) à 1.8  $\mu\text{M}$ . Cette affinité a aussi été évaluée par saturation de liaison en puits par Woo *et al.* (Woo *et al.* 1997), mais la valeur exacte n'a pas été publiée dans l'article, qui cite cependant une valeur micromolaire. Il se pourrait que la constante de dissociation mesurée en polarisation de fluorescence soit sous-estimée à cause d'un phénomène de déplétion en ligand (Hulme et Trevethick 2010) lié au problème de sensibilité. Cependant, ce phénomène ne peut à lui seul expliquer l'absence de réponse observée lors de la titration des molécules d'intérêt par la molécule VCAM-1.

**Tests de saturation en puits.** Cette méthodologie nécessite le radiomarquage des molécules étudiées. Un préalable aux tests de saturation en puits de molécules radioactives est donc la stabilité

## Partie expérimentale : Imagerie

radiochimique des peptides étudiés. L'ensemble des peptides de séquence B2702p & B2702p1 présente une bonne stabilité radiochimique dans leur milieu de marquage (cf. 3.2). C'est aussi le cas du peptide L-B2702p radiomarqué *via* Isolink (résultats non présentés). L'expérimentation de liaison à saturation de produit radiomarqué sur une surface adsorbée de molécules cibles (par l'utilisation d'une solution de VCAM-1 10 nM, excluant tout risque d'artefact liée à la déplétion en ligand) n'a pas permis de mettre en évidence de liaison entre les différents peptides testés et VCAM-1. En effet, en tout point, une activité similaire a été observée dans les puits contenant la protéine d'intérêt et dans les puits contrôles (soit adsorbés avec une protéine contrôle ou sans protéine contrôle). Hormis dans le cas de [<sup>99m</sup>Tc]-HYNIC-L-B2702p1, l'activité mesurée était proportionnelle à la concentration en peptide radioactif incubé. Dans le cas de [<sup>99m</sup>Tc]-HYNIC-L-B2702p1 on observe un infléchissement des courbes obtenues par comptage de l'activité dans les puits contenant VCAM-1 et les puits contrôles (Figure 8C). Ce phénomène relève probablement d'une erreur dans la concentration en peptide réellement présente dans les puits par rapport à la concentration calculée. Dans tous les cas, les données de fixation spécifique n'ont pas pu être ajustées au modèle rendant compte d'une liaison. De même (hormis pour [<sup>99m</sup>Tc]-HYNIC-L-B2702p1), l'utilisation de données de liaison totale, telle que décrit par Swillens (Swillens 1995), n'a pas permis de mettre en évidence de liaison.

Cette technique a été validée par l'utilisation d'un fragment d'anticorps ciblant VCAM-1 radiomarqué au technétium-99m qui a montré une affinité nanomolaire pour sa cible, en prenant en compte les données de fixation spécifique ou totale.

**Autres approches.** Une approche d'évaluation de la liaison entre le peptide et VCAM-1 par saturation a également été entreprise, reposant cette fois sur la titration calorimétrique isotherme (ITC, *isothermal titration calorimetry*). Celle-ci a également échoué. Les valeurs issues de l'intégration des pics de dégagement de chaleur mesurées lors de la mise en contact du peptide et de son partenaire protéique n'ont pas pu être ajustées à un modèle rendant compte de l'interaction entre les partenaires. Toutefois, un phénomène de dégagement de chaleur continu et à croissance exponentielle a été observé après ajout des deux partenaires. Ce phénomène, d'abord interprété comme une contamination bactérienne avant que cette hypothèse ne soit rejetée suite à l'observation de ce même phénomène avec l'utilisation de solutions filtrées, n'a pas pu être expliqué. La dérive de la courbe de base parasitant l'acquisition de données exactes, les résultats partiels négatifs, non entièrement interprétables, n'ont pas été inclus dans cette thèse.

Une dernière approche a été testée, reposant sur la compétition de liaison à saturation, suivant une

approche similaire à celle décrite par Nahrendorf *et al.* (Nahrendorf *et al.* 2009). Dans le cadre de cette approche, la molécule recombinante murine VCAM-1 a été immobilisée sur des colonnes contenant des billes d'agarose par un couplage amine alors qu'une seconde colonne non traitée a été utilisée comme contrôle. L'utilisation du fragment d'anticorps radiomarqué au technétium-99m a permis de valider la technique, démontrant une fixation 33 fois supérieure dans la colonne présentant VCAM-1 que dans la colonne contrôle, fixation qui a pu être réduite à 2 fois celle de la condition contrôle par ajout d'un excès de 273 fois de ce même fragment d'anticorps froid. Cependant, ni la molécule [<sup>99m</sup>Tc]-HYNIC-tetra-L-B2702p1, ni la molécule [<sup>99m</sup>Tc]-MLP ou [<sup>111</sup>In]-MLP, telles que présentées dans l'étude par Nahrendorf *et al.* (Nahrendorf *et al.* 2009) n'ont démontré de comportement similaire. La compétition de la fixation du fragment d'anticorps à VCAM-1 (dont l'affinité a été mesurée par test de saturation en puits à  $11.3 \pm 7.5$  nM) par les peptides n'a pas été envisagée au vu de leur affinité attendue.

**Mise en perspective des résultats obtenus.** Les approches basées sur la saturation de sites de liaison destinées à mesurer l'affinité des peptides (ou tétra-peptides) à VCAM-1 ont été validées soit par l'utilisation d'un fragment d'anticorps ciblant VCAM-1 (spectroscopie SPR, saturation en puits), soit par l'utilisation du peptide L-B2702p et de la molécule Hsp70 (polarisation de fluorescence) qui ont été décrits comme partenaires de liaison (Nossner *et al.* 1996; Woo *et al.* 1997; H. Maeda *et al.* 2007). Cependant, aucune de ces approche n'a permis de mettre en évidence de liaison entre les peptides (ou le tétra-peptide) et VCAM-1, contrairement à ce qui a été décrit dans la littérature (Ling *et al.* 2000; Broisat *et al.* 2007; Dimastromatteo 2010). En effet l'étude de Ling *et al.* (Ling *et al.* 2000) présente pour la première fois VCAM-1 comme partenaire de liaison du peptide L-B2702p, identifié par technique de double hybride et confirmé par analyse de liaison sur membrane. L'affinité de cette liaison a été évaluée à 0.3  $\mu$ M par polarisation de fluorescence (Broisat *et al.* 2007) ; cette même technique a permis d'évaluer l'affinité de L-B2702p1 pour VCAM-1 à 15  $\mu$ M (Dimastromatteo 2010).

**Les énantiomères.** Il a été montré que certains peptides présentent une affinité augmentée pour leur cible lorsque synthétisés à partir d'acides aminés de série D plutôt que L (Kokkoni *et al.* 2006). D-B2702p ne présente pas de liaison aux protéines de la famille de Hsp70 contrairement à L-B2702p (Nossner *et al.* 1996; Woo *et al.* 1997). Aucune donnée antérieure sur la liaison entre VCAM-1 et le peptide B2702p de la série D (D-B2702p) n'a été rapportée, néanmoins, des effets immunomodulateurs semblables ont été observés avec l'utilisation de ce peptide constitué d'acides aminés de la série L ou D (L. Gao, Woo, et Buelow 1996). Les peptides de la série L & D présentent

tous deux des propriétés d'inhibition de l'hème oxydase-1 (Iyer *et al.* 1998). Ling *et al.* (Ling *et al.* 2000) ont postulé qu'une partie des effets immunomodulateurs des peptides B2702p est lié à leur liaison à VCAM-1. Ceci impliquerait la liaison de D-B2702p à VCAM-1 qui n'a jamais été démontrée dans la littérature. Suivant l'approche empirique déjà adoptée pour générer les peptides dérivés de B2702p, le peptide B2702p de série D a été synthétisé afin de pallier aux problèmes de stabilité observés et son affinité pour VCAM-1 a été évaluée *a posteriori*. Les expériences effectuées, limitées aux tests de saturation en puits, indiquent l'absence de liaison entre D-B2702p1 et VCAM-1. Cependant l'ensemble des approches visant à évaluer l'affinité des peptides de série L étant en contradiction avec les résultats antérieurs, qui décrivent une liaison entre ces peptides et VCAM-1, l'évaluation de l'affinité du peptide de série D pour VCAM-1 n'a pas été davantage étudiée.

### 4.1.3 Stabilité des peptides

#### 4.1.3.1 Radiomarquage

**Techniques de radiomarquages utilisées.** La nature organométallique du cœur technétium-tricarbone a apporté un regain d'intérêt dans la conception de produits radiopharmaceutiques technétiés (Alberto *et al.* 1998). Le cœur technétium est un petit complexe capable de se complexer à un grand nombre de ligands. Il a été montré que l'histidine est le meilleur ligand et que sa position en N-terminal est la plus favorable pour le radiomarquage (Egli *et al.* 1999; Waibel *et al.* 1999). Le radiomarquage *via* la méthode Isolink (ou méthode tricarbonyle) s'effectue sur des peptides présentant une histidine en position N-terminale afin de faciliter le radiomarquage avec le cœur technétium-tricarbone.

Le 6-hydrazino nicotinamide (HYNIC) est un autre chélateur bifonctionnel intéressant utilisé pour préparer des molécules technétiées (S. Liu et Edwards 1999). Dans cette approche, il est nécessaire d'utiliser un coligand afin de compléter la sphère de coordination du technétium. Bien que le choix du coligand soit multiple, la tricine est souvent sélectionnée. L'avantage de ce chélatant réside surtout dans le rôle des coligands autorisant des modifications faciles d'hydrophobicité et des propriétés pharmacocinétiques des molécules radiomarquées.

**Stabilité des radiomarquages.** Les peptides B2702p1 de série L et D ont tous été radiomarqués au technétium-99m avec une bonne pureté radiochimique supérieure à 95%, et ce quelle que soit la méthode envisagée (Isolink ou HYNIC). Ils ont également tous présenté une très bonne stabilité dans le milieu de marquage. Que le peptide soit de la série L ou D, aucune différence n'est observée dans le temps de rétention dans les conditions d'analyse. Par contre une différence dans les temps de

rétenion a été observée entre les peptides marqués *via* Isolink et *via* HYNIC, les premiers étant élués vers 19 min et les seconds vers 17 min.

#### 4.1.3.2 Stabilité sanguine

**Peptides marqués au technétium-99m par la méthode Isolink.** L'analyse de stabilité *in vivo* réalisée à partir de sang de souris prélevé 180 min après injection du radiotracer  $[^{99m}\text{Tc}]$ -L-B2702p1 (méthode Isolink) témoigne, en apparence, d'une bonne stabilité. En effet, le temps de rétention du pic d'activité majoritaire est similaire à celui observé en utilisant le radiomarquage initial (~19 min). Cependant, l'analyse *in vitro* par incubation du produit dans du sang de souris révèle que dès 30 min, la fraction libre du plasma présente un pic d'activité majoritaire élué à 16 min et ne présente quasiment plus d'activité à 19 min. Cette observation seule peut laisser supposer un biais méthodologique – changement du temps de rétention lors du protocole d'incubation du produit *in vitro* dans du sang. C'est l'explication qui a été retenue précédemment (Dimastromatteo 2010). Plus récemment, une méthodologie d'analyse plus fine (prélèvement immédiatement après mise en contact avec le sang et méthode de co-injection) a permis de mettre en évidence que cette différence de temps de rétention est due à une dégradation partielle du peptide. L'analyse HPLC de la fraction libre du plasma au temps initial de l'incubation (juste après contact du sang) indique que l'activité éluee au temps de rétention attendu pour le produit intègre ne représente plus que 22% de l'activité totale mesurée. L'analyse de co-injection de la fraction libre du plasma isolée après 30 min d'incubation dans du sang de souris avec le produit de radiomarquage initial a permis de vérifier que le pic à 16 min est différent du peptide technétié initial et confirme donc sa dégradation *in vitro*. L'analyse de la fraction libre du plasma purifié à partir du sang prélevé à 180 min après administration i.v. du produit technétié montre, sur le radiochromatogramme, une faible proportion de produits de dégradation. Ceci peut être expliqué par une élimination biologique plus importante des produits de dégradation que du peptide non dégradé (discutée plus loin).

Le peptide  $[^{99m}\text{Tc}]$ -D-B2702p1 est élué au même temps de rétention en utilisant le radiomarquage initial et après incubation *in vitro* dans le sang. Il présente donc une bonne stabilité *in vitro* dans le sang de souris. La co-injection du radiomarquage initial dans la fraction libre du plasma obtenu après 180 min d'incubation confirme l'intégrité du peptide  $[^{99m}\text{Tc}]$ -D-B2702p1 puisqu'un seul et unique pic majoritaire est visualisé. Le peptide synthétisé à partir d'acides aminés série D apparaît donc plus résistant à la protéolyse tandis que le peptide synthétisé avec des acides aminés série L se dégrade aussi bien dans le sang de souris que dans le sang humain.

**Peptides marqués au technétium-99m par la méthode HYNIC.** Les peptides marqués au

## Partie expérimentale : Imagerie

technétium-99m par leur groupement HYNIC présentent des résultats de stabilité analogues à ceux observés avec les peptides marqués *via* Isolink. Brièvement, lors de l'incubation *in vitro* dans du sang, [<sup>99m</sup>Tc]-HYNIC-L-B2702p1 présente une zone d'activité majoritaire avec de multiples pics élués plus tôt par rapport au peptide initial. Ceci est interprété comme une protéolyse du peptide générant plusieurs produits de dégradation radiomarqués plus petits et plus hydrophiles que le peptide d'origine. A l'inverse, le pic d'activité majoritaire, correspondant au [<sup>99m</sup>Tc]-HYNIC-D-B2702p1, est préservé au cours de l'incubation dans du sang au temps de rétention attendu pour le peptide technétié (Figure 12). Le peptide [<sup>99m</sup>Tc]-HYNIC-D-B2702p1 apparaît donc stable, contrairement au peptide [<sup>99m</sup>Tc]-HYNIC-L-B2702p1.

**Peptides marqués au fluor-18.** Les peptides B2702p1 radiomarqués au fluor-18 par couplage de [<sup>18</sup>F]-fluorobenzaldéhyde aux précurseurs de série L et D ont présenté à réception du produit (~3 h après radio marquage) une dégradation partielle dans le milieu de marquage. Pour le peptide fluoré de la série L, l'analyse *in vitro* par incubation dans du sang humain révèle que le traceur fluoré subit rapidement une forte dégradation ; dès 60 min d'incubation, il ne reste plus que 11% du radiotracer et de nombreux autres sous-produits fluorés sont apparus. Pour le peptide fluoré de la série D, dès la mise en contact de [<sup>18</sup>F]-FBA-D-B2702p1 dans le sang humain, l'analyse de la fraction libre du plasma révèle deux pics distincts : un produit de dégradation et le peptide intègre. L'utilisation de la co-injection a permis de confirmer que le produit élué à 20:25 min correspondait bien au traceur fluoré intègre.

Il apparaît donc que les peptides [<sup>18</sup>F]-FBA-L-B2702p1 et [<sup>18</sup>F]-FBA-D-B2702p1 présentent une stabilité chimique limitée dans leur milieu de marquage et sont tous deux sensibles à la protéolyse dans le plasma. Des stratégies de radiomarquage au fluor-18 alternatives au couplage du [<sup>18</sup>F]-fluorobenzaldéhyde sur le précurseur porteur d'un groupement oxime en N-term ont été envisagées. La première de ces stratégies consiste en la liaison d'un groupement porteur de l'atome de fluor-18 directement par une liaison peptidique ; la seconde consiste en la conjugaison au peptide d'un [<sup>18</sup>F]-fluorodesoxyglucose. Dans les deux cas, ces marquages ont été réalisés sur un précurseur peptidique synthétisé à partir d'acides aminés de la série L, et dans les deux cas l'analyse par incubation dans le sang a montré une forte instabilité du radiotracer (résultats non présentés).

**Dégradation des peptides.** Il est connu que la stabilité sanguine des peptides est faible, en particulier en raison des exopeptidases peu spécifiques présentes dans le plasma (Ahrens, Bellmann-Sickert, et Beck-Sickinger 2012). Les peptidases sont des enzymes (classés EC 3.4 dans la nomenclature des enzyme) catalysant l'hydrolyse de la liaison peptidique entre les résidus des

## Partie expérimentale : Imagerie

peptide ou des protéines. Ces enzymes présentent des sélectivités de substrat très variables et leur activité peut être régulée par la présence d'inhibiteur (Rawlings, Barrett, et Bateman 2012).

L'existence de différences entre espèces concernant l'activité plasmatique des peptidases (Walter, Neidle, et Marks 1975; Jenssen et Aspmo 2008) justifie l'analyse de stabilité dans du sang humain et murin. Les mécanismes impliqués dans la dégradation des peptides n'ont pas été étudiés dans le cadre de ces travaux de thèse.

Diverses modifications permettent d'augmenter la stabilité plasmatique des peptides en inhibant la reconnaissance de la liaison peptidique par les protéases (Powell *et al.* 1993; Mason 2010). L'utilisation d'acides aminés de série D dans la séquence peptidique est une méthode efficace pour inhiber la protéolyse (Schumacher *et al.* 1996; S. Y. Hong, Oh, et Lee 1999). Cette méthode a été retenue dans le cadre de cette étude et a permis l'obtention de produits technétisés [<sup>99m</sup>Tc]-D-B2702p1 et [<sup>99m</sup>Tc]-HYNIC-D-B2702p1 résistants à la protéolyse. Le peptide fluoré de série D a présenté un profil de dégradation moins prononcé que celui de la série L (seulement deux produits radiomarqués ont été identifiés).

Outre la disparition rapide du pic d'activité correspondant au produit intègre lors de l'analyse de la fraction libre isolée pendant l'incubation de [<sup>99m</sup>Tc]-L-B2702p1 (marqué *via* Isolink) dans du sang, un autre élément a pu mener à l'interprétation erronée du changement de temps de rétention du produit dans le sang (Dimastromatteo 2010). Il s'agit de la présence d'un pic largement majoritaire à ~16 min (pouvant même apparaître comme unique avec des conditions d'analyse telles qu'utilisées antérieurement au laboratoire donnant un radiochromatogramme moins résolu). Ceci témoigne de la présence d'un unique produit de dégradation majoritaire radiomarqué, ce qui est différent de ce qui est observé dans le cas des autres produits dégradés ([<sup>99m</sup>Tc]-HYNIC-L-B2702p1 et produits fluorés).

Les études biologiques du peptide [<sup>99m</sup>Tc]-L-B2702p1 (marquage Isolink) ont été effectuées antérieurement à la nouvelle analyse de stabilité. Cette étude rend donc compte du comportement biologique du peptide ainsi que de ses produits de dégradation. Comme le montre l'analyse du sang prélevé 180 min après injection du peptide chez la souris, le peptide non dégradé est encore présent dans la fraction libre du plasma alors que les produits de dégradation ne sont plus retrouvés dans cette fraction ; il est cependant difficile de présager de ce que représente dans ce cas l'activité tissulaire.

#### 4.1.3.3 Répartition sanguine

**Considérations préliminaires sur la répartition sanguine.** La répartition entre la fraction cellulaire, la fraction plasmatique liée aux protéines sanguines et la fraction libre du plasma a été étudiée pour l'ensemble des expériences d'incubation du peptide dans le sang *ex vivo* et l'ensemble des prélèvements sanguins réalisés. La fraction cellulaire correspond au culot obtenu après centrifugation du sang total. Les cellules présentes dans le sang sont les érythrocytes (largement majoritaire), les leucocytes et les thrombocytes. La fraction plasmatique liée aux protéines est obtenue soit par filtration du plasma sur membrane, soit par précipitation avec de l'acide trichloroacétique. Dans les deux cas, les protéines et complexes protéiques de haut poids moléculaire (en comparaison avec les peptides de 1-2 kDa) sont isolés de la fraction libre du plasma. La très grande majorité des protéines plasmatiques est ainsi isolée y compris l'albumine (la protéine plasmatique majoritaire, présentant une masse moléculaire de 65 kDa), les globulines (famille très hétérogène, comprenant les protéines plasmatiques et complexes protéiques de poids moléculaire supérieur à l'albumine, tels que les complexes  $\alpha$ - et  $\beta$ -lipoprotéiques ou encore les  $\gamma$ -globulines) et le fibrinogène (340 kDa). La répartition des peptides (et de leur produit de dégradation) au sein de ces différentes fractions est fonction de leurs propriétés physico-chimiques et donc d'une certaine affinité pour les éléments cités ci-dessus ; on peut ainsi aisément concevoir qu'un produit lipophile interagisse largement avec un domaine hydrophobe de l'albumine, par exemple. Cette séquestration peut avoir des conséquences sur la biodisponibilité des produits pour leurs cibles *in vivo*, et plus largement une implication majeure sur sa pharmacocinétique. À noter toutefois que la fraction libre du plasma est en équilibre dynamique avec les différents pools de produit liés aux éléments cellulaires ou plasmatiques. Il en résulte qu'une déplétion du plasma en produit engendre un déplacement de l'équilibre et donc permet de libérer une portion du produit séquestré.

**Déplétion de la fraction libre et implications.** L'observation d'une déplétion en peptide lors d'une analyse *in vitro* implique sa dégradation. Dans ce cas, l'analyse de la fraction libre du plasma est un bon reflet de la stabilité du produit dans le sang total, bien que seulement qualitativement. En effet, du fait de différences dans les propriétés physico-chimiques entre le produit initial et des produits de dégradation (poids moléculaire, balance hydrophile-hydrophobe, charge) leur répartition entre les différentes fractions analysées n'est *a priori* pas homogène.

*In vivo*, une déplétion en produit dans la fraction libre peut être observée en présence d'une interaction de haute affinité du produit. Cependant, cette déplétion est dynamiquement compensée

## Partie expérimentale : Imagerie

par le déplacement de l'équilibre avec les autres pools de produits (compensation de plus en plus partielle, plus l'interaction est forte et plus la proportion de produit dans la fraction libre est importante). Tout comme dans le cadre de l'analyse *in vitro*, les produits de dégradation et le produit initial présentent une répartition différente *in vivo*. L'hydrolyse du produit initial donne des produits de plus faible masse moléculaire et donc plus solubles en règle générale. Ces produits en plus forte concentration dans la fraction libre du plasma pourraient être plus susceptibles à l'élimination biologique. Ceci est aisément concevable dans le cadre de l'élimination rénale, dont la première étape, la filtration glomérulaire du plasma laisse passer librement dans l'urine primitive une grande partie de molécules d'une masse moléculaire inférieure à 2 kDa (Venturoli et Rippe 2005). Ainsi, lors de l'analyse à partir du sang prélevé *in vivo*, le peptide intègre, en équilibre entre la forme libre et liée (majoritaire), est retrouvé dans la fraction libre du plasma, alors que les produits de dégradation (majoritairement retrouvés sous forme libre) ont largement été éliminés. Cela peut fournir un élément d'explication des observations *a priori* paradoxales de stabilité apparente lors de l'analyse de la fraction libre du plasma prélevé aux animaux 180 min après injection de [<sup>99m</sup>Tc]-L-B2702p1 (marqué *via* Isolink) et [<sup>99m</sup>Tc]-HYNIC-L-B2702p1, en comparaison de l'instabilité observée dans les expériences *in vitro*.

**Répartition sanguine.** L'étude de la répartition sanguine ne présente qu'un intérêt limité dans le cas de peptides dégradés – ce qui est le cas des peptides fluorés et des peptides technétiés de la série L. Le peptide [<sup>99m</sup>Tc]-L-B2702p1 (marquage Isolink) a été étudié en modèle animal. Que ce soit *in vivo* ou *in vitro*, l'activité retrouvée dans la fraction libre du plasma représente  $30 \pm 9\%$  (le reste de l'activité étant lié aux protéines plasmatiques et aux cellules sanguines dans une proportion 2.8:1)

Les peptides de la série D marqués au technétium-99m présentent quant à eux une bonne stabilité sanguine. La proportion de peptide radiomarqué retrouvée dans la fraction libre est très faible dans le cas de [<sup>99m</sup>Tc]-D-B2702p1 (*via* Isolink) :  $3 \pm 2\%$  sur l'ensemble des analyses *in vitro* (la grande majorité du peptide étant liée aux protéines plasmatiques et aux éléments figurés du sang à 2.6:1). Cette faible activité explique le profil « bruité » obtenu lors de l'analyse *in vitro* (Figure 11). Lors de l'incubation de [<sup>99m</sup>Tc]-HYNIC-D-B2702p1 dans le sang,  $27 \pm 4\%$  de peptide radiomarqué est retrouvé dans la fraction libre du plasma (la fraction majoritaire étant alors liée aux protéines plasmatiques).

#### 4.1.4 Étude sur modèle animal

##### 4.1.4.1 [<sup>99m</sup>Tc]-L-B2702p1 (marquage Isolink)

L'évaluation *in vivo* est essentiellement focalisée sur l'objectif de reproduire les résultats antérieurs obtenus avec le peptide [<sup>99m</sup>Tc]-L-B2702p1 (marquage Isolink) qui avait fourni des résultats préliminaires très encourageants (Dimastromatteo 2010). La présente étude a été menée sur un grand nombre d'animaux (n = 29) dans le modèle de lésion focale induite par ligature complète d'une artère carotide ainsi qu'un nombre plus réduit d'animaux (n = 3) âgés de 35 semaines et nourris avec un régime hypercholestérolémiant, présentant des lésions sur l'aorte. L'étude de stabilité affinée qui a démontré le défaut de stabilité de ce peptide dans le sang (cf. 3.2) a été effectuée après cette étude. Dans la majorité des cas, l'imagerie double modalité SPECT/CT a été menée sur un équipement de haute sensibilité et résolution dédié à l'imagerie du petit animal (nanoSPECT/CT, Bioscan), et a été systématiquement appuyé par des résultats provenant de l'analyse effectuée *ex vivo*.

**Imagerie.** L'imagerie SPECT/CT du peptide [<sup>99m</sup>Tc]-L-B2702p1 (marquage Isolink) dans le modèle de carotide ligaturée a montré un point chaud situé dans la région cervicale du côté où la ligature a été effectuée, pour la majorité des animaux étudiés. Le site de ligature ne pouvant être repéré par l'acquisition CT, ce point chaud a systématiquement été recherché sur l'image issue de la reconstruction de l'acquisition SPECT sur une zone anatomiquement pertinente au vu du geste chirurgical mais tout de même assez large. En l'absence de point chaud symétrique la quantification par rapport à une zone symétrique à l'axe sagittal médian donne un rapport > 1. L'image présentant une faible dynamique en l'absence de point chaud franc, il est possible d'identifier des points chauds d'amplitude similaire dans d'autres localisations, non pertinentes au vu de l'intervention. Ceci représente une limitation majeure à cette technique d'évaluation de fixation focale. De plus, le point chaud repéré a été retrouvé dans certains cas en continuité avec d'autres zones présentant une activité importante (à l'échelle utilisée) ; ceci limite l'interprétation de ce signal comme provenant d'une captation focale au niveau de la lésion carotidienne. Les rapports lésion-sur-contrôle trouvés sont compris entre  $1.10 \pm 0.18$  et  $1.43 \pm 0.65$  dans les différentes séries expérimentales menées et ne présentent pas de différences significatives entre eux. Le rapport lésion-sur-contrôle déterminé en imagerie SPECT lors de l'étude antérieure était de 1.58 (rapport des moyennes). Il est à noter que les acquisitions n'ont pas été effectuées sur le même système d'imagerie. Celui utilisé dans les séries expérimentales présentées (nanoSPECT/CT, Bioscan) est un système à quatre têtes d'acquisitions avec collimation multi-sténopée, alors que dans le cas de l'étude antérieure il s'agit d'un système

## Partie expérimentale : Imagerie

avec une seule tête d'acquisition et avec une collimation à ouverture unique (Biospace) le rendant ainsi moins sensible. Par ailleurs, du fait de la taille des ouvertures et de la géométrie du système (distance de la source par rapport à la surface d'acquisition), la résolution est également bien inférieure dans le cas de l'étude antérieure. Dans le cas de l'étude d'imagerie planaire (Lot #3 série 3), aucune différence entre le côté présentant la ligature et le côté controlatéral n'a pu être observée, avec un rapport de quantification lésion-sur-contrôle de  $1.02 \pm 0.17$  (résultats non présentés) tandis que l'étude antérieure faisait ressortir de l'imagerie planaire un rapport de  $1.21 \pm 0.07$ .

**Biodistribution *ex vivo*.** Les résultats *ex vivo* mettent en évidence une grande variabilité dans les profils de biodistribution après injection de [<sup>99m</sup>Tc]-L-B2702p1 (marquage Isolink) suivant les séries expérimentales, réalisées à quelques mois d'intervalle. La constatation de ces différences – dès la première série expérimentale réalisée – a immiscé un doute quant à l'identité des molécules utilisées. Ainsi, deux synthèses *de novo* du peptide L-B2702p1 ont été réalisées par la société Eurogentec, SA (troisième synthèse) et par le Département de Chimie Moléculaire de l'université Grenoble I (DCM), correspondant aux lots 3 et 4 respectivement – les lots 1 et 2, classés chronologiquement par date de synthèse, ayant été produit par Eurogentec SA (première et seconde synthèses). *In fine*, l'identité des quatre lots a été confirmée par séquençage. Dans l'ensemble des cas, les résultats *ex vivo* n'ont pas permis de mettre en évidence de captation focale du peptide dans la lésion induite par ligature de la carotide. Sur les cinq séries expérimentales, le ratio de captation entre la carotide présentant une lésion – au sein de laquelle l'expression de VCAM-1 a été confirmée par immunohistochimie – et la carotide controlatérale contrôle était compris entre  $0.77 \pm 0.21$  et  $1.05 \pm 0.38$  (significativement inférieur au ratio de l'étude antérieure  $2.63 \pm 1.36$ , dans 4 séries sur 5,  $P < 0.05$ , la dernière série étant à la limite de la significativité  $P = 0.05$ ). La fixation lésionnelle présente également de fortes variations entre les 5 séries expérimentales ( $1.23 \pm 0.30$  %ID/g à  $7.02 \pm 2.67$  %ID/g), tout comme l'activité d'autres tissus ou organes prélevés *ex vivo*. Une élimination de l'activité par voie hépato-biliaire et urinaire a été constatée. À noter que cette analyse porte sur un produit dégradé dans le plasma ; l'activité correspond donc aux produits de dégradation du peptide ; ceci peut être un élément d'explication de la variabilité observée dans les valeurs de biodistribution.

### 4.1.4.2 [<sup>99m</sup>Tc]-HYNIC-D-B2702p1

Le peptide de série D, HYNIC-D-B2702p1 radiomarké au technétium-99m a été le seul peptide dont la stabilité dans le sang de souris s'est révélée satisfaisante *in vivo* ; l'autre peptide stable étant D-B2702p1 radiomarké au technétium-99m par la méthode Isolink qui n'a pas été étudié *in vivo* à

## Partie expérimentale : Imagerie

défaut d'avoir démontré la fixation à la molécule cible. Dans le cas de [<sup>99m</sup>Tc]-HYNIC-D-B2702p1, la fixation à VCAM-1 n'a pas non plus été démontrée comme discuté ci-dessus, cependant lorsque cette étude *in vivo* a été menée, des doutes subsistaient sur la méthodologie employée pour l'évaluation de l'affinité, et en l'absence de certitude, l'expérimentation préliminaire sur un faible effectif (n = 3) ici décrite a été mise en place. Cette série expérimentale a été réalisée sur le modèle de souris apoE<sup>-/-</sup> sous régime hypercholestérolémiant, préféré au modèle de ligature pour la taille plus importante des lésions ainsi que la possibilité de les identifier par CT (Wait *et al.* 2013). Cette expérimentation se voulant la plus complète possible sur un faible effectif, la caractérisation *in vivo* de la molécule a été réalisée par une analyse cinétique en SPECT et complétée par une étude *ex vivo* incluant une analyse en autoradiographie de l'aorte.

**Biodistribution.** Les images SPECT n'ont pas permis d'identifier les lésions athéromateuses suite à l'injection du peptide ; le volume d'intérêt situé au niveau de la crosse aortique porteuse de lésions a présenté une activité proche de l'activité sanguine sur l'ensemble des temps d'imagerie. L'analyse *ex vivo* a montré une activité vasculaire plus importante que l'activité sanguine mais peu discriminante entre le tissu vasculaire sain et les lésions. La faible variation observée peut aisément être expliquée par une variation de distribution, en absence de toute fixation spécifique, liée aux propriétés de diffusion de la molécule au sein de tissus aussi différents qu'une paroi vasculaire saine et une plaque athéromateuse. Ce peptide, stable dans le sang, est éliminé par voie urinaire.

## 4.2 Étude FDG

### 4.2.1 Principaux résultats FDG

L'imagerie haute résolution sur un système à double modalité PET/CT a été réalisée dans des conditions considérées *a priori* comme les plus favorables pour cette imagerie de l'athérosclérose au FDG chez les souris apoE<sup>-/-</sup>. Une accumulation de FDG a été observée dans le médiastin supérieur, où se situe la crosse aortique présentant des lésions athéromateuses étendues, cependant cette accumulation n'a pas été identifiée comme provenant principalement de lésions athéromateuses focales. En effet, même si l'analyse *ex vivo* a permis de démontrer une captation de FDG élevée dans les lésions aortiques corrélée à l'état inflammatoire de la plaque ainsi que de bons ratios lésion-sur-sang et lésion-sur-paroi saine, une forte accumulation de FDG dans les tissus à proximité de ces lésions, en particulier dans le BAT péri-aortique localisé en continuité avec le tissu adventiciel, a également été observée. L'activité mesurée dans le BAT péri-aortique est 3.2 fois supérieure à celle retrouvée dans les lésions athéromateuses du groupe contrôle (groupe A). L'optimisation des conditions expérimentales a permis de réduire de 3.1 fois cette captation entre les

groupes A et B, en conséquence elle est du même ordre de grandeur que celle observée dans les lésions athéromateuses dans ce groupe. L'utilisation de propranolol n'a pas permis de diminution supplémentaire de la captation du FDG dans le BAT péri-aortique entre les groupes B et C (P = NS). Ainsi, pour l'ensemble des conditions expérimentales, le BAT péri-aortique joue un rôle significatif dans la captation de FDG observée sur les images *in vivo*.

#### 4.2.2 Rationnel des conditions expérimentales

**Jeûne.** Le FDG est un analogue du glucose ; l'imagerie au FDG implique donc que la captation de glucose (i.e. FDG) soit minimale dans les tissus non ciblés et maximale dans les tissus à imager. Dans ce cadre, la réduction de la glycémie, et donc de l'insulinémie permet de réduire la captation de FDG dans les tissus insulinosensibles alors que sa captation dans les tissus non insulinosensibles est maintenue, voire augmentée grâce à l'augmentation de sa biodisponibilité. Parmi les tissus non insulinosensibles, ou plus exactement dans lesquels l'insuline est sans effet sur le transport du glucose, on trouve les cellules inflammatoires (Ahmed, Kansara, et Berridge 1997). Le jeûne d'une nuit permet de réduire la glycémie ; les souris apoE<sup>-/-</sup> incluses dans le cadre de cette étude présentent une valeur de glycémie à jeun de 83 ± 13 mg/dL.

**Anesthésie.** Au cours de l'anesthésie, un certain nombre de tissus ne sont que faiblement stimulés (cerveau et muscles squelettiques principalement). Il peut donc raisonnablement être supposé que ces tissus présentent un métabolisme basal et donc une faible captation de FDG. L'anesthésie gazeuse à l'isoflurane a été évitée en raison de l'élévation de la captation myocardique de FDG qu'elle entraîne (Toyama *et al.* 2004) ; bien que son effet sur l'inhibition de la thermogenèse (Ohlson *et al.* 2004) eut été favorable dans le cadre de cette étude, cette inhibition a été réalisée par d'autres moyens (cf. ci-dessous). L'anesthésie par injection d'un mélange de kétamine/xylazine n'a pas été utilisée pour éviter l'importante hyperglycémie qu'elle entraîne. Au final, le choix de l'anesthésique s'est porté sur l'infusion i.p. de pentobarbital sodique avec lequel de plus modestes artefacts liés à l'anesthésie sont escomptés (K.-H. Lee *et al.* 2005). L'évaluation *ex vivo* de la biodistribution de FDG montre une activité sanguine plus faible chez les animaux maintenus vigiles (groupe A) que chez les animaux anesthésiés (groupes B) et également une plus faible captation dans un certain nombre de tissus (e.g. poumons, tissu adipeux blanc, intestin, foie, rate), interprétée comme la conséquence d'une plus faible biodisponibilité de FDG. La captation dans le cerveau des animaux vigiles n'est pas significativement supérieure à celle des animaux sous anesthésie, et elle n'est pas non plus systématiquement significativement supérieure dans l'ensemble des muscles squelettiques évalués bien que cette tendance anticipée soit systématiquement observée.

## Partie expérimentale : Imagerie

**Temps d'étude.** Les temps d'imagerie finale (150 à 180 min p.i.) et d'euthanasie (3 h p.i.) sont des temps relativement tardifs par rapport aux temps d'imagerie communément employés pour réaliser l'imagerie au FDG. La majorité des études évaluant la captation du FDG dans les lésions athéromateuses chez la souris se place vers 1 h p.i. (Laurberg *et al.* 2007; Nahrendorf *et al.* 2008; Zhao *et al.* 2008; Silvola *et al.* 2011). Le choix de ce temps d'imagerie a été ouvertement critiqué, jugé trop précoce, aussi bien pour l'imagerie de l'athérosclérose chez l'homme que dans les modèles animaux et résultant en un faible contraste. Un temps d'imagerie de 3 h p.i. été recommandé (Rudd *et al.* 2007). Suivant ces arguments, nous, comme d'autres (Hag *et al.* 2012), avons choisi un temps plus tardif. Ce temps d'imagerie tardif peut également être questionné au vu des enseignements apportés par l'imagerie dynamique à deux temps (*dual-time point imaging*) développée précisément pour discriminer la captation tumorale des signaux positifs correspondant à des processus inflammatoires ; ces derniers sont identifiés au temps précoce et présentent une diminution importante à des temps plus tardifs (Zhuang *et al.* 2001). Ce phénomène est toutefois moins marqué dans le cas de l'inflammation chronique que de l'inflammation aiguë (G. Cheng *et al.* 2013). Une étude sur l'inflammation vasculaire réalisée chez l'homme montre que l'imagerie à 3 h p.i. n'est pas significativement plus avantageuse que l'imagerie à 1 h p.i. (Menezes *et al.* 2009). Enfin, l'accumulation de FDG dans la graisse brune avec le temps a également été montrée (Esen Akkas *et al.* 2011).

**Température.** Les animaux contrôles (groupe A) ont été maintenus vigiles à température ambiante. Il en résulte une captation de FDG élevée dans le tissu adipeux brun, témoignant d'une activation de ce tissu impliqué dans la thermogenèse (Cannon et Nedergaard 2004). Afin de maintenir leur température, les animaux anesthésiés (groupes B et C) ont été chauffés à 37°C. Cette température, en se trouvant au delà de la zone de thermoneutralité des animaux, a permis de réduire la captation de FDG dans le tissu adipeux brun, aussi bien au niveau scapulaire que péri-aortique.

**Propranolol.** L'utilisation du propranolol a permis une réduction de la captation du FDG dans la graisse brune de rat, par inhibition des récepteurs  $\beta_3$ -adrénergiques largement exprimés dans ce tissu (Tatsumi *et al.* 2004). Dans l'étude présentée ici, l'utilisation du propranolol (groupe C) n'a pas permis de réduire la captation de FDG dans la graisse brune au-delà de ce qui avait été obtenu en maintenant les animaux à 37°C (groupe B). Il est intéressant de noter que l'unique tissu où l'on observe une différence entre ces deux groupes est le tissu myocardique ; celui-ci présente une captation de FDG plus importante après injection de propranolol. Cela peut-être mis en rapport avec une plus forte glycémie au temps d'injection constatée dans cette condition. L'interprétation qui

peut-être proposée est que cette élévation de glycémie pourrait entraîner une augmentation de l'insulinémie et donc une restauration du métabolisme glucidique du myocarde. La question du mécanisme entraînant l'augmentation de glycémie une heure après injection de propranolol par rapport aux souris non traitées avec l'inhibiteur, qui présentaient une glycémie à jeun comparable, apparaît *a priori* comme contradictoire avec l'effet hypoglycémiant tissulaire connu des  $\beta$ -bloquants et n'a pas été davantage étudiée puisque sortant du cadre de l'étude. Toutefois, des éléments d'explication peuvent être avancés. Les effets hyperglycémiant de toute anesthésie sont connus, même si ces effets restent relativement limités avec l'utilisation de pentobarbital sodique par rapport e.g. à l'utilisation de mélange kétamine/xylazine (Fueger *et al.* 2006) et l'effet délétère du propranolol sur le contrôle de la glycémie est également connu (Fonseca 2010) ; l'association de ces deux phénomènes pourrait expliquer la différence de glycémie entre les deux groupes et donc la différence de captation myocardique de FDG.

### 4.2.3 Mise en perspective des résultats

#### 4.2.3.1 Captation lésionnelle

**Paramètres influençant la captation lésionnelle.** La captation de FDG au sein des lésions athéromateuses a été positivement corrélée à l'infiltration des macrophages. Cette corrélation est à la base même du principe d'imagerie de l'athérosclérose en utilisant le FDG. Elle a d'ores et déjà été rapporté dans le modèle d'athérosclérose chez le lapin (Ogawa *et al.* 2004) et chez l'homme (Tawakol *et al.* 2006). En utilisant une méthodologie similaire à celle de l'étude présentée ici, une corrélation entre la captation de FDG et l'infiltration de macrophages à été rapportée chez la souris apoE<sup>-/-</sup> à 2 h p.i. (Zhao *et al.* 2011), mais pas lorsque l'évaluation était effectuée à 20 min p.i. (Matter *et al.* 2006). Ces observations tendent à valider le fait que les macrophages jouent un rôle majeur dans la captation du FDG dans les lésions athéromateuses. Il est intéressant de noter que la captation de FDG dans les plaques est influencée par l'état de différenciation des macrophages (Ogawa *et al.* 2012) ; une captation plus importante par des macrophages peu différenciés a été observée, tandis que les cellules spumeuses ne présentent qu'une captation relativement modérée de FDG. Dans le modèle utilisé, des lésions apparaissent dans la crosse aortique dès 20 semaines (Broisat *et al.* 2011). Les animaux de  $36 \pm 2$  semaines inclus dans l'étude présentent des lésions de taille importante, favorable à l'imagerie pour cette raison. Cependant, à cet âge relativement tardif il se pourrait que les cellules présentent majoritairement des caractéristiques de cellules fortement différenciées pour ce qui est de la captation du FDG. L'état d'hypoxie des tumeurs influence la captation de FDG (Rajendran *et al.* 2004) ; ce paramètre influence également la captation de FDG

## Partie expérimentale : Imagerie

par les cellules inflammatoires (Folco *et al.* 2011). La présence d'hypoxie dans les plaques d'athérome murines est un fait avéré (Parathath *et al.* 2011) ; la présence de lésions de taille importante, potentiellement fortement hypoxiques, est donc un facteur favorisant la captation de FDG.

**Comparaison aux données de la littérature.** La valeur de fixation lésionnelle de FDG dans les plaques déterminée à 3 h p.i. par autoradiographie n'a pas présenté de différence entre les groupes expérimentaux ; pour l'ensemble des animaux de l'étude elle a été déterminée à  $5.5 \pm 2.3$  %ID/g soit  $1.5 \pm 0.6$  DUR. Les études antérieures évaluant le FDG dans un modèle murin d'athérosclérose ne présentent pas de données quantitatives quant à la fixation lésionnelle pure. Une partie des études ne présentent que des données de quantification d'imagerie PET (Nahrendorf *et al.* 2009; Bonaterra *et al.* 2012), qui du fait de la résolution spatiale de l'imagerie PET, ne permettent que de quantifier les vaisseaux (athéromateux) dans leur ensemble. Les valeurs de captation de FDG *ex vivo* sont généralement évaluées sur aorte (entière ou segments) (Laitinen *et al.* 2006; Laurberg *et al.* 2007; Zhao *et al.* 2008; Hag *et al.* 2012) ou, dans le cas d'études autoradiographiques, seuls sont présentés des rapports de fixations entre les lésions et la paroi saine, sans données quantitatives quant à la fixation lésionnelle (Silvola *et al.* 2011) ou alors il s'agit de quantification relatives (Zhao *et al.* 2007; Zhao *et al.* 2011). L'étude par Matters *et al.* (Matter *et al.* 2006) fait exception avec des analyses d'images autoradiographiques présentant des échelles ajustées en SUV. Cependant, seule la SUV (DUR) maximale dans la plaque est présentée :  $2.4 \pm 0.5$  évalué à 20 min p.i.

Les rapports de captation lésion-sur-paroi saine de notre étude sont du même ordre de grandeur que ceux rapportés dans la littérature par étude autoradiographique sur coupes d'aorte à 1.5 h p.i. (Silvola *et al.* 2011) ou sur étude d'aorte en face à 3 h p.i. (Matter *et al.* 2006). Dans les deux études précédemment citées, le rapport de fixation a été évalué à  $2.4 \pm 0.4$  et à  $2.6 \pm 0.9$ , respectivement, contre  $3.0 \pm 1.8$  dans l'étude présentée ici. Le rapport de fixation lésion-sur-sang, couramment évalué par quantification d'imagerie dans le cadre d'études effectuées chez l'homme, et dénommé TBR (*target-to-background ratio*), n'est pas présenté dans les études de captation de FDG dans les modèles murins d'athérosclérose. Chez la souris, la faible taille des structures à imager et le faible calibre des vaisseaux au regard de la résolution spatiale de l'imagerie PET ne permet pas l'évaluation de ce rapport *in vivo*.

La captation dans l'aorte (entière ou segment, e.g. crosse aortique) est plus souvent rapportée. La méthodologie choisie dans le cadre de notre étude est incompatible avec l'obtention de cette donnée au niveau de la crosse aortique, une comparaison directe n'est donc pas possible. Cependant, il est

intéressant de noter que cette valeur dépend de l'étendue des lésions athéromateuses dans le tronçon artériel étudié et peut difficilement être comparée entre les différentes études. Ainsi, Laitinen *et al.* (Laitinen *et al.* 2006) ont rapporté une valeur de captation de FDG aortique de  $0.41 \pm 0.16$  %ID/g, évaluée à 1 h p.i. pour des souris LDLR/apoB48. Dans l'étude publiée par Hag *et al.* (Hag *et al.* 2012), la captation aortique s'élevait à 1.2 SUV (DUR), pour des souris apoE<sup>-/-</sup> de 32 semaines sous régime. Laurberg *et al.* (Laurberg *et al.* 2007) montrent une captation de FDG dans la crosse aortique de souris apoE<sup>-/-</sup> de 34-35 semaines non mises à jeun de  $3.6 \pm 1.8$  %ID/g, contre  $11.1 \pm 6.6$  %ID/g dans l'aorte thoracique décrite comme dépourvue de lésions. Les auteurs discutent cela en rapport avec la faible cellularité des lésions avancées : même en présence de cellules inflammatoires présentant une forte captation, leur faible densité dans des lésions majoritairement constituées d'éléments extra-cellulaires (fibres de collagène, protéoglycanes, lipides, tissu nécrotique, calcifications) résulte en une captation modérée de FDG dans les plaques.

### 4.2.3.2 Tissu adipeux brun péri-aortique

Une captation importante dans le BAT péri-aortique a été observée dans le cadre de cette étude. Cette captation a pu être réduite chez l'animal anesthésié et maintenu à 37°C avant et durant toute la période d'accumulation du FDG par rapport à l'animal vigile maintenu à température ambiante durant la période d'accumulation du FDG, passant de  $17.6 \pm 10.7$  %ID/g à  $5.7 \pm 3.7$  %ID/g ( $P < 0.05$ ). L'administration de propranolol, décrit pour diminuer la captation de FDG dans le BAT chez le rongeur (Tatsumi *et al.* 2004), n'a pas permis de réduire davantage la captation de FDG dans ce tissu ( $5.7 \pm 3.7$  %ID/g à  $5.8 \pm 4.4$  %ID/g,  $P = \text{NS}$ ). Cependant, même réduite, cette captation reste du même ordre de grandeur que la captation dans les lésions athéromateuses. Une captation importante de FDG dans le tissu adipeux péri-aortique ( $8.1 \pm 2.5$  %ID/g à 1 h p.i.) a d'ores et déjà été rapportée dans un modèle murin d'athérosclérose (Laitinen *et al.* 2006), cependant cette observation et son implication quant à l'imagerie *in vivo* n'a pas été discutée.

L'étude par Laurberg *et al.* (Laurberg *et al.* 2007) a montré une captation de FDG similaire entre le BAT inter-scapulaire et la crosse aortique ; cette captation apparaît comme relativement modérée par rapport aux données de l'étude présentée ici. Pour les auteurs de cette étude, cette forte captation est un problème pour l'imagerie des structures proches, tel que la crosse aortique. Cette proximité anatomique (~ 5 – 10 mm) est d'un tout autre ordre de grandeur par rapport à la proximité immédiate du BAT péri-aortique avec la paroi vasculaire comme étudié ici.

### 4.2.3.3 Imagerie PET/CT

**Signal PET.** La captation de FDG a été évaluée par quantification d'image dans un volume d'intérêt sphérique de  $0.6 \text{ mm}^3$  (soit  $0.5 \text{ mm}$  de rayon) centré sur des lésions présentes dans la crosse aortique, identifiées par CT. La visualisation de lésions athéromateuses au CT a précédemment été décrite (Wait *et al.* 2013). Le VOI a été placé grâce à des repères anatomiques ; l'absence de captation focale à ce site anatomique témoigne de la relative homogénéité de captation entre les lésions athéromateuses et les structures proches (BAT péri-aortique, thymus, poumons) dans les conditions d'imagerie optimisées (groupes B et C). L'activité du VOI a pu être corrélée positivement à la captation dans le BAT péri-aortique mais pas à l'activité des lésions, du tissu aortique dépourvu de lésions ni à l'activité sanguine. Au vu de leur localisation anatomique, ces quatre tissus sont considérés comme constitutifs du VOI et, au vu de la résolution spatiale de la caméra, ne peuvent être distingués sur l'image (Figure 28).

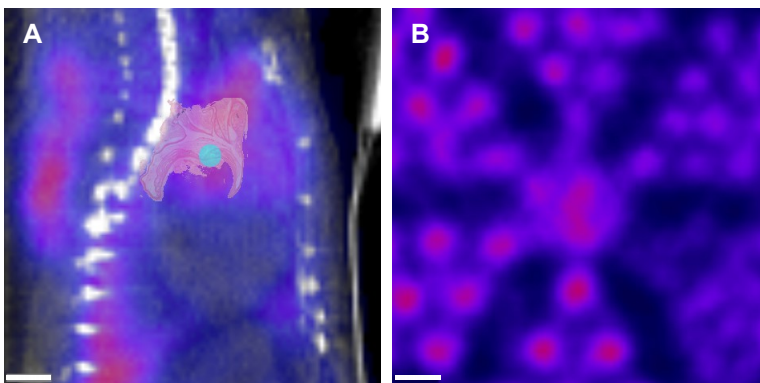


Figure 28. Exemple d'un VOI sphérique de  $0.5 \text{ mm}$  de rayon (cyan) présenté sur coupe sagittale d'image PET/CT avec une coupe histologique de crosse aortique à échelle superposée (A). L'acquisition de fantôme (mini-Jaszczak, diamètre des colonnes de  $1.0 \text{ mm}$  à  $1.5 \text{ mm}$ ) effectuée dans les conditions d'acquisition des images PET (B). Barre d'échelle :  $2 \text{ mm}$ .

L'activité du VOI est proportionnelle à la somme des produit du volume de chaque tissu constitutif du VOI par son activité respective (Eq. 11) :

$$A_{\text{VOI}} = \frac{1}{V_{\text{VOI}}} \sum_i A_i V_i \quad (11)$$

avec  $A_{\text{VOI}}$  et  $V_{\text{VOI}}$  l'activité et le volume du VOI et ( $A_i$ ) et ( $V_i$ ) les activités et les volumes des tissus constitutifs du VOI. A noter qu'une formule analogue peut s'appliquer pour tout volume élémentaire, de dimension correspondant à la résolution spatiale suivant les trois axes (composé de plusieurs voxels, la définition de l'image excédant sa résolution), dans la composition duquel entrent plusieurs tissus distincts (effet volume partiel) (Soret, Bacharach, et Buvat 2007).

Au vu de ces considérations, il n'est pas étonnant que l'activité des tissus présentant une importante captation de FDG et/ou occupant un volume important dans le VOI corrélerent avec l'activité du VOI. Il en résulte que le VOI centré sur les lésions aortiques identifiées dans la crosse de l'aorte n'est pas

discriminant de l'activité lésionnelle mais reflète principalement l'activité dans le BAT péri-aortique. L'étude de la SUV maximale présente un intérêt pour estimer l'activité d'une structure soumise à l'effet de volume partiel : la quantification de la structure soumise à l'effet de volume partiel est moins sous estimée que lorsque l'on étudie la SUV moyenne (Soret, Bacharach, et Buvat 2007). Cependant, cette estimation n'est valable que pour les structures présentant une captation supérieure à celle des structures adjacentes, ce qui n'est pas le cas ici, puisque la captation dans le BAT péri-aortique est au mieux du même ordre de grandeur que la captation lésionnelle que l'on cherche à quantifier.

L'évaluation dans l'aorte thoracique descendante n'a pas été appuyée par des données d'analyse autoradiographiques, cependant du BAT péri-aortique est également retrouvé à ce niveau et une problématique similaire est donc rencontrée.

**Comparaison avec les données de la littérature.** L'activité mesurée dans les VOI correspondant à la crosse aortique et à l'aorte thoracique descendante était supérieure dans le groupe A par rapport aux groupes B et C ; c'est également le cas de la captation dans le BAT péri-aortique à laquelle l'activité du VOI est fortement corrélée. Cette captation s'élève à  $1.4 \pm 0.5$  et  $1.2 \pm 0.3$  SUV pour le groupe A,  $0.9 \pm 0.2$  et  $0.8 \pm 0.1$  SUV pour le groupe B et  $1.0 \pm 0.2$  et  $0.9 \pm 0.1$  SUV pour le groupe C au niveau de la crosse aortique et de l'aorte thoracique descendante respectivement. Pour comparaison, ceci correspond à une gamme de valeurs moyennes de 3.0 – 4.6 %ID/mL dans le cadre de cette étude.

Comme mentionné précédemment, l'étude par Laurberg *et al.* (Laurberg *et al.* 2007) n'a pas permis de visualiser les lésions aortiques ou se développant dans les carotides ligaturées dans le modèle de souris apoE<sup>-/-</sup>. Une partie de cet échec a été attribuée à la forte captation de FDG dans le BAT inter-scapulaire, une autre à la faible cellularité des lésions résultant en une faible accumulation de FDG. L'étude de Laurberg *et al.* a été critiquée par d'autres auteurs (Rudd *et al.* 2007) pour le choix du modèle animal (dimension des lésions et proximité avec des structures présentant une forte captation) incompatible avec l'imagerie PET et pour le temps d'imagerie choisi (1 h p.i., jugé comme trop précoce). Ce temps d'imagerie a pourtant été utilisé dans d'autres études identifiant des lésions athéromateuses dans un modèle murin d'athérosclérose. Ainsi, la souris apoE<sup>-/-</sup> a présenté un signal dans la crosse aortique quantifié à  $\sim 0.9$  SUV dans l'étude par Nahrendorf *et al.* (Nahrendorf *et al.* 2008) et à 1.4 SUV dans l'étude par Bonaterra *et al.* (Bonaterra *et al.* 2012). La souris LDLR<sup>-/-</sup>/apoB<sup>100/100</sup>, avec en plus une délétion de IGF-II, a présenté un signal identifié comme provenant de la crosse aortique quantifié à  $\sim 3.6$  %ID/g au mieux (Silvola *et al.* 2011). Dans cette

## Partie expérimentale : Imagerie

étude, les animaux présentent une forte captation de FDG dans le myocarde, probablement due à l'utilisation d'une anesthésie à l'isoflurane, à la limite des zones quantifiées. Ces trois études ne présentent pas de données *ex vivo* quantitatives quant à la captation de FDG quantifiée sur l'image *in vivo*. Une étude par Hag *et al.* (Hag *et al.* 2012), réalisée dans des conditions expérimentales semblables à celles de l'étude présentée ici (souris apoE<sup>-/-</sup> sous régime hypercholestérolémiant, mises à jeun sur la nuit, anesthésiées, chauffées et imagés à 3 h p.i.) a montré des valeurs de quantification d'imagerie PET analogues aux nôtres de ~1.8 SUV (moyenne du groupe présentant la captation maximale). Cette quantification a été effectuée sur l'ensemble de l'aorte thoracique, y compris la zone du hiatus aortique à proximité immédiate du muscle diaphragme thoraco-abdominal, qui peut présenter une forte captation de FDG. Cette valeur présente une évolution avec l'âge chez les souris nourries avec un régime hypercholestérolémiant. Une forte corrélation entre la valeur obtenue par quantification d'imagerie et la valeur de captation aortique déterminée *ex vivo* a été observée, bien que cette dernière ait systématiquement été inférieure (1.5 à 2.4 fois plus faible sur les moyennes par groupes). Un élément pouvant expliquer cette variation est la captation dans le tissu adipeux brun péri-aortique, quantifié en PET et non compté *ex vivo*, après nettoyage de l'aorte.

### 4.3 Imagerie moléculaire

#### 4.3.1 Imagerie nucléaire et nature des traceurs

**Imagerie nucléaire.** L'imagerie nucléaire est une modalité d'imagerie moléculaire présentant une haute sensibilité mais une résolution spatiale faible. De plus, cette méthodologie d'imagerie ne donne pas accès à l'anatomie du sujet étudié. L'utilisation de l'imagerie bimodale permet de pallier à ce problème. En effet, l'acquisition en tomographie à rayons X (CT) effectuée conjointement à l'acquisition par modalité d'imagerie nucléaire (SPECT ou PET) permet, avec la coregistration des images obtenues, d'obtenir la localisation anatomique précise du signal d'imagerie nucléaire. En recherchant un signal d'origine vasculaire, il peut être utile d'utiliser un produit de contraste au CT, permettant une identification plus aisée de la vascularisation. Alternativement, l'identification de tissus denses au CT peut également être recherchée ; c'est l'approche qui a été retenue dans cette étude, les lésions athéromateuses aortiques pouvant être identifiées dans le modèle d'étude utilisé (Wait *et al.* 2013).

La faible résolution spatiale au regard de la taille des structures à imager (aussi bien en ce qui concerne les lésions chez l'homme que dans le modèle murin d'athérosclérose au vu de la résolution des systèmes d'imagerie clinique et dédié au petit animal, respectivement) conduit nécessairement à un phénomène de volume partiel. En effet, pour s'affranchir de ce phénomène, les structures

## Partie expérimentale : Imagerie

imaginées devraient représenter au minimum 2 fois la résolution du système d'acquisition selon chaque axe considéré (Soret, Bacharach, et Buvat 2007). Les lésions humaines les plus importantes de l'aorte thoracique (grade IV, par échographie trans-œsophagienne) présentent un épaississement intimal de  $\geq 4$  mm (Tunick et Kronzon 2000) ; les caméras PET cliniques de dernière génération (de plus haute résolution que des caméras SPECT cliniques), présentent une résolution spatiale de 4-8 mm (Pysz, Gambhir, et Willmann 2010). Les lésions développées observées dans la crosse aortique dans l'étude présentée ici représentent au maximum  $\sim 300$   $\mu\text{m}$  d'épaisseur, pour une résolution des caméras SPECT dédiées à l'imagerie du petit animal (de plus haute résolution par rapport aux caméras PET) de l'ordre de 0.3–1 mm (Pysz, Gambhir, et Willmann 2010). Ce phénomène de volume partiel implique que l'activité dans les lésions estimée par imagerie est sous-estimée si tant est que les structures adjacentes présentent une captation plus faible que le tissu cible (contraste nécessaire pour toute imagerie). De ce fait, une captation importante par rapport aux tissus adjacents doit être obtenue, sans nécessairement une grande captation absolue, du fait de la grande sensibilité de l'imagerie nucléaire.

**Peptides.** Un peptide est une molécule présentant des caractéristiques favorable pour l'imagerie moléculaire. De par sa faible taille, il présente une cinétique d'élimination rapide. En supposant l'accessibilité et une fixation de haute affinité pour son ligand, il en résulte un bon contraste peu de temps après injection. De plus, sa production est aussi bien plus simple et moins coûteuse que ne serait celle par exemple d'un anticorps spécifique, qui par ailleurs ne présenterait pas les avantages du peptide en termes pharmacocinétiques. Le problème de stabilité plasmatique observée pour un grand nombre de peptides en raison de leur sensibilité aux peptidases peut être pallié par diverses stratégies (Mason 2010), notamment l'utilisation d'acides aminés de série D (Schumacher *et al.* 1996).

**Analogue du glucose.** Le FDG, analogue non hydrolysable du glucose, présente une distribution équivalente à celle de cet ose simple, dans l'ensemble de l'organisme. Une captation très variable en fonction des conditions métaboliques est observée dans les différents tissus. La cinétique sanguine de la fraction non captée (20%) présente une demi-vie sanguine courte ( $\sim 16$  min). Il en résulte un bon contraste dans les tissus présentant un fort métabolisme glucidique dès 30 min p.i. (données chez l'homme : (Swanson, Chilton, et Thrall 1990)).

### 4.3.2 Cibles de l'imagerie

**Inflammation comme critère de vulnérabilité ciblé.** L'inflammation, critère majeur de vulnérabilité (Naghavi *et al.* 2003a), a été retenu comme le plus susceptible d'être visualisé par une

## Partie expérimentale : Imagerie

approche d'imagerie moléculaire. En effet, la taille du corps nécrotique, l'épaisseur de la capsule fibreuse et le degré de sténose sont des critères morphologiques ne se prêtant que mal à une approche consistant à imager un processus moléculaire spécifique. D'autre part, le modèle animal d'étude ne présente qu'une pertinence limitée pour rendre compte de ces critères car les lésions rencontrées ne miment pas assez étroitement les lésions humaines pour lesquels ces critères ont été définis (Bentzon et Falk 2010). Le mécanisme inflammatoire est quant à lui analogue à ce qui est observé chez l'homme. La fissuration de plaque est un autre critère majeur de vulnérabilité ; l'étude de la vulnérabilité *via* ce critère sur un modèle murin apparaît comme peu pertinent. En effet, dans ce modèle animal, la rupture et la fissuration font l'objet d'importantes controverses (Schwartz *et al.* 2007). Enfin, la dénudation endothéliale en présence d'agrégation plaquettaire superficielle, dernier critère majeur de vulnérabilité, est peu favorable à une approche d'imagerie moléculaire. Il s'agit d'un type de plaques vulnérables distinct, pas sujet à la rupture, et qui est responsable d'une minorité d'événements coronaires (Falk *et al.* 2013). De plus, l'érosion de plaque (associé à la présence de thrombus) n'a pas été rapportée dans le modèle murin d'athérosclérose utilisé ici (Bentzon et Falk 2010).

**VCAM-1.** La molécule d'adhésion VCAM-1 joue un rôle majeur dans l'initiation du processus inflammatoire impliqué dans la pathologie athéromateuse. L'expression précoce de VCAM-1 par les cellules endothéliales présente une implication majeure dans l'initiation de la pathologie (Ley et Huo 2001). Au sein de lésions athéromateuses développées, l'expression de VCAM-1 n'est pas restreinte uniquement à l'endothélium artériel. En effet, l'expression de VCAM-1 a été décrite au niveau des cellules musculaires lisses présentes dans le tissu néo-intimal, de l'endothélium des néo-vaisseaux ainsi qu'au niveau des cellules inflammatoires (O'Brien *et al.* 1996). L'expression de VCAM-1 est sous le contrôle de signaux pro-inflammatoires (Osborn *et al.* 1989). Il en résulte que l'expression de VCAM-1 reflète l'état inflammatoire des lésions d'athérome. L'imagerie utilisant un radiotracer spécifique de VCAM-1 renseigne sur l'inflammation des plaques et donc leur vulnérabilité. Des études d'imagerie de l'athérosclérose ciblant VCAM-1 ont été réalisées *via* diverses modalités telles que l'imagerie ultrasonore (Kaufmann *et al.* 2007), la MRI (McAteer *et al.* 2007; McAteer *et al.* 2008) ou encore l'imagerie nucléaire (Nahrendorf *et al.* 2009; Broisat *et al.* 2012) (développé en partie Revue Bibliographique 3.3).

**Métabolisme glucidique.** Le FDG est décrit pour s'accumuler dans les cellules présentant un important métabolisme glucidique, ce qui est le cas des cellules inflammatoires présentes dans les plaques d'athérome (Sheikine et Akram 2010). L'accumulation de FDG reflète donc l'état

## Partie expérimentale : Imagerie

inflammatoire des plaques. Cependant, ce traceur est peu spécifique et une captation dans des structures proches (relativement à la résolution spatiale de l'imagerie PET) peut être gênante pour rendre compte de l'inflammation. Ceci est notamment le cas pour l'imagerie du petit animal, comme montré dans l'étude présentée ici. Par ailleurs, la faible cellularité des lésions peut être responsable d'une faible captation de FDG (Laurberg *et al.* 2007). Cela peut être le cas de lésions vulnérables mais peu inflammatoires (e.g. présentant un large cœur nécrotique acellulaire et donc une densité de cellules relativement faible). La variabilité de captation de FDG dans différentes plaques a été rapportée chez l'homme, certaines lésions ne présentant pas de captation supérieure au tissu vasculaire contrôle (Okane *et al.* 2006). Ces observations combinées aux difficultés de réaliser l'imagerie coronaire en partie à cause du fort métabolisme glucidique cardiaque, pas systématiquement suffisamment diminué par régime (Wykrzykowska *et al.* 2009), montrent certaines limitations du FDG pour l'imagerie de l'athérosclérose. Son apport diagnostique ou en terme de suivi thérapeutique reste encore à déterminer (Sheikine et Akram 2010).

## 5 Conclusion

L'imagerie de l'athérome vulnérable est un enjeu majeur en imagerie cardiovasculaire. Dans cette optique, l'imagerie moléculaire de l'inflammation apparaît comme une approche très pertinente.

Une classe de traceurs peptidiques ciblant la molécule d'adhésion VCAM-1, surexprimée dans le contexte inflammatoire, a été évalué à la suite de travaux antérieurs encourageants. L'évaluation de ces peptides n'a pas permis de confirmer les résultats obtenus précédemment et a mis en évidence un défaut majeur de stabilité radiochimique. Compte tenu de ces résultats, le projet visant à développer un radiopharmaceutique destiné à l'imagerie de l'athérosclérose vulnérable sur la base de ce motif peptidique a été abandonné.

Par ailleurs, une étude visant à évaluer le FDG dans le modèle murin d'athérosclérose utilisé a été menée. La captation de FDG par cellules inflammatoires dans les lésions a bien été observée. Cependant, une forte captation au niveau du BAT péri-aortique a également été montrée. Ceci implique un faible contraste entre lésions athéromateuses et tissus adjacents, compromettant ainsi l'imagerie *in vivo* de l'athérosclérose au FDG dans ce modèle animal. En dépit de ceci, l'évaluation de l'inflammation des lésions murines avec le FDG, notamment par imagerie autoradiographie *ex vivo*, présente un intérêt évident dans le cadre d'étude pré-cliniques sur l'athérosclérose vulnérable.

## Références Bibliographiques

- Achenbach, S, S Ulzheimer, U Baum, M Kachelriess, D Ropers, T Giesler, W Bautz, W G Daniel, W A Kalender, et W Moshage. 2000. « Noninvasive Coronary Angiography by Retrospectively ECG-gated Multislice Spiral CT ». *Circulation* 102 (23) (décembre 5): 2823-2828.
- Achenbach, Stephan, Dieter Ropers, Axel Kuettner, Thomas Flohr, Bernd Ohnesorge, Herbert Bruder, Heike Theessen, Meri Karakaya, Werner G. Daniel, et Werner Bautz. 2006. « Contrast-enhanced coronary artery visualization by dual-source computed tomography—initial experience ». *European journal of radiology* 57 (3): 331–335.
- Agatston, A S, W R Janowitz, F J Hildner, N R Zusmer, M Viamonte Jr, et R Detrano. 1990. « Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography ». *Journal of the American College of Cardiology* 15 (4) (mars 15): 827-832.
- Ahmed, N, M Kansara, et M V Berridge. 1997. « Acute regulation of glucose transport in a monocyte-macrophage cell line: Glut-3 affinity for glucose is enhanced during the respiratory burst ». *The Biochemical journal* 327 ( Pt 2) (octobre 15): 369-375.
- Ahrens, Verena M, Kathrin Bellmann-Sickert, et Annette G Beck-Sickinger. 2012. « Peptides and peptide conjugates: therapeutics on the upward path ». *Future Medicinal Chemistry* 4 (12) (août): 1567-1586. doi:10.4155/fmc.12.76.
- Ait-Oufella, Hafid, Benoît L Salomon, Stéphane Potteaux, Anna-Karin L Robertson, Pierre Gourdy, Joffrey Zoll, Régine Merval, et al. 2006. « Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice ». *Nature medicine* 12 (2) (février): 178-180. doi:10.1038/nm1343.
- Akyildiz, Ali C., Lambert Speelman, Harald van Brummelen, Miguel A. Gutiérrez, Renu Virmani, Aad van der Lugt, Anton FW van der Steen, Jolanda J. Wentzel, et Frank JH Gijzen. 2011. « Effects of Intima Stiffness and Plaque Morphology on Peak Cap Stress ». *BioMedical Engineering OnLine* 10 (1) (avril 8): 25. doi:10.1186/1475-925X-10-25.
- Alberto, Roger, Roger Schibli, André Egli, August P. Schubiger, Ulrich Abram, et Thomas A. Kaden. 1998. « A Novel Organometallic Aqua Complex of Technetium for the Labeling of Biomolecules: Synthesis of [99mTc(OH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> from [99mTcO<sub>4</sub>]<sup>-</sup> in Aqueous Solution and Its Reaction with a Bifunctional Ligand ». *Journal of the American Chemical Society* 120 (31) (août 1): 7987-7988. doi:10.1021/ja980745t.
- Almuhaideb, Ahmad, Nikolaos Papatheanasiou, et Jamshed Bomanji. 2011. « 18F-FDG PET/CT imaging in oncology ». *Annals of Saudi Medicine* 31 (1): 3. doi:10.4103/0256-4947.75771.
- Alón, Ronen, Daniel A. Hammer, et Timothy A. Springer. 1995. « Lifetime of the P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow ». *Nature* 374 (6522): 539–542.
- Aloya, Revital, Anat Shirvan, Hagit Grimberg, Ayelet Reshef, Galit Levin, Dvora Kidron, Avi Cohen, et Ilan Ziv. 2006. « Molecular imaging of cell death in vivo by a novel small molecule probe ». *Apoptosis* 11 (12): 2089–2101.
- Amirbekian, V., M. J. Lipinski, K. C. Briley-Saebo, S. Amirbekian, J. G. S. Aguinaldo, D. B. Weinreb, E. Vucic, et al. 2007. « Detecting and assessing macrophages in vivo to evaluate atherosclerosis noninvasively using molecular MRI ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (3) (janvier 10): 961-966. doi:10.1073/pnas.0606281104.
- Amirbekian, Vardan, Juan Gilberto S. Aguinaldo, Smbat Amirbekian, Fabien Hyafil, Esad Vucic, Marc Sirol, David B. Weinreb, et al. 2009. « Atherosclerosis and Matrix Metalloproteinases: Experimental Molecular MR Imaging in Vivo1 ». *Radiology* 251 (2) (janvier 5): 429-438. doi:10.1148/radiol.2511080539.

## Références Bibliographiques

- Anrather, Josef, Gianfranco Racchumi, et Costantino Iadecola. 2006. « NF- $\kappa$ B regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (9): 5657–5667.
- Araki, Masahiro, Jianglin Fan, et Teruo Watanabe. 1998. « Immunohistochemical localization of lipoprotein lipase and apolipoprotein E in human atherosclerotic lesions ». *Acta histochemica et cytochemica* 31 (6): 485–492.
- Araujo, F B, D S Barbosa, C Y Hsin, R C Maranhão, et D S Abdalla. 1995. « Evaluation of Oxidative Stress in Patients with Hyperlipidemia ». *Atherosclerosis* 117 (1) (septembre): 61-71.
- Arnold, Ludovic, Adeline Henry, Françoise Poron, Yasmine Baba-Amer, Nico van Rooijen, Anne Plonquet, Romain K Gherardi, et Bénédicte Chazaud. 2007. « Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis ». *The Journal of experimental medicine* 204 (5) (mai 14): 1057-1069. doi:10.1084/jem.20070075.
- Barger, A C, et R Beeuwkes 3rd. 1990. « Rupture of Coronary Vasa Vasorum as a Trigger of Acute Myocardial Infarction ». *The American Journal of Cardiology* 66 (16) (novembre 6): 41G-43G.
- Barger, A. Clifford, Reinier Beeuwkes, Lewis L. Lainey, et Kenneth J. Silverman. 1984. « Hypothesis: Vasa Vasorum and Neovascularization of Human Coronary Arteries ». *New England Journal of Medicine* 310 (3): 175-177. doi:10.1056/NEJM198401193100307.
- Barrett, S.R.H., M.P.F. Sutcliffe, S. Howarth, Z–Y. Li, et J.H. Gillard. 2009. « Experimental measurement of the mechanical properties of carotid atherothrombotic plaque fibrous cap ». *Journal of Biomechanics* 42 (11) (août 7): 1650-1655. doi:10.1016/j.jbiomech.2009.04.025.
- Bauer, Claudia, Ulrike Bauder-Wuest, Walter Mier, Uwe Haberkorn, et Michael Eisenhut. 2005. « 131I-labeled peptides as caspase substrates for apoptosis imaging ». *Journal of Nuclear Medicine* 46 (6): 1066–1074.
- Belcaro, G, A N Nicolaidis, G Ramaswami, M R Cesarone, M De Sanctis, L Incandela, P Ferrari, et al. 2001. « Carotid and Femoral Ultrasound Morphology Screening and Cardiovascular Events in Low Risk Subjects: a 10-year Follow-up Study (the CAFES-CAVE Study(1)) ». *Atherosclerosis* 156 (2) (juin): 379-387.
- Benditt, Earl P., et John M. Benditt. 1973. « Evidence for a Monoclonal Origin of Human Atherosclerotic Plaques ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70 (6) (janvier 6): 1753-1756.
- Bennett, Martin, Haixiang Yu, et Murray Clarke. 2012. « Signalling from dead cells drives inflammation and vessel remodelling ». *Vascular Pharmacology* 56 (5–6) (mai): 187-192. doi:10.1016/j.vph.2012.01.006.
- Bentzon, Jacob F, et Erling Falk. 2010. « Atherosclerotic lesions in mouse and man: is it the same disease? ». *Current Opinion in Lipidology* 21 (5) (octobre): 434-440. doi:10.1097/MOL.0b013e32833ded6a.
- Bentzon, Jacob F, Charlotte Weile, Claus S Sondergaard, Johnny Hindkjaer, Moustapha Kassem, et Erling Falk. 2006. « Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis Originate From the Local Vessel Wall and Not Circulating Progenitor Cells in ApoE Knockout Mice ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26 (12) (janvier 12): 2696-2702. doi:10.1161/01.ATV.0000247243.48542.9d.
- Berk, Bradford C., Vladimir Vekshtein, Helen M. Gordon, et Terutaka Tsuda. 1989. « Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. ». *Hypertension* 13 (4): 305–314.
- Berliner, Judith A., Mohamad Navab, Alan M. Fogelman, Joy S. Frank, Linda L. Demer, Peter A. Edwards, Andrew D. Watson, et Aldons J. Lusis. 1995. « Atherosclerosis: basic mechanisms oxidation, inflammation, and genetics ». *Circulation* 91 (9): 2488–2496.

## Références Bibliographiques

- Björkerud, Barbro, et Sören Björkerud. 1996. « Contrary Effects of Lightly and Strongly Oxidized LDL With Potent Promotion of Growth Versus Apoptosis on Arterial Smooth Muscle Cells, Macrophages, and Fibroblasts ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 16 (3) (janvier 3): 416-424. doi:10.1161/01.ATV.16.3.416.
- Bobryshev, Yuri V. 2005. « Transdifferentiation of smooth muscle cells into chondrocytes in atherosclerotic arteries in situ: implications for diffuse intimal calcification ». *The Journal of pathology* 205 (5): 641–650.
- Bonaterrea, Gabriel A., Stefanie Zugel, Joel Thogersen, Sabrina A. Walter, Uwe Haberkorn, Jens Strelau, et Ralf Kinscherf. 2012. « Growth Differentiation Factor-15 Deficiency Inhibits Atherosclerosis Progression by Regulating Interleukin-6-Dependent Inflammatory Response to Vascular Injury ». *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease* 1 (6) (décembre 19). doi:10.1161/JAHA.112.002550. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3540664/>.
- Bond, Andrew R., et Christopher L. Jackson. 2011. « The Fat-Fed Apolipoprotein E Knockout Mouse Brachiocephalic Artery in the Study of Atherosclerotic Plaque Rupture ». *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011. doi:10.1155/2011/379069. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2975993/>.
- Borén, Jan, Katherine Olin, Isabelle Lee, Alan Chait, Thomas N. Wight, et Thomas L. Innerarity. 1998. « Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. » *Journal of Clinical Investigation* 101 (12): 2658.
- Boström, K, K E Watson, S Horn, C Wortham, I M Herman, et L L Demer. 1993. « Bone Morphogenetic Protein Expression in Human Atherosclerotic Lesions ». *The Journal of Clinical Investigation* 91 (4) (avril): 1800-1809. doi:10.1172/JC1116391.
- Boyle, Joseph J, Peter L Weissberg, et Martin R Bennett. 2003. « Tumor necrosis factor-alpha promotes macrophage-induced vascular smooth muscle cell apoptosis by direct and autocrine mechanisms ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23 (9) (septembre 1): 1553-1558. doi:10.1161/01.ATV.0000086961.44581.B7.
- Breyholz, H. J., S. Wagner, B. Levkau, O. Schober, M. Schäfers, et K. Kopka. 2007. « A 18F-radiolabeled analogue of CGS 27023A as a potential agent for assessment of matrix-metalloproteinase activity in vivo. » *The quarterly journal of nuclear medicine and molecular imaging: official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN)[and] the International Association of Radiopharmacology (IAR),[and] Section of the Society of..* 51 (1): 24–32.
- Briley-Saebo, Karen C., Tuyen Hoang Nguyen, Alexander M. Saeboe, Young-Seok Cho, Sung Kee Ryu, Eugenia Volkava, Stephen Dickson, Gregor Leibundgut, Philipp Weisner, et Simone Green. 2012. « In vivo detection of oxidation-specific epitopes in atherosclerotic lesions using biocompatible manganese molecular magnetic imaging probes ». *Journal of the American College of Cardiology* 59 (6): 616–626.
- Briley-Saebo, Karen C., Peter X. Shaw, Willem JM Mulder, Seung-Hyuk Choi, Esad Vucic, Juan Gilberto S. Aguinaldo, Joseph L. Witztum, Valentin Fuster, Sotirios Tsimikas, et Zahi A. Fayad. 2008. « Targeted molecular probes for imaging atherosclerotic lesions with magnetic resonance using antibodies that recognize oxidation-specific epitopes ». *Circulation* 117 (25): 3206–3215.
- Broisat, Alexis, Sophie Hernot, Jakub Toczek, Jens De Vos, Laurent M Riou, Sandrine Martin, Mitra Ahmadi, et al. 2012. « Nanobodies targeting mouse/human VCAM1 for the nuclear imaging of atherosclerotic lesions ». *Circulation research* 110 (7) (mars 30): 927-937. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.265140.

## Références Bibliographiques

- Broisat, Alexis, Laurent M Riou, V Ardisson, D Boturyn, P Dumy, D Fagret, et Catherine Ghezzi. 2007. « Molecular imaging of vascular cell adhesion molecule-1 expression in experimental atherosclerotic plaques with radiolabelled B2702-p ». *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 34 (6) (juin): 830-840. doi:10.1007/s00259-006-0310-4.
- Broisat, Alexis, Jakub Toczek, Nicolas Mesnier, Philippe Tracqui, Catherine Ghezzi, Jacques Ohayon, et Laurent M Riou. 2011. « Assessing low levels of mechanical stress in aortic atherosclerotic lesions from apolipoprotein E-/- mice--brief report ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31 (5) (mai): 1007-1010. doi:10.1161/ATVBAHA.111.225227.
- Brooks, Alan R., Peter I. Lelkes, et Gabor M. Rubanyi. 2002. « Gene Expression Profiling of Human Aortic Endothelial Cells Exposed to Disturbed Flow and Steady Laminar Flow ». *Physiological Genomics* 9 (1) (janvier 1): 27-41. doi:10.1152/physiolgenomics.00075.2001.
- Brown, M S, et J L Goldstein. 1997. « The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor ». *Cell* 89 (3) (mai 2): 331-340.
- Brown, M S, Y K Ho, et J L Goldstein. 1980. « The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells. Continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmic cholesteryl esters ». *The Journal of biological chemistry* 255 (19) (octobre 10): 9344-9352.
- Brown, Mark A., et Richard C. Semelka. 2011. *MRI: basic principles and applications*. Wiley. com. <http://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=oYOIH3YkuMC&oi=fnd&pg=PR9&dq=Magnetic+Resonance+Imaging:+Physical+Principles+and+Sequence+Design&ots=ZILkFzRkCN&sig=DM7LcwENncHOQIXcG38vTX6ZWL0>.
- Burke, Allen P., Andrew Farb, Gray T. Malcom, You-hui Liang, John Smialek, et Renu Virmani. 1997. « Coronary Risk Factors and Plaque Morphology in Men with Coronary Disease Who Died Suddenly ». *New England Journal of Medicine* 336 (18): 1276-1282. doi:10.1056/NEJM199705013361802.
- Burke, Allen P., Frank D. Kolodgie, Andrew Farb, Deena K. Weber, Gray T. Malcom, John Smialek, et Renu Virmani. 2001. « Healed Plaque Ruptures and Sudden Coronary Death Evidence That Subclinical Rupture Has a Role in Plaque Progression ». *Circulation* 103 (7) (février 20): 934-940. doi:10.1161/01.CIR.103.7.934.
- Burke, Allen P., Frank D. Kolodgie, Arthur Zieske, David R. Fowler, Deena K. Weber, P. Jacob Varghese, Andrew Farb, et Renu Virmani. 2004. « Morphologic Findings of Coronary Atherosclerotic Plaques in Diabetics A Postmortem Study ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24 (7) (janvier 7): 1266-1271. doi:10.1161/01.ATV.0000131783.74034.97.
- Burleigh, Mary C., Adrian D. Briggs, Corinne L. Lendon, Michael J. Davies, Gustav V.R. Born, et Peter D. Richardson. 1992. « Collagen types I and III, collagen content, GAGs and mechanical strength of human atherosclerotic plaque caps: span-wise variations ». *Atherosclerosis* 96 (1) (septembre): 71-81.
- Burtea, Carmen, Sébastien Ballet, Sophie Laurent, Olivier Rousseaux, Anne Dencausse, Walter Gonzalez, Marc Port, Claire Corot, Luce Vander Elst, et Robert N. Muller. 2012. « Development of a magnetic resonance imaging protocol for the characterization of atherosclerotic plaque by using vascular cell adhesion molecule-1 and apoptosis-targeted ultrasmall superparamagnetic iron oxide derivatives ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32 (6): e36–e48.
- Burton, Alan C. 1954. « Relation of Structure to Function of the Tissues of the Wall of Blood Vessels ». *Physiological Reviews* 34 (4) (janvier 10): 619-642.
- Cai, Hua, et David G. Harrison. 2000. « Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress ». *Circulation Research* 87 (10) (octobre 11): 840-844. doi:10.1161/01.RES.87.10.840.

## Références Bibliographiques

- Cai, Jianming, Thomas S. Hatsukami, Marina S. Ferguson, William S. Kerwin, Tobias Saam, Baocheng Chu, Norihide Takaya, Nayak L. Polissar, et Chun Yuan. 2005. « In vivo quantitative measurement of intact fibrous cap and lipid-rich necrotic core size in atherosclerotic carotid plaque ». *Circulation* 112 (22): 3437–3444.
- Calara, Federico, Mercedes Silvestre, Florencia Casanada, Natalie Yuan, Claudio Napoli, et Wulf Palinski. 2001. « Spontaneous Plaque Rupture and Secondary Thrombosis in Apolipoprotein E-deficient and LDL Receptor-deficient Mice ». *The Journal of Pathology* 195 (2): 257–263. doi:10.1002/path.915.
- Calkin, Anna C., et Peter Tontonoz. 2010. « Liver x receptor signaling pathways and atherosclerosis ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30 (8): 1513–1518.
- Callister, T Q, B Cooil, S P Raya, N J Lippolis, D J Russo, et P Raggi. 1998. « Coronary artery disease: improved reproducibility of calcium scoring with an electron-beam CT volumetric method ». *Radiology* 208 (3) (septembre): 807-814.
- Camejo, G, F Lalaguna, F López, et R Starosta. 1980. « Characterization and Properties of a Lipoprotein-complexing Proteoglycan from Human Aorta ». *Atherosclerosis* 35 (3) (mars): 307-320.
- Camejo, G., G. Fager, B. Rosengren, E. Hurt-Camejo, et G. Bondjers. 1993. « Binding of Low Density Lipoproteins by Proteoglycans Synthesized by Proliferating and Quiescent Human Arterial Smooth Muscle Cells. » *Journal of Biological Chemistry* 268 (19) (mai 7): 14131-14137.
- Camici, Paolo G, Ornella E Rimoldi, Oliver Gaemperli, et Peter Libby. 2012. « Non-invasive anatomic and functional imaging of vascular inflammation and unstable plaque ». *European heart journal* 33 (11) (juin): 1309-1317. doi:10.1093/eurheartj/ehs067.
- Campbell, Ian C, Daiana Weiss, Jonathan D Suever, Renu Virmani, Alessandro Veneziani, Raymond P Vito, John N Oshinski, et W Robert Taylor. 2013. « Biomechanical Modeling and Morphology Analysis Indicates Plaque Rupture Due to Mechanical Failure Unlikely in Atherosclerosis-prone Mice ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 304 (3) (février 1): H473-486. doi:10.1152/ajpheart.00620.2012.
- Campbell, J H, et G R Campbell. 1994. « The role of smooth muscle cells in atherosclerosis ». *Current opinion in lipidology* 5 (5) (octobre): 323-330.
- Canat, Xavier, Anne Guillaumont, Monsif Bouaboula, Caroline Poinot-Chazel, Jean-Marie Derocq, Pierre Carayon, Gerard Le Fur, et Pierre Casellas. 1993. « Peripheral benzodiazepine receptor modulation with phagocyte differentiation ». *Biochemical pharmacology* 46 (3): 551–554.
- Cannon, Barbara, et Jan Nedergaard. 2004. « Brown adipose tissue: function and physiological significance ». *Physiological reviews* 84 (1) (janvier): 277-359. doi:10.1152/physrev.00015.2003.
- Cardamone, L., A. Valentin, J.F. Eberth, et J.D. Humphrey. 2009. « Origin of Axial Prestretch and Residual Stress in Arteries ». *Biomechanics and modeling in mechanobiology* 8 (6) (décembre): 431-446. doi:10.1007/s10237-008-0146-x.
- Carew, Thomas E., Ramesh N. Vaishnav, et Dali J. Patel. 1968. « Compressibility of the Arterial Wall ». *Circulation Research* 23 (1) (janvier 7): 61-68. doi:10.1161/01.RES.23.1.61.
- Carmeliet, Peter, et Rakesh K. Jain. 2000. « Angiogenesis in Cancer and Other Diseases ». *Nature* 407 (6801) (septembre 14): 249-257. doi:10.1038/35025220.
- Carta, Luca, Jessica E. Wagenseil, Russell H. Knutsen, Boubacar Mariko, Gilles Faury, Elaine C. Davis, Barry Starcher, Robert P. Mecham, et Francesco Ramirez. 2009. « Discrete contributions of elastic fiber components to arterial development and mechanical compliance ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29 (12) (décembre): 2083-2089. doi:10.1161/ATVBAHA.109.193227.

## Références Bibliographiques

- Cavalcante, João L., João A.C. Lima, Alban Redheuil, et Mouaz H. Al-Mallah. 2011. « Aortic Stiffness Current Understanding and Future Directions ». *Journal of the American College of Cardiology* 57 (14) (avril 5): 1511-1522. doi:10.1016/j.jacc.2010.12.017.
- Celermajer, D.S., K.E. Sorensen, V.M. Gooch, O.I. Miller, I.D. Sullivan, J.K. Lloyd, J.E. Deanfield, et D.J. Spiegelhalter. 1992. « Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis ». *The Lancet* 340 (8828) (novembre 7): 1111-1115. doi:10.1016/0140-6736(92)93147-F.
- Chai, Chen-Ket, Ali C. Akyildiz, Lambert Speelman, Frank JH Gijzen, Cees WJ Oomens, Marc RHM van Sambeek, Aad van der Lugt, et Frank Baaijens. 2013. « Local axial compressive mechanical properties of human carotid atherosclerotic plaques—characterisation by indentation test and inverse finite element analysis ». *Journal of biomechanics*.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021929013001334>.
- Chait, A, et T N Wight. 2000. « Interaction of native and modified low-density lipoproteins with extracellular matrix ». *Current opinion in lipidology* 11 (5) (octobre): 457-463.
- Chamley-Campbell, Julie H., et Gordon R. Campbell. 1981. « What controls smooth muscle phenotype? » *Atherosclerosis* 40 (3-4) (novembre): 347-357. doi:10.1016/0021-9150(81)90145-3.
- Chang, Mary Y., Susan Potter-Perigo, Christina Tsoi, Alan Chait, et Thomas N. Wight. 2000. « Oxidized Low Density Lipoproteins Regulate Synthesis of Monkey Aortic Smooth Muscle Cell Proteoglycans That Have Enhanced Native Low Density Lipoprotein Binding Properties ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (7) (février 18): 4766-4773. doi:10.1074/jbc.275.7.4766.
- Chang, Mi-Kyung, Claes Bergmark, Aino Laurila, Sohvi Hökkö, Ki-Hoon Han, Peter Friedman, Edward A. Dennis, et Joseph L. Witztum. 1999. « Monoclonal Antibodies Against Oxidized Low-density Lipoprotein Bind to Apoptotic Cells and Inhibit Their Phagocytosis by Elicited Macrophages: Evidence That Oxidation-specific Epitopes Mediate Macrophage Recognition ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (11) (mai 25): 6353-6358. doi:10.1073/pnas.96.11.6353.
- Chatzizisis, Yiannis S., A. B. Baker, G. K. Sukhova, K. C. Koskinas, M. I. Papafakis, R. Beigel, M. Jonas, et al. 2011. « Augmented Expression and Activity of Extracellular Matrix-Degrading Enzymes in Regions of Low Endothelial Shear Stress Colocalize With Coronary Atheromata With Thin Fibrous Caps in Pigs ». *Circulation* 123 (6) (janvier 31): 621-630. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.970038.
- Chatzizisis, Yiannis S., Ahmet Umit Coskun, Michael Jonas, Elazer R. Edelman, Charles L. Feldman, et Peter H. Stone. 2007. « Role of Endothelial Shear Stress in the Natural History of Coronary Atherosclerosis and Vascular Remodeling Molecular, Cellular, and Vascular Behavior ». *Journal of the American College of Cardiology* 49 (25) (juin 26): 2379-2393. doi:10.1016/j.jacc.2007.02.059.
- Chen, Ian Y., et Joseph C. Wu. 2011. « Cardiovascular Molecular Imaging Focus on Clinical Translation ». *Circulation* 123 (4): 425-443.
- Chen, Jiqui, Ching-Hsuan Tung, Umar Mahmood, Vasilis Ntziachristos, Robert Gyurko, Mark C. Fishman, Paul L. Huang, et Ralph Weissleder. 2002. « In Vivo Imaging of Proteolytic Activity in Atherosclerosis ». *Circulation* 105 (23) (novembre 6): 2766-2771. doi:10.1161/01.CIR.0000017860.20619.23.
- Cheng, Caroline, Dennie Tempel, Rien van Haperen, Arjen van der Baan, Frank Grosveld, Mat J. A. P. Daemen, Rob Krams, et Rini de Crom. 2006. « Atherosclerotic Lesion Size and Vulnerability Are Determined by Patterns of Fluid Shear Stress ». *Circulation* 113 (23) (juin 13): 2744-2753. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.590018.
- Cheng, Gang, Drew A Torigan, Hongming Zhuang, et Abass Alavi. 2013. « When should we recommend use of dual time-point and delayed time-point imaging techniques in FDG PET? » *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* (janvier 30). doi:10.1007/s00259-

## Références Bibliographiques

013-2343-9.

- Cheng, George C., H. M. Loree, R. D. Kamm, M. C. Fishbein, et Richard T. Lee. 1993. « Distribution of Circumferential Stress in Ruptured and Stable Atherosclerotic Lesions. A Structural Analysis with Histopathological Correlation. » *Circulation* 87 (4) (janvier 4): 1179-1187. doi:10.1161/01.CIR.87.4.1179.
- Cheng, Victor Y., Piotr J. Slomka, Ludovic Le Meunier, Balaji K. Tamarappoo, Ryo Nakazato, Damini Dey, et Daniel S. Berman. 2012. « Coronary Arterial 18F-FDG Uptake by Fusion of PET and Coronary CT Angiography at Sites of Percutaneous Stenting for Acute Myocardial Infarction and Stable Coronary Artery Disease ». *Journal of Nuclear Medicine* 53 (4) (avril 1): 575-583. doi:10.2967/jnumed.111.097550.
- Chisolm, Guy M., et Daniel Steinberg. 2000. « The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview ». *Free radical biology and medicine* 28 (12): 1815–1826.
- Chiu, Jeng-Jiann, et Shu Chien. 2011. « Effects of Disturbed Flow on Vascular Endothelium: Pathophysiological Basis and Clinical Perspectives ». *Physiological Reviews* 91 (1) (janvier 1): 327-387. doi:10.1152/physrev.00047.2009.
- Choi, Yun-Seok, Ho-Joong Youn, Woo-Baek Chung, Hui-Jeong Hwang, Dong-Hyeon Lee, Chul-Soo Park, Jae-Beom Lee, et al. 2011. « Uptake of F-18 FDG and ultrasound analysis of carotid plaque ». *Journal of nuclear cardiology: official publication of the American Society of Nuclear Cardiology* 18 (2) (avril): 267-272. doi:10.1007/s12350-011-9338-3.
- Chuong, C. J., et Y. C. Fung. 1986. « Residual Stress in Arteries ». In *Frontiers in Biomechanics*, édité par G. W. Schmid-Schönbein, S. L.-Y. Woo, et B. W. Zweifach, 117-129. Springer New York. [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4612-4866-8\\_9](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4612-4866-8_9).
- Cinamon, Guy, Vera Shinder, Revital Shamri, et Ronen Alon. 2004. « Chemoattractant Signals and Beta 2 Integrin Occupancy at Apical Endothelial Contacts Combine with Shear Stress Signals to Promote Transendothelial Neutrophil Migration ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173 (12) (décembre 15): 7282-7291.
- Clark, J M, et S Glagov. 1985. « Transmural Organization of the Arterial Media. The Lamellar Unit Revisited ». *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)* 5 (1) (février): 19-34.
- Clarke, Murray C. H., Nichola Figg, Janet J. Maguire, Anthony P. Davenport, Martin Goddard, Trevor D. Littlewood, et Martin R. Bennett. 2006. « Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells Induces Features of Plaque Vulnerability in Atherosclerosis ». *Nature Medicine* 12 (9) (septembre): 1075-1080. doi:10.1038/nm1459.
- Clayberger, C, S C Lyu, P Pouletty, et A M Krensky. 1993. « Peptides corresponding to T-cell receptor-HLA contact regions inhibit class I-restricted immune responses ». *Transplantation proceedings* 25 (1 Pt 1) (février): 477-478.
- Clayberger, C, M Rosen, P Parham, et A M Krensky. 1990. « Recognition of an HLA public determinant (Bw4) by human allogeneic cytotoxic T lymphocytes ». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 144 (11) (juin 1): 4172-4176.
- Cocker, Myra S, Brian Mc Ardle, J David Spence, Cheemun Lum, Robert R Hammond, Deidre C Ongaro, Matthew A McDonald, Robert A Dekemp, Jean-Claude Tardif, et Rob S B Beanlands. 2012. « Imaging atherosclerosis with hybrid [(18)F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography imaging: what Leonardo da Vinci could not see ». *Journal of nuclear cardiology: official publication of the American Society of Nuclear Cardiology* 19 (6) (décembre): 1211-1225. doi:10.1007/s12350-012-9631-9.
- Coleman, Raymond, Tony Hayek, Shlomo Keidar, et Michael Aviram. 2006. « A mouse model for human atherosclerosis: Long-term histopathological study of lesion development in the aortic arch

## Références Bibliographiques

of apolipoprotein E-deficient (E0) mice ». *Acta Histochemica* 108 (6) (décembre 6): 415-424. doi:10.1016/j.acthis.2006.07.002.

- Coli, Stefano, Marco Magnoni, Giuseppe Sangiorgi, Massimiliano M. Marrocco-Trischitta, Giulio Melisurgo, Alessandro Mauriello, Luigi Spagnoli, Roberto Chiesa, Domenico Cianflone, et Attilio Maseri. 2008. « Contrast-Enhanced Ultrasound Imaging of Intraplaque Neovascularization in Carotid Arteries: Correlation With Histology and Plaque Echogenicity ». *Journal of the American College of Cardiology* 52 (3) (juillet 15): 223-230. doi:10.1016/j.jacc.2008.02.082.
- Collins, M.J., M. Bersi, E. Wilson, et J.D. Humphrey. 2011. « Mechanical Properties of Suprarenal and Infrarenal Abdominal Aorta: Implications for Mouse Models of Aneurysms ». *Medical engineering & physics* 33 (10) (décembre): 1262-1269. doi:10.1016/j.medengphy.2011.06.003.
- Combadière, Christophe, Stéphane Potteaux, Mathieu Rodero, Tabassome Simon, Adeline Pezard, Bruno Esposito, Régine Merval, Amanda Proudfoot, Alain Tedgui, et Ziad Mallat. 2008. « Combined Inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 Abrogates Ly6Chi and Ly6Clo Monocytosis and Almost Abolishes Atherosclerosis in Hypercholesterolemic Mice ». *Circulation* 117 (13) (janvier 4): 1649-1657. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.745091.
- Constantindes, P, et R N Chakravarti. 1961. « Rabbit arterial thrombosis production by systemic procedures ». *Archives of pathology* 72 (août): 197-208.
- Cordes, Kimberly R., Neil T. Sheehy, Mark P. White, Emily C. Berry, Sarah U. Morton, Alecia N. Muth, Ting-Hein Lee, Joseph M. Miano, Kathryn N. Ivey, et Deepak Srivastava. 2009. « miR-145 and miR-143 Regulate Smooth Muscle Cell Fate and Plasticity ». *Nature* 460 (7256) (août 6): 705-710. doi:10.1038/nature08195.
- Curtiss, Linda K., et Peter S. Tobias. 2009. « Emerging role of Toll-like receptors in atherosclerosis ». *Journal of lipid research* 50 (Supplement): S340–S345.
- Cybulsky, M I, et M A Gimbrone Jr. 1991. « Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis ». *Science (New York, N.Y.)* 251 (4995) (février 15): 788-791.
- Cyrus, Tillmann, Joseph L. Witztum, Daniel J. Rader, Rajendra Tangirala, Sergio Fazio, MacRae F. Linton, et Colin D. Funk. 1999. « Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice ». *Journal of Clinical Investigation* 103 (11): 1597–1604.
- D'Agostino, Ralph B., Ramachandran S. Vasan, Michael J. Pencina, Philip A. Wolf, Mark Cobain, Joseph M. Massaro, et William B. Kannel. 2008. « General cardiovascular risk profile for use in primary care the Framingham Heart Study ». *Circulation* 117 (6): 743–753.
- Dangerfield, J., K. Y. Larbi, M.-T. Huang, A. Dewar, et S. Nourshargh. 2002. « PECAM-1 (CD31) Homophilic Interaction Up-Regulates  $\alpha$ 1 on Transmigrated Neutrophils In Vivo and Plays a Functional Role in the Ability of  $\alpha$ 6 Integrins to Mediate Leukocyte Migration through the Perivascular Basement Membrane ». *Journal of Experimental Medicine* 196 (9) (novembre 4): 1201-1212. doi:10.1084/jem.20020324.
- Darling, Eric M., Stefan Zauscher, Joel A. Block, et Farshid Guilak. 2007. « A Thin-Layer Model for Viscoelastic, Stress-Relaxation Testing of Cells Using Atomic Force Microscopy: Do Cell Properties Reflect Metastatic Potential? ». *Biophysical Journal* 92 (5) (mars 1): 1784-1791. doi:10.1529/biophysj.106.083097.
- Dauzat, Michel, Jean-Pierre Laroche, Antonia Pérez-Martin, Iris Schuster, Gudrun Böge, et Isabelle Quéré. 2013. « Supports d'enseignement consacrés à l'Ultrasonographie Vasculaire ». Site de l'Université Montpellier 1 – Faculté de Médecine de Montpellier – Nîmes. <http://ultrasonographie-vasculaire.etud.univ-montp1.fr/>.
- Davie, Earl W., Kazuo Fujikawa, et Walter Kisiel. 1991. « The coagulation cascade: initiation,

## Références Bibliographiques

- maintenance, and regulation ». *Biochemistry* 30 (43) (octobre 1): 10363-10370. doi:10.1021/bi00107a001.
- Davies, H S, S G Pollard, et R Y Calne. 1989. « Soluble HLA antigens in the circulation of liver graft recipients ». *Transplantation* 47 (3) (mars): 524-527.
- Davies, Michael J. 1990. « A Macro and Micro View of Coronary Vascular Insult in Ischemic Heart Disease ». *Circulation* 82 (3 Suppl) (septembre): II38-46.
- . 2000. « The Pathophysiology of Acute Coronary Syndromes ». *Heart* 83 (3) (janvier 3): 361-366. doi:10.1136/heart.83.3.361.
- Davies, Michael J., P. D. Richardson, N. Woolf, D. R. Katz, et Jessica Mann. 1993. « Risk of Thrombosis in Human Atherosclerotic Plaques: Role of Extracellular Lipid, Macrophage, and Smooth Muscle Cell Content. » *British Heart Journal* 69 (5) (janvier 5): 377-381. doi:10.1136/hrt.69.5.377.
- Davies, Michael J., et Anthony C Thomas. 1985. « Plaque Fissuring--the Cause of Acute Myocardial Infarction, Sudden Ischaemic Death, and Crescendo Angina ». *British Heart Journal* 53 (4) (avril): 363-373.
- Davies, Peter F. 1995. « Flow-Mediated Endothelial Mechanotransduction ». *Physiological Reviews* 75 (3) (juillet): 519.
- Dawber, Thomas R., Gilcin F. Meadors, et Felix E. Moore. 1951. « Epidemiological Approaches to Heart Disease: The Framingham Study ». *American Journal of Public Health and the Nations Health* 41 (3) (mars): 279-286.
- De Caterina, Raffaele, Peter Libby, Hai-Bing Peng, Victor J. Thannickal, T. B. Rajavashisth, M. A. Gimbrone Jr, W. Soo Shin, et James K. Liao. 1995. « Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. » *Journal of Clinical Investigation* 96 (1): 60.
- De Lemos, J., E. Braunwald, M. Blazing, S. Murphy, J. R. Downs, A. Gotto, M. Clearfield, H. Holdaas, D. Gordon, et B. Davis. 2010. « Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials ». *Lancet* 376 (9753): 1670-81.
- De Meyer, Inge, Wim Martinet, Dorien M. Schrijvers, Jean-Pierre Timmermans, Hidde Bult, et Guido R. Y. De Meyer. 2012. « Toll-like Receptor 7 Stimulation by Imiquimod Induces Macrophage Autophagy and Inflammation in Atherosclerotic Plaques ». *Basic Research in Cardiology* 107 (3) (mai 1): 1-13. doi:10.1007/s00395-012-0269-1.
- Deanfield, John E., Julian P. Halcox, et Ton J. Rabelink. 2007. « Endothelial Function and Dysfunction Testing and Clinical Relevance ». *Circulation* 115 (10) (mars 13): 1285-1295. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.652859.
- Decristoforo, Clemens, Bluma Faintuch-Linkowski, Ana Rey, Elisabeth von Guggenberg, Marco Rupprich, Ignacio Hernandez-Gonzales, Teodoro Rodrigo, et Roland Haubner. 2006. « [99mTc]HYNIC-RGD for imaging integrin  $\alpha\beta_3$  expression ». *Nuclear Medicine and Biology* 33 (8) (novembre): 945-952. doi:10.1016/j.nucmedbio.2006.09.001.
- Deguchi, Jun-O, Elena Aikawa, Peter Libby, Jeffrey R Vachon, Masaki Inada, Stephen M Krane, Peter Whittaker, et Masanori Aikawa. 2005. « Matrix Metalloproteinase-13/collagenase-3 Deletion Promotes Collagen Accumulation and Organization in Mouse Atherosclerotic Plaques ». *Circulation* 112 (17) (octobre 25): 2708-2715. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.562041.
- Deguchi, Jun-o, Masanori Aikawa, Ching-Hsuan Tung, Elena Aikawa, Dong-Eog Kim, Vasilis Ntziachristos, Ralph Weissleder, et Peter Libby. 2006. « Inflammation in Atherosclerosis Visualizing

## Références Bibliographiques

- Matrix Metalloproteinase Action in Macrophages In Vivo ». *Circulation* 114 (1) (avril 7): 55-62. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.619056.
- Delfino, A., N. Stergiopoulos, J.E. Moore Jr, et J.-J. Meister. 1997. « Residual strain effects on the stress field in a thick wall finite element model of the human carotid bifurcation ». *Journal of Biomechanics* 30 (8) (août): 777-786. doi:10.1016/S0021-9290(97)00025-0.
- Demer, Linda L., et Yin Tintut. 2008. « Vascular calcification pathobiology of a multifaceted disease ». *Circulation* 117 (22): 2938–2948.
- Demiray, Hilmi. 1972. « A note on the elasticity of soft biological tissues ». *Journal of Biomechanics* 5 (3) (mai): 309-311. doi:10.1016/0021-9290(72)90047-4.
- DiDonato, Deanna, et Dawn L. Brasaemle. 2003. « Fixation Methods for the Study of Lipid Droplets by Immunofluorescence Microscopy ». *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 51 (6) (juin 1): 773-780. doi:10.1177/002215540305100608.
- Dietschy, John M., et Stephen D. Turley. 2002. « Control of Cholesterol Turnover in the Mouse ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (6) (août 2): 3801-3804. doi:10.1074/jbc.R100057200.
- Dimastromatteo, Julien. 2010. « Evaluation de radiotraceurs spécifiques de la plaque d'athérome vulnérable et de l'angiogenèse myocardique ». Université de Grenoble. <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00487779>.
- Dimitriadis, Emiliós K., Ferenc Horkay, Julia Maresca, Bechara Kachar, et Richard S. Chadwick. 2002. « Determination of Elastic Moduli of Thin Layers of Soft Material Using the Atomic Force Microscope ». *Biophysical Journal* 82 (5) (mai): 2798-2810. doi:10.1016/S0006-3495(02)75620-8.
- Dimmeler, Stefanie, Ingrid Fleming, Beate Fisslthaler, Corinna Hermann, Rudi Busse, et Andreas M. Zeiher. 1999. « Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation ». *Nature* 399 (6736): 601–605.
- Dobrin, Philip B. 1978. « Mechanical Properties of Arteries. » *Physiological Reviews* 58 (2) (janvier 4): 397-460.
- Doran, Amanda C., Nahum Meller, et Coleen A. McNamara. 2008. « Role of Smooth Muscle Cells in the Initiation and Early Progression of Atherosclerosis ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28 (5) (janvier 5): 812-819. doi:10.1161/ATVBAHA.107.159327.
- Doring, Yvonne, et Alma Zernecke. 2012. « Plasmacytoid Dendritic Cells in Atherosclerosis ». *Frontiers in Physiology* 3 (juin 28). doi:10.3389/fphys.2012.00230. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3385355/>.
- Dubois, Raymond N., Steven B. Abramson, Leslie Crofford, Rajnish A. Gupta, Lee S. Simon, Leo BA Van De Putte, et Peter E. Lipsky. 1998. « Cyclooxygenase in biology and disease ». *The FASEB Journal* 12 (12): 1063–1073.
- Duewell, Peter, Hajime Kono, Katey J Rayner, Cherilyn M Sirois, Gregory Vladimer, Franz G Bauernfeind, George S Abela, et al. 2010. « NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals ». *Nature* 464 (7293) (avril 29): 1357-1361. doi:10.1038/nature08938.
- Dunphy, Mark P S, Alvin Freiman, Steven M Larson, et H William Strauss. 2005. « Association of vascular 18F-FDG uptake with vascular calcification ». *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine* 46 (8) (août): 1278-1284.
- Dweck, Marc R., Marcus W.L. Chow, Nikhil V. Joshi, Michelle C. Williams, Charlotte Jones, Alison M. Fletcher, Hamish Richardson, et al. 2012. « Coronary Arterial 18F-Sodium Fluoride Uptake A Novel Marker of Plaque Biology ». *Journal of the American College of Cardiology* 59 (17) (avril 24):

## Références Bibliographiques

1539-1548. doi:10.1016/j.jacc.2011.12.037.

- Ebenstein, D. M., et L. A. Pruitt. 2004. « Nanoindentation of soft hydrated materials for application to vascular tissues ». *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 69 (2): 222–232.
- Ebenstein, Donna M., et Lisa A. Pruitt. 2006. « Nanoindentation of biological materials ». *Nano Today* 1 (3) (août): 26-33. doi:10.1016/S1748-0132(06)70077-9.
- Egli, A, R Alberto, L Tannahill, R Schibli, U Abram, A Schaffland, R Waibel, et al. 1999. « Organometallic <sup>99m</sup>Tc-aquaion labels peptide to an unprecedented high specific activity ». *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine* 40 (11) (novembre): 1913-1917.
- Ehara, Shoichi, Yoshiki Kobayashi, Minoru Yoshiyama, Kenei Shimada, Yoshihisa Shimada, Daiju Fukuda, Yasuhiro Nakamura, et al. 2004. « Spotty Calcification Typifies the Culprit Plaque in Patients With Acute Myocardial Infarction An Intravascular Ultrasound Study ». *Circulation* 110 (22) (novembre 30): 3424-3429. doi:10.1161/01.CIR.0000148131.41425.E9.
- Elkin, Benjamin S., Evren U. Azeloglu, Kevin D. Costa, et Barclay Morrison III. 2007. « Mechanical Heterogeneity of the Rat Hippocampus Measured by Atomic Force Microscope Indentation ». *Journal of Neurotrauma* 24 (5) (mai): 812-822. doi:10.1089/neu.2006.0169.
- Esen Akkas, B, D Gökaslan, L Güner, et N Ilgin Karabacak. 2011. « FDG uptake in brown adipose tissue-a brief report on brown fat with FDG uptake mechanisms and quantitative analysis using dual-time-point FDG PET/CT ». *Revista española de medicina nuclear* 30 (1) (février): 14-18. doi:10.1016/j.remn.2010.05.006.
- Fadok, V A, D L Bratton, A Konowal, P W Freed, J Y Westcott, et P M Henson. 1998. « Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF ». *The Journal of clinical investigation* 101 (4) (février 15): 890-898. doi:10.1172/JCI1112.
- Falk, Erling. 1983. « Plaque rupture with severe pre-existing stenosis precipitating coronary thrombosis. Characteristics of coronary atherosclerotic plaques underlying fatal occlusive thrombi. » *British heart journal* 50 (2): 127–134.
- Falk, Erling, Masataka Nakano, Jacob Fog Bentzon, Alope V. Finn, et Renu Virmani. 2013. « Update on Acute Coronary Syndromes: The Pathologists' View ». *European Heart Journal* 34 (10) (juillet 3): 719-728. doi:10.1093/eurheartj/ehs411.
- Falk, Erling, Stephen M. Schwartz, Zorina S. Galis, et Michael E. Rosenfeld. 2007. « Putative Murine Models of Plaque Rupture ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27 (4) (janvier 4): 969-972. doi:10.1161/01.ATV.0000261572.33474.e0.
- Falk, Erling, Prediman K. Shah, et Valentin Fuster. 1995. « Coronary Plaque Disruption ». *Circulation* 92 (3) (janvier 8): 657-671. doi:10.1161/01.CIR.92.3.657.
- Farb, Andrew, Allen P. Burke, Anita L. Tang, Youhui Liang, Poonam Mannan, John Smialek, et Renu Virmani. 1996. « Coronary Plaque Erosion Without Rupture Into a Lipid Core A Frequent Cause of Coronary Thrombosis in Sudden Coronary Death ». *Circulation* 93 (7) (janvier 4): 1354-1363. doi:10.1161/01.CIR.93.7.1354.
- Fayad, Zahi A., Valentin Fuster, John T. Fallon, Timothy Jayasundera, Stephen G. Worthley, Gerard Helft, J. Gilberto Aguinaldo, Juan J. Badimon, et Samin K. Sharma. 2000. « Noninvasive in vivo human coronary artery lumen and wall imaging using black-blood magnetic resonance imaging ». *Circulation* 102 (5): 506–510.
- Feigl, E. O. 1983. « Coronary Physiology ». *Physiological Reviews* 63 (1) (janvier 1): 1-205.
- Feinstein, Steven B. 2004. « The Powerful Microbubble: From Bench to Bedside, from Intravascular

## Références Bibliographiques

- Indicator to Therapeutic Delivery System, and Beyond ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 287 (2) (août): H450-457. doi:10.1152/ajpheart.00134.2004.
- Feng, Dian, Janice A. Nagy, Kathryn Pyne, Harold F. Dvorak, et Ann M. Dvorak. 1998. « Neutrophils Emigrate from Venues by a Transendothelial Cell Pathway in Response to FMLP ». *The Journal of Experimental Medicine* 187 (6) (mars 16): 903-915. doi:10.1084/jem.187.6.903.
- Feng, Yajun, Jeong-Hee Yang, Hayden Huang, Scott P. Kennedy, Thomas G. Turi, John F. Thompson, Peter Libby, et Richard T. Lee. 1999. « Transcriptional profile of mechanically induced genes in human vascular smooth muscle cells ». *Circulation research* 85 (12): 1118–1123.
- Fielding, Christopher J., et P. E. Fielding. 1995. « Molecular physiology of reverse cholesterol transport. » *Journal of lipid research* 36 (2): 211–228.
- Finet, Gérard, Jacques Ohayon, et Gilles Rioufol. 2004. « Biomechanical Interaction Between Cap Thickness, Lipid Core Composition and Blood Pressure in Vulnerable Coronary Plaque: Impact on Stability or Instability ». *Coronary Artery Disease* 15 (1) (février): 13-20.
- Fischer, Andrew H, Kenneth A Jacobson, Jack Rose, et Rolf Zeller. 2008. « Cryosectioning Tissues ». *CSH Protocols* 2008: pdb.prot4991.
- Fitzgerald, Desmond J., Louis Roy, Francesca Catella, et Garret A. FitzGerald. 1986. « Platelet activation in unstable coronary disease. » *The New England journal of medicine* 315 (16): 983.
- Fitzgerald, P. J., T. A. Ports, et P. G. Yock. 1992. « Contribution of Localized Calcium Deposits to Dissection after Angioplasty. An Observational Study Using Intravascular Ultrasound. » *Circulation* 86 (1) (janvier 7): 64-70. doi:10.1161/01.CIR.86.1.64.
- Fleming, Ingrid. 2010. « Molecular Mechanisms Underlying the Activation of eNOS ». *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 459 (6) (mai): 793-806. doi:10.1007/s00424-009-0767-7.
- Fleming, Ingrid, Beate Fisslthaler, Stefanie Dimmeler, Bruce E. Kemp, et Rudi Busse. 2001. « Phosphorylation of Thr495 regulates Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity ». *Circulation research* 88 (11): e68–e75.
- Flood, Christofer, Maria Gustafsson, Robert E. Pitas, Lorenzo Arnaboldi, Rosemary L. Walzem, et Jan Borén. 2004. « Molecular mechanism for changes in proteoglycan binding on compositional changes of the core and the surface of low-density lipoprotein-containing human apolipoprotein B100 ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24 (3): 564–570.
- Flood, Christofer, Maria Gustafsson, Paul E. Richardson, Stephen C. Harvey, Jere P. Segrest, et Jan Borén. 2002. « Identification of the Proteoglycan Binding Site in Apolipoprotein B48 ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (35) (août 30): 32228-32233. doi:10.1074/jbc.M204053200.
- Florian, A., R. Jurcut, C. Ghingina, et J. Bogaert. 2011. « Cardiac Magnetic Resonance Imaging in Ischemic Heart Disease ». *Journal of Medicine and Life* 4 (4) (novembre 14): 330-345.
- Folco, Eduardo J, Yuri Sheikine, Viviane Z Rocha, Thomas Christen, Eugenia Shvartz, Galina K Sukhova, Marcelo F Di Carli, et Peter Libby. 2011. « Hypoxia but not inflammation augments glucose uptake in human macrophages: Implications for imaging atherosclerosis with 18fluorine-labeled 2-deoxy-D-glucose positron emission tomography ». *Journal of the American College of Cardiology* 58 (6) (août 2): 603-614. doi:10.1016/j.jacc.2011.03.044.
- Fonseca, Vivian A. 2010. « Effects of beta-blockers on glucose and lipid metabolism ». *Current medical research and opinion* 26 (3) (mars): 615-629. doi:10.1185/03007990903533681.
- Förstermann, Ulrich, et Thomas Münzel. 2006. « Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease From Marvel to Menace ». *Circulation* 113 (13) (avril 4): 1708-1714. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.602532.

## Références Bibliographiques

- Fox, Kim, Maria Angeles Alonso Garcia, Diego Ardissino, Pawel Buszman, Paolo G. Camici, Filippo Crea, Caroline Daly, et al. 2006. « Guidelines on the Management of Stable Angina Pectoris: Executive Summary The Task Force on the Management of Stable Angina Pectoris of the European Society of Cardiology ». *European Heart Journal* 27 (11) (janvier 6): 1341-1381. doi:10.1093/eurheartj/ehl001.
- Framingham Heart Study. 2013. « History of the Framingham Heart Study ». *Framingham Heart Study website*. <http://www.framinghamheartstudy.org/about/history.html>.
- Frank, Otto. 1899. « Die Grundform des arteriellen Pulses erste Abhandlung: mathematische Analyse » 37: 483-526.
- Frank, Philippe G, Stephanos Pavlides, et Michael P Lisanti. 2009. « Caveolae and transcytosis in endothelial cells: role in atherosclerosis ». *Cell and tissue research* 335 (1) (janvier): 41-47. doi:10.1007/s00441-008-0659-8.
- Frutkin, Andrew D., Goro Otsuka, April Stempien-Otero, Casilde Sesti, Liang Du, Mia Jaffe, Helen L. Dichek, et al. 2009. « TGF- $\beta$ 1 Limits Plaque Growth, Stabilizes Plaque Structure, and Prevents Aortic Dilatation in Apolipoprotein E-Null Mice ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29 (9) (septembre): 1251-1257. doi:10.1161/ATVBAHA.109.186593.
- Fueger, Barbara J, Johannes Czernin, Isabel Hildebrandt, Chris Tran, Benjamin S Halpern, David Stout, Michael E Phelps, et Wolfgang A Weber. 2006. « Impact of animal handling on the results of 18F-FDG PET studies in mice ». *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine* 47 (6) (juin): 999-1006.
- Fujimoto, Shinichiro, Dagmar Hartung, Satoru Ohshima, D. Scott Edwards, Jun Zhou, Padmaja Yalamanchili, Michael Azure, et al. 2008. « Molecular Imaging of Matrix Metalloproteinase in Atherosclerotic Lesions: Resolution With Dietary Modification and Statin Therapy ». *Journal of the American College of Cardiology* 52 (23) (décembre 2): 1847-1857. doi:10.1016/j.jacc.2008.08.048.
- Fulton, David, Jean-Philippe Gratton, Timothy J. McCabe, Jason Fontana, Yasushi Fujio, Kenneth Walsh, Thomas F. Franke, Andreas Papapetropoulos, et William C. Sessa. 1999. « Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt ». *Nature* 399 (6736): 597-601.
- Fung, Y C, et S Q Liu. 1989. « Change of Residual Strains in Arteries Due to Hypertrophy Caused by Aortic Constriction ». *Circulation Research* 65 (5) (novembre): 1340-1349.
- Fung, Y. C., K. Fronek, et P. Patitucci. 1979. « Pseudoelasticity of Arteries and the Choice of Its Mathematical Expression ». *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 237 (5) (janvier 11): H620-H631.
- Furchgott, R F, et J V Zawadzki. 1980. « The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine ». *Nature* 288 (5789) (novembre 27): 373-376.
- Furie, Bruce, et Barbara C. Furie. 2008. « Mechanisms of thrombus formation ». *New England Journal of Medicine* 359 (9): 938-949.
- Fuster, Valentin, Pedro R. Moreno, Zahi A. Fayad, Roberto Corti, et Juan J. Badimon. 2005. « Atherothrombosis and High-Risk Plaque Part I: Evolving Concepts ». *Journal of the American College of Cardiology* 46 (6) (septembre 20): 937-954. doi:10.1016/j.jacc.2005.03.074.
- Gaemperli, Oliver, Joseph Shalhoub, David RJ Owen, Frederic Lamare, Saga Johansson, Naghmeh Fouladi, Alun H. Davies, Ornella E. Rimoldi, et Paolo G. Camici. 2012. « Imaging intraplaque inflammation in carotid atherosclerosis with 11C-PK11195 positron emission tomography/computed tomography ». *European heart journal* 33 (15): 1902-1910.
- Galis, Zorina S., Chad Johnson, Denis Godin, Richard Magid, J. Michael Shipley, Robert M. Senior, et

## Références Bibliographiques

- Eugen Ivan. 2002. « Targeted Disruption of the Matrix Metalloproteinase-9 Gene Impairs Smooth Muscle Cell Migration and Geometrical Arterial Remodeling ». *Circulation Research* 91 (9) (janvier 11): 852-859. doi:10.1161/01.RES.0000041036.86977.14.
- Galis, Zorina S., et J.J. Khatri. 2002. « Matrix Metalloproteinases in Vascular Remodeling and Atherogenesis: The Good, the Bad, and the Ugly ». *Circulation Research* 90 (3): 251-262.
- Galis, Zorina S., G K Sukhova, M W Lark, et P Libby. 1994. « Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques ». *The Journal of clinical investigation* 94 (6) (décembre): 2493-2503. doi:10.1172/JCI117619.
- Gallagher, B M, J S Fowler, N I Gutterson, R R MacGregor, C N Wan, et A P Wolf. 1978. « Metabolic trapping as a principle of radiopharmaceutical design: some factors responsible for the biodistribution of [18F] 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose ». *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine* 19 (10) (octobre): 1154-1161.
- Gallino, Augusto, Matthias Stuber, Filippo Crea, Erling Falk, Roberto Corti, John Lekakis, Jürg Schwitler, et al. 2012. « "In vivo" imaging of atherosclerosis ». *Atherosclerosis* 224 (1) (septembre): 25-36. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.04.007.
- Galluzzi, L., I. Vitale, J. M. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, T. M. Dawson, V. L. Dawson, W. S. El-Deiry, et S. Fulda. 2011. « Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 ». *Cell Death & Differentiation* 19 (1): 107-120.
- Gao, L, J Woo, et R Buelow. 1996. « Both L- and D-isomers of allotrap 2702 prolong cardiac allograft survival in mice ». *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 15 (1 Pt 1) (janvier): 78-87.
- Gao, Qi, Yang Jiang, Tian Ma, Faliang Zhu, Fei Gao, Pin Zhang, Chun Guo, et al. 2010. « A Critical Function of Th17 Proinflammatory Cells in the Development of Atherosclerotic Plaque in Mice ». *The Journal of Immunology* 185 (10) (novembre 15): 5820-5827. doi:10.4049/jimmunol.1000116.
- Gao, Xinyu, Masaru Iwai, Shinji Inaba, Yumiko Tomono, Harumi Kanno, Masaki Mogi, et Masatsugu Horiuchi. 2007. « Attenuation of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression Via Inhibition of Nuclear Factor- $\kappa$ B Activity in Inflammatory Vascular Injury\* ». *American Journal of Hypertension* 20 (11) (janvier 11): 1170-1175. doi:10.1016/j.amjhyper.2007.07.011.
- García-Cardena, Guillermo, Pavel Martasek, Bettie Sue Siler Masters, Phillip M. Skidd, Jacques Couet, Shengwen Li, Michael P. Lisanti, et William C. Sessa. 1997. « Dissecting the Interaction between Nitric Oxide Synthase (NOS) and Caveolin. Functional significance of the NOS caveolin binding domain in vivo. ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (41): 25437-25440.
- Gareus, Ralph, Elena Kotsaki, Sofia Xanthoulea, Ingeborg van der Made, Marion J J Gijbels, Rozina Kardakaris, Apostolos Polykratis, George Kollias, Menno P J de Winther, et Manolis Pasparakis. 2008. « Endothelial cell-specific NF- $\kappa$ B inhibition protects mice from atherosclerosis ». *Cell metabolism* 8 (5) (novembre): 372-383. doi:10.1016/j.cmet.2008.08.016.
- Gay, C G, et J A Winkles. 1991. « Interleukin 1 Regulates Heparin-binding Growth Factor 2 Gene Expression in Vascular Smooth Muscle Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (1) (janvier 1): 296-300.
- Geng, Yong-Jian, Lynne E. Henderson, Ethan B. Levesque, Maria Muszynski, et Peter Libby. 1997. « Fas Is Expressed in Human Atherosclerotic Intima and Promotes Apoptosis of Cytokine-Primed Human Vascular Smooth Muscle Cells ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17 (10) (janvier 10): 2200-2208. doi:10.1161/01.ATV.17.10.2200.
- Geng, Yong-Jian, Qi Wu, Maria Muszynski, Göran K. Hansson, et Peter Libby. 1996. « Apoptosis of

## Références Bibliographiques

- Vascular Smooth Muscle Cells Induced by In Vitro Stimulation With Interferon- $\gamma$ , Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , and Interleukin-1 $\beta$  ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 16 (1): 19–27.
- Gerszten, Robert E., Eduardo A. Garcia-Zepeda, Yaw-Chyn Lim, Masayuki Yoshida, Han A. Ding, Michael A. Gimbrone, Andrew D. Luster, Francis W. Lusinskas, et Anthony Rosenzweig. 1999. « MCP-1 and IL-8 Trigger Firm Adhesion of Monocytes to Vascular Endothelium Under Flow Conditions ». *Nature* 398 (6729) (avril 22): 718-723. doi:10.1038/19546.
- Getz, Godfrey S., et Catherine A. Reardon. 2012. « Animal Models of Atherosclerosis ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32 (5) (janvier 5): 1104-1115. doi:10.1161/ATVBAHA.111.237693.
- Ghosh, Sankar, et Matthew S. Hayden. 2008. « New regulators of NF- $\kappa$ B in inflammation ». *Nature Reviews Immunology* 8 (11): 837–848.
- Gibbons, Gary H., et Victor J. Dzau. 1994. « The emerging concept of vascular remodeling ». Édité par Franklin H. Epstein. *New England Journal of Medicine* 330 (20): 1431–1438.
- Gimbrone, Michael A, Jr. 1995. « Vascular Endothelium: An Integrator of Pathophysiologic Stimuli in Atherosclerosis ». *The American Journal of Cardiology* 75 (6) (février 23): 67B-70B.
- Gimbrone, Michael A, Jr, James N. Topper, Tobi Nagel, Keith R. Anderson, et Guillermo Garcia-Cardena. 2000. « Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 902 (1): 230–240.
- Glagov, Seymour, Elliot Weisenberg, Christopher K. Zarins, Regina Stankunavicius, et George J. Kolettsis. 1987. « Compensatory Enlargement of Human Atherosclerotic Coronary Arteries ». *New England Journal of Medicine* 316 (22): 1371-1375. doi:10.1056/NEJM198705283162204.
- Glavind, J., S. Hartmann, J. Clemmesen, K. E. Jessen, et H. Dam. 1952. « Studies on the role of lipoperoxides in human pathology ». *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica* 30 (1): 1–6.
- Goldstein, James A., Demetris Demetriou, Cindy L. Grines, Mark Pica, Mazen Shoukfeh, et William W. O'Neill. 2000. « Multiple Complex Coronary Plaques in Patients with Acute Myocardial Infarction ». *New England Journal of Medicine* 343 (13): 915-922. doi:10.1056/NEJM200009283431303.
- Goldstein, Joseph L., Y. K. Ho, Sandip K. Basu, et Michael S. Brown. 1979. « Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (1) (janvier): 333-337.
- Gordon, D., M. A. Reidy, E. P. Benditt, et S. M. Schwartz. 1990. « Cell Proliferation in Human Coronary Arteries. ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87 (12) (janvier 6): 4600-4604. doi:10.1073/pnas.87.12.4600.
- Gordon, Siamon, et Philip R Taylor. 2005. « Monocyte and macrophage heterogeneity ». *Nature reviews. Immunology* 5 (12) (décembre): 953-964. doi:10.1038/nri1733.
- Gough, Peter J, Ivan G Gomez, Paul T Wille, et Elaine W Raines. 2006. « Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice ». *The Journal of clinical investigation* 116 (1) (janvier): 59-69. doi:10.1172/JCI25074.
- Gräbner, Rolf, Katharina Lötzer, Sandra Döpping, Markus Hildner, Dörte Radke, Michael Beer, Rainer Spanbroek, et al. 2009. « Lymphotoxin  $\beta$  Receptor Signaling Promotes Tertiary Lymphoid Organogenesis in the Aorta Adventitia of Aged ApoE-/- Mice ». *The Journal of Experimental Medicine* 206 (1) (janvier 16): 233-248. doi:10.1084/jem.20080752.
- Graebe, M, S F Pedersen, L Borgwardt, L Højgaard, H Sillesen, et A Kjaer. 2009. « Molecular pathology in vulnerable carotid plaques: correlation with [18]-fluorodeoxyglucose positron emission

## Références Bibliographiques

tomography (FDG-PET) ». *European journal of vascular and endovascular surgery: the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 37 (6) (juin): 714-721.  
doi:10.1016/j.ejvs.2008.11.018.

- Greaves, David R., et Siamon Gordon. 2009. « The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges ». *Journal of lipid research* 50 (Supplement): S282–S286.
- Greenland, Philip, Joseph S. Alpert, George A. Beller, Emelia J. Benjamin, Matthew J. Budoff, Zahi A. Fayad, Elyse Foster, et al. 2010. « 2010 ACCF/AHA Guideline for Assessment of Cardiovascular Risk in Asymptomatic Adults A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines ». *Circulation* 122 (25) (décembre 21): e584–e636. doi:10.1161/CIR.0b013e3182051b4c.
- Greenland, Philip, Robert O Bonow, Bruce H Brundage, Matthew J Budoff, Mark J Eisenberg, Scott M Grundy, Michael S Lauer, et al. 2007. « ACCF/AHA 2007 clinical expert consensus document on coronary artery calcium scoring by computed tomography in global cardiovascular risk assessment and in evaluation of patients with chest pain: a report of the American College of Cardiology Foundation Clinical Expert Consensus Task Force (ACCF/AHA Writing Committee to Update the 2000 Expert Consensus Document on Electron Beam Computed Tomography) ». *Circulation* 115 (3) (janvier 23): 402-426. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.181425.
- Greenwald, S E, J E Moore Jr, A Rachev, T P Kane, et J J Meister. 1997. « Experimental Investigation of the Distribution of Residual Strains in the Artery Wall ». *Journal of Biomechanical Engineering* 119 (4) (novembre): 438-444.
- Gregersen, Hans, Jingbo Zhao, Xiao Lu, Ji Zhou, et Erling Falk. 2007. « Remodelling of the Zero-stress State and Residual Strains in apoE-deficient Mouse Aorta ». *Biorheology* 44 (2): 75-89.
- Griffin, Gabriel K., Gail Newton, Margarite L. Tarrío, De-xiu Bu, Elena Maganto-Garcia, Veronica Azcutia, Pilar Alcaide, et al. 2012. « IL-17 and TNF- $\alpha$  Sustain Neutrophil Recruitment During Inflammation through Synergistic Effects on Endothelial Activation ». *The Journal of Immunology* 188 (12) (juin 15): 6287-6299. doi:10.4049/jimmunol.1200385.
- Gryglewski, R. J., R. M. J. Palmer, et S. Moncada. 1986. « Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor ». <http://www.nature.com/nature/journal/v320/n6061/abs/320454a0.html>.
- Gunn, Michael D., Nicolas A. Nelken, Xiang Liao, et Lewis T. Williams. 1997. « Monocyte chemoattractant protein-1 is sufficient for the chemotaxis of monocytes and lymphocytes in transgenic mice but requires an additional stimulus for inflammatory activation ». *The Journal of Immunology* 158 (1): 376–383.
- Guo, Xiaomei, et Ghassan S. Kassab. 2003. « Variation of Mechanical Properties Along the Length of the Aorta in C57bl/6 Mice ». *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 285 (6) (janvier 12): H2614-H2622. doi:10.1152/ajpheart.00567.2003.
- Gustafsson, Maria, Malin Levin, Kristina Skåalén, Jeanna Perman, Vincent Fridén, Pernilla Jirholt, Sven-Olof Olofsson, Sergio Fazio, MacRae F. Linton, et Clay F. Semenkovich. 2007. « Retention of Low-Density Lipoprotein in Atherosclerotic Lesions of the Mouse Evidence for a Role of Lipoprotein Lipase ». *Circulation research* 101 (8): 777–783.
- Hag, Anne Mette Fisker, Sune Folke Pedersen, Christina Christoffersen, Tina Binderup, Mette Munk Jensen, Jesper Tranekjær Jørgensen, Dorthe Skovgaard, Rasmus Sejersten Ripa, et Andreas Kjaer. 2012. « (18)F-FDG PET imaging of murine atherosclerosis: association with gene expression of key molecular markers ». *PLoS one* 7 (11): e50908. doi:10.1371/journal.pone.0050908.
- Haga, Jason H., Yi-Shuan J. Li, et Shu Chien. 2007. « Molecular basis of the effects of mechanical

## Références Bibliographiques

- stretch on vascular smooth muscle cells ». *Journal of Biomechanics* 40 (5): 947-960. doi:10.1016/j.jbiomech.2006.04.011.
- Hallow, Karen Melissa, W. Robert Taylor, Alexander Rachev, et Raymond Peter Vito. 2009. « Markers of Inflammation Collocate with Increased Wall Stress in Human Coronary Arterial Plaque ». *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* 8 (6) (décembre 1): 473-486. doi:10.1007/s10237-009-0151-8.
- Han, Ki Hoon, Rajendra K. Tangirala, Simone R. Green, et Oswald Quehenberger. 1998. « Chemokine Receptor CCR2 Expression and Monocyte Chemoattractant Protein-1–Mediated Chemotaxis in Human Monocytes A Regulatory Role for Plasma LDL ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 18 (12): 1983–1991.
- Han, Xinbing, Shiro Kitamoto, Hongwei Wang, et William A Boisvert. 2010. « Interleukin-10 overexpression in macrophages suppresses atherosclerosis in hyperlipidemic mice ». *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24 (8) (août): 2869-2880. doi:10.1096/fj.09-148155.
- Hansson, Göran K., et Andreas Hermansson. 2011. « The immune system in atherosclerosis ». *Nature immunology* 12 (3): 204–212.
- Harrison, David G. 1997. « Perspective Series: Nitric Oxide and Nitric Oxide Synthases. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. ». *Journal of Clinical Investigation* 100 (9): 2153.
- Hartung, Dagmar, Artiom Petrov, Nezam Haider, Shinichiro Fujimoto, Francis Blankenberg, Ai Fujimoto, Renu Virmani, Frank D. Kolodgie, H. William Strauss, et Jagat Narula. 2007. « Radiolabeled monocyte chemotactic protein 1 for the detection of inflammation in experimental atherosclerosis ». *Journal of Nuclear Medicine* 48 (11): 1816–1821.
- Hartung, Dagmar, Renu Virmani, Han Liu, Jun Zhou, Ai Fujimoto, Atsuko Tahara, Leo Hofstra, et Navneet Narula. 2009. « Dual molecular imaging for targeting metalloproteinase activity and apoptosis in atherosclerosis: molecular imaging facilitates understanding of pathogenesis ». *Journal of nuclear cardiology* 16 (5): 753–762.
- Haubner, Roland. 2006. «  $\alpha\beta 3$ -integrin imaging: a new approach to characterise angiogenesis? ». *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 33 (1): 54–63.
- Haubner, Roland, Hans-Jürgen Wester, Wolfgang A. Weber, Christian Mang, Sibylle I. Ziegler, Simon L. Goodman, Reingard Senekowitsch-Schmidtke, Horst Kessler, et Markus Schwaiger. 2001. « Noninvasive imaging of  $\alpha\beta 3$  integrin expression using  $^{18}\text{F}$ -labeled RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography ». *Cancer research* 61 (5): 1781–1785.
- Hausladen, Alfred, Christopher T. Privalle, Teresa Keng, Joseph DeAngelo, et Jonathan S. Stamler. 1996. « Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR ». *Cell* 86 (5): 719–729.
- Hautmann, Martina B., Cort S. Madsen, et Gary K. Owens. 1997. « A Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) Control Element Drives TGF $\beta$ -induced Stimulation of Smooth Muscle  $\alpha$ -Actin Gene Expression in Concert with Two CArG Elements ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (16) (avril 18): 10948-10956. doi:10.1074/jbc.272.16.10948.
- Hayenga, H.N., A. Trache, J. Trzeciakowski, et J.D. Humphrey. 2011. « Regional Atherosclerotic Plaque Properties in ApoE–/– Mice Quantified by Atomic Force, Immunofluorescence, and Light Microscopy ». *Journal of Vascular Research* 48 (6): 495-504. doi:10.1159/000329586.
- Heiland, Vincent M., Caroline Forsell, Joy Roy, Ulf Hedin, et T. Christian Gasser. 2013. « Identification of carotid plaque tissue properties using an experimental-numerical approach ». *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1751616113001549>.

## Références Bibliographiques

- Hengartner, Michael O. 2000. « The biochemistry of apoptosis ». *Nature* 407 (6805): 770–776.
- Henriksen, T, E M Mahoney, et D Steinberg. 1981. « Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (10) (octobre): 6499-6503.
- Henson, P M, D L Bratton, et V A Fadok. 2001. « Apoptotic cell removal ». *Current biology: CB* 11 (19) (octobre 2): R795-805.
- Hergenreider, Eduard, Susanne Heydt, Karine Tréguer, Thomas Boettger, Anton J G Horrevoets, Andreas M Zeiher, Margot P Scheffer, et al. 2012. « Atheroprotective Communication Between Endothelial Cells and Smooth Muscle Cells through miRNAs ». *Nature Cell Biology* 14 (3) (mars): 249-256. doi:10.1038/ncb2441.
- Herman, Michael P., Galina K. Sukhova, Peter Libby, Norbert Gerdes, Nga Tang, Daniel B. Horton, Meagan Kilbride, Roger E. Breitbart, Miyoung Chun, et Uwe Schönbeck. 2001. « Expression of Neutrophil Collagenase (Matrix Metalloproteinase-8) in Human Atheroma A Novel Collagenolytic Pathway Suggested by Transcriptional Profiling ». *Circulation* 104 (16) (octobre 16): 1899-1904. doi:10.1161/hc4101.097419.
- Hillis, L. David, Peter K. Smith, Jeffrey L. Anderson, John A. Bittl, Charles R. Bridges, John G. Byrne, Joaquin E. Cigarroa, Verdi J. DiSesa, Loren F. Hiratzka, et Adolph M. Hutter. 2011. « 2011 ACCF/AHA Guideline for Coronary Artery Bypass Graft Surgery A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines Developed in Collaboration With the American Association for Thoracic Surgery, Society of Cardiovascular Anesthesiologists, and Society of Thoracic Surgeons ». *Journal of the American College of Cardiology* 58 (24): e123–e210.
- Himburg, Heather A., Deborah M. Grzybowski, Andrew L. Hazel, Jeffrey A. LaMack, Xue-Mei Li, et Morton H. Friedman. 2004. « Spatial Comparison Between Wall Shear Stress Measures and Porcine Arterial Endothelial Permeability ». *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 286 (5) (janvier 5): H1916-H1922. doi:10.1152/ajpheart.00897.2003.
- Hishikawa, Keiichi, Barry S. Oemar, Zhihong Yang, et Thomas F. Lüscher. 1997. « Pulsatile Stretch Stimulates Superoxide Production and Activates Nuclear Factor- $\kappa$ B in Human Coronary Smooth Muscle ». *Circulation Research* 81 (5) (janvier 11): 797-803. doi:10.1161/01.RES.81.5.797.
- Hollestelle, Saskia C. G., Margreet R. de Vries, J. Karlijn van Keulen, Arjan H. Schoneveld, Aryan Vink, Chaylendra F. Strijder, Ben J. van Middelaar, Gerard Pasterkamp, Paul H. A. Quax, et Dominique P. V. de Kleijn. 2004. « Toll-Like Receptor 4 Is Involved in Outward Arterial Remodeling ». *Circulation* 109 (3) (janvier 27): 393-398. doi:10.1161/01.CIR.0000109140.51366.72.
- Holmes, David R., Amir Lerman, Pedro R. Moreno, Spencer B. King, et Samin K. Sharma. 2013. « Diagnosis and Management of STEMI Arising From Plaque Erosion ». *JACC: Cardiovascular Imaging* 6 (3) (mars 1): 290-296. doi:10.1016/j.jcmg.2013.01.005.
- Holzappel, Gerhard A, Gerhard Sommer, et Peter Regitnig. 2004. « Anisotropic Mechanical Properties of Tissue Components in Human Atherosclerotic Plaques ». *Journal of Biomechanical Engineering* 126 (5) (octobre): 657-665.
- Holzappel, Gerhard A. 2000. « Nonlinear solid mechanics: a continuum approach for engineering ». <http://www.citeulike.org/group/2006/article/1044720>.
- Holzappel, Gerhard A., Christian T. Gasser, et Michael Stadler. 2002. « A structural model for the viscoelastic behavior of arterial walls: Continuum formulation and finite element analysis ». *European Journal of Mechanics - A/Solids* 21 (3): 441-463. doi:10.1016/S0997-7538(01)01206-2.
- Holzappel, Gerhard A., Gerhard Sommer, Christian T. Gasser, et Peter Regitnig. 2005. « Determination

## Références Bibliographiques

- of Layer-specific Mechanical Properties of Human Coronary Arteries with Nonatherosclerotic Intimal Thickening and Related Constitutive Modeling ». *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 289 (5) (janvier 11): H2048-H2058. doi:10.1152/ajpheart.00934.2004.
- Hong, Cheng, Christoph R Becker, U Joseph Schoepf, Bernd Ohnesorge, Roland Bruening, et Maximilian F Reiser. 2002. « Coronary artery calcium: absolute quantification in nonenhanced and contrast-enhanced multi-detector row CT studies ». *Radiology* 223 (2) (mai): 474-480.
- Hong, Sung Yu, Jong Eun Oh, et Keun-Hyeung Lee. 1999. « Effect of d-amino acid substitution on the stability, the secondary structure, and the activity of membrane-active peptide ». *Biochemical Pharmacology* 58 (11) (décembre 1): 1775-1780. doi:10.1016/S0006-2952(99)00259-2.
- Howarth, S.P.S., T.Y. Tang, R. Trivedi, R. Weerakkody, J. U-King-Im, M.E. Gaunt, J.R. Boyle, et al. 2009. « Utility of USPIO-enhanced MR imaging to identify inflammation and the fibrous cap: A comparison of symptomatic and asymptomatic individuals ». *European Journal of Radiology* 70 (3) (juin): 555-560. doi:10.1016/j.ejrad.2008.01.047.
- Hsiai, Tzung K., Juliana Hwang, Mark L. Barr, Adria Correa, Ryan Hamilton, Mohammad Alavi, Mahsa Rouhanizadeh, Enrique Cadenas, et Stanley L. Hazen. 2007. « Hemodynamics Influences Vascular Peroxynitrite Formation: Implication for LDL Apo B-100 Nitration ». *Free radical biology & medicine* 42 (4) (février 15): 519-529. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.11.017.
- Huang, David, Eric A. Swanson, Charles P. Lin, Joel S. Schuman, William G. Stinson, Warren Chang, Michael R. Hee, Thomas Flotte, Kenton Gregory, et Carmen A. Puliafito. 1991. « Optical coherence tomography ». *Science* 254 (5035): 1178–1181.
- Huang, Hayden, Renu Virmani, Hesham Younis, Allen P. Burke, Roger D. Kamm, et Richard T. Lee. 2001. « The Impact of Calcification on the Biomechanical Stability of Atherosclerotic Plaques ». *Circulation* 103 (8) (février 27): 1051-1056. doi:10.1161/01.CIR.103.8.1051.
- Hudetz, Antal G. 1979. « Incremental elastic modulus for orthotropic incompressible arteries ». *Journal of Biomechanics* 12 (9): 651-655. doi:10.1016/0021-9290(79)90015-0.
- Hulme, Edward C, et Mike A Trevethick. 2010. « Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation ». *British Journal of Pharmacology* 161 (6) (novembre): 1219-1237. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00604.x.
- Hunt, James V., Christopher CT Smith, et Simon P. Wolff. 1990. « Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose ». *Diabetes* 39 (11): 1420–1424.
- Huo, Yuqing, et Klaus F. Ley. 2004. « Role of platelets in the development of atherosclerosis ». *Trends in cardiovascular medicine* 14 (1): 18–22.
- Huo, Yuqing, Andreas Schober, S. Bradley Forlow, David F. Smith, Matthew Craig Hyman, Steffen Jung, Dan R. Littman, Christian Weber, et Klaus Ley. 2003. « Circulating Activated Platelets Exacerbate Atherosclerosis in Mice Deficient in Apolipoprotein E ». *Nature Medicine* 9 (1) (janvier): 61-67. doi:10.1038/nm810.
- Hurt-Camejo, E., G. Camejo, B. Rosengren, F. Lopez, C. Ahlström, G. Fager, et G. Bondjers. 1992. « Effect of arterial proteoglycans and glycosaminoglycans on low density lipoprotein oxidation and its uptake by human macrophages and arterial smooth muscle cells. » *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 12 (5): 569–583.
- Hwang, Jinah, Aniket Saha, Yong Chool Boo, George P. Sorescu, J. Scott McNally, Steven M. Holland, Sergei Dikalov, et al. 2003. « Oscillatory Shear Stress Stimulates Endothelial Production of from P47phox-dependent NAD(P)H Oxidases, Leading to Monocyte Adhesion ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (47) (novembre 21): 47291-47298. doi:10.1074/jbc.M305150200.

## Références Bibliographiques

- Ignarro, L. J., G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns, et G. Chaudhuri. 1987. « Endothelium-derived Relaxing Factor Produced and Released from Artery and Vein Is Nitric Oxide ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84 (24) (janvier 12): 9265-9269.
- Ignatz, Ronald A., et Joan Massague. 1986. « Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. » *Journal of Biological Chemistry* 261 (9): 4337-4345.
- Inaba, Yoichi, Jennifer A Chen, et Steven R Bergmann. 2012. « Carotid plaque, compared with carotid intima-media thickness, more accurately predicts coronary artery disease events: a meta-analysis ». *Atherosclerosis* 220 (1) (janvier): 128-133. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.06.044.
- Ishibashi, S, M S Brown, J L Goldstein, R D Gerard, R E Hammer, et J Herz. 1993. « Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery ». *The Journal of clinical investigation* 92 (2) (août): 883-893. doi:10.1172/JCI116663.
- Ishino, Seigo, Takahiro Mukai, Yuji Kuge, Noriaki Kume, Mikako Ogawa, Nozomi Takai, Junko Kamihashi, Masashi Shiomi, Manabu Minami, et Toru Kita. 2008. « Targeting of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) with 99mTc-labeled anti-LOX-1 antibody: potential agent for imaging of vulnerable plaque ». *Journal of Nuclear Medicine* 49 (10): 1677-1685.
- Iuliano, Luigi, Alberto Signore, Shankar Vallabajosula, Angela R. Colavita, Caterina Camastra, Giuseppe Ronga, Cesare Alessandri, Enrico Sbarigia, Paolo Fiorani, et Francesco Violi. 1996. « Preparation and biodistribution of 99m technetium labelled oxidized LDL in man ». *Atherosclerosis* 126 (1): 131-141.
- Iyer, Suhasini, J Woo, M C Cornejo, L Gao, W McCoubrey, M Maines, et Roland Buelow. 1998. « Characterization and biological significance of immunosuppressive peptide D2702.75-84(E --> V) binding protein. Isolation of heme oxygenase-1 ». *The Journal of biological chemistry* 273 (5) (janvier 30): 2692-2697.
- Jackson, Christopher L., Martin R. Bennett, Erik A. L. Biessen, Jason L. Johnson, et Rob Krams. 2007. « Assessment of Unstable Atherosclerosis in Mice ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27 (4) (janvier 4): 714-720. doi:10.1161/01.ATV.0000261873.86623.e1.
- Jacobin-Valat, Marie-Josée, Kamel Deramchia, Stéphane Mornet, Christoph E. Hagemeyer, Stéphane Bonetto, Rémy Robert, Marc Biran, Philippe Massot, Sylvain Miraux, et Stéphane Sanchez. 2011. « MRI of inducible P-selectin expression in human activated platelets involved in the early stages of atherosclerosis ». *NMR in Biomedicine* 24 (4): 413-424.
- Jaffer, Farouc A, Claudio Vinegoni, Michael C John, Elena Aikawa, Herman K Gold, Alope V Finn, Vasilis Ntziachristos, Peter Libby, et Ralph Weissleder. 2008. « Real-time Catheter Molecular Sensing of Inflammation in Proteolytically Active Atherosclerosis ». *Circulation* 118 (18) (octobre 28): 1802-1809. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.785881.
- Janeway, Charles A. 1989. « Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology ». In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 54:1-13. <http://symposium.cshlp.org/content/54/1.short>.
- Jenssen, Håvard, et Stein Ivar Asp. 2008. « Serum Stability of Peptides ». In *Peptide-Based Drug Design*, édité par Laszlo Otvos, 177-186. *Methods In Molecular Biology*™ 494. Humana Press. [http://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-59745-419-3\\_10](http://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-59745-419-3_10).
- Jin, Chengcheng, Patrick Frayssinet, Richard Pelker, Diane Cwirka, Bo Hu, Agnès Vignery, Stephanie C. Eisenbarth, et Richard A. Flavell. 2011. « NLRP3 inflammasome plays a critical role in the pathogenesis of hydroxyapatite-associated arthropathy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (36): 14867-14872.

## Références Bibliographiques

- Johnson, Chad, et Zorina S. Galis. 2004. « Matrix metalloproteinase-2 and -9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24 (1): 54–60.
- Johnson, Jason L, et Andrew C Newby. 2009. « Macrophage heterogeneity in atherosclerotic plaques ». *Current opinion in lipidology* 20 (5) (octobre): 370-378.  
doi:10.1097/MOL.0b013e3283309848.
- Johnson, Jason L., Kevin Carson, Helen Williams, Sharada Karanam, Andrew Newby, Gianni Angelini, Sarah George, et Christopher Jackson. 2005. « Plaque Rupture After Short Periods of Fat Feeding in the Apolipoprotein E–Knockout Mouse Model Characterization and Effects of Pravastatin Treatment ». *Circulation* 111 (11) (mars 22): 1422-1430.  
doi:10.1161/01.CIR.0000158435.98035.8D.
- Johnson, Jason L., et C L Jackson. 2001. « Atherosclerotic Plaque Rupture in the Apolipoprotein E Knockout Mouse ». *Atherosclerosis* 154 (2) (février 1): 399-406.
- Johnson, Kenneth Langstreth. 1987. *Contact Mechanics*. Cambridge University Press.
- Johnson, Z, A E Proudfoot, et T M Handel. 2005. « Interaction of Chemokines and Glycosaminoglycans: a New Twist in the Regulation of Chemokine Function with Opportunities for Therapeutic Intervention ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16 (6) (décembre): 625-636.  
doi:10.1016/j.cytogfr.2005.04.006.
- Joshi, Francis R., Alistair C. Lindsay, Daniel R. Obaid, Erling Falk, et James HF Rudd. 2012. « Non-invasive imaging of atherosclerosis ». *European Heart Journal–Cardiovascular Imaging* 13 (3): 205–218.
- Kannel, William B., Thomas R. Dawber, Abraham Kagan, Nicholas Revotskie, et Joseph Stokes. 1961. « Factors of Risk in the Development of Coronary Heart Disease—Six-Year Follow-up Experience The Framingham Study ». *Annals of internal medicine* 55 (1): 33–50.
- Kanters, Edwin, Manolis Pasparakis, Marion J J Gijbels, Monique N Vergouwe, Iris Partouns-Hendriks, Remond J A Fijneman, Björn E Clausen, et al. 2003. « Inhibition of NF-kappaB activation in macrophages increases atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice ». *The Journal of clinical investigation* 112 (8) (octobre): 1176-1185. doi:10.1172/JCI18580.
- Kaplan, Zane S, et Shaun P Jackson. 2011. « The Role of Platelets in Atherothrombosis ». *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 2011: 51-61. doi:10.1182/asheducation-2011.1.51.
- Katsuda, Shogo, Heather C. Boyd, Corinne Fligner, Russell Ross, et Allen M. Gown. 1992. « Human atherosclerosis. III. Immunocytochemical analysis of the cell composition of lesions of young adults. ». *The American journal of pathology* 140 (4): 907.
- Katsuda, Shogo, et Toshiyuki Kaji. 2003. « Atherosclerosis and Extracellular Matrix ». *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 10 (5): 267-274.
- Kaufmann, Beat A., John M. Sanders, Christopher Davis, Aris Xie, Patrick Aldred, Ian J. Sarembock, et Jonathan R. Lindner. 2007. « Molecular Imaging of Inflammation in Atherosclerosis With Targeted Ultrasound Detection of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 ». *Circulation* 116 (3) (juillet 17): 276-284. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.684738.
- Kavurma, Mary M., et Martin R. Bennett. 2008. « Expression, regulation and function of trail in atherosclerosis ». *Biochemical Pharmacology* 75 (7) (avril 1): 1441-1450.  
doi:10.1016/j.bcp.2007.10.020.
- Kelly, Kimberly A., Jennifer R. Allport, Andrew Tsourkas, Vivek R. Shinde-Patil, Lee Josephson, et Ralph Weissleder. 2005. « Detection of Vascular Adhesion Molecule-1 Expression Using a Novel

## Références Bibliographiques

Multimodal Nanoparticle ». *Circulation Research* 96 (3) (février 18): 327-336.  
doi:10.1161/01.RES.0000155722.17881.dd.

Kelly-Arnold, Adreanne, Natalia Maldonado, Damien Laudier, Elena Aikawa, Luis Cardoso, et Sheldon Weinbaum. 2013. « Revised microcalcification hypothesis for fibrous cap rupture in human coronary arteries ». *Proceedings of the National Academy of Sciences*.  
<http://www.pnas.org/content/early/2013/05/30/1308814110.short>.

Kerwin, William, Andrew Hooker, Mary Spilker, Paolo Vicini, Marina Ferguson, Thomas Hatsukami, et Chun Yuan. 2003. « Quantitative magnetic resonance imaging analysis of neovasculature volume in carotid atherosclerotic plaque ». *Circulation* 107 (6): 851–856.

Khalil, Maged F., William D. Wagner, et Ira J. Goldberg. 2004. « Molecular Interactions Leading to Lipoprotein Retention and the Initiation of Atherosclerosis ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24 (12) (janvier 12): 2211-2218. doi:10.1161/01.ATV.0000147163.54024.70.

Khan, B V, S S Parthasarathy, R W Alexander, et R M Medford. 1995. « Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells ». *The Journal of clinical investigation* 95 (3) (mars): 1262-1270. doi:10.1172/JCI117776.

Khera, Amit V., Marina Cuchel, Margarita de la Llera-Moya, Amrith Rodrigues, Megan F. Burke, Kashif Jafri, Benjamin C. French, Julie A. Phillips, Megan L. Mucksavage, et Robert L. Wilensky. 2011. « Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis ». *New England Journal of Medicine* 364 (2): 127–135.

Kietselaer, Bas LJH, Chris PM Reutelingsperger, Guido AK Heidendal, Mat JAP Daemen, Werner H. Mess, Leonard Hofstra, et Jagat Narula. 2004. « Noninvasive detection of plaque instability with use of radiolabeled annexin A5 in patients with carotid-artery atherosclerosis ». *New England Journal of Medicine* 350 (14): 1472–1473.

Kim, J. A., M. C. Territo, E. Wayner, T. M. Carlos, F. Parhami, C. W. Smith, M. E. Haberland, A. M. Fogelman, et J. A. Berliner. 1994. « Partial Characterization of Leukocyte Binding Molecules on Endothelial Cells Induced by Minimally Oxidized LDL. » *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 14 (3) (janvier 3): 427-433. doi:10.1161/01.ATV.14.3.427.

Kim, W. Yong, Peter G. Danias, Matthias Stuber, Scott D. Flamm, Sven Plein, Eike Nagel, Susan E. Langerak, Oliver M. Weber, Erik M. Pedersen, et Matthias Schmidt. 2001. « Coronary magnetic resonance angiography for the detection of coronary stenoses ». *New England Journal of Medicine* 345 (26): 1863–1869.

Klouche, M, S Rose-John, W Schmiedt, et S Bhakdi. 2000. « Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation, and proliferation ». *Circulation* 101 (15) (avril 18): 1799-1805.

Kockx, M M, G R De Meyer, J Muhring, W Jacob, H Bult, et A G Herman. 1998. « Apoptosis and Related Proteins in Different Stages of Human Atherosclerotic Plaques ». *Circulation* 97 (23) (juin 16): 2307-2315.

Kodama, T, P Reddy, C Kishimoto, et M Krieger. 1988. « Purification and characterization of a bovine acetyl low density lipoprotein receptor. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (23) (décembre): 9238-9242.

Kokkoni, Nicoleta, Kelvin Stott, Hozefa Amijee, Jody M. Mason, et Andrew J. Doig. 2006. « N-Methylated peptide inhibitors of  $\beta$ -amyloid aggregation and toxicity. Optimization of the inhibitor structure ». *Biochemistry* 45 (32): 9906–9918.

Kolodgie, Frank D., Allen P. Burke, Andrew Farb, Herman K. Gold, J Yuan, Jagat Narula, Alope V. Finn, et Renu Virmani. 2001. « The Thin-cap Fibroatheroma: a Type of Vulnerable Plaque: The Major

## Références Bibliographiques

- Precursor Lesion to Acute Coronary Syndromes ». *Current Opinion in Cardiology* 16 (5) (septembre): 285-292.
- Kolodgie, Frank D., Herman K. Gold, Allen P. Burke, David R. Fowler, Howard S. Kruth, Deena K. Weber, Andrew Farb, et al. 2003. « Intraplaque Hemorrhage and Progression of Coronary Atheroma ». *New England Journal of Medicine* 349 (24): 2316-2325. doi:10.1056/NEJMoa035655.
- Kolodgie, Frank D., Artiom Petrov, Renu Virmani, Navneet Narula, Johan W. Verjans, Deena K. Weber, Dagmar Hartung, et al. 2003. « Targeting of Apoptotic Macrophages and Experimental Atheroma With Radiolabeled Annexin V A Technique With Potential for Noninvasive Imaging of Vulnerable Plaque ». *Circulation* 108 (25) (décembre 23): 3134-3139. doi:10.1161/01.CIR.0000105761.00573.50.
- Komarova, Yulia A, et Asrar B Malik. 2010. « Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways ». *Annual review of physiology* 72: 463-493. doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135833.
- Komarova, Yulia A, Dolly Mehta, et Asrar B Malik. 2007. « Dual regulation of endothelial junctional permeability ». *Science's STKE: signal transduction knowledge environment* 2007 (412) (novembre 13): re8. doi:10.1126/stke.4122007re8.
- Kooi, M. E., V. C. Cappendijk, K. B. J. M. Cleutjens, A. G. H. Kessels, P. J. E. H. M. Kitslaar, M. Borgers, P. M. Frederik, M. J. a. P. Daemen, et J. M. A. van Engelsehoven. 2003. « Accumulation of Ultrasmall Superparamagnetic Particles of Iron Oxide in Human Atherosclerotic Plaques Can Be Detected by In Vivo Magnetic Resonance Imaging ». *Circulation* 107 (19) (mai 20): 2453-2458. doi:10.1161/01.CIR.0000068315.98705.CC.
- Korshunov, Vyacheslav A., Stephen M. Schwartz, et Bradford C. Berk. 2007. « Vascular Remodeling Hemodynamic and Biochemical Mechanisms Underlying Glagov's Phenomenon ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27 (8) (janvier 8): 1722-1728. doi:10.1161/ATVBAHA.106.129254.
- Korte, Chris L. de, Gerard Pasterkamp, Anton F. W. van der Steen, Hein A. Woutman, et Nicolaas Bom. 2000. « Characterization of Plaque Components With Intravascular Ultrasound Elastography in Human Femoral and Coronary Arteries In Vitro ». *Circulation* 102 (6) (août 8): 617-623. doi:10.1161/01.CIR.102.6.617.
- Kovanen, Petri T. 2007. « Mast cells: multipotent local effector cells in atherothrombosis ». *Immunological reviews* 217 (1): 105-122.
- Koyama, H, E W Raines, K E Bornfeldt, J M Roberts, et R Ross. 1996. « Fibrillar collagen inhibits arterial smooth muscle proliferation through regulation of Cdk2 inhibitors ». *Cell* 87 (6) (décembre 13): 1069-1078.
- Krensky, A M, et C Clayberger. 1994. « The induction of tolerance to alloantigens using HLA-based synthetic peptides ». *Current opinion in immunology* 6 (5) (octobre): 791-796.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, Peter Vandenabeele, J. Abrams, Emad S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, et D. R. Green. 2008. « Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009 ». *Cell Death & Differentiation* 16 (1): 3-11.
- Kruth, Howard S., Wei Huang, Itsuko Ishii, et Wei-Yang Zhang. 2002. « Macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (37): 34573-34580.
- Ku, D N, D P Giddens, C K Zarins, et S Glagov. 1985. « Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress ». *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)* 5 (3) (juin): 293-302.

## Références Bibliographiques

- Kubo, Takashi, Toshio Imanishi, Shigeho Takarada, Akio Kuroi, Satoshi Ueno, Takashi Yamano, Takashi Tanimoto, et al. 2007. « Assessment of Culprit Lesion Morphology in Acute Myocardial Infarction Ability of Optical Coherence Tomography Compared With Intravascular Ultrasound and Coronary Angioscopy ». *Journal of the American College of Cardiology* 50 (10) (septembre 4): 933-939. doi:10.1016/j.jacc.2007.04.082.
- Kubota, R, K Kubota, S Yamada, M Tada, T Ido, et N Tamahashi. 1994. « Microautoradiographic study for the differentiation of intratumoral macrophages, granulation tissues and cancer cells by the dynamics of fluorine-18-fluorodeoxyglucose uptake ». *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine* 35 (1) (janvier): 104-112.
- Kubota, R, S Yamada, K Kubota, K Ishiwata, N Tamahashi, et T Ido. 1992. « Intratumoral distribution of fluorine-18-fluorodeoxyglucose in vivo: high accumulation in macrophages and granulation tissues studied by microautoradiography ». *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine* 33 (11) (novembre): 1972-1980.
- Kucik, Dennis F. 2002. « Rearrangement of Integrins in Avidity Regulation by Leukocytes ». *Immunologic Research* 26 (1-3) (août 1): 199-206. doi:10.1385/IR:26:1-3:199.
- Kuge, Yuji, Nozomi Takai, Yuki Ogawa, Takashi Temma, Yan Zhao, Kantaro Nishigori, Seigo Ishino, Junko Kamihashi, Yasushi Kiyono, et Masashi Shiomi. 2010. « Imaging with radiolabelled anti-membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) antibody: potentials for characterizing atherosclerotic plaques ». *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 37 (11): 2093-2104.
- Kumar, Anjali, et Volkhard Lindner. 1997. « Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 17 (10): 2238-2244.
- Kume, Teruyoshi, Takashi Akasaka, Takahiro Kawamoto, Hiroyuki Okura, Nozomi Watanabe, Eiji Toyota, Yoji Neishi, Renan Sukmawan, Yoshito Sadahira, et Kiyoshi Yoshida. 2006. « Measurement of the thickness of the fibrous cap by optical coherence tomography ». *American heart journal* 152 (4): 755-e1.
- Kunjathoor, Vidya V, Maria Febbraio, Eugene A Podrez, Kathryn J Moore, Lorna Andersson, Stephanie Koehn, Jeongmi S Rhee, Roy Silverstein, Henry F Hoff, et Mason W Freeman. 2002. « Scavenger receptors class A-III and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages ». *The Journal of biological chemistry* 277 (51) (décembre 20): 49982-49988. doi:10.1074/jbc.M209649200.
- Kuschert, Gabriele SV, Florence Coulin, Christine A. Power, Amanda El Proudfoot, Rod E. Hubbard, Arlene J. Hoogewerf, et Timothy NC Wells. 1999. « Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses ». *Biochemistry* 38 (39): 12959-12968.
- Laitinen, Iina, Päivi Marjamäki, Merja Haaparanta, Nina Savisto, V Jukka O Laine, Sanna L Soini, Ian Wilson, et al. 2006. « Non-specific binding of [18F]FDG to calcifications in atherosclerotic plaques: experimental study of mouse and human arteries ». *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 33 (12) (décembre): 1461-1467. doi:10.1007/s00259-006-0159-6.
- Lakowicz, Joseph R. 2006. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd edition. New York: Springer.
- Lancelot, Eric, Vardan Amirbekian, Irène Brigger, Jean-Sébastien Raynaud, Sébastien Ballet, Christelle David, Olivier Rousseaux, et al. 2008. « Evaluation of Matrix Metalloproteinases in Atherosclerosis Using a Novel Noninvasive Imaging Approach ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28 (3) (janvier 3): 425-432. doi:10.1161/ATVBAHA.107.149666.
- Landmesser, Ulf, Sergey Dikalov, S. Russ Price, Louise McCann, Tooru Fukui, Steven M. Holland, William E. Mitch, et David G. Harrison. 2003. « Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling

## Références Bibliographiques

- of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension ». *Journal of Clinical Investigation* 111 (8) (avril 15): 1201-1209. doi:10.1172/JCI200314172.
- Lassègue, Bernard, et Kathy K. Griendling. 2010. « NADPH Oxidases: Functions and Pathologies in the Vasculature ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30 (4) (janvier 4): 653-661. doi:10.1161/ATVBAHA.108.181610.
- Laudanna, Carlo, Ji Yun Kim, Gabriela Constantin, et Eugene Butcher. 2002. « Rapid Leukocyte Integrin Activation by Chemokines ». *Immunological Reviews* 186 (août): 37-46.
- Laurberg, Jacob Marsvin, Aage Kristian Olsen, Søren Baarsgaard Hansen, Morten Bottcher, Matthew Morrison, Sally-Ann Ricketts, et Erling Falk. 2007. « Imaging of vulnerable atherosclerotic plaques with FDG-microPET: no FDG accumulation ». *Atherosclerosis* 192 (2) (juin): 275-282. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.07.019.
- Laursen, Jørn Bech, Mark Somers, Sabine Kurz, Louise McCann, Ascan Warnholtz, Bruce A. Freeman, Margaret Tarpey, Tohru Fukai, et David G. Harrison. 2001. « Endothelial Regulation of Vasomotion in ApoE-Deficient Mice Implications for Interactions Between Peroxynitrite and Tetrahydrobiopterin ». *Circulation* 103 (9) (juin 3): 1282-1288. doi:10.1161/01.CIR.103.9.1282.
- Le Floc'h, Simon. 2009. « Modulographie vasculaire : Application à l'identification in-vivo du module de Young local des plaques d'athérosclérose ». Université Joseph-Fourier - Grenoble I. <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00424972>.
- Le Floc'h, Simon, Jacques Ohayon, Philippe Tracqui, Gérard Finet, Ahmed M Gharib, Roch L Maurice, Guy Cloutier, et Roderic I Pettigrew. 2009. « Vulnerable Atherosclerotic Plaque Elasticity Reconstruction Based on a Segmentation-driven Optimization Procedure Using Strain Measurements: Theoretical Framework ». *IEEE Transactions on Medical Imaging* 28 (7) (juillet): 1126-1137. doi:10.1109/TMI.2009.2012852.
- Lederman, R J, R R Raylman, S J Fisher, P V Kison, H San, E G Nabel, et R L Wahl. 2001. « Detection of atherosclerosis using a novel positron-sensitive probe and 18-fluorodeoxyglucose (FDG) ». *Nuclear medicine communications* 22 (7) (juillet): 747-753.
- Lee, Kyung-Han, Bong-Ho Ko, Jin-Young Paik, Kyung-Ho Jung, Yearn Seong Choe, Yong Choi, et Byung-Tae Kim. 2005. « Effects of anesthetic agents and fasting duration on 18F-FDG biodistribution and insulin levels in tumor-bearing mice ». *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine* 46 (9) (septembre): 1531-1536.
- Lee, R. T., S. G. Richardson, H. M. Loree, A. J. Grodzinsky, S. A. Gharib, F. J. Schoen, et N. Pandian. 1992. « Prediction of Mechanical Properties of Human Atherosclerotic Tissue by High-frequency Intravascular Ultrasound Imaging. An in Vitro Study. » *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 12 (1) (janvier 1): 1-5. doi:10.1161/01.ATV.12.1.1.
- Lee, Richard T., A. J. Grodzinsky, E. H. Frank, R. D. Kamm, et F. J. Schoen. 1991. « Structure-dependent Dynamic Mechanical Behavior of Fibrous Caps from Human Atherosclerotic Plaques. » *Circulation* 83 (5) (janvier 5): 1764-1770. doi:10.1161/01.CIR.83.5.1764.
- Lee, Richard T., et Roger D Kamm. 1994. « Vascular mechanics for the cardiologist ». *Journal of the American College of Cardiology* 23 (6) (mai): 1289-1295.
- Lee, Richard T., H M Loree, G C Cheng, E H Lieberman, N Jaramillo, et F J Schoen. 1993. « Computational Structural Analysis Based on Intravascular Ultrasound Imaging before in Vitro Angioplasty: Prediction of Plaque Fracture Locations ». *Journal of the American College of Cardiology* 21 (3) (mars 1): 777-782.
- Lee, Richard T., Frederick J. Schoen, Howard M. Loree, Michael W. Lark, et Peter Libby. 1996. « Circumferential Stress and Matrix Metalloproteinase 1 in Human Coronary Atherosclerosis Implications for Plaque Rupture ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 16 (8)

## Références Bibliographiques

(janvier 8): 1070-1073. doi:10.1161/01.ATV.16.8.1070.

- Lees, Ann M., Robert S. Lees, Frederick J. Schoen, Jonathan L. Isaacsohn, Alan J. Fischman, Kenneth A. McKusick, et H. William Strauss. 1988. « Imaging human atherosclerosis with 99mTc-labeled low density lipoproteins. » *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 8 (5): 461–470.
- Lendon, Corinne L., M J Davies, G V Born, et Peter D Richardson. 1991. « Atherosclerotic Plaque Caps Are Locally Weakened When Macrophages Density Is Increased ». *Atherosclerosis* 87 (1) (mars): 87-90.
- Leong-Poi, Howard, Jonathan Christiansen, Peter Heppner, Christopher W Lewis, Alexander L Klibanov, Sanjiv Kaul, et Jonathan R Lindner. 2005. « Assessment of Endogenous and Therapeutic Arteriogenesis by Contrast Ultrasound Molecular Imaging of Integrin Expression ». *Circulation* 111 (24) (juin 21): 3248-3254. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.481515.
- Leung, Kam. 2004. « Ferumoxsil ». In *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22994/>.
- Levitan, Irena, Suncica Volkov, et Papisani V. Subbaiah. 2010. « Oxidized LDL: Diversity, Patterns of Recognition, and Pathophysiology ». *Antioxidants & Redox Signaling* 13 (1) (juillet): 39-75. doi:10.1089/ars.2009.2733.
- Ley, Klaus, et Yuqing Huo. 2001. « VCAM-1 is critical in atherosclerosis ». *Journal of Clinical Investigation* 107 (10) (mai 15): 1209-1210.
- Ley, Klaus, Carlo Laudanna, Myron I. Cybulsky, et Sussan Nourshargh. 2007. « Getting to the Site of Inflammation: The Leukocyte Adhesion Cascade Updated ». *Nature Reviews Immunology* 7 (9) (septembre): 678-689. doi:10.1038/nri2156.
- Li, Dayuan, Amit R. Patel, Alexander L. Klibanov, Christopher M. Kramer, Mirta Ruiz, Bum-Yong Kang, Jawahar L. Mehta, George A. Beller, David K. Glover, et Craig H. Meyer. 2010. « Molecular imaging of atherosclerotic plaques targeted to oxidized LDL receptor LOX-1 by SPECT/CT and magnetic resonance ». *Circulation: Cardiovascular Imaging* 3 (4): 464–472.
- Li, X, V Van Putten, F Zarinetchi, M E Nicks, S Thaler, L E Heasley, et R A Nemenoff. 1997. « Suppression of smooth-muscle alpha-actin expression by platelet-derived growth factor in vascular smooth-muscle cells involves Ras and cytosolic phospholipase A2 ». *The Biochemical journal* 327 ( Pt 3) (novembre 1): 709-716.
- Li, Yankun, Marie-Christine Gerbod-Giannone, Heather Seitz, Dongying Cui, Edward Thorp, Alan R Tall, Glenn K Matsushima, et Ira Tabas. 2006. « Cholesterol-induced Apoptotic Macrophages Elicit an Inflammatory Response in Phagocytes, Which Is Partially Attenuated by the Mer Receptor ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (10) (mars 10): 6707-6717. doi:10.1074/jbc.M510579200.
- Liao, Xianghai, Judith C. Sluimer, Ying Wang, Manikandan Subramanian, Kristy Brown, J. Scott Pattison, Jeffrey Robbins, Jennifer Martinez, et Ira Tabas. 2012. « Macrophage Autophagy Plays a Protective Role in Advanced Atherosclerosis ». *Cell Metabolism* 15 (4) (avril 4): 545-553. doi:10.1016/j.cmet.2012.01.022.
- Liao, Xudong, Nikunj Sharma, Fehmida Kapadia, Guangjin Zhou, Yuan Lu, Hong Hong, Kaavya Paruchuri, et al. 2011. « Krüppel-like factor 4 regulates macrophage polarization ». *The Journal of Clinical Investigation* 121 (7) (juillet 1): 2736-2749. doi:10.1172/JCI45444.
- Libby, Peter, Andrew H. Lichtman, et Göran K. Hansson. 2013. « Immune Effector Mechanisms Implicated in Atherosclerosis: From Mice to Humans ». *Immunity* 38 (6): 1092–1104.
- Lievens, D, et P von Hundelshausen. 2011. « Platelets in Atherosclerosis ». *Thrombosis and Haemostasis* 106 (5) (novembre): 827-838. doi:10.1160/TH11-08-0592.

## Références Bibliographiques

- Limbird, Lee E. 2004. *Cell Surface Receptors: A Short Course on Theory and Methods*. 3rd éd. Springer.
- Lindner, Jonathan R. 2002. « Detection of Inflamed Plaques with Contrast Ultrasound ». *The American Journal of Cardiology* 90 (10C) (novembre 21): 32L-35L.
- Ling, X, T Tamaki, Y Xiao, S Kamangar, C Clayberger, D B Lewis, et A M Krensky. 2000. « An immunosuppressive and anti-inflammatory HLA class I-derived peptide binds vascular cell adhesion molecule-1 ». *Transplantation* 70 (4) (août 27): 662-667.
- Lipinski, Michael J., Vardan Amirbekian, Juan C. Frias, Juan Gilberto S. Aguinaldo, Venkatesh Mani, Karen C. Briley-Saebo, Valentin Fuster, John T. Fallon, Edward A. Fisher, et Zahi A. Fayad. 2006. « MRI to Detect Atherosclerosis with Gadolinium-containing Immunomicelles Targeting the Macrophage Scavenger Receptor ». *Magnetic Resonance in Medicine* 56 (3): 601–610. doi:10.1002/mrm.20995.
- Lipinski, Michael J., Juan C. Frias, Vardan Amirbekian, Karen C. Briley-Saebo, Venkatesh Mani, Daniel Samber, Antonio Abbate, Juan Gilberto S. Aguinaldo, Davis Massey, et Valentin Fuster. 2009. « Macrophage-specific lipid-based nanoparticles improve cardiac magnetic resonance detection and characterization of human atherosclerosis ». *JACC: Cardiovascular Imaging* 2 (5): 637–647.
- Liu, Jian, Galina K Sukhova, Jiu-Song Sun, Wei-Hua Xu, Peter Libby, et Guo-Ping Shi. 2004. « Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24 (8) (août): 1359-1366. doi:10.1161/01.ATV.0000134530.27208.41.
- Liu, S, et D S Edwards. 1999. « <sup>99m</sup>Tc-Labeled Small Peptides as Diagnostic Radiopharmaceuticals ». *Chemical Reviews* 99 (9) (septembre 8): 2235-2268.
- Liu, Xiaojun, Yunhui Cheng, Shuo Zhang, Ying Lin, Jian Yang, et Chunxiang Zhang. 2009. « A Necessary Role of miR-221 and miR-222 in Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Neointimal Hyperplasia ». *Circulation Research* 104 (4) (février 27): 476-487. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.185363.
- Loree, Howard M., Alan J. Grodzinsky, Susan Y. Park, Lorna J. Gibson, et Richard T. Lee. 1994. « Static circumferential tangential modulus of human atherosclerotic tissue ». *Journal of Biomechanics* 27 (2) (février): 195-204. doi:10.1016/0021-9290(94)90209-7.
- Loree, Howard M., R D Kamm, R G Stringfellow, et Richard T. Lee. 1992. « Effects of fibrous cap thickness on peak circumferential stress in model atherosclerotic vessels ». *Circulation research* 71 (4) (octobre): 850-858.
- Loree, Howard M., Barbara J. Tobias, Lorna J. Gibson, Roger D. Kamm, Donald M. Small, et Richard T. Lee. 1994. « Mechanical Properties of Model Atherosclerotic Lesion Lipid Pools. » *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 14 (2) (janvier 2): 230-234. doi:10.1161/01.ATV.14.2.230.
- Lorenz, Matthias W, Hugh S Markus, Michiel L Bots, Maria Rosvall, et Matthias Sitzer. 2007. « Prediction of Clinical Cardiovascular Events with Carotid Intima-media Thickness: a Systematic Review and Meta-analysis ». *Circulation* 115 (4) (janvier 30): 459-467. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.628875.
- Lorenz, Matthias W., Joseph F. Polak, Maryam Kavousi, Ellisiv B. Mathiesen, Henry Völzke, Tomi-Pekka Tuomainen, Dirk Sander, Matthieu Plichart, Alberico L. Catapano, et Christine M. Robertson. 2012. « Carotid intima-media thickness progression to predict cardiovascular events in the general population (the PROG-IMT collaborative project): a meta-analysis of individual participant data ». *The Lancet* 379 (9831): 2053–2062.
- Lu, Li-Fan, Evan F Lind, David C Gondek, Kathy A Bennett, Michael W Gleeson, Karina Pino-Lagos, Zachary A Scott, et al. 2006. « Mast Cells Are Essential Intermediaries in Regulatory T-cell Tolerance ». *Nature* 442 (7106) (août 31): 997-1002. doi:10.1038/nature05010.

## Références Bibliographiques

- Ludmer, Paul L., Andrew P. Selwyn, Thomas L. Shook, Richard R. Wayne, Gilbert H. Mudge, R. Wayne Alexander, et Peter Ganz. 1986. « Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. » *The New England journal of medicine* 315 (17): 1046.
- Luma, Joane, Marija Sedlar, Evis Harja, et Lynne L. Johnson. 2010. « Noninvasive monitoring the biology of atherosclerotic plaque development with radiolabeled annexin V and matrix metalloproteinase inhibitor in spontaneous atherosclerotic mice ». *Journal of nuclear cardiology* 17 (6): 1073–1081.
- Lundkvist, A., E. Lilleodden, W. Siekhaus, J. Kinney, L. Pruitt, et M. Balooch. 1996. « Viscoelastic properties of healthy human artery measured in saline solution by AFM-based indentation technique ». In *MRS Proceedings*. Vol. 436.  
[http://journals.cambridge.org/abstract\\_S1946427400280482](http://journals.cambridge.org/abstract_S1946427400280482).
- Luo, Guangbin, Patricia Ducy, Marc D. McKee, Gerald J. Pinero, Evelyne Loyer, Richard R. Behringer, et Gérard Karsenty. 1997. « Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein ». <http://www.nature.com/nature/journal/v386/n6620/abs/386078a0.html>.
- Lusis, Aldons J, et Päivi Pajukanta. 2008. « A treasure trove for lipoprotein biology ». *Nature Genetics* 40 (2) (février): 129-130. doi:10.1038/ng0208-129.
- Lutgens, Esther, Ebo D. de Muinck, Sylvia Heeneman, et Mat J. A. P. Daemen. 2001. « Compensatory Enlargement and Stenosis Develop in ApoE<sup>-/-</sup> and ApoE<sup>\*3</sup>-Leiden Transgenic Mice ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 21 (8) (janvier 8): 1359-1365. doi:10.1161/hq0801.093669.
- Lyons, Timothy J. 1992. « Lipoprotein glycation and its metabolic consequences ». *Diabetes* 41 (Supplement 2): 67–73.
- Mach, F, U Schönbeck, J Y Bonnefoy, J S Pober, et P Libby. 1997. « Activation of Monocyte/macrophage Functions Related to Acute Atheroma Complication by Ligation of CD40: Induction of Collagenase, Stromelysin, and Tissue Factor ». *Circulation* 96 (2) (juillet 15): 396-399.
- Madamanchi, Nageswara R., Aleksandr Vendrov, et Marschall S. Runge. 2005. « Oxidative stress and vascular disease ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25 (1): 29–38.
- Maeda, Hideki, Hiroeki Sahara, Yoko Mori, Toshihiko Torigo, Kenjiro Kamiguchi, Yutaka Tamura, Yasuaki Tamura, Kouichi Hirata, et Noriyuki Sato. 2007. « Biological heterogeneity of the peptide-binding motif of the 70-kDa heat shock protein by surface plasmon resonance analysis ». *The Journal of biological chemistry* 282 (37) (septembre 14): 26956-26962. doi:10.1074/jbc.M703436200.
- Maeda, Nobuyo, Lance Johnson, Shinja Kim, John Hagaman, Morton Friedman, et Robert Reddick. 2007. « Anatomical differences and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice with 129/SvEv and C57BL/6 genetic backgrounds ». *Atherosclerosis* 195 (1) (novembre): 75-82. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.12.006.
- Malek, A M, S L Alper, et S Izumo. 1999. « Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis ». *JAMA: the journal of the American Medical Association* 282 (21) (décembre 1): 2035-2042.
- Mason, Jody M. 2010. « Design and development of peptides and peptide mimetics as antagonists for therapeutic intervention ». *Future Medicinal Chemistry* 2 (12) (décembre): 1813-1822. doi:10.4155/fmc.10.259.
- Matsumoto, Takeo, Hironobu Abe, Toshiro Ohashi, Yoko Kato, et Masaaki Sato. 2002. « Local Elastic Modulus of Atherosclerotic Lesions of Rabbit Thoracic Aortas Measured by Pipette Aspiration Method ». *Physiological Measurement* 23 (4) (novembre 1): 635. doi:10.1088/0967-3334/23/4/304.
- Matsumoto, Takeo, Taisuke Goto, Takao Furukawa, et Masaaki Sato. 2004. « Residual stress and strain

## Références Bibliographiques

- in the lamellar unit of the porcine aorta: experiment and analysis ». *Journal of Biomechanics* 37 (6) (juin): 807-815. doi:10.1016/j.jbiomech.2003.08.014.
- Matsumoto, Takeo, K Hayashi, et K Ide. 1995. « Residual Strain and Local Strain Distributions in the Rabbit Atherosclerotic Aorta ». *Journal of Biomechanics* 28 (10) (octobre): 1207-1217.
- Matter, Christian M, Matthias T Wyss, Patricia Meier, Nicolas Späth, Tobias von Lukowicz, Christine Lohmann, Bruno Weber, et al. 2006. « 18F-choline images murine atherosclerotic plaques ex vivo ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26 (3) (mars): 584-589. doi:10.1161/01.ATV.0000200106.34016.18.
- McAteer, Martina A, Nicola R Sibson, Constantin von zur Muhlen, Jurgen E Schneider, Andrew S Lowe, Nicholas Warrick, Keith M Channon, Daniel C Anthony, et Robin P Choudhury. 2007. « In vivo magnetic resonance imaging of acute brain inflammation using microparticles of iron oxide ». *Nature medicine* 13 (10) (octobre): 1253-1258. doi:10.1038/nm1631.
- McAteer, Martina A., Jurgen E. Schneider, Ziad A. Ali, Nicholas Warrick, Christina A. Bursill, Constantin von zur Muhlen, David R. Greaves, Stefan Neubauer, Keith M. Channon, et Robin P. Choudhury. 2008. « Magnetic Resonance Imaging of Endothelial Adhesion Molecules in Mouse Atherosclerosis Using Dual-Targeted Microparticles of Iron Oxide ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28 (1) (janvier 1): 77-83. doi:10.1161/ATVBAHA.107.145466.
- McKee, Clayton T., Julie A. Last, Paul Russell, et Christopher J. Murphy. 2011. « Indentation Versus Tensile Measurements of Young's Modulus for Soft Biological Tissues ». *Tissue Engineering Part B: Reviews* 17 (3) (juin): 155-164. doi:10.1089/ten.teb.2010.0520.
- McLaren, James E., Daryn R. Michael, Tim G. Ashlin, et Dipak P. Ramji. 2011. « Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: Implications for cardiovascular disease therapy ». *Progress in Lipid Research* 50 (4) (octobre): 331-347. doi:10.1016/j.plipres.2011.04.002.
- Mehta, Dolly, et Asrar B Malik. 2006. « Signaling mechanisms regulating endothelial permeability ». *Physiological reviews* 86 (1) (janvier): 279-367. doi:10.1152/physrev.00012.2005.
- Mehta, Jawahar L., Jiawei Chen, Paul L. Hermonat, Francesco Romeo, et Giuseppe Novelli. 2006. « Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders ». *Cardiovascular research* 69 (1): 36-45.
- Meloan, Susan N., et Holde Puchler. 1985. « Chemical Mechanisms of Staining Methods: Von Kossa's Technique: What von Kossa Really Wrote and a Modified Reaction for Selective Demonstration of Inorganic Phosphates ». *Journal of Histotechnology* 8 (1): 11-13. doi:10.1179/014788885794595048.
- Menezes, Leon J., Carl W. Kotze, Brian F. Hutton, Raymondo Endozo, John C. Dickson, Ian Cullum, Syed W. Yusuf, Peter J. Ell, et Ashley M. Groves. 2009. « Vascular Inflammation Imaging with 18F-FDG PET/CT: When to Image? ». *Journal of Nuclear Medicine* 50 (6) (janvier 6): 854-857. doi:10.2967/jnumed.108.061432.
- Mesnier, Nicolas. 2011. « Biomécanique de la croissance de la plaque d'athérosclérose : contribution à l'étude des contraintes résiduelles ». Université de Grenoble. <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00619289>.
- Miao, Cuilian, Shaoguang Chen, Robson Macedo, Shenghan Lai, Kiang Liu, Debiao Li, Bruce A. Wasserman, Jens Vogel-Clausen, João AC Lima, et David A. Bluemke. 2009. « Positive Remodeling of the Coronary Arteries Detected by Magnetic Resonance Imaging in an Asymptomatic Population MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis) ». *Journal of the American College of Cardiology* 53 (18): 1708-1715.
- Michel, Jean-Baptiste, Renu Virmani, Eloisa Arbustini, et Gerard Pasterkamp. 2011. « Intraplaque Haemorrhages as the Trigger of Plaque Vulnerability ». *European Heart Journal* 32 (16) (janvier 8):

## Références Bibliographiques

1977-1985. doi:10.1093/eurheartj/ehr054.

- Millán, Jaime, Lindsay Hewlett, Matthew Glyn, Derek Toomre, Peter Clark, et Anne J. Ridley. 2006. « Lymphocyte Transcellular Migration Occurs through Recruitment of Endothelial ICAM-1 to Caveola- and F-actin-rich Domains ». *Nature Cell Biology* 8 (2) (février): 113-123. doi:10.1038/ncb1356.
- Miller, Gregory J., et Elise F. Morgan. 2010. « Use of microindentation to characterize the mechanical properties of articular cartilage: comparison of biphasic material properties across length scales ». *Osteoarthritis and Cartilage* 18 (8) (août): 1051-1057. doi:10.1016/j.joca.2010.04.007.
- Miller, Yury I., Soo-Ho Choi, Philipp Wiesner, Longhou Fang, Richard Harkewicz, Karsten Hartvigsen, Agnès Boullier, et al. 2011. « Oxidation-Specific Epitopes Are Danger-Associated Molecular Patterns Recognized by Pattern Recognition Receptors of Innate Immunity ». *Circulation Research* 108 (2) (janvier 21): 235-248. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.223875.
- Miller, Yury I., Suganya Viriyakosol, Christoph J. Binder, James R. Feramisco, Theo N. Kirkland, et Joseph L. Witztum. 2003. « Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (3): 1561–1568.
- Mintz, Gary S., Kenneth M. Kent, Augusto D. Pichard, Lowell F. Satler, Jeffrey J. Popma, et Martin B. Leon. 1997. « Contribution of Inadequate Arterial Remodeling to the Development of Focal Coronary Artery Stenoses An Intravascular Ultrasound Study ». *Circulation* 95 (7): 1791–1798.
- Mirbolooki, M Reza, Cristian C Constantinescu, Min-Liang Pan, et Jogeshwar Mukherjee. 2011. « Quantitative assessment of brown adipose tissue metabolic activity and volume using 18F-FDG PET/CT and  $\beta$ -adrenergic receptor activation ». *EJNMMI research* 1 (1): 30. doi:10.1186/2191-219X-1-30.
- Mittleman, Murray A., et Elizabeth Mostofsky. 2011. « Physical, Psychological and Chemical Triggers of Acute Cardiovascular Events Preventive Strategies ». *Circulation* 124 (3): 346–354.
- Moore, Kathryn J., et Ira Tabas. 2011. « Macrophages in the Pathogenesis of Atherosclerosis ». *Cell* 145 (3) (avril 29): 341-355. doi:10.1016/j.cell.2011.04.005.
- Moreno, Pedro R., K. Raman Purushothaman, Valentin Fuster, Dario Echeverri, Helena Trusczynska, Samin K. Sharma, Juan J. Badimon, et William N. O'Connor. 2004. « Plaque Neovascularization Is Increased in Ruptured Atherosclerotic Lesions of Human Aorta Implications for Plaque Vulnerability ». *Circulation* 110 (14) (mai 10): 2032-2038. doi:10.1161/01.CIR.0000143233.87854.23.
- Moreno, Pedro R., K.-Raman Purushothaman, Marc Sirol, Andrew P. Levy, et Valentin Fuster. 2006. « Neovascularization in Human Atherosclerosis ». *Circulation* 113 (18) (septembre 5): 2245-2252. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.578955.
- Mosser, David M., et Justin P. Edwards. 2008. « Exploring the full spectrum of macrophage activation ». *Nature Reviews Immunology* 8 (12) (décembre): 958-969. doi:10.1038/nri2448.
- Motoyama, Sadako, Takeshi Kondo, Masayoshi Sarai, Atsushi Sugiura, Hiroto Harigaya, Takahisa Sato, Kaori Inoue, et al. 2007. « Multislice Computed Tomographic Characteristics of Coronary Lesions in Acute Coronary Syndromes ». *Journal of the American College of Cardiology* 50 (4) (juillet 24): 319-326. doi:10.1016/j.jacc.2007.03.044.
- Motoyama, Sadako, Masayoshi Sarai, Hiroto Harigaya, Hirofumi Anno, Kaori Inoue, Tomonori Hara, Hiroyuki Naruse, et al. 2009. « Computed Tomographic Angiography Characteristics of Atherosclerotic Plaques Subsequently Resulting in Acute Coronary Syndrome ». *Journal of the American College of Cardiology* 54 (1) (juin 30): 49-57. doi:10.1016/j.jacc.2009.02.068.

## Références Bibliographiques

- Moulton, Karen S., Eric Heller, Moritz A. Konerding, Evelyn Flynn, Wulf Palinski, et Judah Folkman. 1999. « Angiogenesis Inhibitors Endostatin or TNP-470 Reduce Intimal Neovascularization and Plaque Growth in Apolipoprotein E-Deficient Mice ». *Circulation* 99 (13) (juin 4): 1726-1732. doi:10.1161/01.CIR.99.13.1726.
- Muller, J. E., G. H. Tofler, et P. H. Stone. 1989. « Circadian Variation and Triggers of Onset of Acute Cardiovascular Disease. » *Circulation* 79 (4) (janvier 4): 733-743. doi:10.1161/01.CIR.79.4.733.
- Muntendam, Pieter, Carol McCall, Javier Sanz, Erling Falk, et Valentin Fuster. 2010. « The BioImage Study: novel approaches to risk assessment in the primary prevention of atherosclerotic cardiovascular disease—study design and objectives ». *American heart journal* 160 (1): 49–57.
- Myers, Kelly S, James H F Rudd, Eric P Hailman, James A Bolognese, Joanne Burke, Cathy Anne Pinto, Michael Klimas, Richard Hargreaves, Hayes M Dansky, et Zahi A Fayad. 2012. « Correlation Between Arterial FDG Uptake and Biomarkers in Peripheral Artery Disease ». *JACC. Cardiovascular Imaging* 5 (1) (janvier): 38-45. doi:10.1016/j.jcmg.2011.08.019.
- Myszka, David G. 1997. « Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors ». *Current Opinion in Biotechnology* 8 (1) (février): 50-57. doi:10.1016/S0958-1669(97)80157-7.
- Myszka, David G., Mathew D. Jonsen, et Barbara J. Graves. 1998. « Equilibrium Analysis of High Affinity Interactions Using BIACORE ». *Analytical Biochemistry* 265 (2) (décembre 15): 326-330. doi:10.1006/abio.1998.2937.
- Naghavi, Morteza, Peter Libby, Erling Falk, S Ward Casscells, Silvio Litovsky, John Rumberger, Juan Jose Badimon, et al. 2003a. « From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I ». *Circulation* 108 (14) (octobre 7): 1664-1672. doi:10.1161/01.CIR.0000087480.94275.97.
- . 2003b. « From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II ». *Circulation* 108 (15) (octobre 14): 1772-1778. doi:10.1161/01.CIR.0000087481.55887.C9.
- Nahrendorf, Matthias, Farouc A. Jaffer, Kimberly A. Kelly, David E. Sosnovik, Elena Aikawa, Peter Libby, et Ralph Weissleder. 2006. « Noninvasive Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Imaging Identifies Inflammatory Activation of Cells in Atherosclerosis ». *Circulation* 114 (14) (mars 10): 1504-1511. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.646380.
- Nahrendorf, Matthias, Edmund Keliher, Peter Panizzi, Hanwen Zhang, Sheena Hembrador, Jose-Luiz Figueiredo, Elena Aikawa, Kimberly Kelly, Peter Libby, et Ralph Weissleder. 2009. « 18F-4V for PET-CT imaging of VCAM-1 expression in atherosclerosis ». *JACC. Cardiovascular imaging* 2 (10) (octobre): 1213-1222. doi:10.1016/j.jcmg.2009.04.016.
- Nahrendorf, Matthias, Hanwen Zhang, Sheena Hembrador, Peter Panizzi, David E Sosnovik, Elena Aikawa, Peter Libby, Filip K Swirski, et Ralph Weissleder. 2008. « Nanoparticle PET-CT imaging of macrophages in inflammatory atherosclerosis ». *Circulation* 117 (3) (janvier 22): 379-387. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.741181.
- Nair, Anuja, Barry D. Kuban, E. Murat Tuzcu, Paul Schoenhagen, Steven E. Nissen, et D. Geoffrey Vince. 2002. « Coronary Plaque Classification With Intravascular Ultrasound Radiofrequency Data Analysis ». *Circulation* 106 (17) (octobre 22): 2200-2206. doi:10.1161/01.CIR.0000035654.18341.5E.
- Najafi-Shoushtari, S Hani, Fjoralba Kristo, Yingxia Li, Toshi Shioda, David E Cohen, Robert E Gerszten, et Anders M Näär. 2010. « MicroRNA-33 and the SREBP Host Genes Cooperate to Control Cholesterol Homeostasis ». *Science (New York, N.Y.)* 328 (5985) (juin 18): 1566-1569. doi:10.1126/science.1189123.

## Références Bibliographiques

- Nakashima, Yutaka, Yong-Xiang Chen, Naoko Kinukawa, et Katsuo Sueishi. 2002. « Distributions of Diffuse Intimal Thickening in Human Arteries: Preferential Expression in Atherosclerosis-prone Arteries from an Early Age ». *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* 441 (3) (septembre): 279-288. doi:10.1007/s00428-002-0605-1.
- Nakashima, Yutaka, Andrew S Plump, Elaine W Raines, Jan L Breslow, et Russell Ross. 1994. « ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree ». *Arteriosclerosis and thrombosis: a journal of vascular biology / American Heart Association* 14 (1) (janvier): 133-140.
- Nakashima, Yutaka, Thomas N. Wight, et Katsuo Sueishi. 2008. « Early Atherosclerosis in Humans: Role of Diffuse Intimal Thickening and Extracellular Matrix Proteoglycans ». *Cardiovascular Research* 79 (1) (janvier 7): 14-23. doi:10.1093/cvr/cvn099.
- Nalla, R. K., J. H. Kinney, et R. O. Ritchie. 2003. « Mechanistic Fracture Criteria for the Failure of Human Cortical Bone ». *Nature Materials* 2 (3) (mars): 164-168. doi:10.1038/nmat832.
- Nasir, Khurram, Matthew J Budoff, Wendy S Post, Elliot K Fishman, Mahadevappa Mahesh, Joao A Lima, et Roger S Blumenthal. 2003. « Electron Beam CT Versus Helical CT Scans for Assessing Coronary Calcification: Current Utility and Future Directions ». *American Heart Journal* 146 (6) (décembre): 969-977. doi:10.1016/S0002-8703(03)00450-2.
- Nauseef, William M. 2008. « Biological roles for the NOX family NADPH oxidases ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (25): 16961–16965.
- Nedergaard, Jan, Tore Bengtsson, et Barbara Cannon. 2007. « Unexpected Evidence for Active Brown Adipose Tissue in Adult Humans ». *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 293 (2) (janvier 8): E444-E452. doi:10.1152/ajpendo.00691.2006.
- Neth, Peter, Maliheh Nazari-Jahantigh, Andreas Schober, et Christian Weber. 2013. « MicroRNAs in Flow-dependent Vascular Remodelling ». *Cardiovascular Research* (mai 13). doi:10.1093/cvr/cvt096.
- Newby, Andrew C., et Alla B. Zaltsman. 1999. « Fibrous Cap Formation or Destruction — the Critical Importance of Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation, Migration and Matrix Formation ». *Cardiovascular Research* 41 (2) (janvier 2): 345-360. doi:10.1016/S0008-6363(98)00286-7.
- Nguyen, Anh T., Delphine Gomez, Robert D. Bell, Julie H. Campbell, Alexander W. Clowes, Giulio Gabbiani, Cecilia M. Giachelli, et al. 2013. « Smooth Muscle Cell Plasticity Fact or Fiction? ». *Circulation Research* 112 (1) (avril 1): 17-22. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.281048.
- Nielsen, Lars Bo. 1996. « Transfer of low density lipoprotein into the arterial wall and risk of atherosclerosis ». *Atherosclerosis* 123 (1): 1–15.
- Nieuwstadt, H.A., A.C. Akyildiz, L. Speelman, R. Virmani, A. van der Lugt, A.F.W. van der Steen, J.J. Wentzel, et F.J.H. Gijsen. 2013. « The influence of axial image resolution on atherosclerotic plaque stress computations ». *Journal of Biomechanics* 46 (4) (février 22): 689-695. doi:10.1016/j.jbiomech.2012.11.042.
- Nishigori, Kantaro, Takashi Temma, Keiko Yoda, Satoru Onoe, Naoya Kondo, Masashi Shiomi, Masahiro Ono, et Hideo Saji. 2013. « Radioiodinated peptide probe for selective detection of oxidized low density lipoprotein in atherosclerotic plaques ». *Nuclear Medicine and Biology* 40 (1) (janvier): 97-103. doi:10.1016/j.nucmedbio.2012.08.002.
- Nossner, E, J E Goldberg, C Naftzger, S C Lyu, C Clayberger, et A M Krensky. 1996. « HLA-derived peptides which inhibit T cell function bind to members of the heat-shock protein 70 family ». *The Journal of experimental medicine* 183 (2) (février 1): 339-348.
- Ntziachristos, Vasilis, Ching-Hsuan Tung, Christoph Bremer, et Ralph Weissleder. 2002.

## Références Bibliographiques

- « Fluorescence molecular tomography resolves protease activity in vivo ». *Nature medicine* 8 (7): 757–761.
- O'Brien, Kevin D., Thomas O. McDonald, Alan Chait, Margaret D. Allen, et Charles E. Alpers. 1996. « Neovascular Expression of E-Selectin, Intercellular Adhesion Molecule-1, and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Human Atherosclerosis and Their Relation to Intimal Leukocyte Content ». *Circulation* 93 (4) (février 15): 672-682. doi:10.1161/01.CIR.93.4.672.
- O'Callaghan, Christopher J., et Bryan Williams. 2000. « Mechanical Strain–Induced Extracellular Matrix Production by Human Vascular Smooth Muscle Cells Role of TGF- $\beta$ 1 ». *Hypertension* 36 (3) (janvier 9): 319-324. doi:10.1161/01.HYP.36.3.319.
- Ogawa, Mikako, Seigo Ishino, Takahiro Mukai, Daigo Asano, Noboru Teramoto, Hiroshi Watabe, Nobuyuki Kudomi, et al. 2004. « 18F-FDG Accumulation in Atherosclerotic Plaques: Immunohistochemical and PET Imaging Study ». *Journal of Nuclear Medicine* 45 (7) (janvier 7): 1245-1250.
- Ogawa, Mikako, Satoki Nakamura, Yuriko Saito, Mutsumi Kosugi, et Yasuhiro Magata. 2012. « What can be seen by 18F-FDG PET in atherosclerosis imaging? The effect of foam cell formation on 18F-FDG uptake to macrophages in vitro ». *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine* 53 (1) (janvier): 55-58. doi:10.2967/jnumed.111.092866.
- Ohayon, Jacques, Olivier Dubreuil, Philippe Tracqui, Simon Le Floc'h, Gilles Rioufol, Lara Chalabreysse, Françoise Thivolet, Roderic I Pettigrew, et Gérard Finet. 2007. « Influence of Residual Stress/strain on the Biomechanical Stability of Vulnerable Coronary Plaques: Potential Impact for Evaluating the Risk of Plaque Rupture ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 293 (3) (septembre): H1987-1996. doi:10.1152/ajpheart.00018.2007.
- Ohayon, Jacques, Gerard Finet, Ahmed M. Gharib, Daniel A. Herzka, Philippe Tracqui, Julie Heroux, Gilles Rioufol, Melanie S. Kotys, Abdalla Elagha, et Roderic I. Pettigrew. 2008. « Necrotic core thickness and positive arterial remodeling index: emergent biomechanical factors for evaluating the risk of plaque rupture ». *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 295 (2) (août): H717-H727. doi:10.1152/ajpheart.00005.2008.
- Ohayon, Jacques, Nicolas Mesnier, Alexis Broisat, Jakub Toczek, Laurent Riou, et Philippe Tracqui. 2012. « Elucidating atherosclerotic vulnerable plaque rupture by modeling cross substitution of ApoE-/- mouse and human plaque components stiffnesses ». *Biomechanics and modeling in mechanobiology* 11 (6) (juillet): 801-813. doi:10.1007/s10237-011-0353-8.
- Ohayon, Jacques, P Teppaz, G Finet, et G Rioufol. 2001. « In-vivo Prediction of Human Coronary Plaque Rupture Location Using Intravascular Ultrasound and the Finite Element Method ». *Coronary Artery Disease* 12 (8) (décembre): 655-663.
- Ohlson, Kerstin B E, Irina G Shabalina, Katarina Lennström, Emma C Backlund, Nina Mohell, Gennady E Bronnikov, Sten G E Lindahl, Barbara Cannon, et Jan Nedergaard. 2004. « Inhibitory effects of halothane on the thermogenic pathway in brown adipocytes: localization to adenylyl cyclase and mitochondrial fatty acid oxidation ». *Biochemical pharmacology* 68 (3) (août 1): 463-477. doi:10.1016/j.bcp.2004.03.028.
- Ohshima, Satoru, Artiom Petrov, Shinichiro Fujimoto, Jun Zhou, Michael Azure, D. Scott Edwards, Toyoaki Murohara, Navneet Narula, Sotirios Tsimikas, et Jagat Narula. 2009. « Molecular Imaging of Matrix Metalloproteinase Expression in Atherosclerotic Plaques of Mice Deficient in Apolipoprotein E or Low-Density-Lipoprotein Receptor ». *Journal of Nuclear Medicine* 50 (4) (janvier 4): 612-617. doi:10.2967/jnumed.108.055889.
- Ohtsuka, A, J Ando, R Korenaga, A Kamiya, N Toyama-Sorimachi, et M Miyasaka. 1993. « The effect of flow on the expression of vascular adhesion molecule-1 by cultured mouse endothelial cells ». *Biochemical and biophysical research communications* 193 (1) (mai 28): 303-310.

## Références Bibliographiques

- Ohtsuki, Katsuichi, Motoya Hayase, Koichi Akashi, Susan Kopiwoda, et H. William Strauss. 2001. « Detection of monocyte chemoattractant protein-1 receptor expression in experimental atherosclerotic lesions An autoradiographic study ». *Circulation* 104 (2): 203–208.
- Oie, Tomonori, Yoshinobu Murayama, Toru Fukuda, Chiharu Nagai, Sadao Omata, Keiichi Kanda, Hitoshi Yaku, et Yasuhide Nakayama. 2009. « Local Elasticity Imaging of Vascular Tissues Using a Tactile Mapping System ». *Journal of Artificial Organs* 12 (1) (mars 1): 40-46. doi:10.1007/s10047-008-0440-5.
- Okamura, Yoshinori, Michiko Watari, Elliot S. Jerud, Donna W. Young, Sally T. Ishizaka, Jeffrey Rose, Jesse C. Chow, et Jerome F. Strauss. 2001. « The Extra Domain A of Fibronectin Activates Toll-like Receptor 4 ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (13) (mars 30): 10229-10233. doi:10.1074/jbc.M100099200.
- Okane, Kumiko, Masanobu Ibaraki, Hideto Toyoshima, Shigeki Sugawara, Kazuhiro Takahashi, Shuichi Miura, Eku Shimosegawa, Junichiro Satomi, Keishi Kitamura, et Tomohiko Satoh. 2006. « 18F-FDG Accumulation in Atherosclerosis: Use of CT and MR Co-registration of Thoracic and Carotid Arteries ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 33 (5) (mai): 589-594. doi:10.1007/s00259-005-0005-2.
- Okura, Yoshifumi, Marijke Brink, Hiroyuki Itabe, Kathrin J. Scheidegger, Afksendiyos Kalangos, et Patrice Delafontaine. 2000. « Oxidized Low-Density Lipoprotein Is Associated With Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells in Human Atherosclerotic Plaques ». *Circulation* 102 (22) (novembre 28): 2680-2686. doi:10.1161/01.CIR.102.22.2680.
- Okura, Yoshifumi, Marijke Brink, Aliya Aftab Zahid, Asif Anwar, et Patrice Delafontaine. 2001. « Decreased Expression of Insulin-like Growth Factor-1 and Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells in Human Atherosclerotic Plaque ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 33 (10) (octobre): 1777-1789. doi:10.1006/jmcc.2001.1441.
- Olson, Emilia S., Tao Jiang, Todd A. Aguilera, Quyen T. Nguyen, Lesley G. Ellies, Miriam Scadeng, et Roger Y. Tsien. 2010. « Activatable Cell Penetrating Peptides Linked to Nanoparticles as Dual Probes for in Vivo Fluorescence and MR Imaging of Proteases ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (9) (février 3): 4311-4316. doi:10.1073/pnas.0910283107.
- Öörni, Katariina, Markku O. Pentikäinen, Mika Ala-Korpela, et Petri T. Kovanen. 2000. « Aggregation, fusion, and vesicle formation of modified low density lipoprotein particles: molecular mechanisms and effects on matrix interactions ». *Journal of lipid research* 41 (11): 1703–1714.
- Osborn, L, C Hession, R Tizard, C Vassallo, S Luhowskyj, G Chi-Rosso, et R Lobb. 1989. « Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes ». *Cell* 59 (6) (décembre 22): 1203-1211.
- Ouimet, Tanja, Eric Lancelot, Fabien Hyafil, Mario Rienzo, François Deux, Marjorie Lemaître, Sophie Duquesnoy, Jérôme Garot, Bernard P. Roques, et Jean-Baptiste Michel. 2012. « Molecular and cellular targets of the MRI contrast agent p947 for atherosclerosis imaging ». *Molecular Pharmaceutics* 9 (4): 850–861.
- Owens, Gary K, Meena S Kumar, et Brian R Wamhoff. 2004. « Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease ». *Physiological reviews* 84 (3) (juillet): 767-801. doi:10.1152/physrev.00041.2003.
- Ozaki, Yukio, Masanori Okumura, Tevfik F. Ismail, Sadako Motoyama, Hiroyuki Naruse, Kousuke Hattori, Hideki Kawai, et al. 2011. « Coronary CT Angiographic Characteristics of Culprit Lesions in Acute Coronary Syndromes Not Related to Plaque Rupture as Defined by Optical Coherence Tomography and Angioscopy ». *European Heart Journal* 32 (22) (janvier 11): 2814-2823. doi:10.1093/eurheartj/ehr189.
- Page-McCaw, Andrea, Andrew J. Ewald, et Zena Werb. 2007. « Matrix metalloproteinases and the

## Références Bibliographiques

- regulation of tissue remodelling ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 8 (3) (mars): 221-233. doi:10.1038/nrm2125.
- Paigen, B, A Morrow, C Brandon, D Mitchell, et P Holmes. 1985. « Variation in Susceptibility to Atherosclerosis Among Inbred Strains of Mice ». *Atherosclerosis* 57 (1) (octobre): 65-73.
- Palinski, W, M E Rosenfeld, S Ylä-Herttuala, G C Gurtner, S S Socher, S W Butler, S Parthasarathy, T E Carew, D Steinberg, et J L Witztum. 1989. « Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (4) (février): 1372-1376.
- Palmer, Richard M.J., A. G. Ferrige, et Salvador Moncada. 1987. « Nitric Oxide Release Accounts for the Biological Activity of Endothelium-derived Relaxing Factor ». *Nature* 327 (6122) (juin 11): 524-526. doi:10.1038/327524a0.
- Palmer, Richard M.J., et Salvador Moncada. 1989. « A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 158 (1) (janvier 16): 348-352. doi:10.1016/S0006-291X(89)80219-0.
- Parathath, Sajesh, Stephanie L. Mick, Jonathan E. Feig, Victor Joaquin, Lisa Grauer, David M. Habel, Max Gassmann, Lawrence B. Gardner, et Edward A. Fisher. 2011. « Hypoxia Is Present in Murine Atherosclerotic Plaques and Has Multiple Adverse Effects on Macrophage Lipid Metabolism Novelty and Significance ». *Circulation Research* 109 (10) (octobre 28): 1141-1152. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.246363.
- Parthasarathy, S., E. Wieland, et D. Steinberg. 1989. « A Role for Endothelial Cell Lipoxygenase in the Oxidative Modification of Low Density Lipoprotein ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86 (3) (janvier 2): 1046-1050.
- Patel, D J, et D L Fry. 1966. « Longitudinal Tethering of Arteries in Dogs ». *Circulation Research* 19 (6) (décembre): 1011-1021.
- Peloquin, John, John Huynh, Rebecca M. Williams, et Cynthia A. Reinhart-King. 2011. « Indentation measurements of the subendothelial matrix in bovine carotid arteries ». *Journal of Biomechanics* 44 (5) (mars 15): 815-821. doi:10.1016/j.jbiomech.2010.12.018.
- Perk, Joep, Guy De Backer, Helmut Gohlke, Ian Graham, Željko Reiner, Monique Verschuren, Christian Albus, et al. 2012. « European Guidelines on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (version 2012) The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by Representatives of Nine Societies and by Invited experts) Developed with the Special Contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR) ». *European Heart Journal* 33 (13) (janvier 7): 1635-1701. doi:10.1093/eurheartj/ehs092.
- Peterson, Lysle H., Roderick E. Jensen, et John Parnell. 1960. « Mechanical Properties of Arteries in Vivo ». *Circulation Research* 8 (3) (janvier 5): 622-639. doi:10.1161/01.RES.8.3.622.
- Pidkovka, Nataliya A., Olga A. Cherepanova, Tadashi Yoshida, Matthew R. Alexander, Rebecca A. Deaton, James A. Thomas, Norbert Leitinger, et Gary K. Owens. 2007. « Oxidized Phospholipids Induce Phenotypic Switching of Vascular Smooth Muscle Cells In Vivo and In Vitro ». *Circulation Research* 101 (8) (décembre 10): 792-801. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.152736.
- Piedrahita, J A, S H Zhang, J R Hagaman, P M Oliver, et N Maeda. 1992. « Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (10) (mai 15): 4471-4475.
- Pischon, Tobias, Cynthia J. Girman, Frank M. Sacks, Nader Rifai, Meir J. Stampfer, et Eric B. Rimm. 2005. « Non-high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B in the prediction of coronary

## Références Bibliographiques

heart disease in men ». *Circulation* 112 (22): 3375–3383.

Plump, A S, J D Smith, T Hayek, K Aalto-Setälä, A Walsh, J G Verstuyft, E M Rubin, et J L Breslow. 1992. « Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells ». *Cell* 71 (2) (octobre 16): 343-353.

Podrez, Eugene A, Tatiana V Byzova, Maria Febbraio, Robert G Salomon, Yi Ma, Manojkumar Valiyaveetil, Eugenia Poliakov, et al. 2007. « Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype ». *Nature medicine* 13 (9) (septembre): 1086-1095. doi:10.1038/nm1626.

Podrez, Eugene A., Maria Febbraio, Nader Sheibani, David Schmitt, Roy L. Silverstein, David P. Hajjar, Peter A. Cohen, William A. Frazier, Henry F. Hoff, et Stanley L. Hazen. 2000. « Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species ». *Journal of Clinical Investigation* 105 (8): 1095–1108.

Podrez, Eugene A., David Schmitt, Henry F. Hoff, et Stanley L. Hazen. 1999. « Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro ». *Journal of Clinical Investigation* 103 (11): 1547–1560.

Powell, M F, T Stewart, L Otvos Jr, L Urge, F C Gaeta, A Sette, T Arrhenius, D Thomson, K Soda, et S M Colon. 1993. « Peptide Stability in Drug Development. II. Effect of Single Amino Acid Substitution and Glycosylation on Peptide Reactivity in Human Serum ». *Pharmaceutical Research* 10 (9) (septembre): 1268-1273.

Prati, Francesco, Evelyn Regar, Gary S. Mintz, Eloisa Arbustini, Carlo Di Mario, Ik-Kyung Jang, Takashi Akasaka, et al. 2010. « Expert Review Document on Methodology, Terminology, and Clinical Applications of Optical Coherence Tomography: Physical Principles, Methodology of Image Acquisition, and Clinical Application for Assessment of Coronary Arteries and Atherosclerosis ». *European Heart Journal* 31 (4) (janvier 2): 401-415. doi:10.1093/eurheartj/ehp433.

Prophet, Edna B., B Mills, J B Arrington, et L H Sobin. 1992. *Laboratory Methods in Histotechnology*. American Registry of Pathology.

Proudfit, William L., Earl K. Shirey, et F. Mason Sones Jr. 1966. « Selective cine coronary arteriography: correlation with clinical findings in 1,000 patients ». *Circulation* 33 (6): 901–910.

Pysz, Marybeth A., Sanjiv S. Gambhir, et Jurgen K. Willmann. 2010. « Molecular Imaging: Current Status and Emerging Strategies ». *Clinical radiology* 65 (7) (juillet): 500-516. doi:10.1016/j.crad.2010.03.011.

Qian, Zhen, Hunt Anderson, Idean Marvasty, Kamran Akram, Gustavo Vazquez, Sarah Rinehart, et Szilard Voros. 2010. « Lesion- and vessel-specific coronary artery calcium scores are superior to whole-heart Agatston and volume scores in the diagnosis of obstructive coronary artery disease ». *Journal of cardiovascular computed tomography* 4 (6) (décembre): 391-399. doi:10.1016/j.jcct.2010.09.001.

Quillard, Thibaut, et Peter Libby. 2012. « Molecular imaging of atherosclerosis for improving diagnostic and therapeutic development ». *Circulation research* 111 (2) (juillet 6): 231-244. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.268144.

Rader, Daniel J., et Alan Daugherty. 2008. « Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis ». *Nature* 451 (7181): 904–913.

Radi, Rafael, Joseph S. Beckman, Kenneth M. Bush, et Bruce A. Freeman. 1991. « Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 288 (2) (août 1): 481-487. doi:10.1016/0003-9861(91)90224-7.

## Références Bibliographiques

- Raghavan, M. L., S. Trivedi, A. Nagaraj, D. D. McPherson, et K. B. Chandran. 2004. « Three-Dimensional Finite Element Analysis of Residual Stress in Arteries ». *Annals of Biomedical Engineering* 32 (2) (février 1): 257-263. doi:10.1023/B:ABME.0000012745.05794.32.
- Rahmim, Arman, et Habib Zaidi. 2008. « PET versus SPECT: strengths, limitations and challenges ». *Nuclear medicine communications* 29 (3): 193–207.
- Raines, Elaine W, S K Dower, et Russell Ross. 1989. « Interleukin-1 Mitogenic Activity for Fibroblasts and Smooth Muscle Cells Is Due to PDGF-AA ». *Science (New York, N.Y.)* 243 (4889) (janvier 20): 393-396.
- Raines, Elaine W, et Nicola Ferri. 2005. « Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Cytokines affecting endothelial and smooth muscle cells in vascular disease ». *Journal of lipid research* 46 (6) (juin): 1081-1092. doi:10.1194/jlr.R500004-JLR200.
- Rajendran, Joseph G., David A. Mankoff, Finbarr O'Sullivan, Lanell M. Peterson, David L. Schwartz, Ernest U. Conrad, Alexander M. Spence, Mark Muzi, D. Greg Farwell, et Kenneth A. Krohn. 2004. « Hypoxia and Glucose Metabolism in Malignant Tumors Evaluation by [18F]Fluoromisonidazole and [18F]Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography Imaging ». *Clinical Cancer Research* 10 (7) (janvier 4): 2245-2252. doi:10.1158/1078-0432.CCR-0688-3.
- Ramana, Kota V., Aruni Bhatnagar, et Satish K. Srivastava. 2004. « Inhibition of Aldose Reductase Attenuates TNF- $\alpha$ -induced Expression of Adhesion Molecules in Endothelial Cells ». *The FASEB Journal* 18 (11) (janvier 8): 1209-1218. doi:10.1096/fj.04-1650com.
- Ratib, Osman, Phelps Me, Huang Sc, Henze E, Selin Ce, et Schelbert Hr. 1982. « Positron Tomography with Deoxyglucose for Estimating Local Myocardial Glucose Metabolism. ». *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 23 (7) (juillet): 577-586.
- Rawlings, Neil D., Alan J. Barrett, et Alex Bateman. 2012. « MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors ». *Nucleic Acids Research* 40 (D1) (janvier): D343-D350. doi:10.1093/nar/gkr987.
- Rayner, Katey J., Yajaira Suarez, Alberto Davalos, Saj Parathath, Michael L. Fitzgerald, Norimasa Tamehiro, Edward A. Fisher, Kathryn J. Moore, et Carlos Fernandez-Hernando. 2010. « MiR-33 Contributes to the Regulation of Cholesterol Homeostasis ». *Science (New York, N.Y.)* 328 (5985) (juin 18): 1570-1573. doi:10.1126/science.1189862.
- Razavian, Mahmoud, Sina Tavakoli, Jiasheng Zhang, Lei Nie, Lawrence W. Dobrucki, Albert J. Sinusas, Michael Azure, Simon Robinson, et Mehran M. Sadeghi. 2011. « Atherosclerosis plaque heterogeneity and response to therapy detected by in vivo molecular imaging of matrix metalloproteinase activation ». *Journal of Nuclear Medicine* 52 (11): 1795–1802.
- Reddy, Junuthula N. 2005. *An Introduction to the Finite Element Method*. 3<sup>e</sup> éd. McGraw-Hill Science/Engineering/Math.
- Reivich, M., D. Kuhl, A. Wolf, J. Greenberg, M. Phelps, T. Ido, V. Casella, et al. 1979. « The [18F]fluorodeoxyglucose Method for the Measurement of Local Cerebral Glucose Utilization in Man. ». *Circulation Research* 44 (1) (janvier 1): 127-137. doi:10.1161/01.RES.44.1.127.
- Resnick, N., T. Collins, W. Atkinson, D. T. Bonthron, C. F. Dewey, et M. A. Gimbrone. 1993. « Platelet-derived Growth Factor B Chain Promoter Contains a Cis-acting Fluid Shear-stress-responsive Element. ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (10) (mai 15): 4591-4595. doi:10.1073/pnas.90.10.4591.
- Resnick, Nitzan, Hava Yahav, Ayelet Shay-Salit, Moran Shushy, Shay Schubert, Limor Chen Michal Zilberman, et Efrat Wofovitz. 2003. « Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse ». *Progress in biophysics and molecular biology* 81 (3): 177–199.

## Références Bibliographiques

- Reusch, Peter, Hisham Wagdy, Regina Reusch, Emily Wilson, et Harlan E. Ives. 1996. « Mechanical Strain Increases Smooth Muscle and Decreases Nonmuscle Myosin Expression in Rat Vascular Smooth Muscle Cells ». *Circulation Research* 79 (5) (janvier 11): 1046-1053. doi:10.1161/01.RES.79.5.1046.
- Rice, Bradley W., Michael D. Cable, et Michael B. Nelson. 2001. « In vivo imaging of light-emitting probes ». *Journal of biomedical optics* 6 (4): 432–440.
- Richardson, Peter D, M J Davies, et G V Born. 1989. « Influence of Plaque Configuration and Stress Distribution on Fissuring of Coronary Atherosclerotic Plaques ». *Lancet* 2 (8669) (octobre 21): 941-944.
- Rigamonti, Elena, Giulia Chinetti-Gbaguidi, et Bart Staels. 2008. « Regulation of Macrophage Functions by PPAR-alpha, PPAR-gamma, and LXRs in Mice and Men ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28 (6) (juin): 1050-1059. doi:10.1161/ATVBAHA.107.158998.
- Rigo, P., P. Paulus, B. J. Kaschten, R. Hustinx, T. Bury, G. Jerusalem, T. Benoit, et J. Foidart-Willems. 1996. « Oncological Applications of Positron Emission Tomography with Fluorine-18 Fluorodeoxyglucose ». *European Journal of Nuclear Medicine* 23 (12) (décembre 1): 1641-1674. doi:10.1007/BF01249629.
- Riou, Laurent M., Alexis Broisat, Julien Dimastromatteo, G. Pons, Daniel Fagret, et Catherine Ghezzi. 2009. « Pre-clinical and clinical evaluation of nuclear tracers for the molecular imaging of vulnerable atherosclerosis: an overview ». *Current Medicinal Chemistry* 16 (12): 1499-1511.
- Roberts, Anita B., Michael B. Sporn, Richard K. Assoian, Joseph M. Smith, Nanette S. Roche, Lalage M. Wakefield, Ursula I. Heine, Lance A. Liotta, Vincent Falanga, et John H. Kehrl. 1986. « Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83 (12): 4167–4171.
- Robinson, Jennifer G., Songfeng Wang, Brian J. Smith, et Terry A. Jacobson. 2009. « Meta-analysis of the relationship between non-high-density lipoprotein cholesterol reduction and coronary heart disease risk ». *Journal of the American College of Cardiology* 53 (4): 316–322.
- Rodriguez, R., et I. Gutierrez. 2003. « Correlation between nanoindentation and tensile properties: Influence of the indentation size effect ». *Materials Science and Engineering: A* 361 (1–2) (novembre 25): 377-384. doi:10.1016/S0921-5093(03)00563-X.
- Rogers, Ian S, Khurram Nasir, Amparo L Figueroa, Ricardo C Cury, Udo Hoffmann, David A Vermylen, Thomas J Brady, et Ahmed Tawakol. 2010. « Feasibility of FDG imaging of the coronary arteries: comparison between acute coronary syndrome and stable angina ». *JACC. Cardiovascular imaging* 3 (4) (avril): 388-397. doi:10.1016/j.jcmg.2010.01.004.
- Rong, James X., Mark Shapiro, Eugene Trogan, et Edward A. Fisher. 2003. « Transdifferentiation of Mouse Aortic Smooth Muscle Cells to a Macrophage-like State after Cholesterol Loading ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (23) (novembre 11): 13531-13536. doi:10.1073/pnas.1735526100.
- Ross, Russell. 1993. « The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s ». <http://www.nature.com/nature/journal/v362/n6423/abs/362801a0.html>.
- . 1999. « Atherosclerosis—an inflammatory disease ». Édité par Franklin H. Epstein. *The New England journal of medicine* 340 (2) (janvier 14): 115-126. doi:10.1056/NEJM199901143400207.
- Ross, Russell, et J A Glomset. 1973. « Atherosclerosis and the Arterial Smooth Muscle Cell: Proliferation of Smooth Muscle Is a Key Event in the Genesis of the Lesions of Atherosclerosis ». *Science (New York, N. Y.)* 180 (4093) (juin 29): 1332-1339.

## Références Bibliographiques

- Rudd, J H F, Z A Fayad, J Machac, P L Weissberg, J R Davies, E A Warburton, A A Tawakol, H W Strauss, et V Fuster. 2007. « Response to "Laurberg JM, Olsen AK, Hansen SB, et al. Imaging of vulnerable atherosclerotic plaques with FDG-microPET: no FDG accumulation" [Atherosclerosis 2006] ». *Atherosclerosis* 192 (2) (juin): 453-454; author reply 451-452. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.10.027.
- Rudd, J H F, E A Warburton, T D Fryer, H A Jones, J C Clark, N Antoun, P Johnström, et al. 2002. « Imaging atherosclerotic plaque inflammation with [18F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography ». *Circulation* 105 (23) (juin 11): 2708-2711.
- Ruehm, Stefan G., Claire Corot, Peter Vogt, Stefan Kolb, et Jörg F. Debatin. 2001. « Magnetic Resonance Imaging of Atherosclerotic Plaque With Ultrasmall Superparamagnetic Particles of Iron Oxide in Hyperlipidemic Rabbits ». *Circulation* 103 (3) (janvier 23): 415-422. doi:10.1161/01.CIR.103.3.415.
- Saam, Tobias, Axel Rominger, Sarah Wolpers, Konstantin Nikolaou, Carsten Rist, Martin Greif, Paul Cumming, et al. 2010. « Association of inflammation of the left anterior descending coronary artery with cardiovascular risk factors, plaque burden and pericardial fat volume: a PET/CT study ». *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 37 (6) (juin): 1203-1212. doi:10.1007/s00259-010-1432-2.
- Saederup, Noah, Liana Chan, Sergio A. Lira, et Israel F. Charo. 2008. « Fractalkine Deficiency Markedly Reduces Macrophage Accumulation and Atherosclerotic Lesion Formation in CCR2<sup>-/-</sup> Mice Evidence for Independent Chemokine Functions in Atherogenesis ». *Circulation* 117 (13) (janvier 4): 1642-1648. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.743872.
- Sage, Andrew P., Yin Tintut, et Linda L. Demer. 2010. « Regulatory Mechanisms in Atherosclerotic Calcification ». *Nature reviews. Cardiology* 7 (9) (septembre): 528-536. doi:10.1038/nrcardio.2010.115.
- Saijo, O., E.S. Filho, H. Sasaki, T. Yambe, M. Tanaka, N. Hozumi, K. Kobayashi, et N. Okada. 2007. « Ultrasonic Tissue Characterization of Atherosclerosis by a Speed-of-Sound Microscanning System ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control* 54 (8): 1571-1577. doi:10.1109/TUFFC.2007.427.
- Saiura, A, M Sata, Y Hirata, R Nagai, et M Makuuchi. 2001. « Circulating Smooth Muscle Progenitor Cells Contribute to Atherosclerosis ». *Nature Medicine* 7 (4) (avril): 382-383. doi:10.1038/86394.
- Sancey, Lucie, Valérie Ardisson, Laurent M. Riou, Mitra Ahmadi, Danièle Marti-Batlle, Didier Boturyn, Pascal Dumy, Daniel Fagret, Catherine Ghezzi, et Jean-Philippe Vuillez. 2007. « In Vivo Imaging of Tumour Angiogenesis in Mice with the Av $\beta$ 3 Integrin-targeted Tracer 99mTc-RAFT-RGD ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 34 (12) (décembre 1): 2037-2047. doi:10.1007/s00259-007-0497-z.
- Sarai, Masayoshi, Dagmar Hartung, Artiom Petrov, Jun Zhou, Navneet Narula, Leo Hofstra, Frank Kolodgie, et al. 2007. « Broad and Specific Caspase Inhibitor-Induced Acute Repression of Apoptosis in Atherosclerotic Lesions Evaluated by Radiolabeled Annexin A5 Imaging ». *Journal of the American College of Cardiology* 50 (24) (décembre 11): 2305-2312. doi:10.1016/j.jacc.2007.08.044.
- Sata, Masataka, Akio Saiura, Atsushi Kunisato, Akihiro Tojo, Seiji Okada, Takeshi Tokuhisa, Hisamaru Hirai, Masatoshi Makuuchi, Yasunobu Hirata, et Ryoza Nagai. 2002. « Hematopoietic Stem Cells Differentiate into Vascular Cells That Participate in the Pathogenesis of Atherosclerosis ». *Nature Medicine* 8 (4) (avril): 403-409. doi:10.1038/nm0402-403.
- Sather, Susan, Karla D Kenyon, Jerry B Lefkowitz, Xiayuan Liang, Brian C Varnum, Peter M Henson, et Douglas K Graham. 2007. « A soluble form of the Mer receptor tyrosine kinase inhibits macrophage clearance of apoptotic cells and platelet aggregation ». *Blood* 109 (3) (février 1):

## Références Bibliographiques

1026-1033. doi:10.1182/blood-2006-05-021634.

- Sawamura, T, N Kume, T Aoyama, H Moriwaki, H Hoshikawa, Y Aiba, T Tanaka, et al. 1997. « An Endothelial Receptor for Oxidized Low-density Lipoprotein ». *Nature* 386 (6620) (mars 6): 73-77. doi:10.1038/386073a0.
- Schaar, Johannes A., Chris L. de Korte, Frits Mastik, Chaylendra Strijder, Gerard Pasterkamp, Eric Boersma, Patrick W. Serruys, et Anton F. W. van der Steen. 2003. « Characterizing Vulnerable Plaque Features With Intravascular Elastography ». *Circulation* 108 (21) (novembre 25): 2636-2641. doi:10.1161/01.CIR.0000097067.96619.1F.
- Schäfers, Michael, Burkhard Riemann, Klaus Kopka, Hans-Jörg Breyholz, Stefan Wagner, Klaus P. Schäfers, Marilyn P. Law, Otmar Schober, et Bodo Levkau. 2004. « Scintigraphic imaging of matrix metalloproteinase activity in the arterial wall in vivo ». *Circulation* 109 (21): 2554–2559.
- Schiopu, Alexandru, Jenny Bengtsson, Ingrid Söderberg, Sabina Janciauskiene, Stefan Lindgren, Mikko P S Ares, Prediman K Shah, Roland Carlsson, Jan Nilsson, et Gunilla Nordin Fredrikson. 2004. « Recombinant Human Antibodies Against Aldehyde-modified Apolipoprotein B-100 Peptide Sequences Inhibit Atherosclerosis ». *Circulation* 110 (14) (octobre 5): 2047-2052. doi:10.1161/01.CIR.0000143162.56057.B5.
- Schneider, Fabrice, Galina K Sukhova, Masanori Aikawa, James Canner, Norbert Gerdes, Sai-Man Timothy Tang, Guo-Ping Shi, Suneel S Apte, et Peter Libby. 2008. « Matrix-metalloproteinase-14 Deficiency in Bone-marrow-derived Cells Promotes Collagen Accumulation in Mouse Atherosclerotic Plaques ». *Circulation* 117 (7) (février 19): 931-939. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.707448.
- Schober, Andreas, Alma Zerneck, Elisa A. Liehn, Philipp von Hundelshausen, Sandra Knarren, William A. Kuziel, et Christian Weber. 2004. « Crucial role of the CCL2/CCR2 axis in neointimal hyperplasia after arterial injury in hyperlipidemic mice involves early monocyte recruitment and CCL2 presentation on platelets ». *Circulation research* 95 (11): 1125–1133.
- Schrijvers, Dorien M, Guido R Y De Meyer, Mark M Kockx, Arnold G Herman, et Wim Martinet. 2005. « Phagocytosis of Apoptotic Cells by Macrophages Is Impaired in Atherosclerosis ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25 (6) (juin): 1256-1261. doi:10.1161/01.ATV.0000166517.18801.a7.
- Schroder, Kate, et Jurg Tschopp. 2010. « The Inflammasomes ». *Cell* 140 (6) (mars 19): 821-832. doi:10.1016/j.cell.2010.01.040.
- Schumacher, T N, L M Mayr, D L Minor Jr, M A Milhollen, M W Burgess, et P S Kim. 1996. « Identification of D-peptide Ligands through Mirror-image Phage Display ». *Science (New York, N.Y.)* 271 (5257) (mars 29): 1854-1857.
- Schwartz, Stephen M., Zorina S. Galis, Michael E. Rosenfeld, et Erling Falk. 2007. « Plaque Rupture in Humans and Mice ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27 (4) (janvier 4): 705-713. doi:10.1161/01.ATV.0000261709.34878.20.
- Schwartz, Stephen M., et C E Murry. 1998. « Proliferation and the Monoclonal Origins of Atherosclerotic Lesions ». *Annual Review of Medicine* 49: 437-460. doi:10.1146/annurev.med.49.1.437.
- Schwenke, Dawn C., et Thomas E. Carew. 1989. « Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. II. Selective retention of LDL vs. selective increases in LDL permeability in susceptible sites of arteries. » *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 9 (6): 908–918.
- Seimon, Tracie A, Marissa J Nadolski, Xianghai Liao, Jorge Magallon, Matthew Nguyen, Nicole T Feric, Marlys L Koschinsky, et al. 2010. « Atherogenic lipids and lipoproteins trigger CD36-TLR2-dependent apoptosis in macrophages undergoing endoplasmic reticulum stress ». *Cell metabolism* 12 (5) (novembre 3): 467-482. doi:10.1016/j.cmet.2010.09.010.

## Références Bibliographiques

- Seimon, Tracie A., Amrom Obstfeld, Kathryn J. Moore, Douglas T. Golenbock, et Ira Tabas. 2006. « Combinatorial Pattern Recognition Receptor Signaling Alters the Balance of Life and Death in Macrophages ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (52) (décembre 26): 19794-19799. doi:10.1073/pnas.0609671104.
- Seneviratne, Anusha, Maarten Hulsmans, Paul Holvoet, et Claudia Monaco. 2013. « Biomechanical Factors and Macrophages in Plaque Stability ». *Cardiovascular Research* (mai 17). doi:10.1093/cvr/cvt097. <http://cardiovascres.oxfordjournals.org/content/early/2013/05/16/cvr.cvt097>.
- Serhan, Charles N, Sue D Brain, Christopher D Buckley, Derek W Gilroy, Christopher Haslett, Luke A J O'Neill, Mauro Perretti, Adriano G Rossi, et John L Wallace. 2007. « Resolution of Inflammation: State of the Art, Definitions and Terms ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21 (2) (février): 325-332. doi:10.1096/fj.06-7227rev.
- Shah, P K, E Falk, J J Badimon, A Fernandez-Ortiz, A Mailhac, G Villareal-Levy, J T Fallon, J Regnstrom, et V Fuster. 1995. « Human Monocyte-derived Macrophages Induce Collagen Breakdown in Fibrous Caps of Atherosclerotic Plaques. Potential Role of Matrix-degrading Metalloproteinases and Implications for Plaque Rupture ». *Circulation* 92 (6) (septembre 15): 1565-1569.
- Shah, Prediman K. 2009. « Inflammation and Plaque Vulnerability ». *Cardiovascular Drugs and Therapy* 23 (1) (février 1): 31-40. doi:10.1007/s10557-008-6147-2.
- Sharp, Peter F., Howard G. Gemmell, et Alison D. Murray. 2005. *Practical nuclear medicine*. Springer London. <http://www.lavoisier.fr/livre/notice.asp?ouvrage=1870073>.
- Sheikine, Yuri, et Kamran Akram. 2010. « FDG-PET imaging of atherosclerosis: Do we know what we see? ». *Atherosclerosis* 211 (2) (août): 371-380. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.01.002.
- Shekhonin, B V, S P Domogatsky, G L Idelson, V E Koteliansky, et V S Rukosuev. 1987. « Relative Distribution of Fibronectin and Type I, III, IV, V Collagens in Normal and Atherosclerotic Intima of Human Arteries ». *Atherosclerosis* 67 (1) (septembre): 9-16.
- Shiomi, Masashi, Takashi Ito, Satoshi Yamada, Seinosuke Kawashima, et Jianglin Fan. 2003. « Development of an Animal Model for Spontaneous Myocardial Infarction (WHHLMI Rabbit) ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23 (7) (janvier 7): 1239-1244. doi:10.1161/01.ATV.0000075947.28567.50.
- Sigovan, Monica, et Emmanuelle Canet-Soulas. 2013. « Molecular MRI of Atherosclerosis with USPIO ». *Current Cardiovascular Imaging Reports* 6 (1) (février 1): 1-10. doi:10.1007/s12410-012-9174-0.
- Silvera, Stephane S, Hamza El Aidi, James H F Rudd, Venkatesh Mani, Lingde Yang, Michael Farkouh, Valentin Fuster, et Zahi A Fayad. 2009. « Multimodality imaging of atherosclerotic plaque activity and composition using FDG-PET/CT and MRI in carotid and femoral arteries ». *Atherosclerosis* 207 (1) (novembre): 139-143. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.04.023.
- Silverstein, Roy L., Wei Li, Young Mi Park, et S. Ohidar Rahaman. 2010. « Mechanisms of Cell Signaling by the Scavenger Receptor CD36: Implications in Atherosclerosis and Thrombosis ». *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 121: 206-220.
- Silvola, Johanna M U, Antti Saraste, Iina Laitinen, Nina Savisto, V Jukka O Laine, Suvi E Heinonen, Seppo Ylä-Herttuala, et al. 2011. « Effects of age, diet, and type 2 diabetes on the development and FDG uptake of atherosclerotic plaques ». *JACC. Cardiovascular imaging* 4 (12) (décembre): 1294-1301. doi:10.1016/j.jcmg.2011.07.009.
- Sima, Anca V., Camelia S. Stancu, et Maya Simionescu. 2009. « Vascular Endothelium in Atherosclerosis ». *Cell and Tissue Research* 335 (1) (janvier 1): 191-203. doi:10.1007/s00441-008-

## Références Bibliographiques

0678-5.

- Simionescu, M., et N. Simionescu. 1993. « Proatherosclerotic Events: Pathobiochemical Changes Occurring in the Arterial Wall before Monocyte Migration. » *The FASEB Journal* 7 (14) (janvier 11): 1359-1366.
- Skålen, Kristina, Maria Gustafsson, Ellen Knutsen Rydberg, Lillemor Mattsson Hultén, Olov Wiklund, Thomas L. Innerarity, et Jan Borén. 2002. « Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis ». *Nature* 417 (6890): 750–754.
- Small, D. M. 1988. « George Lyman Duff Memorial Lecture. Progression and Regression of Atherosclerotic Lesions. Insights from Lipid Physical Biochemistry. » *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 8 (2) (janvier 3): 103-129. doi:10.1161/01.ATV.8.2.103.
- Smith, C. W., S. D. Marlin, R. Rothlein, C. Toman, et D. C. Anderson. 1989. « Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. » *Journal of Clinical Investigation* 83 (6): 2008.
- Smith, Jonathan D., Eugene Trogan, Michael Ginsberg, Claire Grigaux, Jason Tian, et Masaaki Miyata. 1995. « Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (18): 8264–8268.
- Soehnlein, Oliver. 2012. « Multiple Roles for Neutrophils in Atherosclerosis ». *Circulation Research* 110 (6) (mars 16): 875-888. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.257535.
- Soehnlein, Oliver, Maik Drechsler, Mihail Hristov, et Christian Weber. 2009. « Functional Alterations of Myeloid Cell Subsets in Hyperlipidaemia: Relevance for Atherosclerosis ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13 (11-12): 4293–4303. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00965.x.
- Sones, F. M. Jr, et E. K. Shirey. 1962. « Cine coronary arteriography. » *Modern concepts of cardiovascular disease* 31: 735.
- Soper, Daniel S. 2013. *p-Value Calculator for Correlation Coefficients (Online Software)* (version 3.0). Free Statistics Calculators website. <http://www.danielsoper.com/statcalc3/calc.aspx?id=44>.
- Soret, Marine, Stephen L. Bacharach, et Irène Buvat. 2007. « Partial-Volume Effect in PET Tumor Imaging ». *Journal of Nuclear Medicine* 48 (6) (janvier 6): 932-945. doi:10.2967/jnumed.106.035774.
- Sörme, Pernilla, Barbro Kahl-Knutson, Ulf Wellmar, Ulf J Nilsson, et Hakon Leffler. 2003. « Fluorescence polarization to study galectin-ligand interactions ». *Methods in enzymology* 362: 504-512. doi:10.1016/S0076-6879(03)01033-4.
- Speer, Mei Y., Hsueh-Ying Yang, Thea Brabb, Elizabeth Leaf, Amy Look, Wei-Ling Lin, Andrew Frutkin, David Dichek, et Cecilia M. Giachelli. 2009. « Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries ». *Circulation research* 104 (6): 733–741.
- Springer, Timothy A. 1994. « Traffic Signals for Lymphocyte Recirculation and Leukocyte Emigration: The Multistep Paradigm ». *Cell* 76 (2) (janvier 28): 301-314.
- Springer, Timothy A. 1990. « Adhesion receptors of the immune system ». *Nature* 346 (6283): 425–434.
- Staels, Bart, Wolfgang Koenig, Aïda Habib, Régine Merval, Marilynne Lebret, Inés Pineda Torra, Philippe Delerive, et al. 1998. « Activation of Human Aortic Smooth-muscle Cells Is Inhibited by PPAR $\alpha$  but Not by PPAR $\gamma$  Activators ». *Nature* 393 (6687) (juin 25): 790-793. doi:10.1038/31701.
- Stamler, Jonathan S., Santiago Lamas, et Ferric C. Fang. 2001. « Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism ». *Cell* 106 (6): 675–683.

## Références Bibliographiques

- Stancu, Camelia S, Laura Toma, et Anca V Sima. 2012. « Dual role of lipoproteins in endothelial cell dysfunction in atherosclerosis ». *Cell and tissue research* 349 (2) (août): 433-446. doi:10.1007/s00441-012-1437-1.
- Stary, Herbert C. 2000a. « Natural History of Calcium Deposits in Atherosclerosis Progression and Regression ». *Zeitschrift Für Kardiologie* 89 Suppl 2: 28-35.
- . 2000b. « Natural History and Histological Classification of Atherosclerotic Lesions: An Update ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20 (5) (mai): 1177-1178.
- Stary, Herbert C., D H Blankenhorn, A B Chandler, S Glagov, W Insull Jr, M Richardson, M E Rosenfeld, S A Schaffer, C J Schwartz, et W D Wagner. 1992. « A Definition of the Intima of Human Arteries and of Its Atherosclerosis-prone Regions. A Report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association ». *Circulation* 85 (1) (janvier): 391-405.
- Stary, Herbert C., A B Chandler, R E Dinsmore, V Fuster, S Glagov, W Insull Jr, M E Rosenfeld, C J Schwartz, W D Wagner, et R W Wissler. 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 (5) (septembre 1): 1355-1374.
- Stary, Herbert C., A B Chandler, S Glagov, J R Guyton, W Insull Jr, M E Rosenfeld, S A Schaffer, C J Schwartz, W D Wagner, et R W Wissler. 1994. « A Definition of Initial, Fatty Streak, and Intermediate Lesions of Atherosclerosis. A Report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association ». *Circulation* 89 (5) (mai): 2462-2478.
- Steg, Ph Gabriel, Stefan K. James, Dan Atar, Luigi P. Badano, Carina Blomstrom Lundqvist, Michael A. Borger, Carlo Di Mario, et al. 2012. « ESC Guidelines for the Management of Acute Myocardial Infarction in Patients Presenting with ST-segment Elevation The Task Force on the Management of ST-segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology (ESC) ». *European Heart Journal* 33 (20) (janvier 10): 2569-2619. doi:10.1093/eurheartj/ehs215.
- Steinberg, Daniel. 1989. « Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity ». *N. Engl. J. Med.* 320: 915-924.
- . 2009. « The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update ». *The Journal of Lipid Research* 50 (Supplement) (avril): S376-S381. doi:10.1194/jlr.R800087-JLR200.
- Steitz, Susan A., Mei Y. Speer, Marc D. McKee, Lucy Liaw, Manuela Almeida, Hsueh Yang, et Cecilia M. Giachelli. 2002. « Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification ». *The American journal of pathology* 161 (6): 2035-2046.
- Stewart, Cameron R, Lynda M Stuart, Kim Wilkinson, Janine M van Gils, Jiusheng Deng, Annett Halle, Katey J Rayner, et al. 2010. « CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer ». *Nature immunology* 11 (2) (février): 155-161. doi:10.1038/ni.1836.
- Stiel, Georg M., L S Stiel, J Schofer, K Donath, et D G Mathey. 1989. « Impact of Compensatory Enlargement of Atherosclerotic Coronary Arteries on Angiographic Assessment of Coronary Artery Disease ». *Circulation* 80 (6) (décembre): 1603-1609.
- Stocker, Roland, et John F. Keaney. 2004. « Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis ». *Physiological Reviews* 84 (4) (janvier 10): 1381-1478. doi:10.1152/physrev.00047.2003.
- Stone, Gregg W., Akiko Maehara, Alexandra J. Lansky, Bernard de Bruyne, Ecaterina Cristea, Gary S. Mintz, Roxana Mehran, et al. 2011. « A Prospective Natural-History Study of Coronary Atherosclerosis ». *New England Journal of Medicine* 364 (3): 226-235. doi:10.1056/NEJMoa1002358.

## Références Bibliographiques

- Su, B., S. Mitra, H. Gregg, S. Flavahan, M. A. Chotani, K. R. Clark, P. J. Goldschmidt-Clermont, et N. A. Flavahan. 2001. « Redox Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation ». *Circulation Research* 89 (1) (juin 7): 39-46. doi:10.1161/hh1301.093615.
- Su, Haili, Francis G. Spinale, Lawrence W. Dobrucki, James Song, Jing Hua, Sarah Sweterlitsch, Donald P. Dione, Patti Cavaliere, Conroy Chow, et Brian N. Bourke. 2005. « Noninvasive targeted imaging of matrix metalloproteinase activation in a murine model of postinfarction remodeling ». *Circulation* 112 (20): 3157–3167.
- Sukhova, Galina K., Uwe Schönbeck, Elena Rabkin, Frederick J. Schoen, A. Robin Poole, R. Clark Billinghamurst, et Peter Libby. 1999. « Evidence for Increased Collagenolysis by Interstitial Collagenases-1 and -3 in Vulnerable Human Atheromatous Plaques ». *Circulation* 99 (19) (mai 18): 2503-2509. doi:10.1161/01.CIR.99.19.2503.
- Swanson, Dennis P., Henry M. Chilton, et James H. Thrall. 1990. *Pharmaceuticals in Medical Imaging: Radiopaque Contrast Media, Radiopharmaceuticals, Enhancement Agents for Magnetic Resonance Imaging and Ultrasound*. Macmillan Pub. Co.
- Swillens, S. 1995. « Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis. » *Molecular Pharmacology* 47 (6) (janvier 6): 1197-1203.
- Szabó, Csaba, Harry Ischiropoulos, et Rafael Radi. 2007. « Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics ». *Nature Reviews Drug Discovery* 6 (8): 662–680.
- Tabas, Ira. 1999. « Secretory sphingomyelinase ». *Chemistry and physics of lipids* 102 (1): 123–130.
- . 2010a. « Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis ». *Nature reviews. Immunology* 10 (1) (janvier): 36-46. doi:10.1038/nri2675.
- . 2010b. « The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis ». *Circulation research* 107 (7) (octobre 1): 839-850. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.224766.
- Tabas, Ira, YUEQING Li, R. W. Brocia, Shu Wen Xu, T. L. Swenson, et K. J. Williams. 1993. « Lipoprotein lipase and sphingomyelinase synergistically enhance the association of atherogenic lipoproteins with smooth muscle cells and extracellular matrix. A possible mechanism for low density lipoprotein and lipoprotein (a) retention and macrophage foam cell formation. » *Journal of Biological Chemistry* 268 (27): 20419–20432.
- Tabas, Ira, et David Ron. 2011. « Integrating the Mechanisms of Apoptosis Induced by Endoplasmic Reticulum Stress ». *Nature Cell Biology* 13 (3) (mars): 184-190. doi:10.1038/ncb0311-184.
- Tabas, Ira, Alan Tall, et Domenico Accili. 2010. « The Impact of Macrophage Insulin Resistance on Advanced Atherosclerotic Plaque Progression ». *Circulation Research* 106 (1) (août 1): 58-67. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.208488.
- Tabas, Ira, Kevin Jon Williams, et Jan Borén. 2007. « Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications ». *Circulation* 116 (16) (octobre 16): 1832-1844. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.676890.
- Taber, Larry A., et Daniel W. Eggers. 1996. « Theoretical Study of Stress-Modulated Growth in the Aorta ». *Journal of Theoretical Biology* 180 (4) (juin 21): 343-357. doi:10.1006/jtbi.1996.0107.
- Tacke, Frank, David Alvarez, Theodore J. Kaplan, Claudia Jakubzick, Rainer Spanbroek, Jaime Llodra, Alexandre Garin, et al. 2007. « Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques ». *Journal of Clinical Investigation* 117 (1) (janvier 2): 185-194. doi:10.1172/JCI28549.
- Tahara, Nobuhiro, Hisashi Kai, Masatoshi Ishibashi, Hiroyuki Nakaura, Hayato Kaida, Kenkichi Baba,

## Références Bibliographiques

- Naofumi Hayabuchi, et Tsutomu Imaizumi. 2006. « Simvastatin Attenuates Plaque Inflammation: Evaluation by Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography ». *Journal of the American College of Cardiology* 48 (9) (novembre 7): 1825-1831. doi:10.1016/j.jacc.2006.03.069.
- Takagi, Junichi, Benjamin M. Petre, Thomas Walz, et Timothy A. Springer. 2002. « Global Conformational Rearrangements in Integrin Extracellular Domains in Outside-In and Inside-Out Signaling ». *Cell* 110 (5) (septembre 6): 599-611. doi:10.1016/S0092-8674(02)00935-2.
- Takano, Masamichi, Kyoichi Mizuno, Kentaro Okamoto, Shinya Yokoyama, Takayoshi Ohba, et Shunta Sakai. 2001. « Mechanical and structural characteristics of vulnerable plaques: analysis by coronary angiography and intravascular ultrasound ». *Journal of the American College of Cardiology* 38 (1): 99-104.
- Tall, Alan R, Laurent Yan-Charvet, Naoki Terasaka, Tamara Pagler, et Nan Wang. 2008. « HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis ». *Cell metabolism* 7 (5) (mai): 365-375. doi:10.1016/j.cmet.2008.03.001.
- Tang, Dalin, Chun Yang, Jie Zheng, Pamela K Woodard, Gregorio A Sicard, Jeffrey E Saffitz, et Chun Yuan. 2004. « 3D MRI-based Multicomponent FSI Models for Atherosclerotic Plaques ». *Annals of Biomedical Engineering* 32 (7) (juillet): 947-960.
- Tang, Tjun Y., Simon P.S. Howarth, Sam R. Miller, Martin J. Graves, Andrew J. Patterson, Jean-Marie U-King-Im, Zhi Y. Li, et al. 2009. « The ATHEROMA (Atorvastatin Therapy: Effects on Reduction of Macrophage Activity) Study: Evaluation Using Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide-Enhanced Magnetic Resonance Imaging in Carotid Disease ». *Journal of the American College of Cardiology* 53 (22) (juin 2): 2039-2050. doi:10.1016/j.jacc.2009.03.018.
- Tang, Tjun Y., Karin H. Muller, Martin J. Graves, Zhi Y. Li, Stewart R. Walsh, Victoria Young, Umar Sadat, Simon P. S. Howarth, et J. H. Gillard. 2009. « Iron Oxide Particles for Atheroma Imaging ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29 (7) (janvier 7): 1001-1008. doi:10.1161/ATVBAHA.108.165514.
- Tang, Zhenyu, Aijun Wang, Dong Wang, et Song Li. 2013. « Smooth Muscle Cells: To Be or Not To Be? Response to Nguyen et Al ». *Circulation Research* 112 (1) (avril 1): 23-26. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.281055.
- Tang, Zhenyu, Aijun Wang, Falei Yuan, Zhiqiang Yan, Bo Liu, Julia S. Chu, Jill A. Helms, et Song Li. 2012. « Differentiation of Multipotent Vascular Stem Cells Contributes to Vascular Diseases ». *Nature Communications* 3 (juin 6): 875. doi:10.1038/ncomms1867.
- Tarazona, R, G López-Lluch, M D Galiani, E Aguado, F Barahona, R Solana, et J Peña. 2000. « HLA-B2702 (77-83/83-77) peptide binds to beta-tubulin on human NK cells and blocks their cytotoxic capacity ». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 165 (12) (décembre 15): 6776-6782.
- Tatsumi, Mitsuaki, James M Engles, Takayoshi Ishimori, O'Bod Nicely, Christian Cohade, et Richard L Wahl. 2004. « Intense (18)F-FDG uptake in brown fat can be reduced pharmacologically ». *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine* 45 (7) (juillet): 1189-1193.
- Tawakol, Ahmed, Raymond Q. Migrino, Gregory G. Bashian, Shahinaz Bedri, David Vermylen, Ricardo C. Cury, Denise Yates, et al. 2006. « In Vivo 18F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography Imaging Provides a Noninvasive Measure of Carotid Plaque Inflammation in Patients ». *Journal of the American College of Cardiology* 48 (9) (novembre 7): 1818-1824. doi:10.1016/j.jacc.2006.05.076.
- Tawakol, Ahmed, Jagat Narula, et Farouc A Jaffer. 2013. « Molecular Imaging of Atherosclerosis ». In *Atlas of Nuclear Cardiology*, édité par Vasken Dilsizian et Jagat Narula, 425-447. Springer New York. [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-5551-6\\_12](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-5551-6_12).
- Taylor, Fiona, Mark D Huffman, Ana Filipa Macedo, Theresa H M Moore, Margaret Burke, George

## Références Bibliographiques

- Davey Smith, Kirsten Ward, et Shah Ebrahim. 2013. « Statins for the Primary Prevention of Cardiovascular Disease ». *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)* 1: CD004816. doi:10.1002/14651858.CD004816.pub5.
- Tearney, Guillermo J, Sergio Waxman, Milen Shishkov, Benjamin J Vakoc, Melissa J Suter, Mark I Freilich, Adrien E Desjardins, et al. 2008. « Three-dimensional Coronary Artery Microscopy by Intracoronary Optical Frequency Domain Imaging ». *JACC. Cardiovascular Imaging* 1 (6) (novembre): 752-761. doi:10.1016/j.jcmg.2008.06.007.
- Teng, Zhongzhao, Gador Canton, Chun Yuan, Marina Ferguson, Chun Yang, Xueying Huang, Jie Zheng, Pamela K. Woodard, et Dalin Tang. 2010. « 3D Critical Plaque Wall Stress Is a Better Predictor of Carotid Plaque Rupture Sites Than Flow Shear Stress: An In Vivo MRI-Based 3D FSI Study ». *Journal of biomechanical engineering* 132 (3) (mars): 031007. doi:10.1115/1.4001028.
- Thapar, Ankur, Ieuan Harri Jenkins, Amrish Mehta, et Alun Huw Davies. 2013. « Diagnosis and Management of Carotid Atherosclerosis ». *BMJ (Clinical Research Ed.)* 346: f1485.
- Thormann, Esben, Torbjörn Pettersson, et Per M. Claesson. 2009. « How to measure forces with atomic force microscopy without significant influence from nonlinear optical lever sensitivity ». *Review of Scientific Instruments* 80 (9): 093701. doi:10.1063/1.3194048.
- Thorp, Edward, Gang Li, Tracie A. Seimon, George Kuriakose, David Ron, et Ira Tabas. 2009. « Reduced Apoptosis and Plaque Necrosis in Advanced Atherosclerotic Lesions of Apoe<sup>-/-</sup> and Ldlr<sup>-/-</sup> Mice Lacking CHOP ». *Cell Metabolism* 9 (5) (mai): 474-481. doi:10.1016/j.cmet.2009.03.003.
- Thorp, Edward, Manikandan Subramanian, et Ira Tabas. 2011. « The role of macrophages and dendritic cells in the clearance of apoptotic cells in advanced atherosclerosis ». *European journal of immunology* 41 (9) (septembre): 2515-2518. doi:10.1002/eji.201141719.
- Thukkani, Arun K, et Farouc A Jaffer. 2013. « Intravascular near-infrared fluorescence molecular imaging of atherosclerosis ». *American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 3 (3) (avril 9): 217-231.
- Thygesen, Kristian, Joseph S. Alpert, Allan S. Jaffe, Maarten L. Simoons, Bernard R. Chaitman, Harvey D. White, Kristian Thygesen, et al. 2012. « Third Universal Definition of Myocardial Infarction ». *Journal of the American College of Cardiology* 60 (16) (octobre 16): 1581-1598. doi:10.1016/j.jacc.2012.08.001.
- Timpl, R, et M Dziadek. 1986. « Structure, Development, and Molecular Pathology of Basement Membranes ». *International Review of Experimental Pathology* 29: 1-112.
- Torzewski, Michael, Peter X. Shaw, Kyoo-Rok Han, Brian Shortal, Karl J. Lackner, Joseph L. Witztum, Wulf Palinski, et Sotirios Tsimikas. 2004. « Reduced In Vivo Aortic Uptake of Radiolabeled Oxidation-Specific Antibodies Reflects Changes in Plaque Composition Consistent With Plaque Stabilization ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24 (12) (janvier 12): 2307-2312. doi:10.1161/01.ATV.0000149378.98458.fe.
- Toshima, Shun-ichi, Akira Hasegawa, Masahiko Kurabayashi, Hiroyuki Itabe, Tatsuya Takano, Jinpei Sugano, Kyoko Shimamura, et al. 2000. « Circulating Oxidized Low Density Lipoprotein Levels A Biochemical Risk Marker for Coronary Heart Disease ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20 (10) (janvier 10): 2243-2247. doi:10.1161/01.ATV.20.10.2243.
- Touboul, P-J, M G Hennerici, S Meairs, H Adams, P Amarenco, N Bornstein, L Csiba, et al. 2012. « Mannheim carotid intima-media thickness and plaque consensus (2004-2006-2011). An update on behalf of the advisory board of the 3rd, 4th and 5th watching the risk symposia, at the 13th, 15th and 20th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, Brussels, Belgium, 2006, and Hamburg, Germany, 2011 ». *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)* 34 (4): 290-296. doi:10.1159/000343145.

## Références Bibliographiques

- Toyama, Hiroshi, Masanori Ichise, Jieih-San Liow, Douglass C Vines, Nicholas M Seneca, Kendra J Modell, Jurgen Seidel, Michael V Green, et Robert B Innis. 2004. « Evaluation of anesthesia effects on [18F]FDG uptake in mouse brain and heart using small animal PET ». *Nuclear medicine and biology* 31 (2) (février): 251-256. doi:10.1016/S0969-8051(03)00124-0.
- Tracqui, Philippe, Alexis Broisat, Jackub Toczek, Nicolas Mesnier, Jacques Ohayon, et Laurent Riou. 2011. « Mapping elasticity moduli of atherosclerotic plaque in situ via atomic force microscopy ». *Journal of structural biology* 174 (1) (avril): 115-123. doi:10.1016/j.jsb.2011.01.010.
- Trivedi, Rikin A., Chinthake Mallawarachi, Jean-Marie U-King-Im, Martin J. Graves, Jo Horsley, Martin J. Goddard, Andrew Brown, et al. 2006. « Identifying Inflamed Carotid Plaques Using In Vivo USPIO-Enhanced MR Imaging to Label Plaque Macrophages ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26 (7) (janvier 7): 1601-1606. doi:10.1161/01.ATV.0000222920.59760.df.
- Tronc, François, Ziad Mallat, Stéphanie Lehoux, Michel Wassef, Bruno Esposito, et Alain Tedgui. 2000. « Role of Matrix Metalloproteinases in Blood Flow-Induced Arterial Enlargement Interaction With NO ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20 (12) (janvier 12): e120-e126. doi:10.1161/01.ATV.20.12.e120.
- Tsai, Min-Chien, Lihong Chen, Jing Zhou, Zhihui Tang, Tzu-Fang Hsu, Ying Wang, Yu-Tsung Shih, et al. 2009. « Shear Stress Induces Synthetic-to-Contractile Phenotypic Modulation in Smooth Muscle Cells via Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  Activations by Prostacyclin Released by Sheared Endothelial Cells ». *Circulation Research* 105 (5) (août 28): 471-480. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.193656.
- Tsakiris, D A, L Scudder, K Hodivala-Dilke, R O Hynes, et B S Coller. 1999. « Hemostasis in the Mouse (Mus Musculus): a Review ». *Thrombosis and Haemostasis* 81 (2) (février): 177-188.
- Tsimikas, Sotirios, Wulf Palinski, Samuel E. Halpern, David W. Yeung, Linda K. Curtiss, et Joseph L. Witztum. 1999. « Radiolabeled MDA2, an oxidation-specific, monoclonal antibody, identifies native atherosclerotic lesions in vivo ». *Journal of Nuclear Cardiology* 6 (1): 41-53.
- Tunick, Paul A, et Itzhak Kronzon. 2000. « Atheromas of the thoracic aorta: clinical and therapeutic update ». *Journal of the American College of Cardiology* 35 (3) (mars 1): 545-554. doi:10.1016/S0735-1097(99)00604-X.
- Uchida, Yasumi, Fumitaka Nakamura, Takanobu Tomaru, Toshihiro Morita, Tomomitsu Oshima, Toshihiko Sasaki, Satoru Morizuki, et Junichi Hirose. 1995. « Prediction of acute coronary syndromes by percutaneous coronary angiography in patients with stable angina ». *American heart journal* 130 (2): 195-203.
- Vaishnav, R N, et J Vossoughi. 1987. « Residual Stress and Strain in Aortic Segments ». *Journal of Biomechanics* 20 (3): 235-239.
- Vallabhajosula, S, et V Fuster. 1997. « Atherosclerosis: imaging techniques and the evolving role of nuclear medicine ». *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine* 38 (11) (novembre): 1788-1796.
- Van Andel, Carolien J, Peter V Pistecky, et Cornelius Borst. 2003. « Mechanical Properties of Porcine and Human Arteries: Implications for Coronary Anastomotic Connectors ». *The Annals of Thoracic Surgery* 76 (1) (juillet): 58-64; discussion 64-65.
- Van der Wal, A. C., A. E. Becker, C. M. van der Loos, et P. K. Das. 1994. « Site of Intimal Rupture or Erosion of Thrombosed Coronary Atherosclerotic Plaques Is Characterized by an Inflammatory Process Irrespective of the Dominant Plaque Morphology. » *Circulation* 89 (1) (janvier 1): 36-44. doi:10.1161/01.CIR.89.1.36.
- Vanhoutte, Paul M. 2009. « Endothelial Dysfunction ». *Circulation Journal* 73 (4): 595-601. doi:10.1253/circj.CJ-08-1169.

## Références Bibliographiques

- Varnava, Amanda M., Peter G. Mills, et Michael J. Davies. 2002. « Relationship Between Coronary Artery Remodeling and Plaque Vulnerability ». *Circulation* 105 (8) (février 26): 939-943. doi:10.1161/hc0802.104327.
- Vengrenyuk, Yuliya, Stéphane Carlier, Savvas Xanthos, Luis Cardoso, Peter Ganatos, Renu Virmani, Shmuel Einav, Lane Gilchrist, et Sheldon Weinbaum. 2006. « A Hypothesis for Vulnerable Plaque Rupture Due to Stress-induced Debonding Around Cellular Microcalcifications in Thin Fibrous Caps ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (40) (mars 10): 14678-14683. doi:10.1073/pnas.0606310103.
- Vengrenyuk, Yuliya, Theodore J Kaplan, Luis Cardoso, Gwendalyn J Randolph, et Sheldon Weinbaum. 2010. « Computational Stress Analysis of Atherosclerotic Plaques in ApoE Knockout Mice ». *Annals of Biomedical Engineering* 38 (3) (mars): 738-747.
- Venkatasubramanian, Ramji T, Wim F Wolkers, Mithun M Shenoi, Victor H Barocas, Daniel Lafontaine, Charles L Soule, Paul A Iuzzo, et John C Bischof. 2010. « Freeze-thaw Induced Biomechanical Changes in Arteries: Role of Collagen Matrix and Smooth Muscle Cells ». *Annals of Biomedical Engineering* 38 (3) (mars): 694-706. doi:10.1007/s10439-010-9921-9.
- Venturoli, Daniele, et Bengt Rippe. 2005. « Ficoll and Dextran Vs. Globular Proteins as Probes for Testing Glomerular Permeability: Effects of Molecular Size, Shape, Charge, and Deformability ». *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 288 (4) (janvier 4): F605-F613. doi:10.1152/ajprenal.00171.2004.
- Veress, A I, D G Vince, P M Anderson, J F Cornhill, E E Herderick, J D Klingensmith, B D Kuban, N L Greenberg, et J D Thomas. 2000. « Vascular Mechanics of the Coronary Artery ». *Zeitschrift Für Kardiologie* 89 Suppl 2: 92-100.
- Vink, Aryan, Arjan H. Schoneveld, Jelger J. van der Meer, Ben J. van Middelaar, Joost P. G. Sluijter, Mirjam B. Smeets, Paul H. A. Quax, et al. 2002. « In Vivo Evidence for a Role of Toll-Like Receptor 4 in the Development of Intimal Lesions ». *Circulation* 106 (15) (août 10): 1985-1990. doi:10.1161/01.CIR.0000032146.75113.EE.
- Virmani, Renu, Allen P. Burke, Andrew Farb, et Frank D. Kolodgie. 2006. « Pathology of the Vulnerable Plaque ». *Journal of the American College of Cardiology* 47 (8, Supplement) (avril 18): C13-C18. doi:10.1016/j.jacc.2005.10.065.
- Virmani, Renu, Frank D. Kolodgie, Allen P. Burke, Andrew Farb, et Stephen M. Schwartz. 2000. « Lessons From Sudden Coronary Death A Comprehensive Morphological Classification Scheme for Atherosclerotic Lesions ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20 (5) (janvier 5): 1262-1275. doi:10.1161/01.ATV.20.5.1262.
- Von Birgelen, Clemens, Evelyn A. de Vrey, Gary S. Mintz, Antonino Nicosia, Nico Bruining, Wenguang Li, Cornelis J. Slager, Jos R. T. C. Roelandt, Patrick W. Serruys, et Pim J. de Feyter. 1997. « ECG-Gated Three-dimensional Intravascular Ultrasound Feasibility and Reproducibility of the Automated Analysis of Coronary Lumen and Atherosclerotic Plaque Dimensions in Humans ». *Circulation* 96 (9) (avril 11): 2944-2952. doi:10.1161/01.CIR.96.9.2944.
- Von Eckardstein, Arnold, et Lucia Rohrer. 2009. « Transendothelial lipoprotein transport and regulation of endothelial permeability and integrity by lipoproteins ». *Current opinion in lipidology* 20 (3) (juin): 197-205. doi:10.1097/MOL.0b013e32832afd63.
- Von Hundelshausen, Philipp, Rory R. Koenen, Markus Sack, Sebastian F. Mause, Wencke Adriaens, Amanda E. I. Proudfoot, Tilman M. Hackeng, et Christian Weber. 2005. « Heterophilic Interactions of Platelet Factor 4 and RANTES Promote Monocyte Arrest on Endothelium ». *Blood* 105 (3) (janvier 2): 924-930. doi:10.1182/blood-2004-06-2475.
- Von Hundelshausen, Philipp, Kim S. C. Weber, Yuqing Huo, Amanda E. I. Proudfoot, Peter J. Nelson, Klaus Ley, et Christian Weber. 2001. « RANTES Deposition by Platelets Triggers Monocyte Arrest

## Références Bibliographiques

- on Inflamed and Atherosclerotic Endothelium ». *Circulation* 103 (13) (mars 4): 1772-1777. doi:10.1161/01.CIR.103.13.1772.
- Wadham, Carol, et Arduino A. Mangoni. 2009. « Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulation: a novel therapeutic target in cardiovascular disease ». <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1517/17425250902785172>.
- Wagenseil, Jessica E., et Robert P. Mecham. 2009. « Vascular Extracellular Matrix and Arterial Mechanics ». *Physiological Reviews* 89 (3) (janvier 7): 957-989. doi:10.1152/physrev.00041.2008.
- Waibel, R, R Alberto, J Willuda, R Finnern, R Schibli, A Stichelberger, A Egli, et al. 1999. « Stable one-step technetium-99m labeling of His-tagged recombinant proteins with a novel Tc(I)-carbonyl complex ». *Nature biotechnology* 17 (9) (septembre): 897-901. doi:10.1038/12890.
- Wait, John M. S., Hirofumi Tomita, Laurel M. Burk, Jianping Lu, Otto Z. Zhou, Nobuyo Maeda, et Yueh Z. Lee. 2013. « Detection of Aortic Arch Calcification in Apolipoprotein E-Null Mice Using Carbon Nanotube-Based Micro-CT System ». *Journal of the American Heart Association* 2 (1) (février 22). doi:10.1161/JAHA.112.003358. <http://jaha.ahajournals.org/content/2/1/e003358>.
- Walter, R, A Neidle, et N Marks. 1975. « Significant Differences in the Degradation of pro-leu-gly-nH2 by Human Serum and That of Other Species (38484) ». *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 148 (1) (janvier): 98-103.
- Wang, Shijun, Mathieu-Benoit Voisin, Karen Y. Larbi, John Dangerfield, Christoph Scheiermann, Maxine Tran, Patrick H. Maxwell, Lydia Sorokin, et Sussan Nourshargh. 2006. « Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils ». *The Journal of Experimental Medicine* 203 (6) (juin 12): 1519-1532. doi:10.1084/jem.20051210.
- Wang, Yi-Xiang J. 2011. « Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application ». *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery* 1 (1) (décembre): 35-40. doi:10.3978/j.issn.2223-4292.2011.08.03.
- Wang, Yi-Xiang J., S M Hussain, et G P Krestin. 2001. « Superparamagnetic Iron Oxide Contrast Agents: Physicochemical Characteristics and Applications in MR Imaging ». *European Radiology* 11 (11): 2319-2331. doi:10.1007/s003300100908.
- Wang, Zeneng, Stephen J. Nicholls, E. Rene Rodriguez, Outi Kummu, Sohvi Hörkkö, John Barnard, Wanda F. Reynolds, Eric J. Topol, Joseph A. DiDonato, et Stanley L. Hazen. 2007. « Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis ». *Nature medicine* 13 (10): 1176-1184.
- Watanabe, Y. 1980. « Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit) ». *Atherosclerosis* 36 (2) (juin): 261-268.
- Watkins, Gregory A., Ella Fung Jones, M. Scott Shell, Henry F. VanBrocklin, Mei-Hsiu Pan, Stephen M. Hanrahan, Jin Jin Feng, Jiang He, Nor Eddine Sounni, et Ken A. Dill. 2009. « Development of an optimized activatable MMP-14 targeted SPECT imaging probe ». *Bioorganic & medicinal chemistry* 17 (2): 653-659.
- Wei, Sindy H., Ian Parker, Mark J. Miller, et Michael D. Cahalan. 2003. « A Stochastic View of Lymphocyte Motility and Trafficking Within the Lymph Node ». *Immunological Reviews* 195 (1): 136-159. doi:10.1034/j.1600-065X.2003.00076.x.
- Weinberg, Peter D, et C Ross Ethier. 2007. « Twenty-fold Difference in Hemodynamic Wall Shear Stress Between Murine and Human Aortas ». *Journal of Biomechanics* 40 (7): 1594-1598. doi:10.1016/j.jbiomech.2006.07.020.

## Références Bibliographiques

- Weissleder, Ralph, G. Elizondo, J. Wittenberg, C. A. Rabito, H. H. Bengel, et L. Josephson. 1990. « Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide: Characterization of a New Class of Contrast Agents for MR Imaging. » *Radiology* 175 (2) (janvier 5): 489-493.
- Werr, Joachim, Einar E. Eriksson, Per Hedqvist, et Lennart Lindbom. 2000. « Engagement of B2 Integrins Induces Surface Expression of B1 Integrin Receptors in Human Neutrophils ». *Journal of Leukocyte Biology* 68 (4) (janvier 10): 553-560.
- West, Xiaoxia Z., Nikolay L. Malinin, Alona A. Merkulova, Mira Tischenko, Bethany A. Kerr, Ernest C. Borden, Eugene A. Podrez, Robert G. Salomon, et Tatiana V. Byzova. 2010. « Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands ». *Nature* 467 (7318) (octobre 3): 972-976. doi:10.1038/nature09421.
- Westerhof, Nico, Jan-Willem Lankhaar, et Berend E. Westerhof. 2009. « The Arterial Windkessel ». *Medical & Biological Engineering & Computing* 47 (2) (février 1): 131-141. doi:10.1007/s11517-008-0359-2.
- Williams, Gethin, et Gerald M Kolodny. 2008. « Suppression of myocardial 18F-FDG uptake by preparing patients with a high-fat, low-carbohydrate diet ». *AJR. American journal of roentgenology* 190 (2) (février): W151-156. doi:10.2214/AJR.07.2409.
- Williams, Helen, Jason Lee Johnson, Kevin George Stephen Carson, et Christopher Langdale Jackson. 2002. « Characteristics of Intact and Ruptured Atherosclerotic Plaques in Brachiocephalic Arteries of Apolipoprotein E Knockout Mice ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 22 (5) (janvier 5): 788-792. doi:10.1161/01.ATV.0000014587.66321.B4.
- Williams, Kevin Jon, et Ira Tabas. 1995. « The Response-to-Retention Hypothesis of Early Atherogenesis ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 15 (5) (janvier 5): 551-561. doi:10.1161/01.ATV.15.5.551.
- Winter, Patrick M, Anne M Morawski, Shelton D Caruthers, Ralph W Fuhrhop, Huiying Zhang, Todd A Williams, John S Allen, et al. 2003. « Molecular Imaging of Angiogenesis in Early-stage Atherosclerosis with Alpha(v)beta3-integrin-targeted Nanoparticles ». *Circulation* 108 (18) (novembre 4): 2270-2274. doi:10.1161/01.CIR.0000093185.16083.95.
- Wittchen, Erika S. 2009. « Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration ». *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* 14: 2522-2545.
- Witztum, Joseph L. 1994. « The oxidation hypothesis of atherosclerosis ». *The Lancet* 344 (8925): 793-795.
- Wolinsky, Harvey, et Seymour Glagov. 1964. « Structural Basis for the Static Mechanical Properties of the Aortic Media ». *Circulation Research* 14 (5) (janvier 5): 400-413. doi:10.1161/01.RES.14.5.400.
- . 1967. « A Lamellar Unit of Aortic Medial Structure and Function in Mammals ». *Circulation Research* 20 (1) (janvier 1): 99-111. doi:10.1161/01.RES.20.1.99.
- Woo, J, S Iyer, M C Cornejo, L Gao, C Cuturi, J P Soullou, et R Buelow. 1997. « Immunosuppression by D-isomers of HLA class I heavy chain (amino acid 75 to 84)-derived peptides is independent of binding to HSC70 ». *Transplantation* 64 (10) (novembre 27): 1460-1467.
- World Health Organization. 2010. « 10th revision of the International Classification of Diseases (ICD-10) ». World Health Organization. <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en>.
- . 2011. « The top 10 causes of death. Fact sheet N°310. » WHO. juin. <http://www.who.int.gate2.inist.fr/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>.
- World Heart Federation. 2013. « Cardiovascular disease risk factors ». *World Heart Federation website*. <http://www.world-heart-federation.org/cardiovascular-health/cardiovascular-disease-risk-factors/>.

## Références Bibliographiques

- Wykrzykowska, Joanna, Sanaz Lehman, Gethin Williams, J Anthony Parker, Matthew R Palmer, Santosh Varkey, Gerald Kolodny, et Roger Laham. 2009. « Imaging of inflamed and vulnerable plaque in coronary arteries with 18F-FDG PET/CT in patients with suppression of myocardial uptake using a low-carbohydrate, high-fat preparation ». *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine* 50 (4) (avril): 563-568. doi:10.2967/jnumed.108.055616.
- Xu, Yingjia, Gary S. Mintz, Anthony Tam, John A. McPherson, Andrés Iñiguez, Jean Fajadet, Martin Fahy, et al. 2012. « Prevalence, Distribution, Predictors, and Outcomes of Patients With Calcified Nodules in Native Coronary Arteries Clinical Perspective A 3-Vessel Intravascular Ultrasound Analysis From Providing Regional Observations to Study Predictors of Events in the Coronary Tree (PROSPECT) ». *Circulation* 126 (5) (juillet 31): 537-545. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.055004.
- Yamaguchi, Tetsu, Mitsuyasu Terashima, Takashi Akasaka, Takahiro Hayashi, Kyoichi Mizuno, Toshiya Muramatsu, Masato Nakamura, et al. 2008. « Safety and Feasibility of an Intravascular Optical Coherence Tomography Image Wire System in the Clinical Setting ». *The American Journal of Cardiology* 101 (5) (mars): 562-567. doi:10.1016/j.amjcard.2007.09.116.
- Yang, Chun, Dalin Tang, Chun Yuan, Thomas S. Hatsukami, Jie Zheng, et Pamela K. Woodard. 2007. « In Vivo/Ex Vivo MRI-Based 3D Non-Newtonian FSI Models for Human Atherosclerotic Plaques Compared with Fluid/Wall-Only Models ». *Computer modeling in engineering & sciences : CMES* 19 (3) (janvier 1): 233-246.
- Yang, Sae Jeong, Sungeun Kim, Hae Yoon Choi, Tae Nyun Kim, Hye Jin Yoo, Ji A Seo, Sin Gon Kim, et al. 2013. « High-sensitivity C-reactive protein in the low- and intermediate-Framingham risk score groups: Analysis with (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography ». *International journal of cardiology* 163 (3) (mars 10): 277-281. doi:10.1016/j.ijcard.2011.06.054.
- Ylä-Herttuala, S, W Palinski, S W Butler, S Picard, D Steinberg, et J L Witztum. 1994. « Rabbit and Human Atherosclerotic Lesions Contain IgG That Recognizes Epitopes of Oxidized LDL ». *Arteriosclerosis and Thrombosis: a Journal of Vascular Biology / American Heart Association* 14 (1) (janvier): 32-40.
- Yonetsu, Taishi, Tsunekazu Kakuta, Tetsumin Lee, Kentaro Takahashi, Naohiko Kawaguchi, Ginga Yamamoto, Kenji Koura, et al. 2011. « In Vivo Critical Fibrous Cap Thickness for Rupture-prone Coronary Plaques Assessed by Optical Coherence Tomography ». *European Heart Journal* 32 (10) (janvier 5): 1251-1259. doi:10.1093/eurheartj/ehq518.
- Yoshida, Hiroshi, et Reiko Kisugi. 2010. « Mechanisms of LDL oxidation ». *Clinica Chimica Acta* 411 (23-24) (décembre 14): 1875-1882. doi:10.1016/j.cca.2010.08.038.
- Yu, Xiaohui, Susan Dluz, Dana T. Graves, Lei Zhang, Harry N. Antoniades, William Hollander, Somnath Prusty, Anthony J. Valente, Collin J. Schwartz, et Gail E. Sonenshein. 1992. « Elevated expression of monocyte chemoattractant protein 1 by vascular smooth muscle cells in hypercholesterolemic primates ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (15): 6953-6957.
- Yuan, Chun, Shao-xiong Zhang, Nayak L. Polissar, Denise Echelard, Geraldo Ortiz, Joseph W. Davis, Elizabeth Ellington, Marina S. Ferguson, et Thomas S. Hatsukami. 2002. « Identification of fibrous cap rupture with magnetic resonance imaging is highly associated with recent transient ischemic attack or stroke ». *Circulation* 105 (2): 181-185.
- Yun, Mijin, Sunyung Jang, Andrew Cucchiara, Andrew B Newberg, et Abass Alavi. 2002. « 18F FDG uptake in the large arteries: a correlation study with the atherogenic risk factors ». *Seminars in nuclear medicine* 32 (1) (janvier): 70-76. doi:10.1053/snuc.2002.29279.
- Yun, Mijin, D Yeh, L I Araujo, S Jang, A Newberg, et Abass Alavi. 2001. « F-18 FDG uptake in the large arteries: a new observation ». *Clinical nuclear medicine* 26 (4) (avril): 314-319.
- Zarins, C K, D P Giddens, B K Bharadvaj, V S Sottiurai, R F Mabon, et S Glagov. 1983. « Carotid

## Références Bibliographiques

bifurcation atherosclerosis. Quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress ». *Circulation research* 53 (4) (octobre): 502-514.

Zeadin, Melec, Martin Butcher, Geoff Werstuck, Mohammad Khan, Colin K. Yee, et Stephen G. Shaughnessy. 2009. « Effect of Leptin on Vascular Calcification in Apolipoprotein E-Deficient Mice ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29 (12) (janvier 12): 2069-2075. doi:10.1161/ATVBAHA.109.195255.

Zernecke, Alma, Jürgen Bernhagen, et Christian Weber. 2008. « Macrophage Migration Inhibitory Factor in Cardiovascular Disease ». *Circulation* 117 (12) (mars 25): 1594-1602. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.729125.

Zernecke, Alma, et Christian Weber. 2010. « Chemokines in the Vascular Inflammatory Response of Atherosclerosis ». *Cardiovascular Research* 86 (2) (janvier 5): 192-201. doi:10.1093/cvr/cvp391.

Zhang, Jiasheng, Lei Nie, Mahmoud Razavian, Masood Ahmed, Lawrence W. Dobrucki, Abolfazl Asadi, D. Scott Edwards, Michael Azure, Albert J. Sinusas, et Mehran M. Sadeghi. 2008. « Molecular Imaging of Activated Matrix Metalloproteinases in Vascular Remodeling ». *Circulation* 118 (19) (avril 11): 1953-1960. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.789743.

Zhao, Yan, Yuji Kuge, Songji Zhao, Koichi Morita, Masayuki Inubushi, H William Strauss, Francis G Blankenberg, et Nagara Tamaki. 2007. « Comparison of 99mTc-annexin A5 with 18F-FDG for the detection of atherosclerosis in ApoE-/- mice ». *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 34 (11) (novembre): 1747-1755. doi:10.1007/s00259-007-0433-2.

Zhao, Yan, Yuji Kuge, Songji Zhao, H William Strauss, Francis G Blankenberg, et Nagara Tamaki. 2008. « Prolonged high-fat feeding enhances aortic 18F-FDG and 99mTc-annexin A5 uptake in apolipoprotein E-deficient and wild-type C57BL/6J mice ». *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine* 49 (10) (octobre): 1707-1714. doi:10.2967/jnumed.108.051847.

Zhao, Yan, Songji Zhao, Yuji Kuge, William H Strauss, Francis G Blankenberg, et Nagara Tamaki. 2011. « Localization of deoxyglucose and annexin A5 in experimental atheroma correlates with macrophage infiltration but not lipid deposition in the lesion ». *Molecular imaging and biology: MIB: the official publication of the Academy of Molecular Imaging* 13 (4) (août): 712-720. doi:10.1007/s11307-010-0389-7.

Zhou, J, J Møller, C C Danielsen, J Bentzon, H B Ravn, R C Austin, et E Falk. 2001. « Dietary Supplementation with Methionine and Homocysteine Promotes Early Atherosclerosis but Not Plaque Rupture in ApoE-deficient Mice ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 21 (9) (septembre): 1470-1476.

Zhuang, H, M Pourdehnad, E S Lambright, A J Yamamoto, M Lanuti, P Li, P D Mozley, M D Rossman, S M Albelda, et A Alavi. 2001. « Dual time point 18F-FDG PET imaging for differentiating malignant from inflammatory processes ». *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine* 42 (9) (septembre): 1412-1417.

Ziegler-Heitbrock, Loems, Petronela Ancuta, Suzanne Crowe, Marc Dalod, Veronika Grau, Derek N. Hart, Pieter J. M. Leenen, et al. 2010. « Nomenclature of Monocytes and Dendritic Cells in Blood ». *Blood* 116 (16) (octobre 21): e74-e80. doi:10.1182/blood-2010-02-258558.





## Résumé

La maladie coronaire représente un problème majeur de santé publique. Sa manifestation la plus sévère, le syndrome coronarien aigu, est en grande majorité lié à la rupture de plaques d'athérome vulnérables. Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse portent sur l'étude pré-clinique de la plaque d'athérome dans un modèle murin : la souris déficiente en apolipoprotéine E (apoE<sup>-/-</sup>).

La rupture des plaques d'athérome vulnérables survient à la suite d'une élévation des contraintes mécaniques au niveau de la capsule fibreuse. Une première partie de ce travail de thèse porte sur l'évaluation de la contrainte présente dans la paroi des vaisseaux de souris apoE<sup>-/-</sup> porteuses de lésions athéromateuses. Ces lésions présentent une faible rigidité et en conséquence de faibles contraintes. Ces observations donnent un élément d'explication de l'absence de rupture dans ce modèle animal.

Les plaques d'athérome vulnérables présentent une inflammation importante ; l'imagerie de l'inflammation vasculaire est une approche pertinente pour l'identification des plaques d'athérome vulnérables. Une seconde partie de ce travail de thèse porte sur l'imagerie de l'athérosclérose en ciblant le processus inflammatoire chez la souris apoE<sup>-/-</sup> avec d'une part l'évaluation de radiotraceurs peptidiques développés au sein du laboratoire et décrits comme ligands de la molécule d'adhésion VCAM-1, surexprimée dans le contexte inflammatoire, et d'autre part l'évaluation du [<sup>18</sup>F]-fluorodésoxyglucose (FDG), décrit pour s'accumuler dans les cellules inflammatoires et le tissu adipeux brun. L'évaluation poussée des peptides originaux a mis en évidence un manque de robustesse dans leur comportement biologique. D'autre part, une captation similaire de FDG a été observée dans les lésions athéromateuses et du tissu le brun péri-aortique se trouvant à proximité chez la souris apoE<sup>-/-</sup>. Cette limitation souligne la nécessité de l'optimisation des procédés expérimentaux destinés à l'évaluation de l'inflammation des lésions d'athérosclérose avec le FDG dans ce modèle animal.

## Abstract

Coronary artery disease is a major healthcare issue. Acute coronary syndrome is mainly caused by the rupture of vulnerable coronary plaques. This thesis focused on the preclinical study of atherosclerosis in a mouse model: the apolipoprotein E-deficient mouse (apoE<sup>-/-</sup>).

Vulnerable plaque rupture is caused by an elevation of mechanical stress in the fibrous cap of atherosclerotic plaques. The first part of this thesis focused on the parietal stress evaluation in atheromatous lesions from apoE<sup>-/-</sup> mouse vessels. Atherosclerotic tissue showed low stiffness resulting in low levels of mechanical stress in atheromatous lesions. The low level of mechanical stress might account for the atherosclerotic plaque stability in this animal model.

Rupture-prone vulnerable atheromatous plaques are highly inflammatory; vascular inflammation imaging appears therefore as a relevant strategy for vulnerable plaque imaging. The second part of this thesis dealt with atherosclerosis imaging in the apoE<sup>-/-</sup> mouse model, firstly with the evaluation of original peptidic radiotracers described as VCAM-1 binders, an adhesion molecule over-expressed during inflammation, and secondly with the evaluation of [<sup>18</sup>F]-fluorodeoxyglucose (FDG), which was shown to accumulate in inflammatory cells and in the brown adipose tissue (BAT). Advanced evaluation of peptides revealed a lack of robustness in their biological behavior. A similar FDG uptake was observed in the atherosclerotic lesions and in the periaortic brown adipose tissue of apoE<sup>-/-</sup> mouse found in the vicinity. This potential confounding factor emphasizes the need to carefully design preclinical studies using FDG for the evaluation of lesion inflammation in this animal model.